



TESIS DOCTORAL

Eliminación de microcontaminantes farmacéuticos
mediante procesos de oxidación avanzada basados en
contactores biológicos rotativos fúngicos y reactores de
lecho fijo para aguas residuales urbanas y hospitalarias

Autora:

Ana Belén Cruz del Álamo

Directores:

Fernando Martínez Castillejo

Raúl Molina Gil

Programa de Doctorado en Tecnologías Industriales: Química, Ambiental,
Energética, Electrónica, Mecánica y de los Materiales

Escuela Internacional de Doctorado

2020

D. **Fernando Martínez Castillejo**, Catedrático en el área de Ingeniería Química del Departamento de Tecnología Química y Ambiental y D. **Raúl Molina Gil**, Profesor Titular en el área de Ingeniería Química del Departamento de Tecnología Química y Ambiental,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado *“Eliminación de microcontaminantes farmacéuticos mediante procesos de oxidación avanzada basados en contactores biológicos rotativos fúngicos y reactores de lecho fijo para aguas residuales urbanas y hospitalarias”* constituye la memoria que presenta Dña. Ana Belén Cruz del Álamo para aspirar al grado de Doctor en Tecnologías Industriales por la Universidad Rey Juan Carlos y que ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Tecnología Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Móstoles,

A 5 de febrero de 2020

Fdo. Fernando Martínez Castillejo

Fdo. Raúl Molina Gil

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral supone la culminación de varios años de trabajo, esfuerzo y constancia durante los cuales he recibido los conocimientos, la ayuda y el apoyo de muchas personas, a las cuales en estas líneas quiero expresar un reconocimiento público.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, Fernando y Raúl, su dedicación y apuesta por este trabajo. Sus conocimientos e ideas, así como su forma de inculcarlos, han sido fundamentales durante el desarrollo del mismo. La confianza que han depositado en mí ha sido el eje de mi iniciativa y motivación para conseguir este objetivo.

Quisiera continuar haciendo una especial mención a Isabel. Gracias Isa, parte de este trabajo es tuyo. Gracias por tu tiempo, paciencia y dedicación. Por las muchas horas que has invertido y por escuchar mis inquietudes. No solamente quiero expresártelo desde el punto de vista profesional, también quiero agradecerte tu interés por mis preocupaciones personales.

Igualmente quiero reconocer al Dr. Yifeng Zhang el haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación durante tres meses. Gracias a mi aprendizaje en la DTU he podido abrir mi ámbito de investigación a nuevas temáticas.

Quiero dar las gracias a todos mis compañeros del departamento, de los cuales siempre he recibido su ayuda y amabilidad. Dentro de ellos, quiero hacer un especial reconocimiento a los técnicos de laboratorio y becas de colaboración que han participado en este trabajo; así como a los alumnos que he tenido el placer de cotutorizar sus trabajos fin de grado y fin de máster: Cintia, Beatriz, Cristina, Carlos, Nerea y Noelia. Gracias a ellos, he podido compaginar mis tareas docentes e investigadoras. Ya sabemos que cuando se trata de reactores biológicos, toda atención es poca.

Por suerte, este tiempo en la Universidad no solamente me ha dado buenos compañeros, también me ha dado grandes amigos. Pedro es inteligente, leal, honesto, dispuesto y un gran amigo. Ha sido mi fiel compañero de aventura. Alba es risueña, entregada, generosa y empática. Siempre ha estado para escucharme y compartir. Clara es comprensiva, cariñosa, amable y motivadora. Siempre me ha tendido la mano para hablar. Gema es nuestro ejemplo, nos da el punto de experiencia que necesitamos. Julia es locura, compañía y positividad, siempre ha estado presente durante este tiempo.

Fuera del ámbito profesional quiero escribir unas palabras a todas mis amigas. Gracias chicas, sois las mejores compañeras que podría tener. Formamos el mejor de los equipos. Es tan difícil encontrar a personas con las que tener tanta conexión, que a veces me parece imposible. Sé que, dentro de muchos años, cuando vuelva a leer este libro, podré seguir reafirmando estas palabras.

Finalmente, a los que más se alegran de que cierre esta etapa de mi vida y vaya a finalizar un objetivo más. Mi familia. Lo son todo. Desde mis abuelos, tíos, primos hasta mis padres y mi hermano. Somos muchos y muy unidos. Tengo tan buenos equipos en mi vida personal, que sé que solamente podré alcanzar éxitos junto a ellos. Mi hermano Andrés es un ejemplo a seguir, aunque él no lo crea. Frescura, naturalidad y confianza. Deberíamos aprender mucho de él. Mis padres. Ellos me han inculcado los mejores valores que tengo. Constancia, esfuerzo, trabajo, fortaleza, pasión y alegría. Su confianza y estima en/por lo que hago es tan alta, que solo puede salir bien.

Y por último Álvaro, mis pies en la tierra. Mi mejor equipo. Mi dosis de realidad y confianza siempre. Mi mano derecha. Mi gran mentor. Los mejores proyectos que emprendo en la vida son a tu lado.

Porque este trabajo lleva una parte de todos vosotros, solo puedo decir *GRACIAS*.

Quiero terminar dejando un mensaje a Ana del futuro: eres fuerte, puedes con todo, no te agobies. Todo siempre tiene solución.

Ana

“Que no pierdas esa fe
que hoy es eterna
y esa forma de no ser
consciente de ella

que tu curiosidad no desaparezca
y crezca como lo hacen
ahora tus piernas
las que te llevarán tan lejos como quieras
comiéndote la vida
a manos llenas.”

♪ Izal ♪

A nivel mundial, más del 80 % de las aguas residuales generadas por la sociedad regresan al ecosistema sin haber sido tratadas o reutilizadas.

2.000 millones de personas en el mundo se abastecen de una fuente de agua contaminada siendo responsable de alrededor de 500.000 de muertes cada año.

UNESCO, 2019

Mi pequeña gota de agua , en un océano contaminado.

Índice

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	19
2.1. Fuentes de contaminación del agua.....	20
2.1.1. Aguas residuales urbanas.....	23
2.1.2. Microcontaminantes orgánicos (MCO) emergentes.....	28
2.2. Microcontaminantes farmacéuticos en aguas.....	31
2.2.1. Aguas residuales urbanas y hospitalaria.....	33
2.2.2. Aguas superficiales naturales.....	41
2.2.3. Riesgos medioambientales.....	45
2.3. Eliminación de microcontaminantes farmacéuticos en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs).....	48
2.4. Tecnologías para la eliminación de microcontaminantes emergentes.....	58
2.4.1. Procesos físicos.....	58
2.4.2. Procesos biológicos.....	59
2.4.3. Procesos de oxidación avanzada.....	61
2.5. Procesos de biooxidación avanzada y oxidación Fenton heterogénea.....	64
2.5.1. Biooxidación avanzada con hongos ligninolíticos de podredumbre blanca.....	65
2.5.2. Oxidación Fenton heterogénea.....	76
3. OBJETIVOS.....	83
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	89
4.1. Reactivos.....	91
4.2. Preparación del cultivo de hongo ligninolítico <i>Trametes versicolor</i>	94
4.3. Tratamiento de aguas residuales mediante biooxidación avanzada en contactores biológicos rotativos (CBRs).....	96
4.3.1. Tratamiento de aguas residuales urbanas.....	96
4.3.1.1. Instalación experimental.....	97
4.3.1.2. Puesta en marcha de los CBRs.....	98
4.3.1.3. Procedimiento del proceso de tratamiento.....	100
4.3.2. Tratamiento de agua residual hospitalaria.....	107
4.3.2.1. Instalación experimental.....	108

4.3.2.2. Puesta en marcha de los CBRs modificados.....	109
4.3.2.3. Procedimiento del proceso de tratamiento.....	110
4.4. Tratamiento del agua residual hospitalaria mediante oxidación avanzada tipo Fenton con catalizador tipo perovskita.....	113
4.4.1. Preparación y caracterización del catalizador.....	113
4.4.1.1. Preparación del material en polvo.....	113
4.4.1.2. Preparación de los materiales porosos reticulados.....	114
4.4.2. Actividad y estabilidad del catalizador.....	116
4.4.2.1. Catalizador en polvo.....	116
4.4.2.2. Catalizador reticulado conformado sobre espuma macroporosa.....	118
4.4.3. Actividad del catalizador reticulado en el tratamiento de un agua residual hospitalaria.....	120
4.5. Técnicas de caracterización.....	121
4.5.1. Catalizadores de oxidación Fenton.....	121
4.5.1.1. Difracción de Rayos X.....	121
4.5.1.2. Espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma acoplado por inducción (ICP-AES).....	122
4.5.1.3. Distribución del tamaño de partícula.....	122
4.5.1.4. Ensayos de rotura por compresión.....	123
4.5.1.5. Porosidad.....	124
4.5.2. Parámetros fisicoquímicos de aguas residuales.....	124
4.5.2.1. Carbono orgánico total.....	125
4.5.2.2. Demanda química de oxígeno.....	125
4.5.2.3. Nitrógeno amoniacal.....	126
4.5.2.4. Nitrógeno Kjeldahl.....	126
4.5.2.5. Fosfatos.....	128
4.5.2.6. Sólidos en suspensión totales o volátiles.....	128
4.5.2.7. pH y oxígeno disuelto.....	129
4.5.2.8. Ácido gálico.....	129
4.5.2.9. Carbamazepina.....	130

4.5.2.10. Metales.....	130
4.5.2.11. Peróxido de hidrógeno.....	131
4.5.2.12. Compuestos farmacéuticos en baja concentración.....	131
4.5.3. Técnicas de caracterización microbiológica.....	135
4.5.3.1. Bioensayos de actividad microbiológica de la biomasa de CBRs.....	136
4.5.3.2. PCR cuantitativa (qPCR) y secuenciación masiva.....	139
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	145
5.1. Evaluación del proceso de biooxidación avanzada para el tratamiento de un agua residual sintética y un agua real fortificadas con microcontaminantes farmacéuticos.....	151
5.1.1. Puesta en marcha de los contactores biológicos rotativos.....	154
5.1.2. Evaluación del proceso de biooxidación avanzada.....	157
5.2. Tratamiento biológico alternativo de aguas residuales urbanas y eliminación de microcontaminantes farmacéuticos mediante el proceso de biooxidación avanzada.....	173
5.2.1. Tratamiento del agua residual urbana de la planta depuradora a escala piloto de la Universidad Rey Juan Carlos.....	176
5.2.2. Tratamiento del agua residual urbana de una estación depuradora de aguas residuales de Toledo.....	195
5.2.3. Influencia de la composición del agua residual al proceso de biooxidación avanzada.....	202
5.3. Proceso de biooxidación avanzada en contactores biológicos rotativos modificados con madera para el tratamiento descentralizado de aguas residuales hospitalarias con eliminación de microcontaminantes farmacéuticos.....	209
5.3.1. Puesta en marcha de contactores biológicos rotativos modificados.....	212
5.3.2. Tratamiento del agua residual hospitalaria	217
5.3.3. Evolución de las comunidades fúngicas y bacterianas de los CBRs.....	229
5.4. Proceso de oxidación Fenton con catalizadores reticulados tipo perovskita para la eliminación de microcontaminantes farmacéuticos en aguas residuales hospitalarias.....	239
5.4.1. Preparación y caracterización del material tipo perovskita en polvo y del catalizador poroso reticulado.....	242

5.4.2. Actividad y estabilidad del material $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ en polvo.....	246
5.4.3. Actividad catalítica de materiales porosos reticulados tipo perovskita $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ en reactores de lecho fijo	252
5.4.4. Proceso Fenton con catalizador de perovskita soportado en un material poroso reticulado para la eliminación de microcontaminantes farmacéuticos de un agua residual hospitalaria.....	258
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	261
7. ANEXOS.....	267
7.1. Valores de pK_a de compuestos farmacéuticos detectados en los influentes de las depuradoras.....	269
7.2. Determinación de condiciones de los bioensayos de caracterización de la actividad microbiológica.....	270
7.3. Características fisicoquímicas de los compuestos farmacéuticos fortificados durante el tratamiento de las aguas residuales urbanas.....	275
7.4. Concentraciones de microcontaminantes farmacéuticos detectados en el tratamiento de las aguas residuales urbanas mediante biooxidación avanzada.....	276
7.5. Concentraciones de microcontaminantes farmacéuticos detectados en el tratamiento del agua residual hospitalaria mediante biooxidación avanzada.....	279
7.6. Tratamiento del agua residual hospitalaria mediante el proceso tipo Fenton.....	281
8. BIBLIOGRAFÍA.....	283
SUMMARY.....	323

1. Resumen

La presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Departamento de Tecnología Química y Ambiental de la Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología de la Universidad Rey Juan Carlos. Se encuadra dentro de la línea de investigación “Desarrollo de tecnologías avanzadas de oxidación para la eliminación de contaminantes de aguas urbanas e industriales” que el Grupo de Ingeniería Química y Ambiental desarrolla dentro de la temática: “Procesos de Depuración de Aguas Residuales”. Este trabajo ha sido financiado por la Comunidad de Madrid a través de la Red Madrileña de Tratamiento Avanzados de Aguas Residuales (S2013/MAE-2716 REMTAVARES-CM) y la Red Madrileña de Tratamientos para la Reutilización de Aguas Residuales y Valorización de Fangos (S2018/EMT-4341 REMTAVARES-CM) ambas enfocadas en el tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales y en la eliminación de contaminantes emergentes.

El agua es un recurso natural indispensable para la vida y la sostenibilidad del medioambiente que en los últimos años ha sufrido un alarmante deterioro como consecuencia del rápido desarrollo social, económico e industrial. Aunque actualmente la oferta mundial de agua dulce es todavía superior a la demanda, este bien común es cada vez más escaso y está sufriendo un importante deterioro de su calidad.

Esta situación hace que la protección y mejora del medio acuático se manifieste como una preocupación de gran repercusión social, económica y política

orientada a optimizar su aprovechamiento y luchar contra su contaminación. La necesidad de realizar una gestión sostenible del agua, tener una distribución regular, mejorar su calidad y asegurar el cumplimiento de las nuevas legislaciones ha supuesto el desarrollo de nuevos procesos que sean eficaces y eficientes tanto en el tratamiento de las aguas residuales como en la eliminación de los contaminantes presentes en las mismas.

Las aguas residuales urbanas son el conjunto de aguas generadas en núcleos urbanos o en zonas de servicio que se caracterizan por tener una variada composición física, química y biológica. Dentro de los principales agentes químicos contaminantes de emergente preocupación presentes en estas aguas, destacan los compuestos farmacéuticos, tales como los agentes de contraste, analgésicos y antiinflamatorios, antibióticos, anticancerígenos, antiepilépticos y psiquiátricos, anestésicos, antihipertensivos, antihistamínicos, β -bloqueantes, diuréticos, hormonas y reguladores del colesterol. Estos compuestos ya han sido identificados como contaminantes emergentes e incluso, algunos de ellos, se han incluido en la lista de sustancias prioritarias del agua aprobada por el Parlamento Europeo, debido a su potencial toxicidad, alta persistencia en cauces naturales de agua (subterránea, superficial y de consumo) y a su baja biodegradabilidad en los tratamientos convencionales de depuración. Hoy en día, pocas plantas de depuración incorporan en sus líneas de tratamiento procesos para eliminar microcontaminantes emergentes como los compuestos farmacéuticos. Este hecho hace que sus efluentes sean una de las principales fuentes de contaminación de los cauces naturales.

Las aguas residuales urbanas tienen su origen en numerosos focos. Sin embargo, los efluentes hospitalarios son la principal vía de entrada de los compuestos farmacéuticos a los influentes de las depuradoras, contribuyendo en algunos casos entre el 40 y el 75 % de la concentración total tratada. La problemática que presentan los hospitales es que no están sujetos a ninguna ley de vertido de agua en particular, limitándose a diluir sus efluentes con el resto de las corrientes que llegan a los sistemas públicos de tratamiento. Este hecho hace que numerosos estudios ya recojan la necesidad de realizar un pre o co-tratamiento de estas aguas antes de verterlas a los sistemas colectores municipales junto con las aguas residuales domésticas y aborden el desarrollo de tratamientos descentralizados de depuración que sean adecuados para las mismas.

Hasta el momento, son muchos los tratamientos alternativos que se han propuesto para depurar aguas residuales urbanas u hospitalarias y eliminar los compuestos farmacéuticos. Principalmente, se pueden distinguir entre procesos físicos de separación, procesos biológicos o procesos de oxidación avanzada. Sin embargo, todavía gran parte de los tratamientos alternativos propuestos están lejos

de tener una perspectiva realista de aplicación de cara al futuro. La mayoría de ellos consiguen altas tasas de eliminación, pero plantean condiciones de difícil implantación a nivel industrial.

De este modo, y tras la revisión bibliográfica realizada sobre las diferentes tecnologías que hoy en día se han propuesto para abordar el tratamiento de aguas residuales con microcontaminantes farmacéuticos emergentes, esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de dos procesos de oxidación avanzada. Por un lado, un tratamiento de biooxidación avanzada con hongos ligninolíticos de podredumbre blanca, como tratamiento biológico secundario de aguas residuales urbanas en una EDAR o como tratamiento descentralizado de aguas residuales hospitalarias con mayor carga de microcontaminantes. Por otro lado, un proceso de oxidación avanzada Fenton con un catalizador heterogéneo, también como tratamiento descentralizado para la eliminación de compuestos farmacéuticos presentes en aguas residuales hospitalarias.

El proceso de biooxidación avanzada se basa en la actividad del *Trametes versicolor*, un hongo ligninolítico el cual tiene la capacidad natural de generar especies radicalarias altamente oxidantes que atacan tanto a los contaminantes biodegradables como no biodegradables mediante un mecanismo enzimático intra y extra-celular. Actualmente, numerosos trabajos ya han reportado la eficacia de este proceso en la eliminación de compuestos farmacéuticos. Sin embargo, casi todos los estudios presentan grandes limitaciones desde un punto de vista operacional para su posterior escalado a nivel industrial. Entre estas limitaciones destacan: la necesidad de adicionar nutrientes suplementarios que mantengan el crecimiento y la actividad del hongo durante todo el tratamiento, la competencia con otros microorganismos bacterianos propios de las aguas residuales no estériles y el diseño de los biorreactores y la necesidad de operar con altos tiempos de residencia hidráulico.

Por todo ello, una parte del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral está centrado en la propuesta, diseño, evaluación y validación de un tratamiento biológico de depuración de aguas residuales urbanas que sea además efectivo en la eliminación de contaminantes emergentes de origen farmacéutico, basado en un proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor*. El biorreactor propuesto es un sistema de contactores biológicos rotativos (CBRs), donde la biomasa fúngica se encuentra inmovilizada en discos parcialmente sumergidos en el agua residual a tratar. Este tipo de sistemas son robustos y permiten trabajar bajo condiciones aerobias sin necesidad de dosificar aire al reactor. Además, son fácilmente escalables por lo que resultan una alternativa para el diseño de un biorreactor de biooxidación avanzada que pueda aplicarse realmente en depuradoras de aguas residuales urbanas o de tratamiento de aguas residuales con un alto contenido en contaminantes de

origen farmacéutico, como las aguas residuales hospitalarias. A diferencia de otros trabajos estudiados en bibliografía, con este biorreactor se suprimió la adición de sustratos suplementarios fácilmente biodegradables y se operó en continuo con un tiempo de residencia hidráulico no superior a 1 día.

Por otra parte, el proceso de oxidación avanzada Fenton comercial emplea catalizadores homogéneos que presentan una fuerte dependencia del pH ácido para su óptimo rendimiento. Este hecho implica la acidificación del agua residual inicial y la neutralización posterior del agua tratada para la separación de las sales utilizadas como catalizador, incrementando consecuentemente el coste del proceso. Para superar esta limitación, en las últimas décadas, se ha planteado el estudio de catalizadores heterogéneos que permiten trabajar en rangos de pH más amplios y cercanos a la neutralidad. En la actualidad, son muchos los tipos de catalizadores heterogéneos que se han utilizado en procesos de oxidación Fenton. Entre ellos, los procesos basados en catalizadores de cobre han demostrado ser efectivos en la eliminación de diferentes contaminantes, como los compuestos farmacéuticos. A pesar de que ya se haya confirmado la actividad de estos materiales para la eliminación de contaminantes farmacéuticos en agua, la mayoría de estos trabajos utilizan compuestos modelo en matrices de agua sintética y realizan sus ensayos en discontinuo con catalizadores en polvo que dificultan su implantación en procesos continuos de tratamiento.

Para ello, en la presente investigación se desarrollará el diseño de un catalizador heterogéneo macroporoso reticulado tipo perovskita con composición $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ para su aplicación en reactores de lecho fijo. Actualmente, muchos trabajos utilizan perovskitas parcialmente sustituidas como catalizadores en procesos Fenton. Sin embargo, el número de estudios donde se aplican estos materiales para la eliminación de compuestos farmacéuticos aún es limitado. Además, la inmovilización del material catalíticamente activo sobre estructuras macroporosas solventará las limitaciones de operar con catalizadores en polvo en procesos continuos y facilitará su escalado a nivel industrial. En este apartado, se evaluará el efecto del agua matriz sobre la actividad y estabilidad del catalizador en condiciones suaves de temperatura, con moderadas concentraciones de oxidante (peróxido de hidrógeno) y un intervalo de pH que no se restrinja al pH ácido del sistema comercial.

Para el desarrollo de los objetivos de la Tesis Doctoral, el trabajo de investigación se ha dividido en cuatro bloques cuyos resultados y conclusiones se exponen y detallan a continuación.

I. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE BIOOXIDACIÓN AVANZADA PARA EL TRATAMIENTO DE UN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA Y UN AGUA REAL FORTIFICADAS CON MICROCONTAMINANTES FARMACÉUTICOS

En este primer bloque de resultados se ha evaluado la eficacia del proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* para el tratamiento de un agua residual simulada y un agua residual urbana fortificadas con una concentración conocida de compuestos farmacéuticos de diferentes familias terapéuticas. Ambos tratamientos se llevaron a cabo en una unidad de contactores biológicos rotativos (CBRs) operando en continuo con un tiempo de retención hidráulico de 1 día, 40 % de sumergencia de los discos y 12 rpm de velocidad de giro.

El punto de partida para la puesta en marcha de la unidad de CBRs consiste en conseguir estimular el crecimiento y la inmovilización del *Trametes versicolor* sobre los biodiscos. Para ello, fue necesario acondicionar el sistema bajo unas condiciones adecuadas para la producción de exopolisacáridos extracelulares (EPS), los cuales son moléculas responsables de la capacidad de este tipo de hongos para adherirse sobre determinadas superficies. La puesta en marcha se realizó en discontinuo en dos etapas diferentes: una primera fase de inmovilización y crecimiento y una segunda fase de aclimatación. Finalmente, tras 50 días se alcanzó el recubrimiento completo del hongo *Trametes versicolor* sobre los discos de la unidad CBRs, formando un recubrimiento homogéneo y estable en el que el crecimiento del hongo sobre el disco renueva la fracción de biopelícula desprendida por gravedad y arrastre con el efluente de salida durante la operación.

A continuación, se llevó a cabo el tratamiento en continuo de un agua residual sintética dopada con ocho compuestos farmacéuticos durante 120 días. La formulación del agua residual contuvo sacarosa y tartrato de amonio y se añadieron ácido gálico (mediador quinónico, 85 mg/L) y sales de hierro (oxalato de hierro III hexahidratado, 145 mg/L) y manganeso (nitrato de manganeso II tetrahidratado, 20 mg/L) como promotores del proceso de biooxidación avanzada. Posteriormente, se realizó el tratamiento del agua residual real procedente de la salida del tratamiento primario de la depuradora localizada en el Centro de Apoyo Tecnológico de la Universidad Rey Juan Carlos, en este caso, fortificada con trece fármacos pertenecientes a diferentes familias terapéuticas con una concentración inicial de 50 µg/L de cada uno de ellos bajo las mismas condiciones durante 35 días.

En primer lugar, el rendimiento del proceso de biooxidación avanzada fue evaluado según las tasas de reducción obtenidas para la eliminación de carbono, nitrógeno y fósforo. Durante el tratamiento del agua residual sintética se obtuvieron reducciones medias del 68 % para el COT y del 73 % para el N-NH₄⁺. Mientras que

durante el tratamiento del agua residual urbana procedente de la URJC la eliminación de COT aumentó hasta un 82 %, frente al 61 % obtenido para el N-NH_4^+ y el 70 % para el P-PO_4^{3-} . Este incremento en la tasa de reducción obtenida para el COT durante el tratamiento del agua residual urbana real podría estar relacionado con la contribución de la actividad bacteriana al consumo de carbono, propia de las aguas residuales reales no estériles, a pesar de la inhibición parcial bacteriana inducida por la acidificación del medio a pH 4,5. Al contrario que el COT, la tasa de eliminación para el N-NH_4^+ disminuyó ligeramente aproximadamente desde un 73 hasta un 61 % durante el tratamiento del agua residual real. En este caso, el incremento de la concentración de nitrógeno en forma de amonio en el efluente puede estar relacionada con la autólisis celular del micelio fúngico bajo condiciones de hambruna por la competencia con los microorganismos autóctonos del agua residual por los macronutrientes.

Además, cabe destacar que las eficacias obtenidas para el nitrógeno y el fósforo muestran una mejora considerable respecto a las observadas en los tratamientos de fangos activos de las EDARs. Por todo ello, el proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* propuesto parece ser una buena alternativa para el tratamiento en continuo de aguas residuales urbanas reales no estériles en un sistema de CBRs operando con un TRH de 1 día.

El rendimiento del tratamiento propuesto también se evaluó en función de la eliminación de los compuestos farmacéuticos dopados en una concentración inicial de 50 $\mu\text{g/L}$. Las eficiencias de eliminación medias fueron moderadas entre el 30 y el 60 % durante el tratamiento del agua residual urbana simulada, excepto para la cafeína que consiguió un porcentaje de eliminación del 90 %. Las eficacias de eliminación de los trece compuestos farmacéuticos dopados durante el tratamiento del agua residual real también mejoraron notablemente respecto al agua sintética. En este caso, de los trece compuestos farmacéuticos estudiados, doce obtuvieron tasas de eliminación entre el 50 y el 97 %, aproximadamente. Entre ellos, cabe destacar fármacos como carbamazepina, diclofenaco o ranitidina, los cuales mejoraron considerablemente su eliminación frente a las tasas obtenidas en EDARs con diferentes tratamientos convencionales de fangos activos.

Con estos resultados se pudo concluir que el sistema de contactores biológicos rotativos propuesto como reactor alternativo para el proceso de biooxidación avanzada con el hongo ligninolítico *Trametes versicolor*, puede trabajar de forma estable y efectiva con un TRH de 1 día, en condiciones no estériles, sin añadir sustratos fácilmente biodegradables que mantengan la actividad del sistema, sin renovar periódicamente la biomasa fúngica del biorreactor y sin aireación externa. Además, cabe destacar que el cambio de la matriz de agua residual sintética a un agua

real no afectó a la estabilidad de la biomasa fúngica, la cual se mantuvo estable durante 155 días de operación.

II. TRATAMIENTO BIOLÓGICO ALTERNATIVO DE AGUAS RESIDUALES URBANAS Y ELIMINACIÓN DE MICROCONTAMINANTES FARMACÉUTICOS MEDIANTE EL PROCESO DE BIOOXIDACIÓN AVANZADA

En este segundo bloque de resultados se ha realizado el estudio del tratamiento en continuo de dos aguas residuales urbanas de diferente procedencia y características (Universidad Rey Juan Carlos y EDAR de Toledo) mediante un proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor*.

En primer lugar, se realizó el tratamiento del agua residual urbana procedente de la depuradora a escala planta piloto situada en el Campus de Móstoles de la Universidad Rey Juan Carlos (Madrid), pero a diferencia del tratamiento anterior, sin fortificar con compuestos farmacéuticos. De acuerdo con la experimentación previa, el sistema de contactores biológicos rotativos (CBRs) operó en continuo con un TRH de 1 día (caudal de entrada constante en 10 L/día). Además, se estableció un grado de sumergencia y una velocidad de giro de los discos del 40 % y de 12 rpm, respectivamente. El pH del agua residual real fue modificado a 4,5 con una disolución de ácido sulfúrico 2N.

A su vez, este tratamiento se dividió en tres etapas diferentes realizadas de manera consecutiva en el tiempo. Una primera etapa, donde se llevó a cabo el tratamiento del agua residual de la depuradora de la Universidad Rey Juan Carlos sin añadir los sustratos promotores del proceso de biooxidación avanzada durante 65 días. Posteriormente, en una segunda etapa, el agua residual se trató en la unidad de CBRs operando durante 30 días bajo las mismas condiciones, pero en este caso añadiéndose los promotores del proceso de biooxidación avanzada en las condiciones ya probadas en el apartado anterior (85 mg/L de ácido gálico, 145 mg/L oxalato de hierro (III) hexahidratado y 20 mg/L nitrato de manganeso (II) tetrahidratado). Finalmente, se realizó una última etapa de tratamiento de 20 días, donde se mantuvieron las condiciones de la etapa anterior con los promotores del proceso de biooxidación avanzada, pero disminuyendo el tiempo de residencia hidráulico a 12 horas.

Durante las diferentes etapas evaluadas, se obtuvieron altas tasas de reducción para el COT y P-PO₄³⁻ (alrededor del 70 % en ambos casos). Por el contrario, el N-NH₄⁺ obtuvo reducciones inferiores al 15 % para todas las etapas. El resultado obtenido para el nitrógeno amoniacal puede deberse a la baja capacidad de asimilación de nitrógeno del *Trametes versicolor* con respecto a sus altos

requerimientos de carbono. Así como, a la capacidad del hongo para degradar compuestos orgánicos nitrogenados como fuente de carbono en aguas con baja relación C:N. Así, sus escasos requerimientos de nitrógeno son cubiertos por la degradación de nitrógeno orgánico, en lugar del nitrógeno amoniacal liberado en el proceso de amonificación del agua residual, limitando así la tasa de reducción de N-NH_4^+ .

En el caso de los compuestos farmacéuticos detectados en el agua residual de entrada al reactor, las tasas de eliminación alcanzadas fueron muy diversas dependiendo de la etapa de funcionamiento del CBR. Así, se comprobó que la adición de ácido gálico y sales de hierro y manganeso promueven una mayor eficacia del tratamiento fundamentalmente para la eliminación de los compuestos farmacéuticos, comparado con la etapa de tratamiento biológico con el hongo en ausencia de promotores de la biooxidación avanzada. Por otro lado, tras comparar las etapas donde se operó con diferentes tiempos de retención hidráulico (TRH), se vio que un TRH de 12 horas redujo significativamente la capacidad de eliminación de los fármacos presentes en el agua residual tratada.

A continuación, se llevó a cabo el tratamiento del agua residual urbana procedente del tratamiento primario de una EDAR situada de la provincia de Toledo. Este tratamiento fue dividido también en dos etapas con dos lotes de aguas residuales que presentaron notables diferencias en su composición. De nuevo, durante el tratamiento se obtuvieron altas tasas de eliminación de COT y P-PO_4^{3-} (75 y 65 % aproximadamente), mientras que el N-NH_4^+ obtuvo reducciones inferiores al 20 %. Para el caso de los fármacos detectados en este agua residual, se obtuvieron destacables tasas de eliminación para GFZ, HCT y SMX con valores de 65, 98 y 70 %, respectivamente. Además, cabe mencionar la tasa de eliminación obtenida para el DCF (50 %), compuesto altamente refractario a los tratamientos convencionales de fangos activos.

Debido a las variaciones en la composición inicial de las diferentes aguas residuales, se estudió la influencia de la relación COT:N-NH_4^+ y COT:P-PO_4^{3-} en el rendimiento del proceso. Para ello, se compararon los resultados obtenidos con las aguas residuales trabajando siempre con los promotores del proceso de biooxidación avanzada y un TRH de 1 día. Los resultados mostraron que la relación COT:P-PO_4^{3-} no es un parámetro significativo para el tratamiento del agua residual urbana con *Trametes versicolor*. Por el contrario, la relación COT:N-NH_4^+ sí parece ser un parámetro significativo en el tratamiento del agua residual urbana. Una mayor relación COT:N-NH_4^+ mejora ligeramente las tasas de eliminación de COT, N-NH_4^+ y P-PO_4^{3-} . Sin embargo, también promueve el desarrollo de comunidades bacterianas que

pueden inhibir parcialmente la actividad fúngica reduciendo su eficacia en la eliminación de los contaminantes farmacéuticos.

Durante el tratamiento de ambas aguas residuales (Universidad Rey Juan Carlos y EDAR de Toledo) también se evaluó la actividad fúngica o bacteriana de la biomasa soportada sobre los CBRs después del tratamiento. Para ello, se realizaron bio-ensayos en discontinuo donde se evaluó la actividad de cada tipo de microorganismo según la capacidad de eliminación de acetato de sodio como sustrato fácilmente biodegradable. Así, se monitorizó la eliminación de este sustrato en términos de carbono orgánico total (COT) tras añadir inhibidores selectivos de bacterias (bactericidas, actividad fúngica) y de hongos (fungicida, actividad bacteriana). El inóculo de biomasa utilizado en ambos casos se recogió de la superficie de los biodiscos al finalizar el tratamiento completo de cada agua residual (planta depuradora piloto del de la URJC y EDAR de Toledo). Los resultados mostraron que para ambos inóculos las especies fúngicas dominan la actividad del proceso biológico. En el caso del inóculo procedente del reactor de tratamiento del agua residual de la EDAR de Toledo, las bacterias mostraron una mayor contribución a la actividad total del sistema (entre un 25 y 37 %) en comparación con el inóculo del reactor de tratamiento del agua residual de la planta piloto de la URJC (inferior al 15 %).

III. PROCESO DE BIOOXIDACIÓN AVANZADA EN CONTACTORES BIOLÓGICOS MODIFICADOS CON MADERA PARA EL TRATAMIENTO DESCENTRALIZADO DE AGUAS RESIDUALES HOSPITALARIAS CON ELIMINACIÓN DE MICROCONTAMINANTES FARMACÉUTICOS

El tratamiento en continuo del agua residual procedente de la salida del colector principal de un hospital de la Comunidad de Madrid se realizó en dos unidades de CBRs donde sus discos se recubrieron con planchas de madera de pino como medio para favorecer el soporte de la biomasa fúngica sobre los discos y sustrato adicional natural para su mantenimiento y crecimiento. Ambas unidades operaron en paralelo con la finalidad de estudiar la reproducibilidad del proceso de biooxidación avanzada y así validarlo como tratamiento biológico descentralizado alternativo a los tratamientos de fangos activos convencionales de las estaciones depuradoras.

Para ello, el punto de partida fue la puesta en marcha de las dos unidades de CBRs modificadas con planchas de madera. En este caso, debido a la nueva modificación técnica realizada en los CBRs y a las características del agua residual a tratar, la puesta en marcha se dividió en cuatro fases: pretratamiento de las planchas de madera, fase de inmovilización y crecimiento y fase de aclimatación. Así, tras 80

días de puesta en marcha (1 día de pretratamiento, 30 días de inmovilización, 40 días de crecimiento y 10 días de aclimatación) se ha conseguido la inmovilización del hongo *Trametes versicolor* sobre los discos de madera de las dos unidades de CBRs modificadas, logrando un recubrimiento homogéneo de toda su superficie.

Una vez finalizada la puesta en marcha, se realizó el tratamiento del agua residual hospitalaria simultáneamente en ambas unidades operando en continuo con un TRH de 1 día (caudal de entrada al biorreactor constante en 10 L/día). Además, se estableció una sumergencia y una velocidad de giro de los discos del 40 % y de 12 rpm, respectivamente. El pH del agua residual de entrada a los biorreactores fue ajustado a 4,5 y se añadió un mediador quinónico (ácido gálico) y sales de hierro y manganeso como promotores del proceso de biooxidación avanzada (85 mg/L de ácido gálico, 145 mg/L de oxalato de hierro (III) hexahidratado y 20 mg/L de nitrato de manganeso (II) tetrahidratado).

La reducción de carbono orgánico total, nitrógeno (total Kjeldahl (NTK) y amoniacal) y fósforo (fosfatos) se monitorizó durante los 75 días de tratamiento del agua residual hospitalaria, obteniendo eliminaciones medias de un 80% para el COT, un 20 % para NTK, un 10 % para el N-NH_4^+ y un 75 % para el P-PO_4^{3-} . Además, se observó que el ácido gálico introducido como promotor quinónico de biooxidación avanzada era consumido completamente, mientras que la fuente de hierro adicionada se acumulaba sobre la biomasa inmovilizada en los CBRs.

Durante el tratamiento del agua residual hospitalaria en ambos biorreactores se detectaron 18 de los 22 compuestos farmacéuticos analizados. Atenolol (ATN) y ciclofosfamida (CPD) fueron los fármacos que se detectaron con mayor carga en el agua residual; seguidos de los antibióticos (azitromicina, AZM), de los agentes de contraste (iohexol, IHX) y los fármacos psiquiátricos (sulpirida, SPD). Cabe destacar que las tasas de eliminación alcanzadas para los 18 compuestos estudiados fueron muy similares en ambos biorreactores. Los compuestos detectados en mayor concentración mostraron una eliminación prácticamente completa durante el tratamiento del agua hospitalaria mediante el proceso de biooxidación avanzada. De los 18 fármacos detectados, 8 de los compuestos estudiados (atenolol, ATN; azitromicina, AZM; cafeína, CFN; ciclofosfamida, CPD; ibuprofeno, IBP; metoprolol, MTP; metronidazol, MDZ y sulpirida, SPD) obtuvieron tasas de eliminación entre un 80 y 100 % en ambos biorreactores. Mientras que únicamente cuatro de ellos (4-AAA, HCT, IHX y PGT) se redujeron por debajo del 40 %.

Las dos unidades de CBRs estudiadas mostraron resultados similares, demostrando la reproducibilidad del tratamiento continuo estudiado. Con estas conclusiones se puede validar el proceso de biooxidación avanzada como

pretratamiento in situ de los efluentes de aguas residuales del hospital antes de descargar en la red de alcantarillado. Ambos sistemas de CBRs se mantuvieron estables durante los 75 días de operación sin la necesidad de añadir sustratos adicionales biodegradables. Además, no fue necesario realizar renovaciones parciales de biomasa, dosificar aire o controlar la temperatura, que son las principales limitaciones de los tratamientos biológicos fúngicos para una posible implementación como tratamiento de aguas residuales a gran escala.

En el agua residual hospitalaria también se llevó a cabo un análisis de las especies soportadas sobre ambas unidades de CBRs modificados. Diferentes técnicas de microbiología molecular como la PCR cuantitativa (qPCR) y la secuenciación masiva permitieron identificar y cuantificar la evolución con el tiempo de operación de las diferentes comunidades microbiológicas presentes en el biorreactor. Los resultados revelaron que, al introducir las planchas de madera como soporte de la biomasa, se favorece la aparición de bacterias y hongos propias de la descomposición de la misma. Además, la diversidad de las comunidades bacteriana y fúngica parecen estabilizarse en ambas unidades de CBRs durante los 75 días de tratamiento del agua residual hospitalaria, resultando ser muy activa tanto para la reducción de la materia orgánica soluble como para la degradación de moléculas orgánicas complejas, como los microcontaminantes farmacéuticos.

IV. PROCESO DE OXIDACIÓN FENTON CON CATALIZADORES RETICULADOS TIPO PEROVSKITA PARA LA ELIMINACIÓN DE MICROCONTAMINANTES FARMACÉUTICOS EN AGUAS RESIDUALES HOSPITALARIAS

En el cuarto y último bloque de la investigación, se realizó la preparación y evaluación de un material reticulado poroso tipo perovskita $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ para su aplicación como catalizador heterogéneo en un proceso Fenton destinado a la eliminación de compuestos farmacéuticos presentes en aguas residuales hospitalarias. Inicialmente, se optimizó el método de conformado de los materiales porosos reticulados tipo perovskita ($\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ -RPP).

De manera paralela, se evaluó la influencia de la temperatura, la concentración de peróxido de hidrógeno y del pH sobre la actividad y estabilidad del catalizador en polvo utilizando aguas residuales hospitalarias fortificadas con carbamazepina como compuesto farmacéutico modelo. Finalmente, se evaluó la eficacia del material reticulado poroso para la eliminación de los compuestos farmacéuticos detectados en el agua residual hospitalaria mediante el proceso Fenton en un reactor continuo de lecho fijo.

La actividad del material perovskita $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ en polvo en términos de eliminación de carbamazepina (CZP) como contaminante modelo aumentó progresivamente con la disminución del pH. Sin embargo, la acidificación del medio afectó considerablemente a la estabilidad del catalizador. Los mejores resultados, donde se alcanzó un compromiso entre actividad y estabilidad del catalizador, se obtuvieron con un valor de pH de 5,5 y una temperatura de 50 °C. A este pH se observó una baja lixiviación de especies metálicas de cobre y en consecuencia, de pérdida de fase activa. Al mismo tiempo a 50 °C se alcanzó una total eliminación de CZP y consumo de peróxido de hidrógeno en apenas 10 minutos y una mineralización de COT aproximadamente del 22 % después de 120 minutos de reacción. Además, cabe destacar que estos resultados se obtuvieron con una carga de catalizador (0,6 g/L) y una concentración de peróxido de hidrógeno (0,7 g/L), las cuales fueron inferiores a las empleadas en otros trabajos en bibliografía para la eliminación de CZP a través de procesos Fenton homogéneos y heterogéneos.

La perovskita en polvo $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ se conformó con éxito en forma de material poroso reticulado para ser utilizado como catalizador heterogéneo en un reactor de lecho fijo de flujo ascendente para el tratamiento descentralizado de aguas residuales hospitalarias para la eliminación de microcontaminantes farmacéuticos.

Los experimentos en el reactor de lecho fijo en continuo con la perovskita conformada como material poroso reticulado mostraron que el aumento de la temperatura (de 50 a 90 °C) mejoró la eficacia del catalizador en la eliminación de CZP sin que la estabilidad del material poroso reticulado se viera apenas afectada. El catalizador mostró una actividad notable (aproximadamente 100 % de eliminación de CZP) y estabilidad (baja lixiviación de las especies metálicas de la perovskita $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$) durante 70 horas en operación continua en un reactor de lecho catalítico trabajando a 70 °C, pH de 5,5, dosis moderadas de peróxido de hidrógeno (700 mg/L) y un tiempo de residencia de 3 minutos.

Finalmente, el catalizador de perovskita mostró una alta eficacia para la eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos detectados en las aguas residuales del hospital en el rango real de $\mu\text{g/L}$ (antibióticos, agentes de contraste de rayos X, fármacos psiquiátricos o analgésicos y antiinflamatorios). La mayoría de ellos fueron eliminados con tasas de eliminación superiores al 90-95 %. Metoprolol y carbamazepina (69 y 27 %, respectivamente) fueron los dos compuestos farmacéuticos eliminados en menor extensión, pero, en cualquier caso, la concentración de ambos después del tratamiento fue inferior a la concentración que causa un efecto de toxicidad crónico o letal en los organismos acuáticos. Por lo tanto, el material de perovskita poroso reticulado basado en la perovskita $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ se considera un catalizador prometedor similar a Fenton para su implementación en

reactores de lecho fijo para el tratamiento descentralizado de aguas residuales hospitalarias antes de verterlas a los colectores generales de saneamiento.

2. Introducción

El agua es un recurso natural indispensable para la vida humana y la sostenibilidad del medio ambiente que, durante las últimas décadas, ha sufrido un alarmante deterioro como consecuencia del rápido desarrollo social, económico e industrial.

A pesar de que el planeta posee tres cuartas partes de agua en su superficie, únicamente un 2,5 % es agua dulce (Contreras López y Molero Meneses, 2006), encontrándose además en su mayor parte congelada en los polos o en acuíferos subterráneos poco accesibles. A pesar de todo, la disponibilidad mundial de agua dulce es todavía superior a la demanda y se trata de un recurso renovable. Sin embargo, este carácter renovable está siendo amenazado por dos graves problemas: su distribución irregular entre la población mundial y el deterioro de su calidad. De este modo, aunque miles de millones de personas han obtenido servicios básicos de agua potable y saneamiento desde el año 2000, aún queda un largo recorrido para alcanzar el objetivo mundial de agua limpia y saneamiento seguro establecido por la ONU dentro del plan de *Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)* para el 2030 (Asamblea General ONU, 2015), centrado en lograr servicios sostenibles de agua libre de contaminación. La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en su último informe de monitorización de los *Progresos en Materia de agua potable, Saneamiento e Higiene* (OMS y UNICEF, 2017), que tres de cada diez personas en el mundo, es decir, 2.100 millones de personas, aún carecían de acceso a agua potable en 2015. Además,

4.500 millones no poseen una red de saneamiento segura y eficiente, lo que aumenta el riesgo de contraer enfermedades.

Por otro lado, el mantenimiento y mejora del medio acuático implica la regeneración y reutilización de aguas residuales como objetivo esencial para mejorar el aprovechamiento de este recurso natural. En consecuencia, el Parlamento Europeo ha establecido una legislación restrictiva dentro del marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. La Directiva 2000/60/CE y sus posteriores modificaciones 2008/105/CE y 2013/39/UE establecen una estrategia para luchar contra la contaminación hídrica que implica la identificación de sustancias prioritarias y establece una lista de aquellas que suponen un riesgo significativo para el medio acuático.

La necesidad de realizar una gestión sostenible del agua, tener una distribución regular, mejorar su calidad y asegurar el cumplimiento de la legislación ha supuesto el desarrollo de nuevas tecnologías que sean eficaces y eficientes, tanto en el tratamiento de las aguas residuales como en la potabilización del agua.

2.1. FUENTES DE CONTAMINACIÓN DEL AGUA

La contaminación del agua se define en la Directiva 2000/60/CE como *“la introducción directa o indirecta, como consecuencia de la actividad humana, de sustancias o calor en la atmósfera, el agua o el suelo, que puedan ser perjudiciales para la salud humana o para la calidad de los ecosistemas acuáticos, o de los ecosistemas terrestres que dependen directamente de ecosistemas acuáticos, y que causen daños a los bienes materiales o deterioren o dificulten el disfrute y otros usos legítimos del medio ambiente”*. Por su parte, el agua residual puede definirse como aquella que se desprende de la acción humana una vez que ha sido alterada por diferentes fuentes de contaminación (Metcalf & Eddy y col., 1998).

Los orígenes más importantes de contaminación del medio hídrico son (Sperling, 2007; Sainz Sastre, 2005):

- **Causas naturales:** fenómenos meteorológicos, arrastres y la vida natural.
- **Núcleos urbanos:** aguas sanitarias de zonas residenciales, centros comerciales, hospitales, industrias ubicadas en cascos urbanos y ganadería estabulada.
- **Industria:** aguas de proceso, transporte de materiales, limpieza, aguas sanitarias y refrigeración.
- **Explotaciones ganaderas y agrícolas:** ganadería en libertad, abonos y contaminantes fitosanitarios.

- **Transporte marítimo:** vertidos de hidrocarburos u otros residuos oleosos y aguas sucias o residuos sólidos de los servicios a bordo.

De forma global, las aguas residuales se pueden clasificar fundamentalmente en tres tipos en función de su origen: urbanas, industriales y agropecuarias. En la Figura 2.1 se muestra un esquema simplificado del ciclo del agua residual con sus diferentes focos de contaminación y tratamiento.

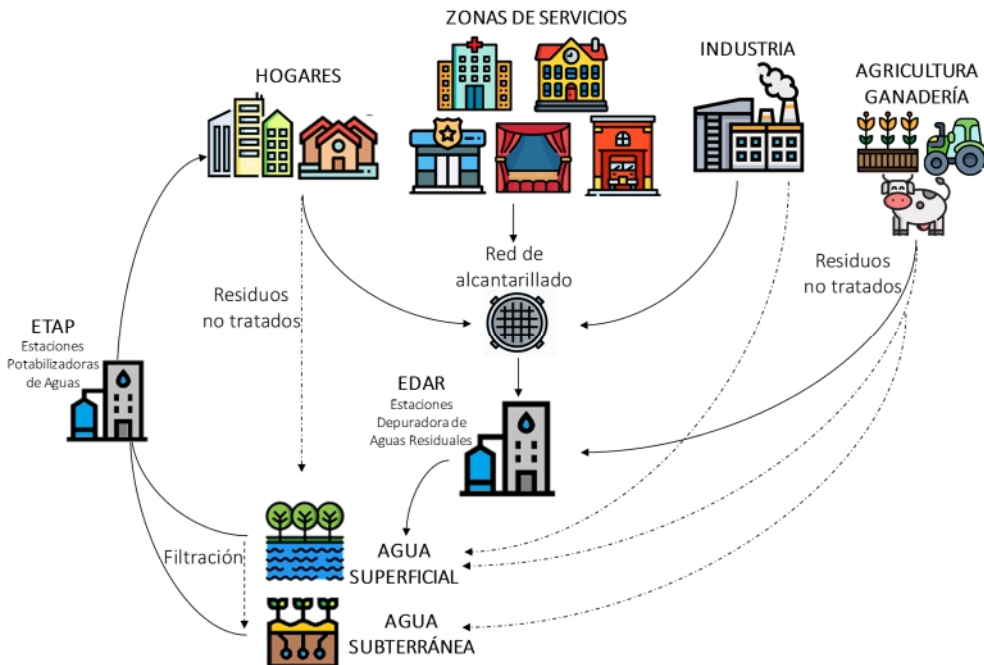


Figura 2.1. Ciclo de gestión de las aguas residuales (adaptación de Sperling, 2007)

Las características de cada tipo de agua residual están muy marcadas por su procedencia. A continuación, se resumen los aspectos más importantes de cada una de ellas:

1. Aguas residuales urbanas. La Directiva 91/271/CEE (Parlamento y Consejo Europeo, 1991) y su modificación 98/15/CE del Consejo Europeo (Parlamento y Consejo Europeo, 1998), que tienen por objeto el tratamiento y vertido de aguas residuales urbanas e industriales, definen las aguas residuales urbanas como “*el conjunto de las aguas residuales generadas en núcleos urbanos o en zonas de servicio contaminadas principalmente por causa del metabolismo humano y las actividades domésticas*”. Además, considera la mezcla de éstas con aguas residuales procedentes de zonas de servicios, locales comerciales o industriales (con composición similar que

las domésticas) y/o las aguas de escorrentía pluvial. Este tipo de aguas se caracterizan por su variada composición física, química y biológica. En ellas, destaca un elevado contenido de sustratos de origen animal, vegetal y sintéticos: carbohidratos, grasas, aceites, proteínas y contaminantes químicos de uso cotidiano (tensoactivos/detergentes, cosméticos o fármacos). Además, presentan sólidos de origen mineral (arenas, lodos, arcillas, etc.) y también carbonatos, cloruros y compuestos de nitrógeno, fósforo o azufre. Finalmente, también contienen constituyentes biológicos como bacterias, algas, virus, hongos, larvas y nematodos (Martín García y col., 2006; Metcalf & Eddy y col., 1998).

2. Aguas residuales industriales. Según la Directiva 91/271/CEE y su modificación 98/15/CE del Consejo Europeo, las aguas residuales industriales se definen como *“todas aquellas aguas residuales vertidas desde locales utilizados para efectuar cualquier actividad comercial o industrial, que no sean aguas residuales domésticas ni de escorrentía pluvial”*. Por lo general, el resultado de estas actividades suele generar una contaminación hídrica que produce un fuerte impacto en los ecosistemas y que es muy heterogénea en función del tipo de industria. Además, estos efluentes poseen una carga variable y de mayor peligrosidad que los domésticos, ya que contienen altas cargas y compuestos de elevada toxicidad no biodegradables (Sperling, 2007). En algunas ocasiones, si la carga contaminante no es muy elevada y el caudal de vertido es moderado, las industrias están autorizadas para realizar el vertido de sus aguas en el sistema de alcantarillado donde se diluyen con el conjunto de aguas residuales urbanas. Sin embargo, aquellas que producen los contaminantes más peligrosos poseen sistemas de depuración propios antes de su vertido al sistema integral de saneamiento.

3. Aguas residuales agropecuarias. Estas aguas son aquellas que provienen de explotaciones agrícolas o ganaderas y también de la escorrentía producida en los terrenos cultivados. Contienen grandes cantidades de materia orgánica, fertilizantes, plaguicidas, pesticidas y biocidas. En el caso de las explotaciones ganaderas la contaminación procede fundamentalmente de residuos orgánicos, nitrógeno, fósforo y sólidos en suspensión. Cabe destacar que las actividades agrícolas son una de las principales fuentes de contaminación de las aguas subterráneas (Liu, 2007).

El volumen de aguas residuales generado de cada tipo viene determinado por el consumo y necesidades de agua limpia en cada sector. La agricultura y ganadería son los sectores que más consumo requieren del mundo, gastando un 69 % del agua total consumida frente a un 23 % del sector industrial y un 8 % de las áreas urbanas, si bien estos datos pueden presentar variaciones en función del grado de desarrollo del país (Contreras López y Molero Meneses, 2006). En cualquier caso, la pérdida

gradual de la calidad del agua como consecuencia de su uso origina un gran volumen de aguas residuales que deben ser adecuadamente depuradas de acuerdo a las legislaciones vigentes para su vertido, regeneración o reutilización.

La presente Tesis Doctoral se va a centrar en el tratamiento de aguas residuales urbanas generadas en núcleos residenciales y en zonas de servicio, como los hospitales, las cuales presentan una problemática específica derivada de la presencia de contaminantes emergentes de especial preocupación, como se detalla más adelante.

2.1.1. Aguas residuales urbanas

Las aguas residuales urbanas son una mezcla compleja de agua y una serie de contaminantes orgánicos e inorgánicos tanto en suspensión como disueltos. Convencionalmente, este término suele utilizarse para referirse al conjunto de las aguas residuales domésticas, aguas de escorrentía pluvial y en algunos casos aguas industriales (Martín García y col., 2006; Metcalf & Eddy y col., 1998). Dentro de esta denominación, aquellas que proceden de la escorrentía superficial y de los drenajes o filtraciones de un municipio (aguas pluviales, limpieza pública, riego y otros servicios) se denominan **aguas blancas**. Por el contrario, las que proceden del uso doméstico del agua en zonas de viviendas y de servicios (aguas de cocina, baño, lavado, fecales, hospitales, etc.) se denominan **aguas negras** debido a que generalmente contienen un mayor grado de contaminación (Contreras López y Molero Meneses, 2006).

Los contaminantes que se pueden encontrar en las aguas residuales urbanas son principalmente de tres tipos: físicos, químicos y biológicos. A continuación, se detalla individualmente cada uno de los constituyentes y contaminantes de las aguas residuales urbanas más importantes correspondientes a cada uno de los tres grupos indicados.

1) Contaminantes físicos

- a) **Temperatura:** influye en la velocidad de las reacciones químicas y de los procesos bioquímicos. Su valor oscila en los efluentes urbanos entre 15 y 20 °C, por lo que cambios bruscos fuera de este rango pueden provocar variaciones en la biota presente en el agua.
- b) **Olor:** se debe a la liberación de gases, principalmente sulfuro de hidrógeno.
- c) **Turbidez:** es un parámetro que está ligado con la presencia de materia coloidal y en suspensión.

- d) **Sólidos:** se pueden clasificar por su tamaño o naturaleza. Dentro de los sólidos totales del agua residual, se distinguen según su capacidad de sedimentación: sólidos disueltos, en suspensión, coloidales y sedimentables. Los sólidos en suspensión son la fracción de los sólidos totales que son capaces de quedarse retenidos en una membrana filtrante de un tamaño determinado ($0,45 \mu\text{m}$). Por otro lado, los sólidos sedimentables son aquellos que no se mantienen suspendidos o disueltos y son capaces de decantar con el agua en reposo; mientras que los coloidales no sedimentan ni flotan. Así mismo, los sólidos de naturaleza orgánica se denominan sólidos volátiles, mientras que los de naturaleza inorgánica reciben el nombre de sólidos fijos.

2) Contaminantes químicos

Los contaminantes químicos pueden ser de origen orgánico e inorgánico. En la Figura 2.2 se presenta una composición química porcentual media aproximada de un agua residual urbana (Contreras López y Molero Meneses, 2006).

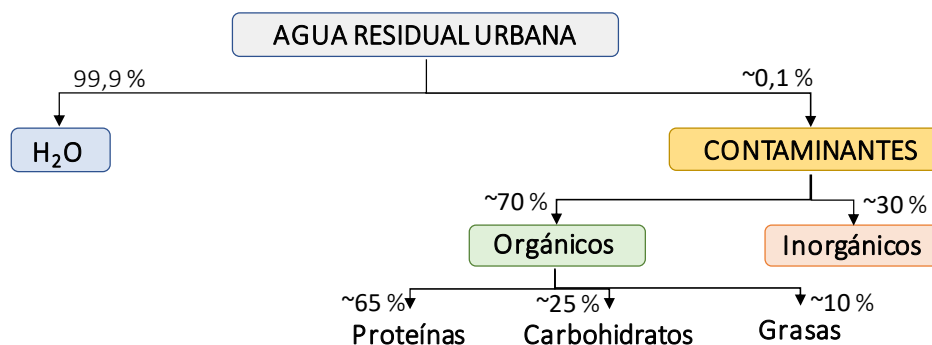


Figura 2.2. Composición porcentual de aguas residuales urbanas (adaptación de Contreras López y Molero Meneses, 2006)

➤ **Compuestos orgánicos**

La materia orgánica en las aguas residuales urbanas (Figura 2.2) está compuesta principalmente por proteínas, carbohidratos, grasas y aceites y por otros compuestos orgánicos nitrogenados como la urea. A continuación, se describen brevemente cada uno de los contaminantes orgánicos principales en este tipo de aguas residuales:

- a) **Proteínas:** son los principales componentes del organismo animal y su composición química es muy compleja e inestable. Junto con la urea, son la

principal fuente de nitrógeno en el agua residual con una cantidad del 16 % respecto al total.

- b) **Carbohidratos:** en este grupo se incluyen los azúcares, los almidones, la celulosa y los compuestos de fibra de madera, siendo estos dos últimos los más importantes en aguas residuales urbanas. Los azúcares y almidones tienen tendencia a descomponerse por un proceso de fermentación bacteriana, mientras que la celulosa y compuestos derivados de la madera se descomponen gracias a la actividad de diversos hongos.
- c) **Grasas y aceites:** engloba las grasas animales, aceites y ceras, los cuales son compuestos no solubles en agua que permanecen en su superficie debido a su menor densidad. Generalmente, no muestran descomposición por acción bacteriana y dificultan la transferencia de oxígeno.

En menor cantidad, también resultan relevantes otros compuestos orgánicos como:

- d) **Agentes tensioactivos y espumas:** formados por moléculas de gran tamaño responsables de la aparición de espumas en aguas de origen doméstico.
- e) **Otros compuestos nitrogenados:** la presencia de nitrógeno orgánico en aguas residuales, junto con las proteínas, proviene de la urea ya que es uno de los principales excrementos derivados del metabolismo humano.
- f) **Compuestos orgánicos volátiles (COVs):** su alta volatilidad facilita su transporte y movilidad desde el medio acuático a la atmósfera, aumentando sus posibilidades de liberación al medio ambiente.
- g) **Compuestos procedentes de productos del cuidado personal, limpieza doméstica, pesticidas o fármacos:** son contaminantes que en los últimos años han sido objeto de un seguimiento especial en el tratamiento de aguas residuales. Son sustancias que no suelen eliminarse completamente en los tratamientos convencionales de depuración y no existe una legislación actual que los regule.

Debe indicarse que normalmente se utilizan un conjunto de parámetros que permiten cuantificar de manera global los contaminantes anteriormente descritos. Los parámetros de caracterización más habituales son el contenido en carbono orgánico total (COT); la demanda química de oxígeno (DQO), definida como la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar químicamente los compuestos orgánicos presentes en el agua; o la demanda biológica de oxígeno a 5 días (DBO₅), definida como la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar biológicamente los compuestos orgánicos de las aguas residuales.

➤ **Compuestos inorgánicos**

A continuación, se describen brevemente cada uno de los contaminantes inorgánicos principales en este tipo de aguas residuales:

- a) **Cloruros:** su presencia en las aguas se debe tanto al contacto con suelos, rocas y sales como a los excrementos humanos. La alta presencia de cloruros en el agua residual puede tener un impacto significativo en el proceso de reutilización del agua depurada debido a que le dota de una elevada salinidad.
- b) **Carbonatos y bicarbonatos:** la alcalinidad del agua es debida a la presencia de hidróxidos (OH^-), carbonatos (CO_3^{2-}) y bicarbonatos (HCO_3^-) principalmente de calcio, magnesio, sodio, potasio y amonio.
- c) **Compuestos de nitrógeno:** el contenido de nitrógeno inorgánico total está compuesto por el nitrógeno amoniacal (NH_4^+), nitritos (NO_2^-) o nitratos (NO_3^-). La presencia en las aguas residuales urbanas de nitritos o nitratos es considerablemente baja, siendo mayoritaria en su forma amoniacal como producto de la descomposición biológica de los compuestos orgánicos nitrogenados y por la hidrólisis de la urea.
- d) **Compuestos de fósforo:** su presencia en las aguas residuales suele darse en forma de fosfatos inorgánicos (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- y H_3PO_4).
- e) **Compuestos de azufre:** suele darse en forma de ion sulfato (SO_4^{2-}), el cual bajo la acción bacteriana en condiciones anaerobias puede reducirse a sulfuro de hidrógeno (H_2S).
- f) **Metales pesados:** aunque no son muy comunes en las aguas residuales urbanas, algunos de ellos han sido clasificados como contaminantes inorgánicos prioritarios debido a su alta toxicidad (cobre, níquel, cadmio, mercurio, plomo, plata, cromo, arsénico, zinc y boro). Por el contrario, otros como el potasio, calcio, hierro o magnesio son necesarios para el desarrollo biótico en concentraciones adecuadas.

En general, la composición de las aguas residuales urbanas sigue un patrón bastante estable en cuanto a sus constituyentes químicos orgánicos e inorgánicos. En la Tabla 2.1 se muestran los datos de caracterización típicos de los constituyentes descritos en aguas residuales urbanas.

Tabla 2.1. Composición típica del agua residual doméstica de origen urbano (fuente: Metcalf & Eddy y col., 1998, página 125)

Contaminantes	Concentración (mg/L)		
	Débil	Media	Fuerte
Sólidos totales	350	720	1.200
Disueltos totales	250	500	850
Fijos	145	300	525
Volátiles	105	200	325
Sólidos en suspensión	100	220	350
Fijos	20	55	75
Volátiles	80	165	275
Sólidos sedimentables	5	10	20
Demanda biológica de oxígeno 5 días 20 °C	110	220	400
Carbono orgánico total	80	160	290
Demanda química de oxígeno	250	500	1.000
Parámetro biodegradabilidad (DBO ₅ /DQO)		0,44	
Nitrógeno (total en forma de N)	20	40	85
Orgánico	8	15	35
Amoniacal	12	25	50
Nitritos	0	0	0
Nitratos	0	0	0
Fósforo (total en forma de P)	4	8	15
Orgánico	1	3	5
Inorgánico	3	5	10
Cloruros	30	50	100
Sulfatos	20	30	50
Alcalinidad	50	100	200
Grasa	50	100	150
pH		~7	
Compuestos orgánicos volátiles (µg/L)	< 100	100-400	> 400

Como se puede observar, la carga de contaminantes orgánicos de las aguas residuales suele ser elevada, aunque gran parte de ella es biodegradable (DBO₅ / DQO > 0,4) (Martín García y col., 2006). Los sólidos en suspensión volátiles corresponden al 80 % del total de sólidos en suspensión. Por otro lado, los sólidos disueltos fijos son el 70 % de los sólidos totales, lo que indica la elevada cantidad de sales en estas aguas. Además, el contenido en nutrientes es moderado y se caracterizan por ausencia de metales pesados.

3) Contaminantes biológicos

Los contaminantes biológicos engloban todos los microorganismos patógenos (bacterias, virus, protozoos y gusanos parásitos) procedentes de los deshechos humanos. Este tipo de contaminación es común en las aguas residuales de procedencia doméstica y de zonas de servicio como los hospitales.

En la Tabla 2.2, se recoge una estimación del número de microorganismos cuya presencia es habitual en las aguas residuales domésticas. Como se puede observar, los coliformes, estreptococos y enterococos son las especies bacterianas que tienen mayor presencia en estas aguas residuales (Metcalf & Eddy y col., 1996).

Tabla 2.2. Tipos y número de microorganismos habitualmente presentes en aguas residuales domésticas de origen urbano (fuente: Metcalf & Eddy y col., 1998)

Microorganismos	Concentración (nº/mL)
Coliformes totales	10^5 - 10^6
Coliformes fecales	10^4 - 10^5
Estreptococos fecales	10^3 - 10^4
Enterococos	10^2 - 10^3
<i>Shigella</i>	Presentes
<i>Salmonella</i>	1-100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10-100
<i>Clostridium perfringens</i>	10-1.000
<i>Mycovacterium tuberculosis</i>	Presentes
Cistos de protozoos	10-1.000
Cistos de giarda	0-100
Cistos de cryptosporidium	0-10
Huevos de helmintos	0-10
Virus entéricos	10-100

2.1.2. Microcontaminantes orgánicos (MCO) emergentes

En la última década, entre los contaminantes que se encuentran presentes en las aguas residuales urbanas han despertado especial preocupación determinados **microcontaminantes orgánicos**, también llamados **contaminantes emergentes**. Estos compuestos, previamente desconocidos o no reconocidos, son sustancias de las que se desconoce su impacto real sobre el medioambiente y por ello, en la actualidad, no se encuentran legislados (Campo, 2015). En los últimos años, han sido objeto de un seguimiento especial por parte de la comunidad científica, suponiendo un importante desafío en cuanto a su detección, cuantificación y tratamiento. La baja concentración

(ng/L o µg/L) en la que se encuentran en los medios acuáticos hace que sea de especial complejidad su cuantificación, así como la determinación de los posibles efectos adversos que tienen sobre los ecosistemas y la salud pública a medio y largo plazo (Rodríguez-Narváez, y col., 2017).

Los contaminantes emergentes son productos que engloban una gran variedad de compuestos químicos, constituyendo un grupo muy diverso sin una clasificación clara ya que muchos de ellos pueden incluirse dentro de varios tipos. El número de compuestos cada vez es más grande y su clasificación crece a medida que se identifican nuevos componentes. Richardson y Ternes, en su último informe bianual sobre la detección de nuevos contaminantes emergentes, realizaron una clasificación con más de veinte grupos diferentes (Richardson y Ternes, 2017). La mayoría de ellos son productos de uso diario, por lo que una de las maneras más comunes para catalogarlos es en función de su utilidad. Entre los principales grupos se encuentran los **detergentes** (derivados del alquilfenol etoxilado); **pesticidas** (simazine, trialato, oxidiazón); **narcóticos** (cocaína, heroína, morfina); **plásticos** (bisfenol A, tereftalato de polietileno); **antisépticos** (triclosán); **aditivos de gasolina** (metil terc-butil éter); **compuestos farmacéuticos** (antibióticos, analgésicos, agentes de contraste, etc.); **productos de cuidado e higiene personal** (siloxanos, N,N-Dietilmeta-toluamida, fragancias, jabones, etc.); **retardantes de llama bromados** (éter de penta-bromo-di-fenilo) y **compuestos per-fluorados** (per-fluoro-octano-ato) (Brusseau y Artiola, 2019; Bai y col., 2018; Gogoi y col., 2018; Wilkinson y col., 2017; Pal y col., 2014).

Debido a su progresiva detección y cuantificación en aguas superficiales y de consumo, en el año 2000 en Europa se produjo una creciente preocupación por sus límites de vertido, lo que llevó a la publicación de la Directiva Marco del Agua 2000/60/CE donde se estableció la necesidad de identificar y controlar determinadas sustancias prioritarias en el agua. Esta Directiva establece el concepto de sustancia prioritaria y sustancia peligrosa, definiéndolas como:

- **Sustancias peligrosas:** *“aquellas sustancias o grupos de sustancias que son tóxicas, persistentes y pueden causar bioacumulación, así como otras sustancias o grupos de sustancias que entrañan un nivel de riesgo análogo”*
- **Sustancias prioritarias:** *“sustancias identificadas que presentan un riesgo significativo para el medio acuático o a través de él. Se establece un orden prioritario entre las sustancias que serán objeto de medidas, basándose en el riesgo existente para el medio acuático o a través de él, que se determinará mediante una evaluación de riesgos y una evolución específica de los mismos centrada únicamente en la ecotoxicidad acuática y en la toxicidad humana a*

*través del medio acuático. Entre estas sustancias se encuentran las **sustancias peligrosas prioritarias**".*

Posteriormente, la Directiva 2008/105/CE estableció un listado de 33 sustancias o grupos de sustancias prioritarias de mayor preocupación para las aguas europeas y sobre las que se establecerían normas de calidad y medidas de control de emisión a escala comunitaria. Cinco años más tarde, el Parlamento Europeo aprobó la Directiva 2013/39/UE en la cual la lista de compuestos prioritarios se amplió a un total de 45 sustancias. Además, en esta Directiva se introdujo una cláusula según la cual la Comisión revisará y modificará la lista de sustancias prioritarias cada cuatro años y podrá identificar nuevas sustancias susceptibles de ser incorporadas a la lista.

Así, se crea una lista de observación de sustancias sobre las que deben recabarse datos de seguimiento a nivel de la Unión Europea para que sirva de base a futuros ejercicios de asignación de prioridad. La lista contiene un máximo de diez sustancias o grupos de sustancias y se actualiza cada dos años. Actualmente, ésta ha sido actualizada tres veces incluyendo en ella grupos de compuestos farmacéuticos, pesticidas, productos de cosmética y aditivos alimenticios (Parlamento y Consejo Europeo, 2015/485 y 2018/840). En la Tabla 2.3 se presenta un esquema de las sustancias incorporadas en las tres revisiones.

Actualmente, Suiza es el único país que cuenta con una legislación referente a los límites de vertido de contaminantes emergentes de la lista de observación de sustancias prioritarias, fijándose el reto de garantizar para el año 2040 una eliminación media mínima del 80 % de una lista de doce contaminantes emergentes utilizados como indicadores en sus plantas depuradoras de aguas residuales (FOEN, 2017). Esta lista incluye compuestos prioritarios de las listas de observación, como el diclofenaco o la claritromicina, y otros no presentes en las listas, como la citalopram o el metoprolol (Bourin y col., 2018; Rizzo y col., 2019).

Tabla 2.3. Lista de observación de sustancias prioritarias del agua

Documento	Nombre de la sustancia Grupo de sustancias	Categoría
Directiva 2013/39/UE	Diclofenaco	Compuesto farmacéutico
	17-β-estradiol	Compuesto farmacéutico
	17-α-ethinylestradiol	Compuesto farmacéutico
Decisión ejecutiva 2015/495/UE	Diclofenaco	Compuesto farmacéutico
	17-β-estradiol	Compuesto farmacéutico
	17-α-ethinylestradiol	Compuesto farmacéutico
	2,6-di-terc-Butil-4-metilfenol	Plaguicida
	4-Metoxicinamato de 2-etilhexilo	Cuidado personal
	Antibióticos macrólidos ^(a)	Compuestos farmacéuticos
	Metiocarb	Plaguicida
	Neonicotinoides ^(b)	Plaguicidas
	Oxadiazon	Plaguicida
Trialato	Plaguicida	
Decisión ejecutiva 2018/840/UE	17-α-ethinylestradiol	Compuesto farmacéutico
	17-β-estradiol, estrona	Compuestos farmacéuticos
	Antibióticos macrólidos ^(a)	Compuestos farmacéuticos
	Metiocarb	Plaguicida
	Neonicotinoides ^(b)	Plaguicidas
	Metaflumizona	Plaguicida
	Amoxicilina	Compuesto farmacéutico
Ciprofloxacina	Compuesto farmacéutico	

(a) Eritromicina, claritromicina, azitromicina

(b) Imidacloprid, tiacloprid, tiametoxam, clotianidina, acetamiprid.

2.2. MICROCONTAMINANTES FARMACÉUTICOS EN AGUAS RESIDUALES

Dentro de la gran variedad de microcontaminantes orgánicos emergentes, los **compuestos farmacéuticos** suscitan una especial preocupación debido a su alta presencia en aguas superficiales, subterráneas y de consumo (Gogoi y col., 2018). Aproximadamente se estima que más de 3.000 compuestos se usan actualmente como fármacos, incluyendo entre ellos grupos de particular relevancia como analgésicos, antibióticos, antidiabéticos, β-bloqueantes, anticonceptivos, reguladores del colesterol y hormonas (Rodríguez-Narváez y col., 2017; Fatta-Kassinos y col., 2011). Hasta el momento, los antibióticos han sido uno de los grupos más estudiados debido a que su presencia, incluso a muy bajas concentraciones, puede implicar el desarrollo de mutaciones en especies bacterianas (Camargo y col., 2014; Nazaret y

Aminov, 2014). Otro grupo de fármacos que también ha recibido una gran atención son los compuestos polares, como el naproxeno o ketoprofeno, ya que tienen características muy hidrofílicas que los hace muy persistentes en el medio (Taheran y col., 2018). La elevada producción y consumo de estos compuestos, así como su continua introducción en el medioambiente hace que no necesiten ser persistentes para ocasionar efectos adversos (Taheran y col., 2018). Muchos de ellos pueden sufrir procesos de transformación que originan metabolitos que pueden llegar a ser incluso más peligrosos que los propios compuestos de origen. Por tanto, otro campo de investigación derivado es conocer las rutas metabólicas que realizan en su transformación, así como los metabolitos que se generan en esos procesos.

La fuente original de los contaminantes emergentes se remonta a su fabricación en las plantas industriales donde se producen anualmente toneladas de compuestos químicos (3.303 toneladas de paracetamol en Francia en el 2008) (Wilkinson y col., 2017). En la actualidad, se puede considerar que cada persona representa un punto potencial de origen de contaminación de las aguas con compuestos farmacéuticos y productos de higiene personal, los cuales con el paso de las décadas han aumentado su uso y consumo. Como se puede observar en la Figura 2.3, un estudio realizado en Cataluña mostró que el consumo medio total de 165 compuestos farmacéuticos se incrementó desde 599 toneladas/año en 2013 hasta 638 toneladas/año en 2016, lo que supone más de un 6,5 % en tan solo tres años (Gómez-Canela y col., 2019).

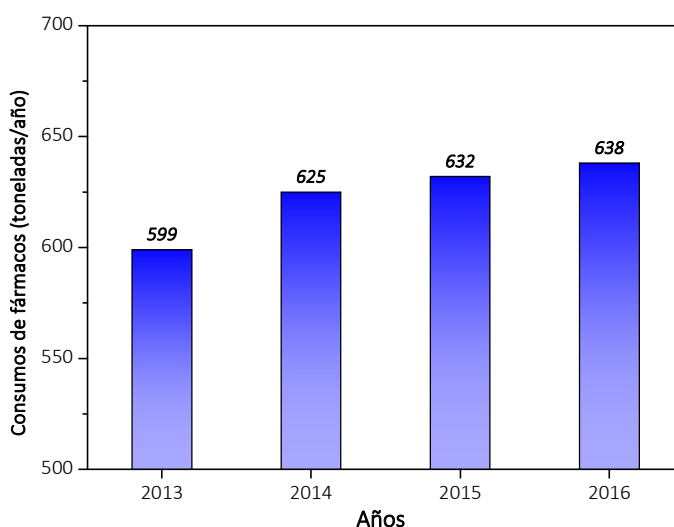


Figura 2.3. Consumo de compuestos farmacéuticos en Cataluña (fuente: Gómez-Canela y col. 2019)

El uso y disposición diaria de estos compuestos hace que inevitablemente una de sus principales vías de entrada al medio natural acuático sean los efluentes de las estaciones depuradoras de tratamiento de aguas residuales urbanas. Los productos farmacéuticos no utilizados y la excreción parcial de fármacos no metabolizados por el cuerpo humano son desechados en los sistemas integrales de saneamiento, generando aguas residuales urbanas contaminadas con estos compuestos. Los tratamientos convencionales de depuración no son capaces de eliminar estos microcontaminantes, por lo que este canal representa casi el 90 % de la entrada de fármacos residuales al medio acuático (Olsen y col., 2009; Jjemba, 2006).

La agricultura y las actividades ganaderas o veterinarias también generan corrientes acuosas residuales con presencia de estos contaminantes. Así, el riego con aguas residuales reutilizadas, el uso de herbicidas o pesticidas y los compuestos farmacéuticos usados en animales introducen estos compuestos en el suelo, generando la contaminación no solo de las aguas superficiales sino también de las subterráneas. Finalmente, cabe destacar la escorrentía, las lluvias y la lixiviación como procesos de contaminación indirecta que también afectan notablemente a la contaminación de las aguas subterráneas (Brusseau y Artiola, 2019). En los últimos años, ha crecido la preocupación sobre el estado de los acuíferos subterráneos, ya que se ha detectado la presencia de ciertos compuestos químicos en elevada concentración, como es el caso de la tri-metilamina utilizada en la agricultura para regular el crecimiento de las plantas (Gordalla y col., 2013).

2.2.1. Aguas residuales urbanas y hospitalarias

La presencia de contaminantes emergentes de tipo farmacéutico en aguas residuales urbanas ha sido ampliamente demostrada durante los últimos veinte años (Verlicchi y col. 2013 a; Deblonde y col. 2011; Rosal y col. 2010 a). El rango de concentración de estos contaminantes varía considerablemente en función del desarrollo y de las actividades socioeconómicas de la zona, período del año o de la pluviometría.

Según un estudio realizado por Verlicchi y col. (2013 a) en una estación depuradora de aguas residuales de 12.000 habitantes/equivalentes durante el mes de marzo de 2010, de entre los 73 compuestos farmacéuticos analizados, los analgésicos y antiinflamatorios fueron los compuestos mayoritarios en los influentes de la depuradora, en este caso con una concentración de 5,1 µg/L. Dentro de este grupo terapéutico, destaca la concentración de diclofenaco (284 ng/L) y naproxeno (178 ng/L). El segundo grupo fueron los antibióticos (5 µg/L), destacando la alta concentración en la que se encontraron azitromicina (131 ng/L), ciprofloxacino (638

ng/L), claritromicina (284 ng/L) y sulfametoxazol (214 ng/L). El tercero fueron los antihipertensivos y diuréticos (3 µg/L), siendo la hidroclorotiazida el fármaco detectado encontrado en mayor concentración en el agua residual (1165 ng/L). Finalmente, se encontraron en menor proporción fármacos de otros grupos terapéuticos, como β-bloqueantes (3 µg/L) con el atenolol (734 ng/L), estimulantes o psiquiátricos (0,9 µg/L) con la carbamazepina (372 ng/L), reguladores lipídicos (0,6 µg/L) con el gemfibrozilo (108 ng/L) o los diuréticos (0,4 µg/L).

Por otro lado, un estudio recopilatorio realizado en el año 2011 donde se recogieron datos del vertido de 45 depuradoras entre los años 1997 y 2010 también concluyó que los grupos terapéuticos con mayor presencia en los influentes de las depuradoras fueron: los analgésicos y antiinflamatorios, antibióticos y los estimulantes o fármacos psiquiátricos (Deblonde y col. 2011). Sin embargo, a diferencia del estudio de Verlicchi y col. (2013 a), en este caso también se incluyeron dentro de esta lista los agentes de contraste. Además, los fármacos detectados en mayor concentración para cada grupo terapéutico también variaron considerablemente. En este caso, el ibuprofeno fue el analgésico detectado en mayor concentración (13 µg/L), valor muy superior al reportado por Verlicchi y col. (2013 a) (0,081 µg/L). Martín y col. (2012) también detectaron altas concentraciones de ibuprofeno (50,6 a 12,9 µg/L) en el influente de cuatro depuradoras de entre 950.000 y 200.000 habitantes/equivalente. La distribución de los antibióticos fue similar con destacables concentraciones de ciprofloxacino (620 ng/L), claritromicina (344 ng/L) y sulfametoxazol (320 ng/L) (Deblonde y col. 2011). Finalmente, cabe destacar la presencia de los agentes de contraste como el iohexol (6,7 µg/L), iopromida (9,2 µg/L) y iomeprol (6,05 µg/L) (Deblonde y col. 2011).

Tras esta recopilación, se puede concluir que existen determinados compuestos que son comunes en la mayoría de los influentes de las depuradoras (ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, ketoproxeno, ciprofloxacino, claritromicina, sulfametoxazol, metronidazol, hidroclorotiazida, atenolol, cafeína, carbamazepina, gemfibrozilo y metoprolol); sin embargo, la concentración en la que se encuentran tiene una importante variabilidad en función de la zona y el tiempo de muestreo.

En la Tabla 2.4, se recoge un resumen de los rangos de concentración en los que se encuentran los compuestos mayoritarios detectados en los influentes de las depuradoras.

Tabla 2.4. Concentración de los compuestos farmacéuticos mayoritarios detectados en influentes de aguas residuales urbanas

Contaminantes	Concentraciones (µg/L)	
	Alta	Baja
Agentes de contraste		
Iohexol ^(a)	6,7	ND
Iopromida ^(a)	9,2	ND
Iomeprol ^(a)	6,05	ND
Analgésicos y antiinflamatorios		
Diclofenaco ^{(a) (c) (e) (f)}	3,1	0,16
Ibuprofeno ^(a)	22,7	0,014
Ketoprofeno ^{(a) (c) (e) (f)}	5,7	0,146
Naproxeno ^{(a) (c) (f)}	23,21	0,206
Paracetamol ^(b)	37	1,57
Antibióticos		
Azitromicina ^(f)	0,13	<LOQ
Ciprofloxacino ^{(a)(b) (f)}	13,6	0,09
Claritromicina ^{(a) (f)}	0,28	ND
Eritromicina ^{(a)(b)}	2,3	<LOQ
Metronidazol ^{(b) (f)}	0,28	0,04
Ofloxacino ^{(a) (f)}	5,3	0,007
Sulfametoxazol ^{(a) (f)}	0,67	0,03
Tetraciclina ^(a)	ND	ND
Trimetoprima ^(a)	1,3	0,25
Antiepilépticos, estimulantes y psiquiátricos		
Antipirina ^(b)	0,072	<LOQ
Carbamazepina ^{(a) (e)}	1,9	0,082
Cafeína ^{(a)(b)}	118	3,69
Antihistamínicos		
Ranitidina ^(b)	1,5	<LOQ
β-bloqueantes		
Atenolol ^{(a)(b) (c) (d)}	2,4	0,03
Metoprolol ^{(a) (c) (d)}	4,9	0,02
Propranolol ^(a)	0,51	0,036
Diuréticos		
Hidroclorotiazida ^{(b) (f)}	11	0,415
Furosemida ^{(b) (f)}	1,05	<LOQ
Reguladores lipídicos		
Gemfibrozilo ^{(b) (f)}	17	0,108

(a) Deblonde y col., 2011
(d) Vieno y col., 2007

(b) Rosal y col., 2010 a
(e) Metcalfe y col., 2003

(c) Jelic y col., 2011
(f) Martín y col. 2012

El agua residual urbana tiene diferentes focos de origen, siendo uno de los principales las zonas de servicios públicos como colegios, hospitales, residencias, prisiones o comercios. El consumo de estas instalaciones depende especialmente de su tamaño y del servicio que prestan, midiéndose en base a parámetros estandarizados como el número de habitantes equivalentes, número de camas, números de estudiantes, etc. Generalmente, presentan valores de consumo muy superiores a los 132 L/habitante/día de consumo medio doméstico en España según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE, 2018).

Los **hospitales** o entornos hospitalarios son posiblemente las instalaciones de servicios públicos que más agua demandan, desde 500 a 1.100 L/cama/día (Metcalf & Eddy y col., 1998), frente a los 132 L/hab/día necesarios para consumo de la población urbana (INE, 2018). En el año 2002, el Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, España) que cuenta con un número de camas superior a 1.200 consumió 384.947 m³. En el 2010, tras un plan de gestión sostenible, esta cifra disminuyó a 243.202 m³ (Massieu, 2010). A pesar de ello, en los grandes hospitales, estas estrategias siguen sin ser suficientes ya que, en equivalencia, es el agua consumida por más de 5.000 habitantes españoles durante un año. Otros artículos a nivel internacional cifraron la demanda en 750 L/persona/día en Francia, 1.213 L/cama/día en el Hospital de Medellín (Colombia), 1.360 L/cama/día en un hospital situado en la ciudad de Lima (Perú) y más de 2.000 L/cama/día en el Hospital Militar de Bogotá (Colombia) (Ergueta Acebey, 2016); estimándose que el 80 % de estas aguas de consumo se transforman en agua residual (Ergueta Acebey, 2016).

Según la directiva 91/271/CEE y su modificación 98/15/CE del Consejo Europeo, todos aquellos municipios con un número superior a 2.000 habitantes equivalentes están obligados a realizar una gestión adecuada de sus aguas residuales antes de verterlas al medio ambiente. Sin embargo, los hospitales generan volúmenes de agua superiores a estos municipios y no tienen esa obligación. Estos establecimientos no están sujetos a ninguna ley de vertido de agua en particular, limitándose a diluir sus efluentes con el resto de las corrientes que llegan de las líneas de saneamiento.

La composición de las aguas residuales hospitalarias que vierten al colector de la red de saneamiento público es similar a las de las aguas residuales urbanas, aunque suelen detectarse mayores niveles de sólidos en suspensión, carga orgánica, nitrógeno total, sulfatos o patógenos (Verlicchi y col., 2018; El-Ogri y col., 2016; Verlicchi y col., 2010 a y b; Kümmerer y col., 2001). En la Tabla 2.5 se muestran a modo de ejemplos los datos de caracterización de un agua hospitalaria de un estudio reciente de Verlicchi y col. (2018).

Tabla 2.5. Composición del agua residual hospitalaria (fuente: Verlicchi y col., 2018)

Contaminantes	Concentraciones (mg/L)	
	Alta	Baja
Sólidos suspensión	3.260	104
Demanda biológica de oxígeno 5 días 20 °C	2.575	4
Carbono orgánico total	565	31
Demanda química de oxígeno total	7.764	39
Demanda química de oxígeno soluble	700	380
Parámetro biodegradabilidad (DBO ₅ /DQO)	0,8	0,1
Nitrógeno (total en forma de N)	230	40
Orgánico	150	30
Amoniacal	70	10
Nitritos	4,5	0,06
Nitratos	2	<0,5
Fósforo (total en forma de P)	23	7
Fosfatos	19	2
Cloruros	400	80
Sulfatos	2.370	40
Detergentes	34	0,3
pH	9	6
Grasa	210	50
Turbidez (NUT)	480	100
Compuestos fenólicos (µg/L)	79	10
EC ₅₀ (<i>Daphnia</i>) (UT)	117	10
Microorganismos	Alta	Baja
Coliformes totales (Nº/100 mL)	10 ⁷	10 ⁴
Coliformes fecales (Nº/100 mL)	10 ⁷	10 ³
Enterococos	10 ⁶	10 ³
<i>Salmonella</i>	100	1
Virus Hepatitis A	10 ⁴	10 ³
Virus entéricos	10 ⁶	10 ⁵

Asimismo, estas **aguas hospitalarias** presentan una considerable carga de compuestos químicos englobados en lo que se ha definido previamente como contaminantes emergentes de naturaleza farmacéutica (Rodríguez-Mozaz y col., 2015). A pesar de que el consumo, uso y aplicación de los compuestos farmacéuticos en los hospitales varía significativamente entre años, países y función principal del hospital (general, pediátrico, universitario, maternidad, psiquiátrico, etc.), existen grupos farmacéuticos como son los analgésicos y antiinflamatorios, antibióticos y agentes de contraste, que están presentes de forma mayoritaria en todos sus

efluentes (Santos y col., 2013). Kümmerer y col. (2001) cuantificaron que un 26 % del total de los antibióticos utilizados en humanos son consumidos en hospitales. Asimismo, un trabajo realizado en uno de los hospitales generales de Suiza que cuenta con 338 camas y da servicio a más de 250.000 habitantes, analizó sus aguas residuales de salida obteniendo que más de 775 kg de compuestos farmacéuticos eran excretados al año, lo que equivale a 2,3 kg/cama al año (Escher y col., 2011). Del total vertido, el 58 % fueron agentes de contraste para rayos-X, el 19 % a laxativos, el 16 % correspondió con antibióticos y el 8 % restante con compuestos de otras familias terapéuticas. Otros estudios corroboraron que los agentes de contraste, utilizados para la realización de imágenes de rayos-X, tiene una elevada presencia en estos efluentes con más del 50 % del vertido total (Mendoza y col., 2015; Santos y col., 2013; Weissbrodt y col., 2009). Cabe destacar que estos compuestos son mayoritarios en las aguas de salida de los hospitales ya que son biológicamente inertes y muy estables al metabolismo humano haciendo que se excreten prácticamente en su totalidad (Steger-Hartmann y col., 2002). En la Tabla 2.6, se recogen los rangos de concentración para los contaminantes mayoritarios que han sido detectados en aguas residuales hospitalarias (Verlicchi y col., 2018; Santos y col., 2013; Daouk y col., 2016; Ferrando-Climent y col., 2014; Verlicchi y col., 2013 a y b).

Tabla 2.6. Rangos de concentración para los compuestos farmacéuticos mayoritarios detectados en aguas residuales hospitalarias (adaptación de: Verlicchi y col., 2018; Daouk y col., 2016; Ferrando-Climent y col., 2014; Verlicchi y col., 2013; Santos y col., 2013)

Contaminantes	Concentraciones ($\mu\text{g/L}$)	
	Alta	Baja
Agentes de contraste		
Iopromida	2.500	0,05
Iomeprol	1.392	0,01
Analgésicos y antiinflamatorios		
Ácido salicílico	70	$7 \cdot 10^{-3}$
Codeína	50	$4 \cdot 10^{-3}$
Diclofenaco	15	0,047
Ibuprofeno	43	0,07
Ketoprofeno	3,2	0,08
Naproxeno	11	0,045
Paracetamol	1.368	0,21
Antibióticos		
Azitromicina	7,3	0,09
Ciprofloxacino	125	0,03
Claritromicina	3	$2 \cdot 10^{-3}$
Eritromicina	83	0,048
Metronidazol	90	0,1
Ofloxacino	35	0,35
Penicilina	5	0,85
Sulfametoxazol	83	0,04
Tetraciclina	4	0,01
Trimetoprima	15	0,01
Anticancerígenos		
Ciclofosfamida	2	$8 \cdot 10^{-3}$
Ifosfamida	2	0,01
Tamoxifeno	0,17	$4 \cdot 10^{-3}$
Antiepilépticos y psiquiátricos		
Carbamazepina	2	0,02
Diazepam	0,050	0,01
Lorazepam	1,3	0,03
Antihipertensivos		
Losartán	1	0,07
Valsartán	20	0,01
Antihistamínicos		
Ranitidina	12	0,02

Tabla 2.6. (Continuación) Rangos de concentración para los compuestos farmacéuticos mayoritarios detectados en aguas residuales hospitalarias (adaptación de: Verlicchi y col., 2018; Daouk y col., 2016; Ferrando-Climent y col., 2014; Verlicchi y col., 2013; Santos y col., 2013)

Contaminantes	Concentraciones (µg/L)	
	Alta	Baja
β-bloqueantes		
Atenolol	20	0,09
Metoprolol	25	0,02
Propranolol	0,8	0,004
Diuréticos		
Hidroclorotiazida	1	0,2
Furosemida	33	0,5
Hormonas		
17-β-estradiol	0,04	0,03
Estrona	0,03	0,02
Estriol	0,50	0,35
Reguladores del colesterol		
Benzafibrato	1,4	10 ⁻³
Gemfibrozilo	1,1	10 ⁻³
Atorvastatina	0,6	10 ⁻³

Por otro lado, en la Tabla 2.7 se resume un valor medio de concentración presente en los dos tipos de aguas para las familias terapéuticas detectadas de forma mayoritaria tanto en aguas residuales urbanas como hospitalarias. Como puede observarse, las aguas hospitalarias suelen tener una concentración entre 3 y 15 veces superior que las domésticas para dos de sus grupos mayoritarios (analgésicos y antibióticos), y entre 50 y 150 veces superior para los agentes de contraste.

Tabla 2.7. Concentraciones medias por familias terapéuticas en aguas residuales hospitalarias y urbanas (fuente: Verlicchi y col., 2010 a)

Familia terapéutica	Concentración (µg/L)		
	Hospitalaria	Urbana	Relación
Agentes de contraste	1.000 - 500	10 - 7	50 - 150
Analgésicos y antiinflamatorios	200 - 100	40 - 12	3 - 15
Antibióticos	100 - 10	10 - 1	1 - 10
β-bloqueantes	20 - 5	5 - 1	1 - 20
Hormonas	0,5 - 0,2	0,1 - 0	1 - 3

Además, cabe destacar que en las aguas residuales hospitalarias se combina la presencia de antibióticos con una importante carga microbiológica. Este hecho es muy relevante debido al efecto que produce en el desarrollo de cepas bacterianas multirresistentes (Rodríguez-Mozaz y col., 2015). Actualmente, ya existen numerosos estudios que demuestran la capacidad de diferentes grupos bacterianos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* y *faecalis*) para desarrollar genes resistentes a los antibióticos. En estos estudios se concluye que los efluentes hospitalarios son una de las principales fuentes de estos microorganismos multirresistentes, con una presencia de al menos de 2 a 10 veces mayor que en los efluentes domésticos (Jung y col., 2004; Ruiz y col., 2004; Blanch y col., 2003; Obst y col., 2003; Ohlsen y col., 2003).

Debido a todas estas características, la gestión de las aguas residuales generadas en los hospitales es un tema de elevada repercusión y sujeta a continuos estudios dentro de la comunidad científica. En este contexto, numerosos trabajos ya recogen la necesidad de realizar un pretratamiento o co-tratamiento de estas aguas antes de verterlas junto con las aguas residuales domésticas y abordan la necesidad de desarrollar tratamientos descentralizados de depuración que sean adecuados para las mismas (Rodríguez-Narvaez y col., 2017; Verlicchi y col., 2012; Verlicchi y col., 2010 b; Pauwels y Verstraete, 2006). Sin embargo, en la actualidad, ningún hospital en España cuenta con una planta descentralizada de tratamiento de sus aguas residuales. En la Unión Europea, únicamente el hospital de Herlev en Dinamarca ha implantado una unidad piloto con una etapa inicial de tratamiento biológico combinado con membranas cerámicas y una etapa final de afino con carbón activado y ozonización (Project partners: Herlev Hospital – Jess Krarup, 2015).

2.2.2. Aguas superficiales naturales

Actualmente, numerosos contaminantes farmacéuticos y algunos productos de transformación o metabolitos han sido detectados en cauces naturales de agua (ríos y lagos), aguas subterráneas e incluso en aguas de consumo. Una larga lista, de más de 160 sustancias, conforma todas aquellas que han sido encontradas en diversos sistemas acuáticos a muy bajas concentraciones (ng/L y µg/L), en países como Estados Unidos, Japón, Inglaterra, Finlandia y España (Kümmerer, 2010). En la Tabla 2.8, se recoge una recopilación de las concentraciones detectadas de estos compuestos por familias terapéuticas en varios tipos de aguas naturales y efluentes de depuradora (Gogoi y col., 2018).

Tabla 2.8. Concentraciones de familias de compuestos farmacéuticos en diversos medios
(fuente: Gogoi y col., 2018)

Grupo farmacológico	Efluente de depuradora	Agua superficial	Agua subterránea	Agua consumo
Analgésico y antiinflamatorio	60 µg/L	5 µg/L	-	0,12 µg/L
Antibióticos	6 µg/L	1,9 µg/L	0,2 µg/L	-
Antiepilépticos	22 µg/L	1,8 µg/L	1,1 µg/L	0,05 µg/L
β-bloqueantes	9 µg/L	2 µg/L	-	0,27 µg/L
Hormonas	0,1-650 ng/L	0,1-17 ng/L	13-80 ng/L	0,2-2,1 ng/L
Reguladores del colesterol	5 µg/L	0,2 µg/L	7,5 µg/L	0,17 µg/L

Como se puede observar en la Tabla 2.8, las aguas de consumo mostraron concentraciones de fármacos inferiores a las aguas superficiales o aguas subterráneas, siendo muy superiores en los efluentes de las depuradoras. Este hecho coincide con los resultados publicados previamente por otros autores donde ya se ha demostrado que su presencia en las aguas superficiales y subterráneas es considerablemente mayor que en el agua potable (Wilkinson y col., 2017; National Association of Clean Water Agencies, 2012; Benotti y Brownawell, 2009). Cabe destacar que los niveles de concentración detectados en aguas potables de consumo actualmente no suponen un riesgo inmediato para la salud humana. En 2003, Webb y col. evaluaron los riesgos de exposición de los humanos al consumir agua potable con trazas de estos contaminantes, concluyendo que consumir 2 litros diariamente no supondría un riesgo durante 70 años de vida. Sin embargo, el vertido continuo de estas sustancias al medioambiente sin ningún control puede producir su bioacumulación en el medio acuático, generando un riesgo potencial para el medioambiente y los organismos acuáticos, que sufren un mayor grado de exposición.

Un análisis pormenorizado de los estudios más relevantes dedicados al análisis de compuestos farmacéuticos en aguas superficiales y subterráneas se muestra en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9. Concentraciones de fármacos en diferentes medios

Fármaco	Situación/cauce	Concentración (ng/L)	Referencia
Analgésicos y antiinflamatorios			
Ácido acetilsalicílico	España (Galicia)	2.400	Rodil y col., (2012)
Diclofenaco	España (río Ebro)	148	Ferreira da Silva y col., (2011)
Ketoprofeno	España (río Ebro)	1.060	Ferreira da Silva y col., (2011)
Naproxeno	España (río Ebro)	84,4	Ferreira da Silva y col., (2011)
Paracetamol	España (Galicia)	750	Rodil y col., (2012)
	Estados Unidos	110	Kolpin y col., (2002)
	Italia (río Po)	40.000	Al Aukidy y col., (2012a)
Ibuprofeno	España (río Ebro)	872	Ferreira da Silva y col., (2011)
	Agua salada	700	Weigel y col. (2004)
	Canadá (agua dulce)	200	Li (2014)
	Italia (río Po)	470	Al Aukidy y col., (2012a)
	España (río Ebro)	277	Ferreira da Silva y col., (2011)
	España (Galicia)	7.500	Rodil y col., (2012)
Antibióticos			
Eritromicina	Estados Unidos	> 30	Focazio y col., (2008)
	España (río Ebro)	42	Ferreira da Silva y col., (2011)
Penicilina	Estados Unidos	> 30	Focazio y col., (2008)
Sulfametoxazol	España (agua dulce)	18	García-Galán y col., (2012)
	Canadá (agua dulce)	46	Van Stempvoort y col. (2013)
Sulpirida	España (agua dulce)	28	García-Galán y col., (2012)
Trimetoprima	Canadá (agua dulce)	2	Van Stempvoort y col. (2013)
Anticancerígenos			
Ciclofosfamida	Aguas superficiales	64,8	Moldovan y col., (2006)
Ifosfamida	Aguas superficiales	0,14	Buerge y col., (2006)
Tamoxifeno	Aguas superficiales	25	Coetsier y col., (2009)
Antiepilépticos y psiquiátricos			
Carbamazepina	España (río Ebro)	50	Ferreira da Silva y col., (2011)
		50	Stackelberg y col. (2004)
β-bloqueantes			
Atenolol	Francia(subterránea)	> 30	Vulliet y Cren-Olivé, (2011)
	Korea (superficial)	690	Kim y col., (2009)
	Inglaterra(superficial)	680	Kasprzyk-Hordern y col., (2008)
	España (río Ebro)	1.237	Ferreira da Silva y col., (2011)
	España (Galicia)	900	Rodil y col., (2012)
Diuréticos			
Hidroclorotiazida	España (río Ebro)	> 186	Ferreira da Silva y col., (2011)
Furosemida	España (río Ebro)	> 93	Ferreira da Silva y col., (2011)
Reguladores del colesterol			
Gemfibrozilo	España (río Ebro)	212	Ferreira da Silva y col., (2011)

El grupo de compuestos mayoritario detectado en aguas superficiales corresponde a la familia de los analgésicos y antiinflamatorios, destacando entre otros: el ibuprofeno, paracetamol, naproxeno, ketoprofeno y diclofenaco, así como algunos de sus metabolitos. Weigel y col. (2004) cuantificaron la concentración del ibuprofeno en el mar en 700 ng/L, siendo ligeramente menor en cauces naturales de agua dulce con niveles de 200 ng/L en Canadá (Li, 2014), 470 ng/L en el río Po, Italia (Al Aukidy y col., 2012), 277 ng/L en el río Ebro, España (Ferreira da Silva y col., 2011) y 7,5 µg/L en aguas gallegas, España (Rodil y col., 2012). El paracetamol está considerado como uno de los fármacos más consumidos a nivel mundial y esto se refleja en las concentraciones presentes en los cauces naturales de agua. Así, en un muestreo realizado en Estado Unidos se detectó la presencia de este contaminante a niveles medios de 110 ng/L en el 24 % de las muestras recogidas (Kolpin y col., 2002). Estos valores de concentración aumentaron en las cuencas de río europeos como el Po (Italia) hasta 40 µg/L (Al Aukidy y col., 2012) o el Ebro (España) hasta 872 ng/L (Ferreira da Silva y col., 2011). El naproxeno también se detectó en ríos de Canadá con valores de 550 ng/L (Li, 2014), en Italia con una concentración de 81 ng/L (Al Aukidy y col., 2012) y en aguas gallegas o en la cuenca del Ebro, con valores de 0,75 µg/L y 87,4 ng/L, respectivamente (Ferreira da Silva y col., 2011; Rodil y col., 2012). Finalmente, otros analgésicos como el ketoprofeno, el diclofenaco o el ácido acetilsalicílico también conforman la lista de fármacos detectados en ríos con concentraciones considerablemente altas (1.060 ng/L, 148 ng/L y 2,4 µg/L respectivamente) (Ferreira da Silva y col., 2011; Rodil y col., 2012).

La siguiente familia terapéutica más destacable son los antibióticos. La eritromicina y penicilina fueron detectados en aguas superficiales y subterráneas de Estados Unidos en niveles superiores a los 30 ng/L (Focazio y col., 2008). A nivel nacional, la eritromicina también se detectó en concentraciones similares (42 ng/L) en la cuenca del Ebro (Ferreira da Silva y col., 2011) y otras sulfonamidas como el sulfametoxazol o sulpirida se encontraron en España en cantidades superiores a los 18 y 28 ng/L, así como sus respectivos metabolitos acetilados en 9 y 52 ng/L (García-Galán y col., 2012). Van Stempvoort y col. (2013) también identificaron trimetoprima y sulfametoxazol en aguas subterráneas de Canadá (2 y 46 ng/L).

Los fármacos psiquiátricos como los antiepilépticos, entre los que destaca la carbamazepina, fueron fármacos presentes en varios estudios realizados en diferentes países. Ferreira da Silva y col. (2011) y Stackelberg y col. (2004) documentaron la presencia de este compuesto en aguas naturales con una concentración aproximada de 50 ng/L. Por otra parte, de la familia de los β-bloqueantes destaca el atenolol, el cual se ha detectado en numerosos países tanto en aguas superficiales como subterráneas con concentraciones muy variadas: Francia

(>30 ng/L en agua subterránea; Vulliet y Cren-Olivé, 2011), Corea (690 ng/L; Kim y col., 2009), Inglaterra (680 ng/L; Kasprzyk-Hordern y col., 2008) y España (1.237 ng/L a 900 ng/L; Ferreira da Silva y col., 2011; Rodil y col., 2012).

Otros grupos minoritarios como hormonas, diuréticos, reguladores del colesterol y anticancerígenos también se han identificado en los análisis de aguas superficiales. Anticancerígenos como ciclofosfamida, ifosfamida o tamoxifeno se detectaron en variadas concentraciones desde 0,14 a 65 ng/L (Coetsier y col., 2009; Buerge y col., 2006; Moldovan y col., 2006). Entre los diuréticos y reguladores del colesterol destacan algunos como la hidroclorotiazida (> 186 ng/L), la furosemida (>93 ng/L) o el gemfibrozilo (212 ng/L) recogidos en estudios realizados en España (Ferreira da Silva y col., 2011).

2.2.3. Riesgos medioambientales

Como ha quedado reflejado en el apartado anterior, diversos contaminantes farmacéuticos dentro del grupo de los microcontaminantes orgánicos emergentes han sido detectados en numerosas ocasiones en cauces naturales de agua. Actualmente, aunque aún es difícil establecer una relación causa-efecto directa sobre las consecuencias adversas de éstos en el medio acuático, diferentes estudios ya han demostrado como las hormonas o los β -bloqueantes crean cambios en la reproducción de los peces (Kidd y col., 2007) o inhiben la fotosíntesis de las algas (Escher y col., 2006). En la Tabla 2.10, se resumen los principales efectos adversos provocados en el medioambiente por la presencia de estos contaminantes. Como se puede observar, crean problemas en los procesos reproductivos y psicológicos, aumentan los índices de cáncer y ayudan a desarrollar genes mutantes resistentes a antibióticos en los microorganismos bacterianos.

Generalmente, estos trabajos estudian la ecotoxicidad individual de cada compuesto. Sin embargo, la realidad es diferente, ya que suelen encontrarse en matrices de agua complejas donde hay una gran variedad y mezcla de todos ellos. Por ello, es necesario considerar las interacciones y sinergias que pueden existir al combinarse en un mismo medio. Para tener en cuenta todas las variables se utilizan índices de riesgo o peligro medioambiental (*risk quotient* o *hazard quotient* - RQ o HQ) con los cuales se evalúa la ecotoxicidad global de productos farmacéuticos sobre el medio acuático (EMEA-European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2006).

Tabla 2.10. Efectos causados en el medioambiente por los compuestos farmacéuticos (fuente: Gogoi y col., 2018)

Grupo farmacológico	Ejemplo de fármaco	Efecto negativo
Antibióticos ^(a) ^(b) ^(c)	Penicilina	Resistencia bacteriana patógena
	Sulfonamidas	Alteración del microbiota natural
	Tetraciclinas	Alteraciones en la cadena alimenticia
	Claritromicina, Tilosina	Inhibición en el crecimiento de las algas
Antiinflamatorio ^(e)	Diclofenaco	Lesiones renales y branquiales
Antiepiléptico y psiquiátrico ^(f)	Carbamazepina	Estrés en los peces
β -bloqueante ^(h)	Propranolol	Inhibición en la fotosíntesis de las algas Cambios ciclo reproductivo de los peces
Estimulante psiquiátrico ^(d)	Cafeína	Alteraciones endocrinas en los peces
Hormonas ^(a)	Estrona y estradiol	Cambios hormonales en peces macho
Reguladores colesterol ^(g)	Gemfibrozilo	Inhibición en el crecimiento de las algas Efectos hormonales que aumentan el riesgo de cáncer de mama en humanos
Reguladores endocrinos ⁽ⁱ⁾ ^(j)	Tiroxina	Efectos hormonales femeninos en hombres

(a) Witte, 1998; (b) Daughton y Ternes, 1999 (c) Yang y Ray, 2008; (d) Li y col., 2012; (e) Schwaiger y col., 2004; (f) Li y col., 2010; (g) Rosal y col., 2010 b; (h) Huggett y col., 2002; (i) Kirschner y col., 1997; (j) Dodds y Lawson, 1938

Estos índices relacionan la concentración ambiental medida o estimada (*predicted environmental concentration-PEC*) con la concentración establecida sin efecto (*predicted non-effect concentration-PNEC*). La estimación del PNEC de cada compuesto es un factor fundamental a la hora de determinar el riesgo ambiental en base a estos índices. El PNEC se calcula a partir de la concentración mínima que causa un efecto de toxicidad crónica (EC50) o según la dosis letal media (LC50) sobre uno de los tres niveles tróficos analizados: algas, *daphnia* o peces. Usualmente, como margen de seguridad, se establece como PNEC una concentración 1.000 veces inferior a la previamente determinada en estos ensayos toxicológicos. De este modo, una elevada concentración de un compuesto farmacéutico en el agua no conlleva necesariamente un mayor riesgo ambiental (Escher y col., 2011), ya que dicho valor podría ser inferior al PNEC de ese compuesto. Los compuestos farmacéuticos que tengan menores valores de PNEC serán aquéllos que pueden tener un mayor riesgo o peligro ambiental, pues concentraciones muy bajas en el medio podrían superar su valor mínimo de concentración sin efecto (PNEC).

En la Tabla 2.11, se muestran los valores de EC50 o LC50 de algunos de los microcontaminantes farmacéuticos más habituales encontrados en aguas residuales, usados en el cálculo de sus respectivos PNEC.

Tabla 2.11. Valores de toxicidad obtenidos para diferentes compuestos farmacéuticos

Grupo farmacológico	Fármaco	Ensayo toxicológico	Concentración (mg/L)
Agentes de contraste	Iomeprol ^(d)	EC50	256
Analgésicos y antiinflamatorios	Diclofenaco ^(a)	LC50	710
	Ibuprofeno ^(b)	LC50	0,001
	Ketoprofeno ^(d)	EC50	2
	Naproxeno ^(c)	EC50	3,7
	Metamizol ^(b)	LC50	0,005
	Paracetamol ^(b)	LC50	160
Antibióticos	Amoxicilina ^(b)	LC50	0,003
	Azitromicina ^(c)	EC50	0,002
	Ciprofloxacina ^(c)	EC50	0,005
	Claritromicina ^(d)	EC50	0,002
	Eritromicina ^(c)	EC50	0,02
	Ofloxacino ^(d)	EC50	0,005
	Sulfametoxazol ^(c)	EC50	0,027
	Trimetoprima ^(a)	LC50	0,058
Antiepilépticos y psiquiátricos	Carbamazepina ^(a)	LC50	168
	Diazepam ^(d)	EC50	4,2
	Lorazepam ^(d)	EC50	1.683
B-bloqueantes	Atenolol ^(c)	LC50	20
	Metoprolol ^(d)	EC50	6,15
	Propranolol ^(d)	EC50	0,05
Diuréticos	Hidroclorotiazida ^(a)	LC50	298
Estimulantes	Cafeína ^(a)	LC50	40
Reguladores colesterol	Gemfibrozilo ^(a)	LC50	851

(a) Bai y col., 2018; (b) Gómez-Canela y col., 2019; (c) Lucas y col., 2016; (d) Mendoza y col., 2015

Como se puede observar en la Tabla 2.11, los antibióticos son los compuestos que muestran un mayor riesgo medioambiental pues tienen los valores de EC50 o LC50 más bajos, destacando la amoxicilina y ciprofloxacina, compuestos incluidos en la última lista de observación de sustancias prioritarias del agua (2018/840/UE). La alta toxicidad de los antibióticos ya ha sido destacada en diferentes trabajos (Gómez-Canela y col., 2019; Semerjian y col., 2018), a pesar de encontrarse en menores concentraciones que analgésicos como el paracetamol o ibuprofeno en los efluentes de depuradoras y en medios acuáticos naturales. Así, Gómez-Canela y col. (2019), en un estudio realizado sobre aguas naturales catalanas donde se analizaron 165 compuestos, concluyeron que la amoxicilina y metamizol fueron los fármacos con mayor contribución al riesgo ambiental. Por el contrario, destacaron que el ibuprofeno y paracetamol, a pesar de encontrarse en una mayor concentración, poseían menor riesgo ambiental. Semerjian y col. (2018) demostraron también que los fármacos presentes en un efluente depuradora con mayor riesgo ambiental eran los antibióticos (metoprolol, ciprofloxacina, eritromicina, ofloxacino, sulfadiazina y

sulfametoxazol) junto con el paracetamol y la sulpirida. Para el caso de cuatro aguas hospitalarias procedentes de Coímbra (Portugal), ciprofloxacino, ofloxacino e ibuprofeno fueron los compuestos que mostraron mayor riesgo ambiental para los tres niveles tróficos, aunque en el caso del ibuprofeno fue debido a su alta concentración (Santos y col., 2013).

Finalmente, cabe destacar que muchos de estos compuestos tienen potencial de bio-acumulación en el medio acuático y terrestre. Son varios los estudios que han demostrado la presencia de estos compuestos en sedimentos, suelos y fangos (Ferreira da Silva y col., 2011). La persistencia de estos compuestos hace que su riesgo ambiental potencial aumente considerablemente, ya que no solamente implican una consecuencia puntual, sino que pueden llegar a desarrollar efectos negativos crónicos. Actualmente, existen otros parámetros como el PBT (*persistent, bioaccumulative and toxic substances*) los cuales no solamente tienen en cuenta la toxicidad del compuesto (T), sino también su persistencia (P) y bio-acumulación (B). Sin embargo, la falta de datos y la complejidad en su cuantificación hacen que hoy en día sea aún complicado establecer límites de vertido, sistemas monitorizados de detección o incluso una legislación que regule estos microcontaminantes emergentes.

2.3. ELIMINACIÓN DE MICROCONTAMINANTES FARMACÉUTICOS EN ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES (EDARs)

La Directiva 91/271/CEE define los sistemas de recogida, tratamiento y vertido necesarios para el correcto funcionamiento de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) y expone la obligación de realizar un tratamiento primario, secundario o una combinación de ambos. Además, establece unos límites de vertido de obligado cumplimiento para evitar la evacuación de aguas residuales tratadas insuficientemente al medio (Tabla 2.12).

Tabla 2.12. Requisitos por los vertidos procedentes de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas (Directiva 91/271/CEE)

Parámetro	Concentración	Porcentaje mínimo de reducción
Demanda bioquímica de oxígeno sin nitrificación (DBO ₅ a 20 °C)	25 mg/L O ₂	70-90
Demanda química de oxígeno (DQO)	125 mg/L O ₂	75
Total sólidos en suspensión	35 mg/L	90
ZONAS SENSIBLES PROPENSAS A EUTROFIZACIÓN (> 100.000 habitantes-equivalentes)		
Fósforo total	1 mg/L	80
Nitrógeno total	10 mg/L	70-80

Las EDAR cuentan con dos líneas de tratamiento: la **línea de aguas** y la **línea de fangos**. En la Figura 2.4, se presenta un diagrama general de los diferentes tratamientos que comprenden cada una de las líneas. Centrándonos en la línea de tratamiento de aguas, las EDARs están diseñadas principalmente para eliminar los sólidos en suspensión y la materia orgánica. En algunas de ellas se pueden encontrar también tratamientos terciarios focalizados en la eliminación de nutrientes (compuestos de nitrógeno y fósforo) y procesos de desinfección para la eliminación de patógenos. Sin embargo, pocas plantas incorporan en sus líneas de tratamiento procesos para eliminar contaminantes emergentes, metales pesados u otros micro-contaminantes.

Dentro de la línea de tratamiento de aguas, **el pretratamiento y el tratamiento primario** eliminan principalmente los sólidos totales y sólidos en suspensión presentes en el agua residual mediante la utilización de procesos mecánicos y fisicoquímicos. Previamente a este tratamiento, el agua residual bruta debe ser acondicionada en un pretratamiento basado en el desbaste de los sólidos más grandes. Generalmente, la eliminación de los sólidos durante estas etapas es aproximadamente de un 98 % para los sólidos sedimentables y entre el 45 - 85 % para los sólidos en suspensión. Asimismo, también suele producirse una reducción del 30 - 50 % de la DBO₅ (Martín García y col., 2006).

Posteriormente el **tratamiento secundario** reduce biológicamente la materia orgánica disuelta en el agua residual. Comúnmente, este proceso es un tratamiento biológico en condiciones aerobias donde los microorganismos, fundamentalmente bacterias, biodegradan la materia orgánica soluble. El proceso de fangos activos es actualmente la tecnología más utilizada a nivel mundial. En sus distintas modalidades, en este proceso, el cultivo biológico se encuentra en suspensión en la cuba de un

biorreactor (reactores de flujo pistón, mezcla completa o secuenciales, así como tanques profundos o lagunas aireadas, son algunos de los más comunes). Otro tipo de sistemas utilizados, son los biorreactores de cultivo fijo donde los microorganismos se encuentran adheridos en forma de biopelícula a una superficie. Entre ellos, destacan reactores basados en filtros percoladores, contactores biológicos rotativos o bio-filtros activados. Actualmente, también se han desarrollado a nivel comercial procesos híbridos con biomasa en suspensión e inmovilizada sobre soportes plásticos (*IFAS- Integrated Fixes Activated Sludge*; Shreve y Brennan, 2019) o biorreactores de membrana que combina un sistema de lodos activos convencional con un proceso de membrana para obtener un efluente de mayor calidad y separar el fango del efluente (Tan y col., 2019). Habitualmente, tras el tratamiento biológico, se reduce la carga de materia orgánica soluble en un 80 - 95 % y los sólidos en suspensión en un 80 - 90 % (Martín García y col., 2006).

Finalmente, puede existir un **tratamiento terciario**, con procesos adicionales que tienen la finalidad de alcanzar los límites de vertido en cuanto a nutrientes o cumplir los criterios del Real Decreto 1620/2007 para la reutilización de aguas en sus diferentes usos en términos de reducción de microorganismos (nematodos intestinales y *E. coli*), sólidos en suspensión o turbidez. Procesos químicos y biológicos en diferentes condiciones se han empleado fundamentalmente para la eliminación de nutrientes mientras que una variedad más amplia de procesos se ha empleado para obtener los estándares de calidad de aguas para su reutilización como la desinfección (cloro, ozono, radiación UV), adsorción con carbón activo, lechos de filtración en arena o procesos de membranas (osmosis inversa, ultra y microfiltración).

En los procesos de la línea de tratamiento de aguas, se generan fangos residuales (primario o secundario), que son tratados en la **línea de fangos** mediante procesos convencionales de espesamiento para eliminación parcial del agua, estabilización por digestión aerobia o anaerobia y deshidratación final del fango para su valorización o gestión final.

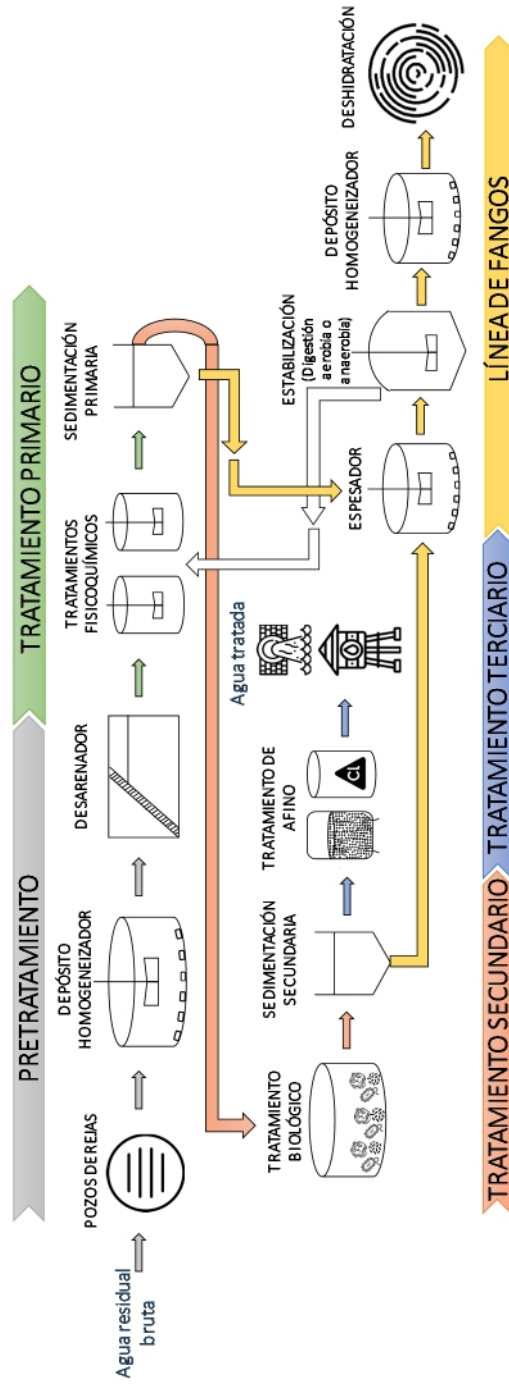


Figura 2.4. Esquema general de una EDAR (adaptación del Metcalf & Eddy y col., 1998)

Las EDARs están diseñadas para depurar grandes volúmenes de aguas residuales en un tratamiento centralizado donde las tecnologías dispuestas están focalizadas en la reducción de los contaminantes regulados en las normativas actuales, como la demanda biológica y química de oxígeno, los sólidos totales o los nutrientes, entre otros. Sin embargo, las plantas de depuración actuales no han sido diseñadas para eliminar microcontaminantes emergentes, lo que hace que la eficacia de eliminación de estas tecnologías convencionales sea muy reducida para la mayoría de los casos (Deblonde y col., 2011). De este modo, los efluentes de las EDARs, a pesar de ser aguas ya tratadas, son una de las principales fuentes de contaminación de los cauces naturales (Tondera y col., 2018).

En la Tabla 2.13, se muestra un resumen de las eficacias de eliminación obtenidas en diferentes EDARs para los compuestos farmacéuticos detectados mayoritariamente en los influentes de las depuradoras (Han-Tran y col., 2017; Thiebault y col., 2017; Bollmann y col., 2016; Verlicchi y col., 2013 a; Martín y col., 2012; Deblonde y col., 2011; Jelic y col., 2011; Rosal y col., 2010 a; Vieno y col., 2007; Metcalfe y col., 2003). Todos ellos son estudios realizados en EDARs reales, que presentan diferentes tratamientos biológicos y químicos que operan bajo múltiples condiciones.

Por lo general, los sistemas de fangos activos presentan eficacias menores que las tecnologías combinadas donde se obtienen efluentes de mayor calidad. En la Tabla 2.13, se observa que los productos farmacéuticos eliminados fácilmente durante los tratamientos de fangos activos (cafeína, ibuprofeno o paracetamol) se eliminan igualmente bien en el resto de los tratamientos considerados. Sin embargo, cuando la eficacia de eliminación es baja durante este tratamiento, su eliminación mejora con los procesos combinados (fangos activos con nitrificación y desnitrificación, o con una etapa anóxica o biodegradación multietapa aerobia y anaerobia). Aun así, la eficiencia de eliminación en la mayoría de los casos está lejos de ser completa. Por otro lado, en algunos casos (atenolol, claritromicina, eritromicina, hidroclorotiazida, metronidazol, metoprolol, propanolol), las eficiencias de eliminación reportadas no mejoraron considerablemente en los procesos combinados respecto a los sistemas de fangos activos.

Tabla 2.13. Eficacias de eliminación de compuestos farmacéuticos en EDARs

Fármaco	Tratamiento	Eliminación (%)	Referencia
Ácido clorifébrico	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	80	(a)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	54	(b)
	Fangos activos	39	(c)
Antipirina	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	46	(b)
	Fangos activos	9-65	(c) (d)
	Fangos activos anóxicos/aeróbicos	90-96	(e)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	65	(a)
Atenolol	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	14	(b)
	Fangos activos	36 - 63	(c) (f) (g)
Azitromicina	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	-1	(a)
Cafeína	Fangos activos anóxicos/aeróbicos	100	(e)
	Fangos activos	91-97	(c) (h)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	94	(b)
Carbamazepina	Fangos activos anóxicos/aeróbicos	0-19	(e)
	Fangos activos	-21 - 88	(h) (i)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	10	(b)
Ciprofloxacina	Fangos activos	62	(c)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	57	(b)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	71	(a)
Claritromicina	Fangos activos	56	(c)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	8	(a)
Diclofenaco	Fangos activos anóxicos/aeróbicos	-17 a 29	(e)
	Fangos activos	-15 a 55	(c) (d) (f) (h)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	35	(a)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	5	(b)
Estrona	Fangos activos	0	(h)
Eritromicina	Fangos activos	49	(c)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	4	(b)
Furosemida	Fangos activos	60	(c)

Tabla 2.13. (Continuación) Eficiencias de eliminación de compuestos farmacéuticos en EDARs

Fármaco	Tratamiento	Eliminación (%)	Referencia
Gemfibrozilo	Fangos activos	-7-52	(c) (h)
	Fangos activos anóxicos/aeróbicos	75-83	(e)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	46	(a)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	76	(b)
Hidroclorotiazida	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	53	(b)
	Fangos activos	53	(c)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	57	(a)
Ibuprofeno	Fangos activos anóxicos/aeróbicos	97-98	(e)
	Fangos activos	74 -100	(c) (d)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	92	(a)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	95	(b)
Iohexol	Fangos activos	60	(c)
	Fangos activos anóxicos/aeróbicos	7-70	(e)
Iopamidol	Fangos activos	17	(c)
Ketoprofeno	Fangos activos	31 - 100	(c) (f) (i)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	49	(a)
Metronidazol	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	39	(b)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	34	(a)
	Fangos activos	39	(c)
Metoprolol	Fangos activos	34- 56	(c) (g)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	29	(a)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	7	(b)
Naproxeno	Fangos activos	82	(c)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	61	(b)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	79	(a)
Ofloxacino	Fangos activos	65	(c)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	64	(b)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	61	(a)

Tabla 2.13. (Continuación) Eficiencias de eliminación de compuestos farmacéuticos en EDARs

Fármaco	Tratamiento	Eliminación (%)	Referencia
Paracetamol	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	100	(b)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	96	(a)
Propranolol	Fangos activos	49	(c)
	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	29	(a)
Ranitidina	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	30	(a)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	31	(b)
	Fangos activos	18	(c)
Sulfametoxazol	Fangos activos con nitrificación/desnitrificación	52	(a)
	Biodegradación anaerobia/aerobia (A2O) multietapa	17	(b)
	Fangos activos	18	(c)
Sulpirida	Fangos activos anóxicos/aeróbicos	10-74	(e)
	Fangos activos	0 - 84	(c) (f)

(a) Verlicchi y col., 2013 a; (b) Rosal y col., 2010 a; (c) Deblonde y col., 2011; (d) Thiebault y col., 2017; (e) Han-Tran y col., 2017; (f) Jelic y col. 2011; (g) Vieno y col. 2007; (h) Martin y col., 2012; (i) Metcalfe y col. 2003; (f) Bollmann y col., 2016

En la Figura 2.5, se recogen los valores medios y los rangos de las eficacias de eliminación de los compuestos farmacéuticos recogidos en la Tabla 2.13. Otra de las conclusiones más importantes extraída de la comparativa de estos estudios, es que existe una significativa dispersión entre los datos de eliminación obtenidos para las diferentes depuradoras estudiadas. Principalmente, como se ha comentado anteriormente, el tipo de tratamiento presente en la depuradora hace que se obtengan mayores o menores eficacias de eliminación. Sin embargo, esta disparidad no solo se debe al tipo de tratamiento utilizado sino también a las características fisicoquímicas de cada contaminante farmacéutico, los efectos estacionales, la metodología utilizada para el muestreo o la concentración inicial de microcontaminantes presentes en el agua residual urbana de entrada a la depuradora (Rodríguez-couto y col., 2019). Todos estos factores tienen un alto impacto en las reducciones alcanzadas, haciendo difícil la comparativa entre diferentes plantas de tratamiento, o incluso entre las plantas de tratamiento operando en diferentes épocas del año.

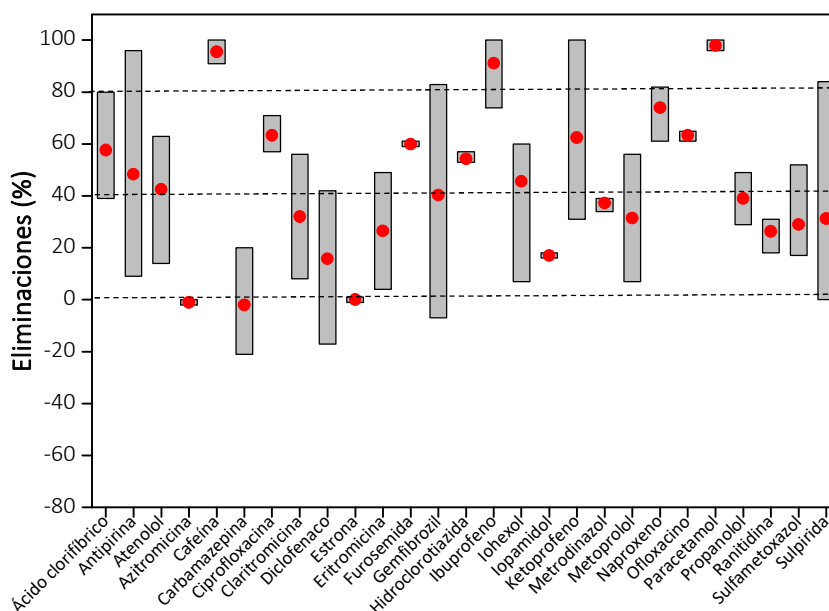


Figura 2.5. Valores medios y rango de eficacias de eliminación de los compuestos farmacéuticos en diferentes EDARs urbanas. Adaptado de: Han-Tran y col., 2017; Thiebault y col., 2017; Bollmann y col., 2016; Verlicchi y col., 2013 a; Martín y col., 2012; Deblonde y col., 2011; Jelic y col., 2011; Rosal y col., 2010 a; Vieno y col., 2007; Metcalfe y col., 2003.

A pesar de la variabilidad, se observa que, de los veintisiete compuestos estudiados, trece muestran tasas de eliminación medias inferiores al 40 %: carbamazepina, el grupo de antibióticos macrólidos (azitromicina, claritromicina, eritromicina) junto con el diclofenaco, fármacos añadidos en las últimas listas de observación de sustancias prioritarias del agua (2015/495/UE y 2018/840/UE), y los agentes de contraste (iopamidol e iohexol). Por otro lado, compuestos pertenecientes a la familia de los estimulantes o analgésicos y antiinflamatorios (cafeína, ibuprofeno y paracetamol) muestran una mayor eliminación en las EDARs convencionales, con valores superiores al 90%. El resto de los fármacos han mostrado tasas moderadas y variables entre un 40 y 90 %.

Debido a la diferente naturaleza que tienen todos estos compuestos farmacéuticos, en los últimos años, se han publicado varios trabajos en los que se ha buscado una relación entre las características moleculares y propiedades fisicoquímicas de estos contaminantes y su eficacia de eliminación. Algunos de ellos, proponen utilizar las propiedades de hidrofobicidad de los compuestos y la presencia en su estructura de grupos dadores o aceptores de electrones como criterios para

analizar la eficacia de eliminación en sistemas biológicos de tratamiento de aguas (Tadkaew y col., 2011). Sin embargo, otros investigadores sugieren que este análisis muestra ciertas limitaciones ya que consideran la posible disociación de las moléculas, así como las interacciones electrostáticas que hacen que parte de los contaminantes se adsorban en la biomasa del reactor biológico. De este modo, parámetros como el coeficiente de reparto (K_{OW}), el pKa o la estructura molecular del fármaco son factores que pueden ser también determinantes en la eliminación de estos compuestos en el tratamiento biológico de las depuradoras (Rodríguez-couto y col., 2019; Han-Tran y col., 2017).

En función de los parámetros descritos, los fármacos con grupos dadores de electrones en su estructura, o cuyos grupos aceptores estén en menor proporción que los dadores, presentan elevadas tasas de eliminación en los tratamientos biológicos. Además, también muestran buenas tasas de eliminación los fármacos que se encuentran no disociados parcialmente en el medio ($pK_a > pH_{medio}$, Tabla 7.1 del Anexo 7.1). Por ejemplo, el ibuprofeno, paracetamol o caféina son fármacos que recopilan estas características y en todos los estudios analizados de depuradoras se han observado eliminaciones medias superiores al 90 % (Figura 2.5, Tabla 2.13). Por el contrario, los fármacos con menores eliminaciones (carbamazepina, claritromicina, eritromicina, iopamidol y sulfametoxazol) presentan mayoritariamente en su estructura grupos aceptores de electrones y bajos valores de pKa (Han-Tran y col., 2017; Rosal y col., 2010 a).

En cualquier caso, debido a los problemas medioambientales potenciales derivados de estos contaminantes en las aguas y a la eficacia de eliminación tan dispar que presentan las tecnologías de depuración convencionales, es necesario el planteamiento de nuevas alternativas de tratamiento o mejoras sobre las ya existentes, de modo que no solamente sean efectivas en la reducción de los parámetros regulados legalmente, sino también en la eliminación este tipo de microcontaminantes. Asimismo, las alternativas propuestas también podrían plantearse para el tratamiento descentralizado de aguas residuales con alta carga de microcontaminantes orgánicos farmacéuticos, como es el caso de los efluentes procedentes de los centros hospitalarios, reduciendo así uno de sus principales focos de emisión y evitando su traslado a las EDARs urbanas por los colectores de saneamiento general.

El desarrollo de tratamientos avanzados de depuración constituye un objetivo esencial en las EDAR para alcanzar los límites de vertido o estándares de calidad para la posterior reutilización del agua. Durante los últimos años, se han desarrollado diversas tecnologías como tratamiento final de afino, en muchas ocasiones dentro de los denominados tratamientos terciarios. La mayoría de ellas se podrían clasificar en

tres grupos principales: tecnologías de separación (adsorción, membranas y filtración), tratamientos biológicos avanzados o procesos de oxidación avanzada. Una gran parte de estas tecnologías se han centrado en la eliminación de nutrientes, metales pesados y microcontaminantes emergentes. Sin embargo, a día de hoy, los trabajos centrados en la eliminación de microcontaminantes siguen siendo limitados y difícilmente escalables (Rodríguez-Narvaez y col., 2017). A continuación, se resumen las principales tecnologías propuestas hasta el momento.

2.4. TECNOLOGÍAS PARA LA ELIMINACIÓN DE MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EMERGENTES

2.4.1. Procesos físicos

Estas tecnologías se basan en la separación y retirada de los microcontaminantes del efluente acuoso. Este tipo de procesos constituyen un grupo muy consolidado para el tratamiento descentralizado de pequeños volúmenes de agua, aunque alguno de ellos ya se ha implantado a mayor escala (Rizzo y col., 2019). Entre todas las tecnologías, la adsorción es uno de los procesos más utilizados para la eliminación de microcontaminantes emergentes como los compuestos farmacéuticos. La eficacia de la eliminación por adsorción depende en gran parte del adsorbente y del tipo de contaminante. Numerosos materiales han sido utilizados para la eliminación de fármacos, pesticidas, metales, etc., destacando los tratamientos de adsorción sobre carbón activo, carbón vegetal, arcillas, zeolitas y materiales más innovadores como nanotubos de carbono o grafeno (Sophia y Lima, 2018).

El carbón activo es uno de los materiales más utilizados para la eliminación de microcontaminantes debido a su alta porosidad y superficie específica. Habitualmente, estas propiedades ayudan a que se obtengan altas eficacias de eliminación, siendo superiores en la mayoría de ocasiones al 65 % (Rodríguez-Narvaez y col., 2017). Del mismo modo, la adsorción de diferentes compuestos farmacéuticos (tetraciclina, ciprofloxacina, ibuprofeno, amoxicilina, diclofenaco, paracetamol y cafeína) sobre bio-carbones activos preparados a partir materiales naturales (madera, cascara de cacahuete, arroz, huesos de aceitunas, etc.) también ha sido ampliamente estudiada en bibliografía, aunque los resultados obtenidos se encuentran alejados de los obtenidos con carbones activos más convencionales (Huang y col., 2014; Pouretedal y Sadegh, 2014; Torres-Pérez y col., 2012; Sotelo y col., 2012; Ruiz y col., 2010; Zheng y col., 2013; Liu y col., 2012; Yao y col., 2012). La utilización de nanotubos de carbono como adsorbente es una alternativa muy prometedora debido a su

elevada área superficial y su gran porosidad. Se han probado para eliminar amoxicilina, ciprofloxacina, ibuprofeno, cafeína, tetraciclina y ofloxacino de diferentes matrices acuosas. En función del tipo de nanotubos utilizado (pared simple, pared doble, etc.), las eliminaciones son variables entre un 10 - 100 % (Kang y col., 2019; Arfanis y col., 2017; Mohammadi y col., 2015; Peng y col., 2012). Finalmente, el grafeno se ha utilizado satisfactoriamente como adsorbente de diversos microcontaminantes modelo como el bisfenol A (Xu y col., 2012), sulfametoxazol (Hao Chen y col., 2014), diclofenaco (Jauris y col., 2016), cafeína o paracetamol (Al-Khateeb y col., 2014) obteniendo eliminaciones superiores al 80 % en todos los casos.

Otra de las tecnologías consolidadas dentro de los procesos físicos son la separación de los microcontaminantes mediante membranas, fabricadas de diferentes materiales en función de las especificaciones de filtrado (tamaño de poro, carga superficial o hidrofobicidad). Los procesos con membranas están basados en el uso de la presión hidrostática para separar generalmente sólidos en suspensión o compuestos de alto peso molecular. La filtración por membranas se puede clasificar según su tamaño de poro (de mayor a menor) en microfiltración (1 a 0,1 μm), ultrafiltración (0,1 a 0,01 μm), nanofiltración (0,01 a 0,001 μm), osmosis y osmosis inversa (0,001 a 0,0001 μm) (Rodríguez-Narvaez y col., 2017).

La eliminación de microcontaminantes emergentes se ha estudiado ampliamente con membranas de ultrafiltración alcanzándose tasas de eliminación muy variables: paracetamol (11-20 %), metoprolol (8-49 %), cafeína (2-21 %), antipirina (6-23 %), sulfametoxazol (10-40 %), diclofenaco (26-68 %), bisfenol A (75-98 %), naproxeno (70 %), gemfibrozilo (95 %), ibuprofeno (60 %) y carbamazepina (15 %) (Melo-Guimaraes y col., 2013; Heo y col., 2012; Acero y col., 2010). Sin embargo, en la última década se han desarrollado tratamientos de osmosis inversa y nanofiltración que han permitido mejorar las tasas de eliminación hasta un 99 % para compuestos como paracetamol, cafeína, sulfametoxazol, carbamazepina, ibuprofeno, naproxeno y bisfenol A (Yangali-Quintanilla y col., 2010).

2.4.2. Procesos biológicos

Como ya se mostró anteriormente, los tratamientos biológicos de fangos activos muestran bajas eliminaciones para una gran variedad de familias terapéuticas (antibióticos, antiepilépticos, β -bloqueantes, diuréticos, hormonas, psiquiátricos, etc.) (Ahmed y col., 2017). Este hecho hace necesario el planteamiento de nuevas alternativas de tratamiento biológico o mejoras sobre los sistemas convencionales, como son las tecnologías combinadas.

La aplicación de condiciones anaeróbicas en los sistemas de fangos activos y los procesos de nitrificación y desnitrificación en condiciones aerobias y anóxicas con bacterias autótrofas, han demostrado una mejora en la eliminación de microcontaminantes emergentes frente al tratamiento biológico convencional (Verlicchi y col., 2013 a; Rosal y col., 2010 a). De nuevo, la naturaleza del compuesto tiene una elevada influencia en la eficacia de este tipo de procesos biológicos. Así, ibuprofeno, naproxeno y eritromicina mostraron valores de eliminación superiores al 80 % durante estos tratamientos; mientras que otros compuestos como carbamazepina, diclofenaco o sulfametoxazol únicamente alcanzan valores de reducción inferiores al 20 % (Phan y col., 2014; Suarez y col., 2010).

Otra de las mejoras propuestas ha sido el uso de carbón activo en tratamientos de fangos activos para promover la acción combinada de la adsorción de los microcontaminantes y la degradación biológica de la materia orgánica (Jin y col., 2013). Esta tecnología mostró mejores eliminaciones que el tratamiento convencional para algunos compuestos farmacéuticos como el atenolol, carbamazepina, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, gemfibrozilo, sulfametoxazol y cafeína (Gerrity y col., 2011).

Los biorreactores de membrana también han mostrado un gran potencial en la eliminación de fármacos que son refractarios a los tratamientos convencionales. Este tipo de biorreactores permite trabajar con altas concentraciones de biomasa y desacoplar el tiempo de residencia hidráulico del tiempo de retención celular. Como consecuencia, se ha observado que los reactores de membrana con tiempos de residencia celular prolongados promueven una mayor eficiencia de biodegradación de contaminantes orgánicos refractarios. Hoy en día, los biorreactores de membrana son una propuesta muy atractiva para el tratamiento de las aguas residuales urbanas, debido a las recientes innovaciones técnicas y la reducción drástica de los costes de las membranas empleadas. En cualquier caso, estos sistemas han mostrado buenas tasas de eliminación para una gran variedad de productos analgésicos, antiinflamatorios, antibióticos y fármacos psiquiátricos (Monsalvo y col., 2014; Trinh y col., 2012).

Por otra parte, se han estudiado procesos biológicos basados en otros microorganismos como microalgas y hongos, los cuales han mostrado resultados prometedores en la eliminación de microcontaminantes emergentes en aguas residuales (García-Rodríguez y col., 2014). Así, el uso de microalgas es un proceso de creciente interés en los últimos años debido a las ventajas que éstas presentan: bajo consumo de nutrientes, fijación y recambio del carbono y generación de productos de alto valor añadido debido a su versátil metabolismo y capacidad de sobrevivir en condiciones extremas. Actualmente, la capacidad de las microalgas para eliminar

compuestos farmacéuticos ha sido demostrada con varias especies (*Scenedesmus oblicuo*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Desmodesmus subspicatus*, *Nannochloris sp.*, *Chlamydomonas mexicana*, *Scenedesmus oblicuo*, *Chlorella pyrenoidosa* y *Microcystis aeruginosa*) (Xiong y col., 2018). En concreto, su efectividad se ha demostrado en la eliminación de analgésicos (ibuprofeno, naproxeno, paracetamol y ketoprofeno) y antibióticos (ciprofloxacina, metoprolol, eritromicina, azitromicina o amoxicilina) (Matamoros y col., 2015), aunque siguen mostrando bajas reducciones para otros compuestos como la carbamazepina (Xiong y col., 2018; Garcia-Rodríguez y col., 2014).

Finalmente, los hongos de podredumbre blanca (WRF: *white-rot fungi*), entre los que se encuentra el *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Irpex lacteus* o *Pleurotus ostreatus*, también han mostrado un gran potencial debido al complejo sistema enzimático intra- y extracelular que poseen. Este grupo de hongos tiene la capacidad de generar radicales hidroxilo de elevado potencial oxidante para la oxidación de sustratos no biodegradables como los microcontaminantes farmacéuticos emergentes. Hasta el momento, son muchos los trabajos que han presentado eficaces reducciones de fármacos pertenecientes a diversas familias terapéuticas utilizando estos hongos. Sin embargo, las tasas obtenidas muestran importantes variaciones en función de las condiciones en las que se desarrolla el proceso y las características del agua residual (Mir-Tutusaus y col., 2018 a).

2.4.3. Procesos de oxidación avanzada

Los procesos de oxidación avanzada (PAO) se definen como procesos que implican la formación de radicales hidroxilo (Glaze y col., 1987). Estos radicales, de un potencial de oxidación ($E = 2,80 \text{ V}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) mucho mayor que el de otros oxidantes tradicionales (ozono, $2,07 \text{ V}$ o peróxido de hidrógeno, $1,78 \text{ V}$), son capaces de oxidar compuestos orgánicos disueltos en el agua de manera no selectiva, pudiendo alcanzar su mineralización completa. Los PAO han demostrado ser tecnologías muy efectivas para degradar compuestos tóxicos, refractarios y/o inhibitorios para los procesos biológicos convencionales (Kanakaraju y col., 2018; Wang y Wang, 2016; Wang y col., 2012).

Dentro de los PAO, podemos distinguir procesos que emplean reactivos químicos (ozono, peróxido de hidrógeno, persulfato) o aplicación de energía (radiación ultravioleta, irradiación de ultrasonidos, electricidad) para la generación de radicales hidroxilos. Precisamente, uno de los inconvenientes de estos procesos es el elevado coste de los reactivos empleados o el consumo energético de los sistemas de

irradiación. En la Figura 2.6 se muestra una clasificación de los principales PAO basados en estas tecnologías (Rodríguez Fernández-Alba y col., 2006).

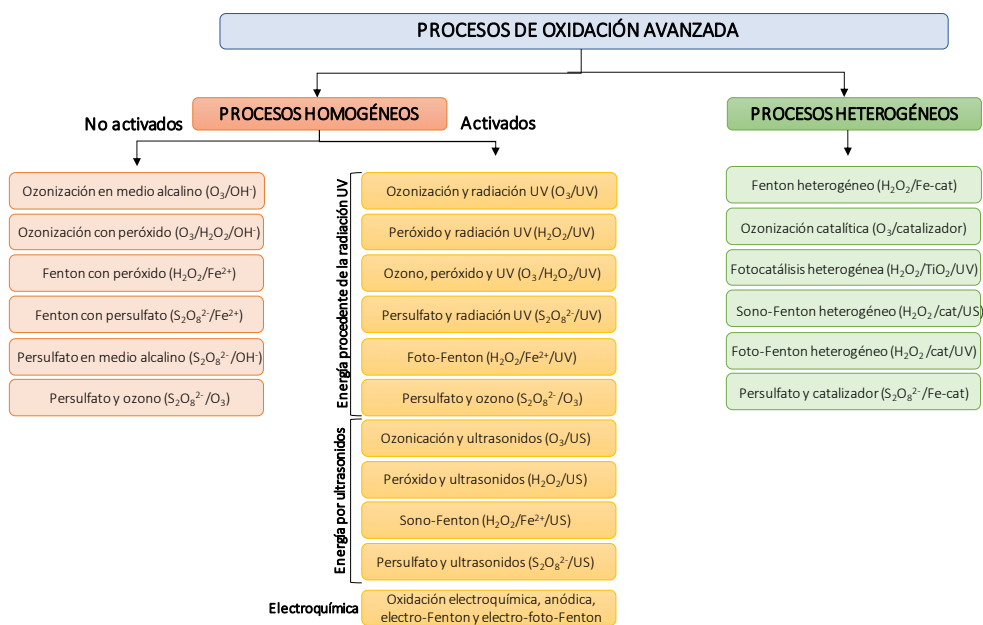


Figura 2.6. Clasificación de los procesos de oxidación avanzada (adaptación de Rodríguez Fernández-Alba y col., 2006)

Como puede observarse, los PAO pueden clasificarse en procesos homogéneos y heterogéneos. En los primeros, el medio de reacción con el oxidante y el catalizador están en fase líquida, mientras que en los heterogéneos el catalizador se encuentra en fase sólida. Asimismo, se distinguen procesos donde se combinan varios oxidantes con y sin catalizador y, en algunos casos, están activados por una fuente de radiación UV, ultrasonidos o electricidad. Entre los procesos catalíticos cabe destacar el **proceso Fenton** que emplea originalmente peróxido de hidrógeno con $Fe(II)$, pero también se ha probado utilizando otros metales con propiedades redox como el cobre, cobalto o manganeso (Bokare y Choi, 2014). El proceso Fenton ha desarrollado múltiples variantes al utilizar las fuentes de activación mencionadas anteriormente, como el foto-Fenton, sono-Fenton o electro-Fenton. En el caso de los procesos fotoquímicos heterogéneos, la fotocatalisis heterogénea con óxido de titanio ha sido el más desarrollado. Sin embargo, también han aparecido otros procesos fotocatalíticos con diferentes oxidantes (ozono, peróxido de hidrógeno y persulfato). En los últimos años, la tendencia en los procesos de fotocatalisis homogénea y heterogénea ha sido la activación mediante radiación solar. Por otro lado, los procesos catalíticos se centran en emplear catalizadores heterogéneos con

un rango de aplicación más amplio que los sistemas homogéneos (limitados fuertemente por el pH del agua para mantener el catalizador en disolución), reduciéndose al mismo tiempo la generación de fangos metálicos como consecuencia de la neutralización de los catalizadores metálicos disueltos para eliminarlos de las aguas tratadas mediante los procesos homogéneos.

Los procesos de ozonización, fotocatalisis o el proceso Fenton, foto-Fenton y electro-Fenton tanto homogéneo como heterogéneo son procesos que han mostrado destacables eliminaciones de compuestos farmacéuticos de la gran mayoría de familias terapéuticas (Kanakaraju y col., 2018). La ozonización y sus diversas combinaciones con H₂O₂, UV y ultrasonidos han obtenido altas eliminaciones para diversas familias terapéuticas, pero asumiendo bajas mineralizaciones debido a la formación de productos intermedios durante el proceso. Recientes estudios reportaron eliminaciones completas de indometacina (antiinflamatorio), propranolol (β -bloqueante) y tetraciclina (antibiótico) con una dosis moderada de ozono, pero únicamente una mineralización de COT del 35 al 50 % (Zhao y col., 2017; Almomani y col., 2016; Wang y col., 2011). Por ello, generalmente estos procesos se utilizan como pretratamiento para la eliminación de fármacos en combinación con sistemas de fangos activos o de biodegradación aerobia que sean capaces de eliminar la materia orgánica.

Por otro lado, los procesos Fenton y sus variantes como el foto-Fenton o electro-Fenton han sido realmente efectivos en la eliminación de compuestos farmacéuticos para la eliminación de antibióticos, antiinflamatorios y analgésicos (Kanakaraju y col., 2018). Antibióticos como amoxicilina, ofloxacino, ciprofloxacino y sulfametoxazol han sido completamente eliminados mediante procesos Fenton o foto-Fenton activados con luz solar utilizando diversos catalizadores de hierro (FeSO₄, oxalato de hierro, citrato de hierro, partículas de hierro cero o hierro en su forma mineral) (Zhu y col., 2019 b; Muñoz y col., 2018; Serrano y col., 2019; Muñoz y col., 2015; Du y col., 2017; De Lima Perini y col., 2013; Michael y col., 2012; Trovó y col., 2011). Los procesos Fenton también han sido efectivos con otras familias de fármacos como los analgésicos, antiinflamatorios, los fármacos psiquiátricos o β -bloqueante. En particular, fármacos como antipirina (Davididou y col., 2017), ibuprofeno (Miralles-Cuevas y col., 2014), carbamazepina (Expósito y col., 2018), metoprolol (Romero y col., 2016), diclofenaco (Souza y col., 2014) han sido completamente oxidados con concentraciones moderadas de H₂O₂ y catalizador. Los procesos de electro-Fenton son más recientes por lo que el número de trabajos es más reducido. Sin embargo, ya ha sido demostrada la eficacia de los mismos en la eliminación de diclofenaco, sulfametoxazol y carbamazepina (García-Espinoza y col., 2018; Loos y col., 2018). De los oxidantes mencionados, el peróxido de hidrógeno presenta ligeras ventajas frente

al ozono ya que se ha comprobado que obtiene mejores tasas de eliminación y conlleva menores costes asociados en vistas a un futuro escalado a nivel industrial (Riaño y col., 2014).

Finalmente, cabe destacar la existencia de un creciente número de trabajos basados en tecnologías que combinan tratamientos biológicos seguidos por procesos físicos, químicos y oxidativos. La ozonización o los sistemas de membranas se utilizan en muchas ocasiones como pre o post-tratamiento de un sistema biológico de fangos activos o de carbón activado, donde además se suelen incrementar las tasas de reducción alcanzadas para los contaminantes emergentes (Ahmed y col., 2017). En otros casos no es una secuencia de procesos, sino una combinación *in-situ* de ambos como son los procesos de biooxidación avanzada, en los cuales la generación de las especies oxidantes se activa y produce debido a la actividad de diferentes tipos de microorganismos. Los sistemas bio-electroquímicos también se han propuesto como una tecnología de tratamiento de aguas residuales de próxima generación, ya que se puede generar especies oxidantes reduciendo los requerimientos de energía (Werner y col., 2015). En algunos casos, estos sistemas ya han demostrado una alta eficacia en la eliminación de compuestos farmacéuticos (Nadai y col., 2018).

2.5. PROCESOS DE BIOOXIDACIÓN AVANZADA Y OXIDACIÓN FENTON HETEROGÉNEA

En los últimos 20 años numerosas publicaciones se han centrado en la eliminación de los microcontaminantes emergentes presentes en aguas residuales y naturales. Sin embargo, todavía gran parte de las mejoras del tratamiento convencional o los tratamientos alternativos propuestos están lejos de tener una perspectiva realista de aplicación de cara al futuro cercano.

Aunque algunos procesos físicos, como membranas de nanofiltración y osmosis inversa, o los sistemas de adsorción han demostrado elevadas tasas de eliminación, éstos tan solo consiguen retener y concentrar los microcontaminantes en un menor volumen de agua o en un sólido, pero en ningún caso consiguen su degradación, originando corrientes concentradas de microcontaminantes o adsorbentes saturados que necesitan ser regenerados (Ahmed y Hameed, 2018; Ganiyu y col., 2015).

Por otro lado, la mayoría de los estudios se realizan con matrices de aguas sintéticas o aguas dopadas con concentraciones de microcontaminantes superiores a las reales. Estos trabajos permiten una evaluación preliminar de los sistemas de tratamiento investigados, pero sus resultados deben validarse con aguas reales

constituidas por matrices más complejas que pueden contener otros componentes que influyan en el proceso. Asimismo, gran parte de los trabajos se realizan en sistemas discontinuos, que requieren de su validación en procesos continuos con las condiciones de operación optimizadas previamente.

De este modo, y tras la revisión bibliográfica realizada sobre las diferentes tecnologías que hoy en día se han propuesto para abordar el tratamiento de aguas residuales con microcontaminantes farmacéuticos emergentes, esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de dos procesos de oxidación avanzada que operen en continuo. Por un lado, un tratamiento de **biooxidación avanzada con hongos ligninolíticos de podredumbre blanca**, como tratamiento biológico secundario de aguas residuales urbanas en una EDAR o como tratamiento descentralizado de aguas residuales hospitalarias con mayor carga de microcontaminantes. Por otro lado, un proceso de **oxidación avanzada Fenton heterogénea**, también como tratamiento descentralizado para la eliminación de compuestos farmacéuticos presentes en aguas residuales hospitalarias. A continuación, se detalla el estado del arte de cada una de las tecnologías remarcando sus fortalezas y limitaciones.

2.5.1. Biooxidación avanzada con hongos ligninolíticos de podredumbre blanca

Los hongos son microorganismos eucariotas, aerobios, multicelulares, no fotosintéticos, heterótrofos y que se reproducen por esporas. Es decir, están formados por múltiples células en las que el núcleo se separa del citoplasma mediante una membrana celular y obtienen energía a partir de la oxidación de moléculas orgánicas reducidas en presencia de oxígeno. Junto con las bacterias, son los principales responsables de la descomposición del carbono en la biosfera. Los hongos se pueden clasificar en protohongos, quitridios y hongos terrestres.

Parte de la investigación de esta Tesis Doctoral se centra en la aplicación de hongos ligninolíticos en procesos de depuración de aguas residuales, los cuales pertenecen a la división de los hongos terrestres y a la clase *Dikarya*. Estos hongos pueden a su vez agruparse en dos divisiones: los **basidiomicetos y ascomicetos** (Krueger y col., 2016).

Los hongos ligninolíticos se pueden dividir a su vez en hongos de **podredumbre blanca o marrón**. Los hongos de podredumbre blanca constituyen el 90 % de los hongos ligninolíticos, mientras que los de podredumbre marrón únicamente representan el 7 % del grupo (Hatakka y Hammel, 2011). En particular, se ha trabajado con ***Trametes versicolor***, conocido también como *Coriolus versicolor* o *Polyporus*

versicolor, un tipo de hongo de putrefacción o podredumbre blanca, de la división basidiomiceto, que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Estos hongos pueden vivir en ambientes húmedos y secos, su temperatura óptima de crecimiento varía entre 20 y 30 °C y son capaces de crecer en condiciones ácidas. En la Figura 2.7, se esquematiza la taxonomía de esta especie.

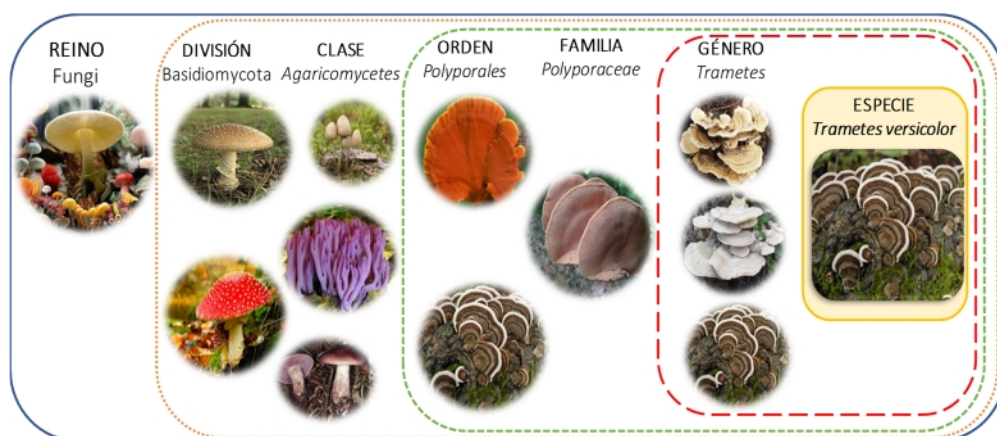


Figura 2.7. Taxonomía del *Trametes versicolor*

Este tipo de hongos descomponen de forma natural la lignina gracias a un potente sistema enzimático extracelular capaz de despolimerizarla en compuestos orgánicos de menor peso molecular (Wu y col., 2005). Al degradar la lignina, consiguen acceso a la celulosa y hemicelulosa que aprovechan como fuente de carbono y energía, absorbiéndolas a través de su pared celular (Archibald y col., 1997). En la Figura 2.8, se muestra un esquema simplificado de la despolimerización natural de la lignina por la acción de hongos ligninolíticos de podredumbre blanca (Martínez y col., 2005).

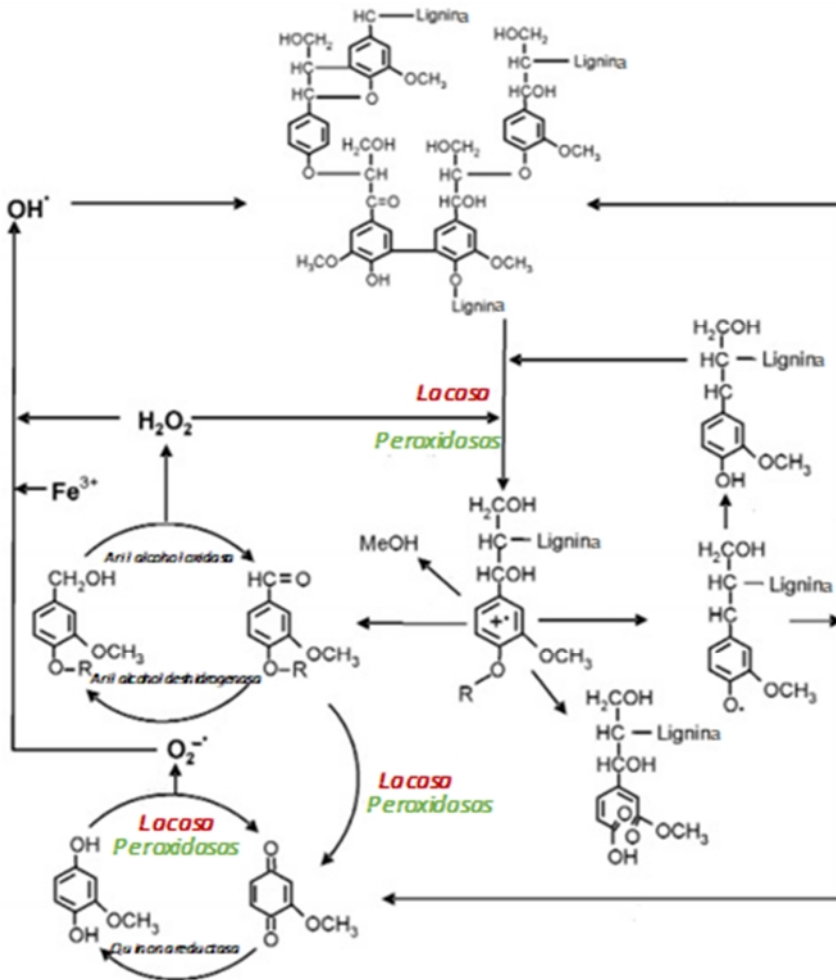


Figura 2.8. Esquema de la biodegradación natural de la lignina por hongos ligninolíticos de podredumbre blanca (fuente: Martínez y col., 2005)

Como se puede observar, el mecanismo es un proceso biooxidativo no específico que requiere la presencia de oxígeno. Los hongos ligninolíticos de podredumbre blanca realizan la despolimerización de la lignina gracias a la participación de dos tipos de enzimas modificadoras de la lignina (EML): las peroxidasas y las oxidasas. Las enzimas son proteínas que cuentan con un centro catalítico en su estructura, siendo capaces de interactuar directamente con el sustrato a degradar o bien cooperar en el proceso mediante la producción de agentes oxidantes (H_2O_2).

Por un lado, las peroxidasas son enzimas que necesitan la presencia de peróxido de hidrogeno para realizar su acción oxidativa. Los hongos ligninolíticos principalmente producen tres tipos: lignino-peroxidasa (LiP), manganeso-peroxidasa (MnP) y versátil-peroxidasa (VP). Estas enzimas tienen un alto potencial redox que les permite oxidar compuestos aromáticos muy complejos. La LiP es una enzima con especificidad relativa capaz de degradar compuestos no fenólicos, los cuales constituyen aproximadamente un 90 % de la lignina. La MnP es la encargada de generar Mn^{3+} que actúa como oxidante del resto de compuestos reducidos y se encarga de iniciar el ciclo de biooxidación. La VP combina las propiedades del resto de las peroxidasas descritas junto con la capacidad de oxidar algunos compuestos fenólicos (Córdoba Bolaños y Cultid Chamorro, 2015).

Por otro lado, las otras enzimas que forman parte del mecanismo natural son las oxidasas. Éstas se diferencian de las peroxidasas en que no necesitan peróxido de hidrógeno para iniciar su acción metabólica, sino únicamente la presencia de oxígeno. La más importante para este tipo de hongos es la lacasa que se clasifica como una oxido-reductasa que presenta un bajo potencial redox y es la encargada de la reducción del oxígeno disuelto en agua y la posterior oxidación de los sustratos fenólicos (Martínez y col., 2005). Además, estos hongos también incluyen en su mecanismo la formación de aril alcohol oxidasa y deshidrogenasa, así como las quinona reductasas (Martínez y col., 2005; Guillén y col., 1997).

Tras este proceso enzimático de despolimerización se obtienen tanto moléculas orgánicas más simples (cadena corta y menor peso molecular), como agentes oxidantes entre los que se encuentra el peróxido de hidrogeno, radicales hidroxilo y el anión superóxido (Guillén y col., 1997). La presencia de estos agentes oxidantes es esencial para continuar el proceso de biooxidación natural, ya que las peroxidasas requieren de su existencia (Córdoba Bolaños y Cultid Chamorro, 2015).

La producción de las enzimas modificadoras de la lignina se ve promovida cuando el hongo se encuentra en un medio con limitaciones de fuentes de carbono y nitrógeno, ya que requiere de la despolimerización de la lignina para conseguir sustratos fácilmente asimilables y así crecer o mantenerse. Este proceso puede producirse en presencia de otros sustratos orgánicos complejos diferentes de la lignina como por ejemplo algunos de sus derivados (polifenoles, fenoles o quinonas).

Generalmente, estos hongos se han utilizado para eliminar moléculas orgánicas recalcitrantes como hidrocarburos aromáticos policíclicos (Dao y col., 2019; Anasonye y col., 2015; Borràs y col., 2010), pesticidas (Hai y col., 2012; Bending y col., 2002), explosivos (Van Aken y Agathos, 2001), tintes (Rekik y col., 2019), metales (Bayramoğlu y col., 2003) o compuestos farmacéuticos (Mir-Tutusaus y col., 2018;

Grandclément y col., 2017; Nguyen y col., 2013; Yang y col., 2013 b). Todos ellos son compuestos que tienen una estructura orgánica compleja, por lo que no son asimiladas fácilmente por otros microorganismos.

Una de sus aplicaciones más notables ha sido en la industria papelera donde es necesario separar las fibras de celulosa presentes en la lignina. Habitualmente, esta separación se realiza utilizando técnicas mecánicas o químicas. Sin embargo, algunos estudios ya han demostrado que estos hongos son un potencial agente para realizar la deslignificación biológica de la madera en el proceso denominado *bio-pulping* (Ali y Sreekrishnan, 2001).

Finalmente, estos microorganismos también han sido utilizados en procesos de valorización de sustratos lignocelulósicos. Actualmente, millones de toneladas de residuos lignocelulósicos son producidas por la actividad humana considerándose un grave problema medioambiental. Los hongos ligninolíticos han sido considerados una alternativa para su aprovechamiento y generación de productos de mayor valor añadido como compuestos con valores terapéuticos (Mizerska-Dudka y col., 2015) o biocombustibles a partir de la fracción lipídica acumulada en la biomasa fúngica generada en el proceso (Vasiliadou y col., 2016).

A. Mecanismos de eliminación de contaminantes en aguas residuales por hongos ligninolíticos de podredumbre blanca

Los hongos ligninolíticos de podredumbre blanca como el *Trametes versicolor* cuentan con diversas rutas para la bioeliminación de sustratos orgánicos complejos y poco biodegradables como la bioadsorción, biodegradación enzimática extracelular e intracelular y la biooxidación avanzada. Todas estas rutas son complementarias (Olicón-Hernández y col., 2017) y se producen de manera simultánea junto con la asimilación de moléculas orgánicas fácilmente biodegradables presentes en el agua residual, que los microorganismos adsorben a través de su pared celular como fuente de energía para mantener su actividad metabólica y su crecimiento celular. Sin embargo, se ha demostrado que la bioadsorción, que se rige por las características de hidrofobicidad del compuesto y la composición específica de la pared celular del hongo, tiene una contribución minoritaria en la eliminación de compuestos farmacéuticos (Lucas y col., 2018; Vasiliadou y col., 2013).

En cuanto a los procesos enzimáticos, en la Figura 2.9 se representa un esquema de las principales rutas enzimáticas utilizadas por los hongos ligninolíticos para degradar contaminantes orgánicos complejos (Harms y col., 2011). Aunque la mayoría de trabajos están centrados en el estudio de las enzimas extracelulares,

como las descritas en la Figura 2.8 para la lignina, debido a su potencial capacidad oxidativa y fácil aislamiento e inmovilización, el mecanismo biodegradativo enzimático intracelular juega también un papel determinante en la degradación de los contaminantes orgánicos (Olicón-Hernández y col., 2017).

El mecanismo interno está mediado por el sistema enzimático citocromo P450 (CYP450), cuya principal función es transformar los contaminantes en moléculas más polares e hidrosolubles que permitan su excreción. Los procesos realizados por el citocromo P450 se han dividido en dos fases. En la fase I se produce la oxidación, reducción o hidrólisis de los compuestos transformándolos en productos más hidrosolubles a causa de la formación de nuevos grupos funcionales polares (carboxilos, hidroxilos o aminos). En la fase II, catalizada por las transferasas, se producen reacciones de conjugación (sulfonación, acetilación, etc.) con moléculas endógenas del hongo (ácido glucurónico, sulfatos, acetatos o aminoácidos) las cuales poseen un carácter polar que facilita el transporte y su rápida excreción (Rodríguez González y Rodeiro Guerra, 2014).

Por otro lado, al igual que ocurre para el caso de moléculas naturales como la lignina, el mecanismo biodegradativo enzimático extracelular está basado en el ataque enzimático mediante la acción de peroxidasas y oxido-reductasas no específicas. Estas enzimas probablemente han evolucionado en la naturaleza para soportar el crecimiento fúngico en sustratos refractarios y no accesibles para la mayoría de las bacterias, dotando al hongo de una ventaja ecológica frente a otros microorganismos. Como se ha visto en las Figura 2.8 y 2.9, estas enzimas son capaces de oxidar inespecíficamente una amplia gama de sustratos mediante la reducción del oxígeno molecular (lacasas) y por reacciones de oxidación-reducción utilizando H_2O_2 como aceptor de electrones (peroxidasas) (Harms y col., 2011).

Actualmente, existe una gran cantidad de trabajos que evalúan principalmente sus mecanismos naturales de bio-eliminación por la vía enzimática (Mir-Tutusaus y col., 2018). Generalmente, estos trabajos han mostrado buenas eliminaciones para aquellos compuestos farmacéuticos que interactúan con la biomasa fúngica y son poco recalcitrantes a los sistemas biológicos (ibuprofeno, cafeína, paracetamol, ranitidina o gemfibrozilo). Sin embargo, todavía muestran bajas o moderadas eliminaciones para compuestos que no suelen eliminarse en los procesos biológicos convencionales como carbamazepina, diclofenaco, metronidazol, sulfametoxazol, hidroclorotiazida, atenolol o iopromida (Mir-Tutusaus y col., 2016, 2017 y 2018 a y b; Palli y col., 2017 y 2016; Lucas y col., 2016; Vasiliadou y col. 2016; Ferrando-Climent y col., 2014 y 2015; Zhang y col. 2012; Jelic y col., 2012; Marco-Urrea et al., 2009 y 2010 a y b).

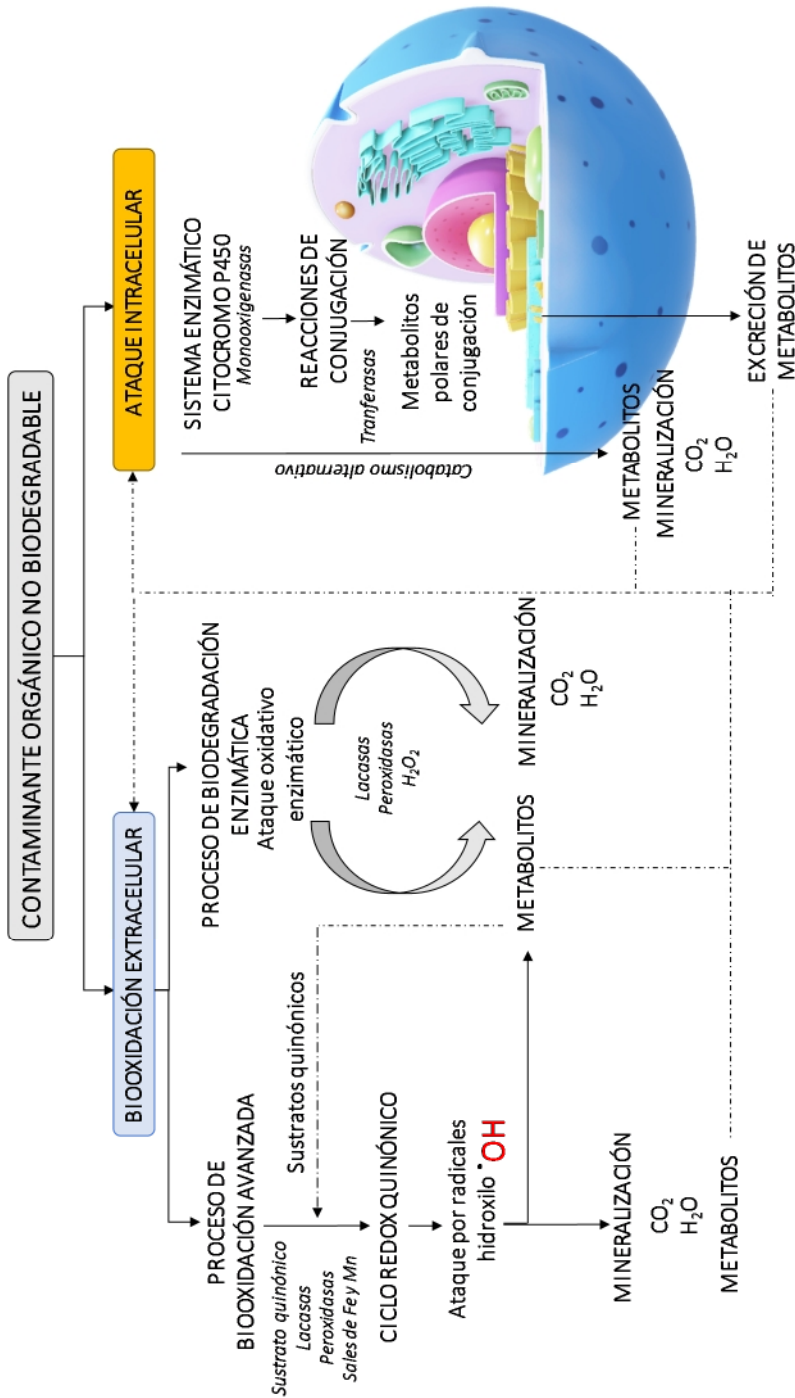


Figura 2.9. Rutas enzimáticas para la bio-eliminación de contaminantes orgánicos no biodegradables por hongos ligninolíticos

No obstante, como se muestra también en la Figura 2.9, extracelularmente se puede promover un **proceso de biooxidación avanzada**. Este proceso se produce a través de ciclos de oxidación-reducción de compuestos quinónicos o derivados que promueven la formación de radicales superóxido a partir del oxígeno molecular, los cuales a su vez evolucionan a peróxido de hidrogeno que reacciona con el hierro reducido del medio formando radicales hidroxilo (Figura 2.10). La no especificidad y alto potencial de oxidación de los radicales hidroxilo convierte a este mecanismo en una vía poderosa para la eliminación de los contaminantes emergentes (Krueger y col., 2016).

La capacidad de producir radicales hidroxilo a partir del metabolismo biológico de los hongos de podredumbre blanca fue demostrado en 2009 por Gómez Toribio y col. Estos autores incubaron micelios fúngicos de *Pleurotus eryngii*, los cuales eran generadores de lacasa, peroxidasa y quinona-reductasa, junto con un sustrato quinónico y una sal de hierro y manganeso, impulsando el ciclo redox del sustrato quinónico en ausencia de lignina para promover la producción de radicales hidroxilo mediante reacciones tipo Fenton (Figura 2.10). Con este sistema, consiguieron degradar de manera eficaz fenol y un azo-colorante, respaldando así que el proceso propuesto, denominado proceso de biooxidación avanzada, era un tratamiento alternativo para la degradación de contaminantes orgánicos complejos.

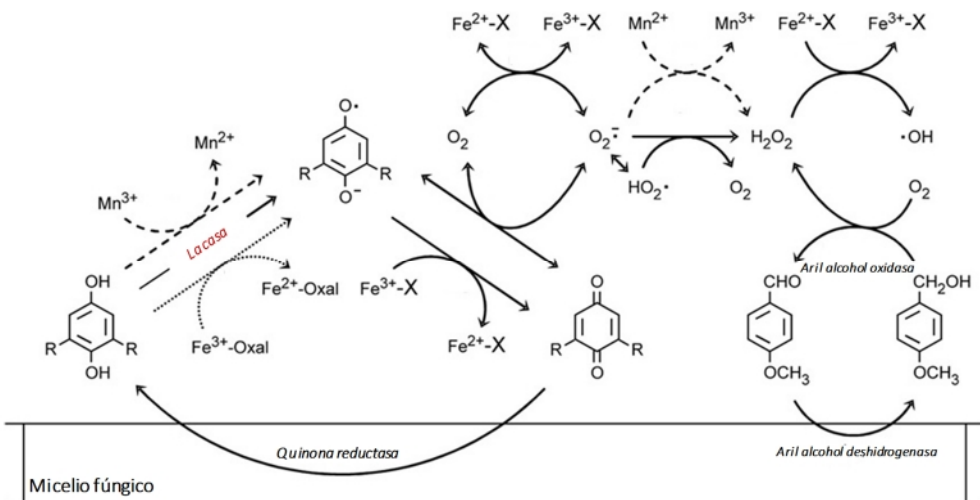


Figura 2.10. Esquema de las principales reacciones involucradas en la producción de radicales hidroxilo mediante un proceso de biooxidación avanzada con hongos ligninolíticos

Posteriormente, Marco-Urrea y col. (2010 b) estudiaron la oxidación de atenolol, propranolol, carbamazepina y ácido clorifbrico mediante este mismo proceso logrando altas tasas de eliminación para todos los compuestos farmacéuticos y reduciendo el tiempo de reacción de 8 a 1 día. Actualmente, existen pocos trabajos donde se promueva el proceso de biooxidación avanzada con hongos de podredumbre blanca. Recientemente Vasiliadou y col. (2018) estudió el papel del mediador quinónico en el proceso de biooxidación avanzada de fármacos con *Trametes versicolor*. Para ello, se evaluó la eliminación de trece fármacos usando cuatro mediadores diferentes: benzoquinona, di-metil-benzoquinona, ácido gálico y menadiona. Entre todos los mediadores probados, la di-metil-benzoquinona y el ácido gálico mostraron las mejores eficiencias en la eliminación de los trece compuestos seleccionados. Además, se demostró la importancia del mediador en el ciclo de producción de H_2O_2 y Fe^{2+} , así como en el proceso catalítico Fenton. Los autores propusieron el ácido gálico como el mediador óptimo debido a que, al ser un producto posible de la degradación de la lignina puede formar fácilmente un compuesto semi-quinónico dentro del ciclo del metabolismo biológico del hongo. Además, es un producto que se puede obtener de forma natural en las hojas y cortezas de diferentes árboles y plantas, así como formando parte de los taninos.

B. Limitaciones de los procesos biológicos con hongos ligninolíticos

A pesar de que los sistemas de eliminación de contaminantes orgánicos en aguas residuales basados en hongos ligninolíticos de podredumbre blanca presentan interesantes características y ventajas respecto a otros sistemas biológicos, presentan limitaciones que hace que su implementación a escala real todavía no se haya producido a nivel comercial (Mir-Tutusaus y col., 2018 a). A continuación, se describen en mayor profundidad algunas de las principales limitaciones que presenta la tecnología de eliminación de contaminantes en aguas residuales basadas en hongos, así como posibles propuestas para solucionarlas (Mir-Tutusaus y col., 2018 a).

Necesidad de adicionar nutrientes suplementarios. Los hongos necesitan asimilar una carga de carbono y nitrógeno suficiente para conseguir crecer y mantener su actividad. Generalmente, estos requerimientos son superiores a las cargas de carbono y difieren en la relación carbono/nitrógeno que presentan las aguas residuales urbanas o asimilables. Por ello, a pesar de que las aguas residuales contienen nutrientes que los hongos podrían aprovechar, actualmente la mayoría de los trabajos añaden nutrientes adicionales (glucosa, sacarosa, tartrato de amonio, extracto de Malta) que aseguren su supervivencia (Badia-Fabregat y col., 2015; Zhang

y Geißen, 2012). Tanto es así, que únicamente, existe un estudio donde se demuestra la capacidad de estos hongos para asimilar las fuentes naturales de carbono y nitrógeno contenidas en el agua residual (Palli y col., 2017). Este hecho implica un importante problema para su aplicación a gran escala, ya que todos estos aditivos externos conllevan un coste adicional que sería considerablemente alto teniendo en cuenta los volúmenes de agua a tratar. Las posibles soluciones propuestas conllevan la reducción o eliminación de las cargas de sustratos extras con diseños alternativos de los reactores, por ejemplo, con biomasa fúngica soportada sobre sustrato lignocelulósico que actúe como fuente natural de carbono (Torán y col., 2017; Lu y col., 2009; Ehlers y Rose, 2005), la sustitución por otras fuentes de menor coste o centrar esta tecnología en aplicaciones muy específicas donde los volúmenes de agua a tratar sean reducidos pero con altas concentraciones de contaminantes (Verlicchi y col., 2010 b).

Competencia con otros microorganismos. Los primeros trabajos dedicados a proponer y evaluar la eficacia de los sistemas basados en hongos ligninolíticos para la eliminación de contaminantes orgánicos, trabajaron sobre matrices de agua sintéticas o aguas residuales esterilizadas, para poder asociar la eliminación de los compuestos orgánicos con la actividad metabólica exclusivamente de los hongos (Nguyen y col., 2013; Rodarte-Morales y col., 2012; Zhang y Geißen, 2012; Marco-Urrea y col., 2010 y 2009; Blánquez y col., 2004). Sin embargo, las aguas residuales reales contienen una gran diversidad de microorganismos autógenos como bacterias, hongos, patógenos, virus, protozoos, etc., por lo que el tratamiento de este tipo de aguas conlleva ineludiblemente la aparición de estos microorganismos en los sistemas de depuración fúngicos. Así, una importante limitación es la contaminación bacteriana de la biomasa de los biorreactores fúngico cuando se opera bajo condiciones no estériles. Estos microorganismos pueden competir por las fuentes de sustrato conduciendo a la desestabilización de la biomasa fúngica, lo que puede reducir la eficacia del proceso en la eliminación de fármacos. Actualmente, la coexistencia de especies fúngicas y bacterianas durante el tratamiento de aguas no estériles ya ha sido estudiado por Badia-Fabregat y col. (2015, 2016, 2017). Se han propuesto diferentes estrategias para limitar la contaminación bacteriana y mantener una biomasa fúngica más estable y activa por un mayor periodo de tiempo. El ajuste del pH a valores ácidos (Borràs y col., 2008), la renovación o purga parcial de la biomasa (Mir-Tutusaus y col., 2017; Badia-Fabregat y col., 2016; Blánquez y col., 2006) o la regulación de relación C:N han sido algunas de ellas. Sin embargo, ninguna de ellas ha sido completamente satisfactoria. Como ya se ha mencionado, la optimización de la relación C:N no es factible desde un punto de vista económico, además de que esta variable depende de la naturaleza del agua residual. Por otro lado, la opción de renovar parcialmente la biomasa requiere de un sistema externo para el cultivo y crecimiento de hongo fresco

que debe inocularse periódicamente al biorreactor, lo que supondría la necesidad de operar un reactor adicional para tal fin (Badia-Fabregat y col., 2016).

Tiempo de residencia hidráulico en los biorreactores fúngicos. El tiempo de residencia hidráulico que requiere esta tecnología suele ser superior al estipulado para los tratamientos biológicos bacterianos de depuración. Generalmente, los tratamientos con hongos ligninolíticos necesitan un mínimo de entre 1 y 3 días para la eliminación de contaminantes (Blánquez y col., 2006). Este hecho hace que se requiera de equipos de gran tamaño para tratar grandes caudales de agua residual. Esta situación hace que la mayoría de los estudios publicados comprendan el tratamiento de pequeños volúmenes de agua residual en discontinuo y requiriendo de una constante agitación y suministro de aire (Mir-Tutusaus y col., 2016, 2018 b; Palli y col., 2017 y 2016; Lucas y col., 2016; Ferrando-Climent y col., 2014 y 2015; Jelic y col., 2012; Marco-Urrea et al., 2009 y 2010 a). Además, bajo estas condiciones de operación, en ocasiones se genera el sobrecrecimiento de la biomasa pudiendo llegar a colapsar los equipos (Palli y col., 2017). La principal solución propuesta consiste en la inmovilización de la biomasa fúngica sobre rellenos (Li y col., 2015; Rodarte-Morales y col., 2012), espumas (Li y col., 2016; Yadav et al., 2015; Zhang y Geißen, 2012), sustratos lignocelulósicos (madera) (Torán y col., 2017; Lu et al., 2009; Ehlers y Rose, 2005) o carbón que conduzcan a sistemas más robustos y duraderos en el tiempo.

Debido a todas estas limitaciones, el reto de cualquier tecnología de depuración de aguas residuales basada en hongos ligninolíticos, y en concreto en el sistema de biooxidación avanzada, consiste en conseguir una tecnología robusta que acabe con todas las limitaciones mencionadas y sea escalable sin un elevado coste asociado. El primer paso hacia la gran escala es descartar alternativas que no son factibles ni económica ni medioambientalmente, como la esterilización del medio o la renovación constante de la biomasa del biorreactor por hongo fresco cultivado de forma externa. En la búsqueda de nuevas alternativas, la inmovilización se presenta como una propuesta sólida para disminuir la contaminación bacteriana y mejorar el diseño de los biorreactores. Además, es necesario abordar el diseño de estos sistemas investigando estos tratamientos con matrices de agua reales, las cuales no han sido fortificadas con una mayor concentración de fármacos o con sustratos que ayuden al crecimiento y mantenimiento del hongo. Finalmente, es importante validar los resultados obtenidos en reactores a escala laboratorio con experimentación a escala planta piloto, siendo escasos los trabajos realizados hasta el momento en este sentido.

Por todo ello, una parte del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral está centrado en la propuesta, diseño y validación de un sistema de depuración de aguas

residuales urbanas que sea además efectivo en la eliminación de contaminantes emergentes de origen farmacéutico, basado en el proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor*. El biorreactor propuesto es un sistema de contactores biológicos rotativos (CBRs), donde la biomasa fúngica se encuentra inmovilizada en discos parcialmente sumergidos en el agua residual a tratar. Este tipo de sistemas son robustos y permiten trabajar bajo condiciones aerobias sin necesidad de dosificar aire al reactor. Además, son fácilmente escalables por lo que se presentan como una alternativa para el diseño de un biorreactor de biooxidación avanzada que pueda aplicarse realmente en depuradoras de aguas residuales urbanas o de tratamiento de aguas residuales con un alto contenido en contaminantes de origen farmacéutico, como las aguas residuales hospitalarias.

2.5.2. Oxidación Fenton heterogénea

El **proceso Fenton** basado en la generación de radicales hidroxilo mediante la combinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ion hierro (Fe^{2+}) resulta muy efectivo en la eliminación de compuestos tóxicos o refractarios presentes en aguas residuales (Kumar y col., 2019; Zhu y col., 2019 b). La eficacia de este proceso de oxidación avanzada puede variar significativamente en función de diferentes variables como el pH y la temperatura del agua, la concentración de peróxido de hidrógeno y de Fe^{2+} o la carga contaminante presente en el agua residual (Wang y col., 2016). De todas ellas, la primera resulta ser un factor muy determinante y restrictivo (Zhang y col., 2019) ya que la necesidad de asegurar que el catalizador de sales de hierro esté en disolución y que no se produzca su precipitación para evitar reducir su actividad, hace que sea necesario trabajar bajo condiciones de pH ácido. La problemática surge en que la mayoría de aguas residuales no tienen un valor de pH dentro del rango óptimo del proceso (2-3) (Pignatello y col., 2006). Este hecho implica el acondicionamiento del agua (acidificación) antes de su tratamiento, incrementando consecuentemente el coste del proceso por las etapas adicionales de acidificación y posterior neutralización para la separación de las sales de hierro adicionadas como catalizador del efluente tratado.

Para superar esta limitación del proceso Fenton clásico homogéneo, en las últimas décadas se ha planteado el estudio de catalizadores heterogéneos donde se reemplaza el hierro en disolución por un catalizador sólido (Zhu y col., 2019 b). En este proceso heterogéneo, la reacción ocurre sobre los centros metálicos activos del catalizador, siendo uno de los principales retos del proceso evitar la lixiviación de las especies metálicas al medio acuoso en las condiciones ácidas y oxidantes que se emplean. El uso de catalizadores heterogéneos permite la posibilidad de trabajar en

rangos de pH más amplios y cercanos a la neutralidad (Zhang y col., 2019). Además, facilita la posterior separación del catalizador del efluente tratado (Garrido-Ramírez y col., 2010).

En la actualidad son muchos los tipos de catalizadores heterogéneos que se han probado para procesos de oxidación Fenton. La mayoría de ellos, se basan en catalizadores de hierro en su forma mineral (magnetita, ferrita, hematita, goetita, etc.) (Zhu y col., 2019 b; Muñoz y col., 2018; Serrano y col., 2019; Muñoz y col., 2015), catalizadores en los que el hierro está soportado (sobre zeolitas, arcillas, carbón activo, materiales mesoporosos) (Muñoz y col., 2013; Pariente col., 2013; Melero y col., 2006; Guélou y col., 2003; Ovejero y col., 2001) y otros como partículas de hierro metálico u óxidos mixtos (Zhang y col., 2019; Zhu y col., 2019 a y b; Garrido-Ramírez y col., 2010). Por otro lado, se ha demostrado que otros metales con propiedades redox pueden descomponer el H_2O_2 para formar radicales hidroxilo. Los metales más utilizados son fundamentalmente los iones de cobre, manganeso y cobalto (Bokare y Choi, 2014). Entre ellos, los procesos basados en catalizadores de cobre han demostrado ser efectivos en la eliminación de diferentes contaminantes, tanto compuestos farmacéuticos (Sun y col., 2019; Zhu y col., 2019 a), como otro tipo de contaminantes industriales orgánicos, como el fenol, derivados fenólicos y tintes (Brillas y García-Segura, 2020; Cheng y col., 2018; Wang y col., 2016). En la Tabla 2.14 se muestra a modo resumen los catalizadores heterogéneos con cobre en la fase activa empleados para eliminar diferentes contaminantes en aguas residuales mediante procesos Fenton heterogéneo.

La utilización de un catalizador u otro, así como las condiciones de operación del proceso (pH y temperatura) son variables que se están optimizando para mejorar el rendimiento del proceso y superar las desventajas que presenta el proceso homogéneo clásico (Bello y col., 2019). Carriazo y col. (2011) demostraron la estabilidad del Cu^{2+} en el proceso de descomposición del peróxido de hidrógeno mediante catálisis heterogénea a pH cercanos a la neutralidad (5,5 -6,5). Además, concluyeron que la elevada actividad catalítica de los sistemas sólidos de cobre a valores de pH cercanos a la neutralidad hace que estos materiales puedan considerarse sistemas catalíticos prometedores para futuras aplicaciones en la degradación, con peróxido de hidrógeno, de compuestos orgánicos en aguas residuales, ya que se elimina la necesidad de ajustar el pH a la neutralidad.

Tabla 2.14. Catalizadores heterogéneos con cobre utilizados en procesos de oxidación avanzada tipo Fenton

Catalizador	Contaminante	Referencia
Ferrita-Cu	Imidacloprid	Wang y col., 2014
Nanopartículas magnéticas γ -Fe ₂ O ₃ /Cu	Fenol	Ling y col., 2014
Nanopartículas de Fe/Cu sobre un carbón mesoporoso ordenado	Fenol Bisfenol A	Wang y col., 2015
Goetita dopada con Cu (Cu-Fe-OOH)	Diclofenaco	Xu y col., 2016
Nanopartículas de Cu-Fe ₃ O ₄ -FeOOH	Compuestos quinónicos	Krumina y col., 2017
Nanopartículas CuFe ₂ O ₄	Carbamazepina	Ding y col., 2016
Microesferas de sílice/Cu	Fenitoína Ibuprofeno	Lyu y col., 2015
MOFs-Cu	Naranja de metilo	Han y col., 2016
Zeolitas MFI-Cu	Fenol Ácido fórmico	Valkaj y col., 2011
Catalizador multimetálico (Cu/Fe/Zn)	Paracetamol Arsénico	Lu y col., 2016
Partículas bimetalicas de Fe/Cu en nanofibras de carbono	Naranja de metilo	Wang y col., 2017
Nanopartículas CuFeO ₂	Ofloxacino	Dai y col., 2018
Ferrita-Cu	Ácido gálico	López-Ramón y col., 2018
Nitruro de carbono dopado con Cu	Rodamina B	Zhu y col., 2019 a
Aerogel de óxido de grafeno cargado con nanotubos de ferrita-Cu	Rodamina B Azul de metileno Naranja de metilo	Yao y col., 2019
Nanotubos de CuO en una malla de Cu	Rodamina B	Su y col., 2019
Nanopartículas Cu ⁰	Metronidazol	Xu y col., 2019
Cu/ZrO ₂	Ibuprofeno	Hussain y col., 2020
Materiales organometálicos bimetalicos de Fe/Cu	Sulfametoxazol	Tang y Wang, 2020
Magnetita-Cu (Fe _{3-x} Cu _x O ₄)	Ciclofosfamida	Emídio y col., 2020

A. Eliminación de microcontaminantes emergentes farmacéuticos

A pesar de que ya se haya confirmado la actividad de estos materiales para la eliminación de contaminantes farmacéuticos en agua (Kumar y col., 2019), la mayoría de estos trabajos utilizan compuestos modelo en matrices de agua sintética o agua ultrapura. Por lo tanto, el estudio de su aplicabilidad a matrices de agua reales, tanto en aguas urbanas como aguas hospitalarias, es aún necesario. Como ya se sabe, estas matrices son un complejo escenario para este tipo de procesos de oxidación avanzada, ya que en ellas se encuentran presentes una gran variedad de compuestos que acompañan a los fármacos y pueden reaccionar con los radicales hidroxilo generados. La turbidez, la carga de materia orgánica, los sólidos en suspensión, los metales pesados o diferentes iones que reaccionan con los radicales hidroxilo (CO₃²⁻,

HCO_3^- , Cl^-) pueden reducir la capacidad de eliminación del proceso Fenton o incluso generar procesos inhibitorios o desactivadores (Wang y Jin Xu, 2012).

Actualmente, existen estudios donde ya se ha probado la eficacia del proceso Fenton en homogéneo o heterogéneo en matrices de aguas residuales industriales reales con cosméticos, pesticidas o tintes (Pliego y col., 2012; Rodrigues y col., 2009; Bautista y col., 2007). Sin embargo, son pocos los trabajos centrados en el tratamiento de aguas residuales hospitalarias, las cuales se caracterizan por tener altas concentraciones de compuestos farmacéuticos. Recientemente, Muñoz y col. y Berto y col. han publicado procesos Fenton para el tratamiento de aguas hospitalarias, centrándose tanto en la reducción de DQO y COT (Muñoz y col., 2016; Berto y col., 2009) como en la eliminación de determinados compuestos farmacéuticos (metronidazol, sulfametoxazol, atenolol, trimetoprima y diltiazem, ranitidina) (Muñoz y col., 2018; Muñoz y col., 2017). En ellos se demostró que la eficacia del proceso disminuye al tratar matrices reales, obteniendo eliminaciones de fármacos y reducciones de DQO menores que cuando esos experimentos se realizaron en agua ultrapura (Muñoz y col., 2018; Muñoz y col., 2017). En cualquier caso, cabe mencionar que estos estudios se realizaron en discontinuo operando con bajos volúmenes de agua (reactores de 0,5L), haciendo que de momento estas tecnologías necesiten validarse para ser implantadas a escala real.

Por todo ello, es necesario plantear nuevos procesos de oxidación avanzada tipo Fenton los cuales no solamente superen las limitaciones del proceso homogéneo, sino que también sean eficaces en la eliminación de compuestos farmacéuticos presentes en aguas residuales hospitalarias reales operando en modo continuo.

B. Aplicación de materiales tipo perovskita de cobre como catalizadores Fenton heterogéneos

Este trabajo de investigación se ha centrado en los óxidos mixtos de tipo perovskita debido a su progresiva utilización en los últimos años como catalizadores heterogéneos de numerosos procesos, incluido el proceso Fenton heterogéneo para aplicaciones ambientales. La estructura perovskita tiene una fórmula molecular ABO_3 donde A es un catión de gran tamaño, usualmente del grupo de los lantánidos (La, Ba, Ca y Sr), con número de coordinación igual a 12, mientras B es un catión de menos tamaño, normalmente un metal de transición (Ni, Ti, Co, Fe, Mn y Cu), con número de coordinación igual a 6 en la estructura (Figura 2.11).

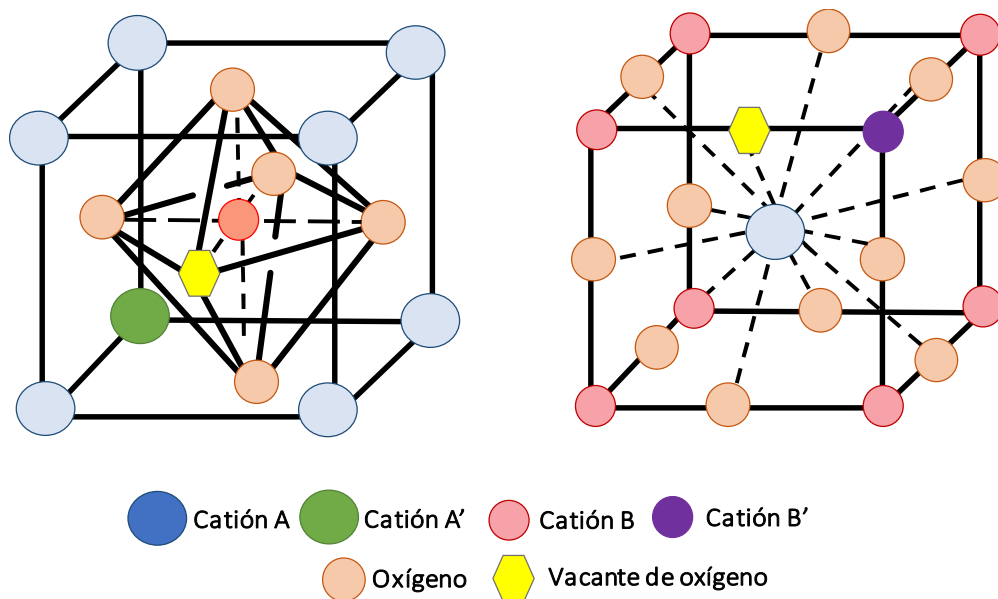


Figura 2.11. Estructura tipo perovskita en función del número de coordinación del catión (a) catión B (b) catión A

Sus propiedades catalíticas están estrechamente relacionadas con la naturaleza de los cationes A y/o B, los cuales pueden modificarse mediante su sustitución parcial por otros elementos de radio similar (A' y B' en la Figura 2.11). Este hecho conduce a la formación de óxidos mixtos complejos, donde pueden producirse vacantes de oxígeno para garantizar la electroneutralidad del material y la formación de defectos estructurales, dependiendo en cada caso de la diferencia de carga y radio de los cationes A-A' y B-B' (Wei y col., 2008). Esto a su vez favorece la movilidad del oxígeno en la estructura de la perovskita, haciendo que los óxidos de tipo perovskita sean materiales prometedores como catalizadores heterogéneos para utilizar en procesos Fenton debido a la posible mejora en la generación de radicales hidroxilo adicionales gracias a la esa movilidad del oxígeno, y a la estabilidad química característica de este tipo de materiales (Bradha y col., 2015).

Sin embargo, el número de estudios donde se aplican estos materiales como catalizadores en procesos tipo Fenton para la eliminación de compuestos farmacéuticos aún es limitado. En este marco, Taran y col. (2016) realizaron la aplicación de materiales perovskita tipo LaBO_3 (B = Fe, Cu, Mn, Co, Ni) para la eliminación de fenol mediante un proceso de oxidación húmeda. Los resultados demostraron que únicamente los materiales que contenían hierro y cobre fueron

activos en la eliminación de este contaminante. Rusevova y col., (2014) también utilizaron perovskitas que contenían hierro (LaFeO_3 y BiFeO_3) para la eliminación de fenol, concluyendo que estos materiales mantenían su actividad trabajando en un rango de pH cercano a la neutralidad (5 y 7) con una insignificante concentración de metales lixiviados tras 24 horas de reacción. Otros autores aplicaron este tipo de perovskitas que contenían hierro (LaFeO_3 y BiFeO_3) en la eliminación de dos compuestos farmacéuticos (ketoprofeno y sulfametoxazol) mediante un proceso Fenton heterogéneo (Nie y col., 2015; Zhao y col., 2013). En ambos casos se consiguieron considerables eliminaciones para ambos compuestos farmacéuticos trabajando en intervalos de pH entre 5 y 8 con limitada lixiviación del hierro en el efluente final. Además, Nie y col. (2015) mostraron que el catalizador (LaFeO_3) pudo ser reutilizado en la eliminación de sulfametoxazol manteniendo su actividad catalítica durante diez ciclos de reacción.

En menor medida también se han probado perovskitas sustituyendo el hierro por cobre como especie metálica activa. Wang y col. (2018) mostraron cómo la incorporación parcial de cobre en una perovskita LaAlO_3 , mejoró la eliminación de los contaminantes orgánicos seleccionados, entre ellos el ibuprofeno. Finalmente, Carrasco-Díaz y col. (2016) prepararon perovskitas tipo $\text{LaCu}_{1-x}\text{Mn}_x\text{O}_3$ activas en la degradación de paracetamol, obteniendo eliminaciones superiores al 95 % tras 5 horas de reacción a 25 °C y un valor de pH cercano a la neutralidad. Además, descartaron la posible contribución del proceso en homogéneo al sistema Fenton propuesto debido a que la lixiviación de metales fue inferior al 1 %.

C. Catalizadores heterogéneos estructurados

Un punto crítico para la implementación a gran escala de procesos tipo Fenton heterogéneos en reactores de lecho fijo y/o reactores de tanque agitado es que los catalizadores en polvo deben estar granulados o inmovilizados en macroestructuras abiertas (Bello y col., 2017; Tisa y col., 2014). En este sentido, se han propuesto algunos reactores continuos de lecho fijo con catalizadores heterogéneos para procesos de oxidación de tipo Fenton basados en rellenos catalíticos granulados que contienen la fase activa metálica (Oral y Kantar, 2019; Martínez y col., 2018; Bello y col., 2017; Pariente y col., 2015; Tisa y col., 2014).

En los últimos años, también se ha investigado el desarrollo de materiales cerámicos porosos reticulados, los cuales se sintetizaron utilizando un método de replicación basado en la impregnación de una espuma polimérica, también llamada esponja polimérica. Este procedimiento es simple y efectivo para hacer **materiales porosos reticulados en forma de espumas**. En este método, la espuma polimérica

porosa es utilizada como soporte o estructura base y se impregna con una suspensión de precursores cerámicos para formar una estructura macroporosa con una alta resistencia mecánica después de eliminar el polímero orgánico y sinterizar los precursores cerámicos por calcinación a alta temperatura (Fey y col., 2017). La aplicación de catalizadores heterogéneos conformados como materiales porosos reticulados para AOP apenas se ha recogido en estudios anteriores. Se pueden encontrar algunos ejemplos en sistemas fotocatalíticos para la purificación de agua o aire utilizando estructuras porosas reticuladas de diferentes materiales (espumas de alúmina, alúmina/mullita, cordierita o polisiloxano-poliuretano) como soporte del fotocatalizador de TiO_2 (Plesch y col., 2012; Yao y col., 2011; Josset y col., 2010). Kocakuşakoğlu y col. (2015) demostraron un rendimiento notable utilizando una red tridimensional abierta de ZnO con una alta porosidad en la degradación fotocatalítica del azocolorante rojo reactivo 180 (Kocakuşakoğlu y col., 2015).

Por todo ello, una parte del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral está centrado en la propuesta y diseño de síntesis de materiales porosos reticulados en forma de espuma tipo perovskita como catalizadores heterogéneos del proceso Fenton para el tratamiento descentralizado de un agua residual hospitalaria en un reactor de lecho fijo.

3. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo de investigación es el desarrollo de **nuevos tratamientos para la eliminación de microcontaminantes emergentes de tipo farmacológico presentes en aguas residuales reales** mediante procesos biológicos con hongos ligninolíticos de podredumbre blanca (*Trametes versicolor*, **proceso de biooxidación avanzada**) y con catalizadores heterogéneos de tipo perovskita (**proceso de oxidación avanzada Fenton**).

Hoy en día, el proceso de **biooxidación avanzada** con hongos ligninolíticos de podredumbre blanca presenta una serie de limitaciones para su viabilidad a escala de planta piloto. Entre ellas, se encuentran el diseño del biorreactor y la aplicación de condiciones de operación factibles que aseguren el mantenimiento de las especies fúngicas frente al desplazamiento provocado por la presencia de poblaciones bacterianas durante el tratamiento de efluentes residuales reales no estériles. Otra limitación importante ha sido la necesidad de operar con tiempos de residencia hidráulicos elevados con los que se alcancen buenas eficacias de eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos. Por ello, el primer objetivo de este trabajo relativo al proceso de biooxidación avanzada se centrará en evaluar un sistema que supere las limitaciones planteadas hasta el momento, de manera que sea fácilmente escalable a nivel industrial. El sistema propuesto se basa en un biorreactor de **contactores biológicos rotativos** donde la biomasa fúngica se inmovilizará sobre los contactores rotativos, también llamados biodiscos. En este tipo de biorreactor, se

evaluará la aportación de mediadores quinónicos como promotores del proceso de biooxidación avanzada, en ausencia de sustratos adicionales fácilmente biodegradables y operando con un tiempo de residencia hidráulico no superior a 1 día. El proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* se valorará como alternativa al tratamiento biológico actual presente en las estaciones de depuración de aguas residuales urbanas, así como, tratamiento descentralizado específico de efluentes residuales hospitalarios antes de su vertido al colector general de aguas de saneamiento.

Por otra parte, el proceso de **oxidación avanzada Fenton** comercial emplea catalizadores homogéneos que presentan una fuerte dependencia del pH ácido (≈ 3) para su óptimo rendimiento. En la presente investigación se llevará a cabo el diseño de un **catalizador heterogéneo macroporoso reticulado tipo perovskita** para su aplicación en **reactores de lecho fijo**. El proceso se estudiará con aguas residuales reales para evaluar el efecto del agua matriz sobre la actividad y estabilidad del catalizador en condiciones suaves de temperatura, moderados aportes de oxidante (peróxido de hidrógeno) y un intervalo de pH que no se restrinja al pH ácido del sistema comercial.

A continuación, se resume el plan de trabajo de cada uno de los procesos de oxidación planteados para conseguir el objetivo general:

Proceso de biooxidación avanzada

1. Evaluación inicial del sistema de contactores biológicos rotativos con *Trametes versicolor* para el tratamiento de un agua residual simulada y un agua residual real fortificada con microcontaminantes farmacéuticos de diferentes familias terapéuticas.
2. Influencia de mediadores quinónicos como promotores del proceso de biooxidación avanzada para reducir el tiempo de retención hidráulico del tratamiento, preferiblemente a un máximo de 1 día.
3. Influencia de contactores biológicos rotativos de madera para una mayor estabilización de la biomasa fúngica inmovilizada y asegurar fuentes biodegradables suplementarias para el hongo.
4. Análisis de las poblaciones de microorganismos generadas en los contactores biológicos rotativos durante el tratamiento de efluentes de aguas residuales reales no estériles.
5. Evaluación y validación del proceso de biooxidación avanzada en contactores biológicos rotativos: i) alternativa al tratamiento biológico de estaciones de depuración de aguas residuales urbanas (planta piloto del Campus de Móstoles de la Universidad Rey Juan Carlos y EDAR de la provincia de Toledo); y ii)

tratamiento descentralizado de aguas residuales hospitalarias (hospital zona sur de la Comunidad de Madrid).

Proceso de oxidación avanzada Fenton

6. Desarrollo de catalizadores Fenton basados en la inmovilización materiales tipo perovskita sobre estructuras reticuladas en forma de espumas macroporosas.
7. Influencia del pH, la temperatura y la concentración de oxidante (peróxido de hidrógeno) sobre la actividad y la estabilidad del catalizador trabajando con matrices reales de aguas residuales.
8. Aplicación de los catalizadores porosos reticulados tipo perovskita en reactores de lecho fijo de operación en continuo con matrices reales de aguas residuales.
9. Evaluación del proceso de oxidación avanzada Fenton con catalizadores heterogéneos en reactores de lecho fijo como tratamiento descentralizado de aguas residuales hospitalarias (hospital zona sur de la Comunidad de Madrid).

4. Procedimiento experimental

4.1. REACTIVOS

En la presente investigación se han empleado los siguientes reactivos, en los que se indica su concentración o pureza, así como la empresa suministradora.

- Acetato de cobre (II) hidratado (98 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Acetato de sodio (>99 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Acetonitrilo (calidad LC-MS, J.T. Baker)
- Ácido acético glacial (calidad LC-MS, Scharlab S.L.)
- Ácido bórico (extra puro, PanReaC-AppliChem)
- Ácido cítrico (99,5 % p/p pureza, Fluka)
- Ácido clofíbrico (>99 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma-Aldrich)
- Ácido clorhídrico 0,1N (PanReaC-AppliChem)
- Ácido fólico (> 97 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Ácido gálico (96 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Ácido α -lipoico (bio-reactivo > 98 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Ácido nítrico (65 % p/p alta pureza, Scharlab S.L.)
- Ácido p-aminobenzoico (>99 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Ácido sulfúrico (96-98 % v/v pureza, Sigma Aldrich)
- Agar nutriente para microbiología (Sigma Aldrich)
- Agua desionizada ultrapura (Mili-Q 18,2 M Ω Ultra-pore)

- Alumbre de potasio dodecahidratado (>98 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Ampicilina (> 96 % p/p pureza: anhídrido, Sigma Aldrich)
- Antipirina (> 99 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma Aldrich)
- Atenolol (> 98,5 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma Aldrich)
- Bentonita (Quimivisa)
- Biotina (> 99 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Cafeína (> 98,5 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma-Aldrich)
- Carbamazepina (> 99 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma Aldrich)
- Cianocobalamina (vitamina B12) (bio-reactivo > 98 % p/p, Sigma-Aldrich)
- Cloruro de calcio anhídrido (> 93 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Cloruro de sodio (> 99,5 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Contraspum KWE (Zschimmer & Schwarz)
- Diclofenaco (> 98,5 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma Aldrich)
- Dicromato de potasio (extra puro, Scharlab S.L.)
- Dolapix CE 64 (Zschimmer & Schwarz)
- D-Pantotenato de calcio (vitamina B5) (> 98 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Etanol (96 % p/p pureza, Scharlab S.L.)
- Extracto de Malta (para cultivo microbiológico, Sigma Aldrich)
- Fosfato de sodio dibásico (> 99 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Fosfato de sodio monobásico (> 99 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Fosfato de potasio monobásico (> 99,99 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Gemfibrozilo (> 98,5 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma Aldrich)
- Hidroclorotiazida (> 98,5 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma Aldrich)
- Hidrocloruro de tiamina (vitamina B1) (bio-reactivo: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma Aldrich)
- Hidróxido de sodio (> 99 % p/p pureza en pellets, Sigma Aldrich)
- Ibuprofeno (> 98 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma-Aldrich)
- Metanol (calidad HPLC, Scharlab S.L.)
- Metanol (calidad LC-MS, Scharlab S.L.)
- Molibdato de sodio dihidratado (99,5 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Niacina (vitamina B3) (bio-reactivo > 98 % p/p, Sigma Aldrich)

- Nitrilotriacetato sal trisódica monohidratada (98 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Nitrato de lantano (III) hexahidratado (99,9 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Nitrato de manganeso (II) tetrahidratado (> 97 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Nistatina (bio-reactivo: apto para cultivo celular, Sigma Aldrich)
- Optapix PA 4G (Zschimmer & Schwarz)
- Oxalato de hierro (III) hexahidratado (> 99,9 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Oxisulfato de titanio (IV) (1,9-2,1 % v/v para la determinación de peróxido de hidrogeno (H15) según la normativa DIN 38 409-15)
- Peróxido de hidrógeno (30 % v/v pureza, Scharlab S.L.)
- Piridoxina (vitamina B6) (> 98 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Progesterona (> 99 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma Aldrich)
- Ranitidina (> 98 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma Aldrich)
- Riboflavina (vitamina B2) (bio-reactivo >98 % p/p, Sigma Aldrich)
- Sacarosa
- Sulfametoxazol (> 99 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma Aldrich)
- Sulfato de cobalto (II) heptahidratado (> 99 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Sulfato de cobre (II) pentahidratado (extra puro, Scharlab S.L.)
- Sulfato de hierro (II) heptahidratado (> 99 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Sulfato de magnesio heptahidratado (> 98 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Sulfato de manganeso (II) monohidratado (> 99 % p/p pureza, Sigma Aldrich)
- Sulfato de mercurio (II) (> 98 % p/p pureza, Chem-lab)
- Sulfato de plata (99,5 % p/p pureza, Chem-lab)
- Sulfato de potasio (> 98 % p/p pureza, Chem-lab)
- Sulfato de zinc monohidratado (> 98 % p/p pureza, Chem-lab)
- Sulpirida (> 99 % p/p pureza: anhídrido apto para análisis analíticos, Sigma Aldrich)
- Tartrato de amonio dibásico (> 99,9 % p/p pureza, Scharlau S.L.)
- Tetraciclina (> 98 % p/p pureza: apto para síntesis, Sigma Aldrich)

4.2. PREPARACIÓN DEL CULTIVO DE HONGO LIGNINOLÍTICO *Trametes versicolor*

Todos los experimentos de biooxidación avanzada se han realizado utilizando el hongo *Trametes versicolor* (CECT 20817), también conocido como *Polyporus* o *Coriolus versicolor*, perteneciente a la familia de los políperos (*Polyporaceae*). El cultivo activo puro de esta cepa ha sido suministrado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Para su utilización es necesario obtener el hongo en forma de partículas miceliales o biomasa fúngica triturada. El procedimiento que se ha seguido para su preparación, como se muestra en la Figura 4.1, consta de tres etapas (Vasiliadou y col., 2016): siembra y crecimiento en placa Petri, crecimiento en medio acuoso y homogeneización de la biomasa fúngica.

A. Siembra y crecimiento en placa Petri

En primer lugar, se ha sembrado el hongo en placa Petri empleando un medio compuesto de 10 g de extracto de Malta y 10 g de agar que se disuelven en 500 mL de agua ultrapura a pH 4,5. Tanto la disolución de agar de extracto de Malta, como el material a utilizar se esterilizan previamente en un autoclave a 121 °C durante quince minutos. Además, en todas las etapas de cultivo del hongo, es necesario trabajar en campana de flujo laminar estéril.

Sobre las placas, con el agar de extracto de Malta ya sólido, se realiza la inoculación de 0,5-1 cm² del cultivo activo puro de *Trametes versicolor* con ayuda de un asa de siembra recta (Figura 4.1, imagen A1). Posteriormente, las placas inoculadas se mantienen en estufa a 25 °C durante 5-6 días, obteniendo un recubrimiento como el que se aprecia en la imagen A2 de la Figura 4.1.

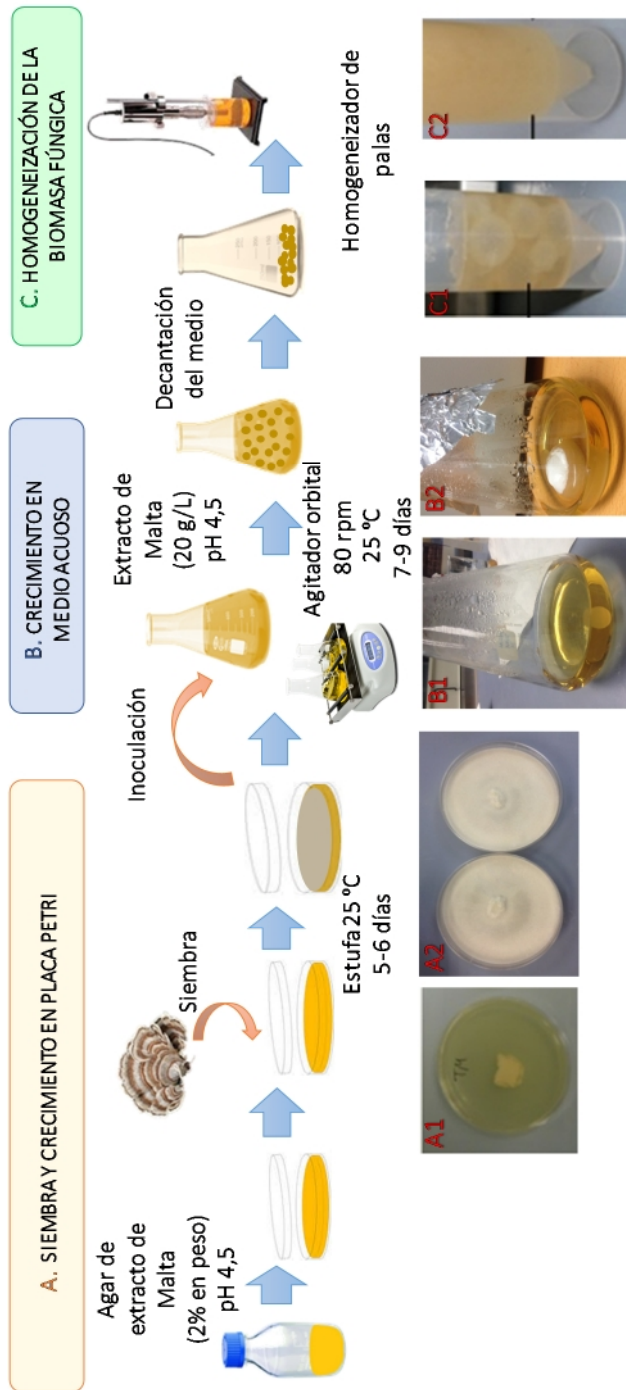


Figura 4.1. Esquema de la preparación y acondicionamiento de la biomasa fúngica micelial de *Trametes versicolor*.

B. Crecimiento en medio acuoso

El hongo sembrado en la etapa anterior sirve como punto de partida para conseguir su crecimiento en medio acuoso. Para ello, se inoculan cuatro partes hongo (1 cm² de área), procedentes de las placas Petri anteriormente preparadas, en una disolución de 20 g/L de extracto de Malta (3 g de extracto en 150 mL de agua ultrapura) a pH 4,5 en matraces Erlenmeyer de 500 mL previamente esterilizados.

Tras la inoculación en dicho medio, se mantienen a 25 °C en un agitador orbital a 80 rpm durante 7-9 días. En la etapa B de la Figura 4.1, se puede ver el aspecto del hongo al comienzo de su crecimiento (imagen B1) y después de la incubación en el medio líquido tras 9 días (imagen B2).

C. Homogeneización de la biomasa fúngica

Finalmente, se decanta la biomasa fúngica para eliminar el caldo de cultivo, y a continuación, se somete a un proceso de trituración con un homogeneizador de palas, obteniéndose una biomasa fúngica en forma de pasta triturada como la que se puede observar en la etapa C de la Figura 4.1, antes (imagen C1) y después (imagen C2) de la homogeneización.

Esta biomasa homogeneizada será utilizada para inocular los contactores biológicos rotativos y que se produzca su inmovilización sobre la superficie de los discos.

4.3. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES MEDIANTE BIOOXIDACIÓN AVANZADA EN CONTACTORES BIOLÓGICOS ROTATIVOS (CBRs)

En este apartado se describe la instalación y el procedimiento experimental seguido durante la evaluación y validación del proceso de biooxidación avanzada con el hongo *Trametes versicolor* inmovilizado sobre el sistema de contactores biológicos rotativos para la eliminación de microcontaminantes orgánicos de origen farmacéutico en el tratamiento de: i) aguas residuales urbanas procedentes de la salida del tratamiento primario de una estación de depuración y ii) aguas residuales hospitalarias antes de su vertido a la red de saneamiento.

4.3.1. Tratamiento de aguas residuales urbanas

El tratamiento de aguas residuales de estaciones de depuración tras el tratamiento primario mediante el proceso de biooxidación avanzada con *Trametes*

versicolor se llevó a cabo en unidades de contactores biológicos rotativos a escala de laboratorio. El estudio de efluentes de diferente naturaleza, procedencia, composición y carga de microcontaminantes farmacéuticos se ha realizado para evaluar y validar la aplicabilidad y reproducibilidad de esta tecnología como alternativa al tratamiento biológico convencional. A continuación, se describe la instalación experimental empleada, su puesta en marcha y las condiciones de operación de los diferentes tratamientos.

4.3.1.1. Instalación experimental

La unidad de contactores biológicos rotativos (CBRs) empleada durante el estudio del proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* para el tratamiento de aguas residuales urbanas, está fabricada por ACAI Depuración S.L. y se esquematiza en la Figura 4.2, constando de las siguientes partes:

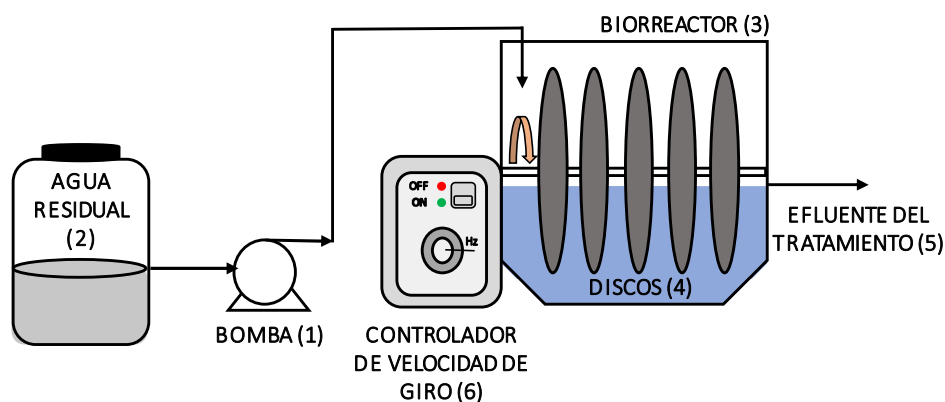


Figura 4.2. Instalación de contactores biológicos rotativos

Tanque de alimentación y bomba de impulsión. El caudal de entrada al biorreactor está controlado por una bomba peristáltica modelo DULCO®flex de la casa comercial ProMinent GUGAL S.A., capaz de suministrar caudales de hasta 12 L/h con una elevada precisión (1). La bomba está conectada a un tanque de alimentación donde se encuentra el agua residual a tratar junto con los mediadores empleados para promover el proceso de biooxidación avanzada (2).

Unidad de contactores biológicos rotativos. Está constituido por una cuba (3) de chapa de acero inoxidable plegada AISI 304 con forma de prisma cuadrangular y una capacidad de 24,5 L. En su interior, se disponen longitudinalmente cinco discos de polipropileno con un espesor de 3 mm y un diámetro de 30 cm (4), los cuales

generan una superficie total para la inmovilización de la biomasa fúngica de 0,71 m². Éstos pueden girar a diferentes velocidades en un rango de 1 a 20 rpm y se pueden sumergir en un porcentaje variable, en función del nivel del agua residual controlado mediante salidas del biorreactor a diferentes alturas (5). El eje central del sistema está conectado a un motor que permite la rotación de todos los biodiscos, homogeneizando la mezcla presente en la cuba y proporcionando unas condiciones aerobias al biorreactor.

Controlador de la velocidad de giro de los contactores rotativos. Se lleva a cabo mediante un variador de frecuencia (6) conectado al motor que hace girar el eje al que están acoplados los discos. El rango de frecuencia es de 0 a 35 Hz, lo que corresponde con una velocidad de giro de hasta 20 rpm.

4.3.1.2. Puesta en marcha de los CBRs

En la unidad de contactores biológicos rotativos presentada anteriormente, se ha realizado el tratamiento en continuo de diferentes aguas residuales urbanas mediante un proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor*. Para ello previamente se realizó la inmovilización del hongo *Trametes versicolor* sobre los discos que conforman el biorreactor hasta conseguir la formación de una biopelícula fúngica de espesor y distribución homogénea.

La puesta en marcha, realizada en discontinuo, se dividió en dos fases. Una primera fase de inmovilización y crecimiento durante 30 días, y una segunda de aclimatación de la biomasa fúngica inmovilizada durante 20 días. A continuación, se describen los detalles de ambas fases para la puesta en marcha del biorreactor.

A. Fase de inmovilización y crecimiento del hongo *Trametes versicolor*

Inicialmente el reactor se llenó con 15 L de una disolución de extracto de Malta como medio de cultivo recomendado para el crecimiento de esta cepa de hongo según la CECT. La disolución utilizada a pH 4,5 tiene una concentración de 6,5 g/L de este sustrato, lo que equivale a 3 g/L de carbono orgánico total (COT), 30 mg/L de N-NH₄⁺ y 5 mg/L de P-PO₄³⁻. A continuación, se inoculó la cuba del reactor con 100 mL de *Trametes versicolor* en forma de biomasa fúngica triturada preparada según el método previamente descrito (apartado 4.2). El volumen de trabajo fue constante durante toda esta fase, con la finalidad de mantener un grado de inmersión de los discos del 60 %. La velocidad de giro de los discos se fijó en 7,5 rpm.

Durante los 30 días de esta fase de inmovilización y crecimiento, se mantuvo la concentración de extracto de Malta en el biorreactor entre 6,5 y 3,25 g/L (equivalente a 3 y 1,5 g/L de COT, respectivamente). Para ello, la concentración de carbono orgánico total consumida por los microorganismos se monitorizó diariamente. Cuando se detectó una concentración de COT inferior a 1,5 g/L, se reemplazó un litro del medio del interior de la cuba de la unidad de contactores biológicos rotativos por 1 L de una disolución de extracto de Malta con la concentración adecuada para recuperar la concentración inicialmente alimentada.

B. Fase de aclimatación

Una vez alcanzada una biopelícula de hongo de espesor y distribución homogénea, se llevó a cabo la fase de aclimatación también realizado en un modo de operación en discontinuo. Durante esta etapa, de 20 días de duración, se reemplazó la disolución de extracto de Malta por un agua residual sintética. La formulación del agua empleada, según la receta descrita por Marco-Urrea y col. (2010 a y 2009), fue la siguiente: 8 g/L de sacarosa, 498 mg/L de tartrato de amonio, 100 mL/L de una disolución de macronutrientes y 10 mL/L de una disolución de micronutrientes a pH 4,5. La descripción de las disoluciones de macro y micronutrientes incluidas en la formulación del agua residual simulada se muestran a continuación en las Tablas 4.1 y 4.2 (Kirk y col., 1978). Durante esta fase, se mantuvo de nuevo la concentración de COT entre 3 y 1,5 g/L, utilizando la misma metodología descrita en la fase anterior.

Tabla 4.1. Composición y concentración de la disolución de macronutrientes

DISOLUCIÓN DE MACRONUTRIENTES	
Compuesto	Concentración (g/L)
Fosfato potásico monobásico	0,2
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,05
Cloruro de calcio anhídrido	0,01

Tabla 4.2. Composición y concentración de la disolución de micronutrientes

DISOLUCIÓN DE MICRONUTRIENTES	
Compuesto	Concentración (g/L)
Nitrilotriacetato sal trisódica monohidratada	1,5
Sulfato de magnesio heptahidratado	3
Sulfato de manganeso (II) monohidratado	0,5
Cloruro de sodio	1
Sulfato de hierro (II) heptahidratado	0,1
Sulfato de cobalto (II) heptahidratado	0,156
Sulfato de zinc monohidratado	0,111
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	0,0068
Cloruro de calcio anhídrido	0,082
Ácido bórico	0,01
Molibdato de sodio dihidratado	0,01
Alumbre de potasio dodecahidratado	0,01
Biotina	0,002
Ácido fólico	0,002
Hidrocloreuro de tiamina (vitamina B1)	0,005
Riboflavina (Vitamina B2)	0,005
Piridoxina (Vitamina B6)	0,01
Cianocobalamina (Vitamina B12)	0,0001
Niacina (Vitamina B3)	0,005
D-pantotenato de calcio (Vitamina B5)	0,005
Ácido p-aminobenzoico	0,005
Ácido α -lipoico	0,005

4.3.1.3. Procedimiento del proceso de tratamiento

Una vez realizada la puesta en marcha y aclimatación de la unidad de contactores biológicos rotativos, se llevó a cabo el tratamiento en continuo de aguas residuales urbanas de diferente procedencia y composición, con el objetivo de evaluar y validar la aplicabilidad de esta tecnología para el tratamiento de efluentes procedentes del tratamiento primario de estaciones depuradoras de aguas residuales.

En primer lugar, se realizó el tratamiento de dos aguas residuales urbanas (sintética y real) dopadas con compuestos farmacéuticos de diferente naturaleza hasta una concentración de 50 $\mu\text{g/L}$. Estos tratamientos, se efectuaron con la finalidad

de evaluar la eficacia del proceso de biooxidación avanzada. A continuación, se realizó el tratamiento de dos aguas residuales reales urbanas procedentes del tratamiento primario de una planta depuradora piloto situada en el Campus de Móstoles de la Universidad Rey Juan Carlos y de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) situada en la provincia de Toledo. En este caso, el objetivo fue validar la tecnología de depuración con aguas residuales urbanas reales de diferentes características y bajo diferentes condiciones de operación.

Como mediadores para promover el proceso de biooxidación avanzada se añadieron a las aguas residuales 85 mg/L de ácido gálico como mediador quinónico y 145 mg/L oxalato de hierro (III) hexahidratado junto con 20 mg/L nitrato de manganeso (II) tetrahidratado como fuentes metálicas redox adicionales. Las concentraciones utilizadas de estos mediadores se seleccionaron de acuerdo a un trabajo previo publicado por Marco-Urrea y col. (2010 a). Respecto al mediador quinónico, se sustituyó la benzoquinona por ácido gálico, tras haberse comprobado su eficacia en el trabajo desarrollado por Vasiliadou y col. (2018) y ser un compuesto natural que se encuentra de forma abundante en plantas y corteza de árboles y un subproducto de la biodegradación natural de la lignina.

En comparación con las condiciones de operación de la puesta en marcha, el grado de sumergencia de los contactores biológicos rotativos se redujo al 40 % y la velocidad de giro se aumentó a 12 rpm. Además, el pH también se ajustó a 4,5 con ácido sulfúrico 2 N o de hidróxido de sodio 10 M, para ralentizar el metabolismo bacteriano frente al fúngico (Woo-Sik y col., 2010).

Durante el tratamiento de las aguas residuales descritas, se realizó el seguimiento de las cargas de carbono orgánico total (COT), nitrógeno en forma de amonio (N-NH_4^+), fósforo en forma de fosfatos (P-PO_4^{3-}) y de los compuestos farmacéuticos, tanto en el agua residual de entrada como del efluente de salida del tratamiento biológico. La demanda química de oxígeno total (DQO_T) se determinó semanalmente en ambas corrientes. Además, se monitorizó el pH de la corriente de entrada y salida del biorreactor, así como la concentración de oxígeno disuelto en el agua residual presente en la cuba de los contactores biológicos rotativos.

En la Tabla 4.3, se indican las condiciones de operación de los tratamientos de diferentes tipos de efluentes de aguas residuales urbanas estudiados en la unidad de contactores biológicos rotativos con *Trametes versicolor*, así como las etapas previas de puesta en marcha y acondicionamiento del biorreactor.

Tabla 4.3 Condiciones de operación de los tratamientos de diferentes tipos de efluentes de aguas residuales urbanas en los CBRs con *Trametes versicolor*

	Agua residual			Condiciones de operación CBRs				
	Alimento	pH	Fármacos	Promotores de biooxidación avanzada	Modo de operación	TRH	Sumergencia (%)	Velocidad (rpm)
Inmovilización y crecimiento	Extracto de malta	4,5	-	-	Discontinuo	-	60 ± 10	7,5
	Sacarosa		8 g/L					
Aclimatación	Tartrato de amonio	4,5	-	-	Discontinuo	-	60 ± 10	7,5
	Macronutrientes		100 mL/L					
	Micronutrientes		10 mL/L					
TRATAMIENTOS DE AGUAS RESIDUALES URBANAS								
Agua residual sintética dopada con fármacos	Sacarosa	0,6 g/L	4-AAA, DCF, ACF, GFZ,	Ácido gálico	85 mg/L			
	Tartrato de amonio	37 mg/L	HCT, CZP, CFN, SMX	Oxalato de hierro (III)	145 mg/L	1 día	40 ± 10	12
	Macronutrientes	100 mL/L		Nitrato de manganeso (II)	20 mg/L			
	Micronutrientes	10 mL/L	50 µg/L					
				4-AAA, DCF, ACF, GFZ, HCT, CZP, CFN, SMX, IBP, SPD, RNT, PGT, ATN	Ácido gálico	85 mg/L		
Agua residual depuradora URIC dopada con fármacos <i>URIC 1-dopada</i>	Agua residual bruta			Oxalato de hierro (III)	145 mg/L			
	COT: 415 mg/L	4,5				1 día	40 ± 10	12
	N-NH ₄ ⁺ : 50 mg/L			Nitrato de manganeso (II)	20 mg/L			
			P-PO ₄ ³⁻ : 2 mg/L					
			50 µg/L					

Tabla 4.3 (continuación). Condiciones de operación de los tratamientos de diferentes tipos de efluentes de aguas residuales urbanas en los CBRs con *Trametes versicolor*

Etapa	Agua residual				Condiciones de operación CBRs			
	Alimento	pH	Fármacos	Promotores de biooxidación avanzada	Modo de operación	TRH	Sumergencia (%)	Velocidad (rpm)
TRATAMIENTOS DE AGUAS RESIDUALES URBANAS								
Agua residual depuradora URJC URJC 2-Fúngico	Agua residual bruta COT: 145 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 120 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 12 mg/L	4,5	Concentración natural	-	Continuo	1 día	40 ± 10	12
Agua residual depuradora URJC URJC 3-Fúngico + biooxidación	Agua residual bruta COT: 115 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 175 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 14 mg/L	4,5	Concentración natural	Ácido gálico Oxalato de hierro (III) Nitrito de manganeso (II)	Continuo	1 día	40 ± 10	12
Agua residual depuradora URJC URJC 4-TRH 0,5 días	Agua residual bruta COT: 140 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 30 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 10 mg/L	4,5	Concentración natural	Ácido gálico Oxalato de hierro (III) Nitrito de manganeso (II)	Continuo	12 h	40 ± 10	12
Agua residual EDAR Toledo Toledo-1	Agua residual bruta COT: 76 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 29 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 13 mg/L	4,5	Concentración natural	Ácido gálico Oxalato de hierro (III) Nitrito de manganeso (II)	Continuo	1 día	40 ± 10	12
Agua residual EDAR Toledo Toledo-2	Agua residual bruta COT: 116 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 41 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 2,3 mg/L	4,5	Concentración natural	Ácido gálico Oxalato de hierro (III) Nitrito de manganeso (II)	Continuo	1 día	40 ± 10	12

A. Agua residual urbana sintética dopada con fármacos

El agua residual urbana sintética tuvo la misma formulación que la descrita anteriormente en la fase de aclimatación de la biomasa fúngica (Marco-Urrea y col., 2010 a; Marco-Urrea y col., 2009). Ésta fue dopada con ocho compuestos farmacéuticos en una concentración de 50 µg/L de cada uno ellos. Los compuestos seleccionados fueron: antipirina (4-AAA), ácido clofíbrico (ACF), cafeína (CFN), carbamazepina (CZP), diclofenaco (DCF), gemfibrozilo (GFZ), hidroclorotiazida (HCT) y sulfametoxazol (SMX). En la Tabla 4.4, se recoge las familias terapéuticas a las que pertenece cada uno de los microcontaminantes.

Tabla 4.4. Familias terapéuticas de los fármacos dopados en el agua residual simulada

Familia terapéutica	Compuesto farmacéutico	Abreviatura
Antiinflamatorios y analgésicos	Antipirina	4-AAA
	Diclofenaco	DCF
Reguladores de lípidos y colesterol en sangre	Ácido clofíbrico	ACF
	Gemfibrozilo	GFZ
	Hidroclorotiazida	HCT
Psiquiátricos	Carbamazepina	CZP
	Cafeína	CFN
Antibióticos	Sulfametoxazol	SMX

El biorreactor operó en continuo durante 120 días con un caudal de 10 L/día y un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 1 día. Este TRH se fijó en base a que previamente en bibliografía, se recogieron resultados satisfactorios con hongos ligninolíticos utilizando TRH moderados entre 3 y 1 día (Marco-Urrea y col., 2010 a y b; Mir-Tutusaus y col., 2018 a). Asimismo, es un tiempo de residencia comparable con el de un tratamiento biológico secundario en una planta de depuración urbana (Vasiliadou y col., 2014; Kim y col., 2005).

B. Agua residual urbana de la planta depuradora piloto de la URJC

El agua residual de esta planta piloto procede del tratamiento primario de la depuradora localizada en el Centro de Apoyo Tecnológico de la Universidad Rey Juan Carlos (URJC) en Móstoles (Madrid). Esta planta diseñada y construida por la empresa Depuración Ibérica de Aguas (D.E.I.D.A), depura las aguas residuales del Campus de Móstoles con el objetivo de reutilizar el agua para el riego de las zonas verdes o los sistemas contraincendios. El diseño propuesto ofrece la versatilidad suficiente para asumir grandes variaciones de caudal y carga, propias de las actividades realizadas en

el campus. Como se muestra en la Figura 4.3, esta planta depuradora a nivel de escala piloto cuenta con las etapas características de una estación depuradora de aguas urbanas como son: pretratamiento, tratamiento primario, secundario y terciario. Asimismo, también presenta una línea de tratamiento de fangos.

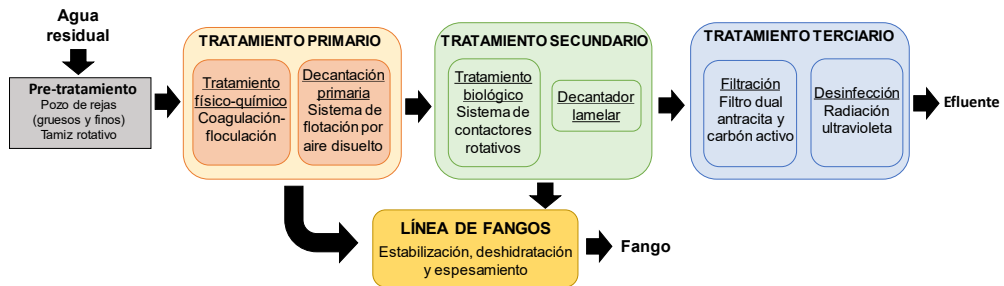


Figura 4.3. Esquema de la planta piloto de depuración de aguas residuales de la URJC

La captación de agua se realiza desde el colector general de la universidad, a través de un pozo de bombeo donde se encuentra dispuesto un sistema de rejillas para la separación de sólidos gruesos con un paso libre de 40 mm. Desde este pozo, se bombea el agua hasta la estación depuradora donde se mide el caudal bruto de entrada a la planta. La instalación está diseñada para un caudal máximo de 360 m³/d y 1.800 habitantes equivalentes. El pretratamiento del agua residual de entrada se completa con un tamiz rotativo para el desbaste de sólidos finos (0,75 mm de paso) y un depósito de homogenización posterior. El tratamiento primario o tratamiento físicoquímico consta de un tanque de coagulación, otro de floculación y un separador de sólidos y aceites y grasas por flotación con aire. El reactor biológico bacteriano utilizado en el tratamiento secundario es un sistema análogo al utilizado durante este trabajo de investigación, basado en un sistema de biodiscos dividido en 3 unidades y un decantador lamelar. Finalmente, completan el tratamiento del agua antes de su vertido, un sistema de filtración con carbón activo y una unidad de desinfección por radiación ultravioleta. Paralelamente, existe una línea de fangos donde se recogen todos los lodos purgados durante el tratamiento del agua. Esta línea consta de un sistema de espesado y deshidratación que genera un fango que se gestiona como un residuo sólido. El agua residual recogida para esta experimentación procede de la salida del tratamiento primario después del proceso de flotación con aire disuelto para la eliminación de sólidos en suspensión, aceites y grasas.

Como se puede ver en la Tabla 4.3, el tratamiento de esta agua residual se ha llevado a cabo en cuatro etapas donde se varió la concentración de los microcontaminantes farmacéuticos del agua o las condiciones de operación. En la primera etapa, el agua residual (URJC-1) se alimentó al sistema durante 35 días

dopada con trece compuestos farmacéuticos con una concentración inicial de 50 µg/L de cada uno de ellos. Los compuestos añadidos fueron: antipirina (4-AAA), ácido clofíbrico (ACF), atenolol (ATN), cafeína (CFN), carbamazepina (CZP), diclofenaco (DCF), gemfibrozilo (GFZ), hidroclorotiazida (HCT), ibuprofeno (IBP), progesterona (PGT), ranitidina (RNT), sulfametoxazol (SMX) y sulpirida (SPD). En la Tabla 4.5, se muestran las familias terapéuticas a las que pertenecen los fármacos que anteriormente no se han incluido en la Tabla 4.4.

Tabla 4.5. Familias terapéuticas de fármacos dopados en el agua residual urbana URJC-1

Familia terapéutica	Compuesto farmacéutico	Abreviatura
Antiinflamatorios y analgésicos	Ibuprofeno	IBP
Psiquiátricos	Sulpirida	SPD
Antihistamínicos	Ranitidina	RNT
Hormonas	Progesterona	PGT
β-bloqueantes	Atenolol	ATN

Posteriormente, en una segunda etapa (**URJC-2**) que duró 65 días, se alimentó el agua residual bruta sin dopar, manteniendo la concentración de microcontaminantes farmacéuticos propia del agua residual. Además, en esta segunda etapa no se añadieron los mediadores promotores del proceso de biooxidación avanzada, siendo el proceso de depuración completamente biológico, derivado del metabolismo natural de los hongos sin potenciar ningún proceso de biooxidación avanzada. Durante esta etapa, se mantuvieron constantes el resto de las condiciones de operación de la unidad de CBRs (TRH, grado de sumergencia y velocidad de giro de los biodiscos). En la tercera etapa (**URJC-3**), el agua residual se trató operando bajo las mismas condiciones durante 30 días, pero añadiendo los mediadores promotores del proceso de biooxidación avanzada, con concentraciones iguales a las empleadas para la matriz de agua sintética y la etapa URJC-1. Finalmente, se realizó una última etapa de tratamiento (**URJC-4**) donde se mantuvieron las condiciones anteriores durante 20 días, pero se disminuyó el tiempo de residencia hidráulico a 0,5 días.

C. Agua residual urbana de una EDAR de Toledo

Como tercera parte del estudio, se realizó el tratamiento del agua residual urbana procedente de la salida del tratamiento primario de una estación depuradora de aguas residuales ubicada en la provincia de Toledo. Actualmente, la EDAR opera con un caudal medio de 8.800 m³/d y una población de 65.000 habitantes

equivalentes, dando servicio a la ciudad de Toledo y sus urbanizaciones colindantes antes de verter las aguas tratadas al río Tajo. La depuradora consta de una línea de aguas y otra de fangos. Además, realiza una gestión ecosostenible reutilizando las aguas tratadas en la propia planta y generando biogás a partir de los fangos obtenidos.

La línea de tratamiento de agua consta de las etapas convencionales de depuración de una EDAR: pretratamiento, primario, secundario y terciario. En la etapa de pretratamiento, se realiza el desbaste de los sólidos con un doble pozo de gruesos (20 mm de paso) y un tamizado de finos (3 mm de paso), así como el desarenado y desengrasado con un canal aireado. A continuación, se dispone una decantación primaria en tanques de sedimentación donde la materia en suspensión se deposita por acción de la gravedad. El tratamiento biológico es un sistema de fangos activos con eliminación de nitrógeno y fósforo por vía biológica, desarrollado en tanques aireados mediante el proceso denominado NIPHO plus, seguido de una clarificación posterior o decantación secundaria. Esta agua de salida se somete a un tratamiento de afino mediante cámaras de floculación, decantación lamelar, filtros de discos y desinfección con luz ultravioleta. Por otra parte, la línea de fangos cuenta con una cámara de mezclado, espesadores, fermentadores, tanque de digestión anaerobia y sistemas de deshidratación mecánica. Al igual que con el agua residual urbana procedente de la depuradora piloto de la URJC, el agua recogida para esta experimentación procede de la salida del tratamiento primario.

Como se puede ver en la Tabla 4.3, el tratamiento continuo del agua residual se divide en dos etapas debido a que el agua residual recogida en dos campañas de muestreo mostró una composición diferente en cada una de ellas (**Toledo-1** y **Toledo-2**). En ambas etapas se operó con un TRH de 1 día, una sumergencia de los biodiscos del 40 % y una velocidad de giro de 12 rpm durante 22 días. El agua residual se alimentó sin dopar compuestos farmacéuticos, con el pH ajustado a 4,5 y los mediadores promotores del proceso de biooxidación avanzada en las mismas concentraciones que en el caso del agua procedente de la depuradora piloto del Campus de Móstoles de la URJC.

4.3.2. Tratamiento de agua residual hospitalaria

El tratamiento de un agua residual hospitalaria mediante el proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* se llevó a cabo en dos unidades modificadas de contactores biológicos rotativos que operaron de forma paralela bajo las mismas condiciones de operación. De este modo, se pudo evaluar y validar la aplicabilidad y reproducibilidad de esta tecnología para el tratamiento descentralizado de efluentes hospitalarios donde la concentración de contaminantes

es superior que en un agua residual urbana. A continuación, se describen las instalaciones experimentales empleadas, su puesta en marcha y las condiciones de operación de los diferentes tratamientos.

4.3.2.1. Instalación experimental

Para esta parte de la investigación, se realizó una modificación en las unidades de contactores biológicos rotativos, la cual consistió en el recubrimiento de los discos de polipropileno con placas de madera para promover una mayor adhesión y estabilización del hongo *Trametes versicolor*. La madera como sustrato lignocelulósico proporciona una fuente natural de nutrientes para este tipo de hongos ligninolíticos de podredumbre blanca (Torán y col., 2017). Como se puede observar en la Figura 4.4, los cinco discos de polipropileno se recubrieron con una plancha de madera de pino natural de 0,5 cm de espesor, sin variar la superficie total disponible para la inmovilización de la biomasa ($0,71 \text{ m}^2$). Además, el sistema también incluye un sistema de palas solidario al eje de giro de los discos para mejorar la turbulencia y la homogeneización del contenido de la cuba, así como la transferencia de masa de oxígeno del aire atmosférico al líquido.

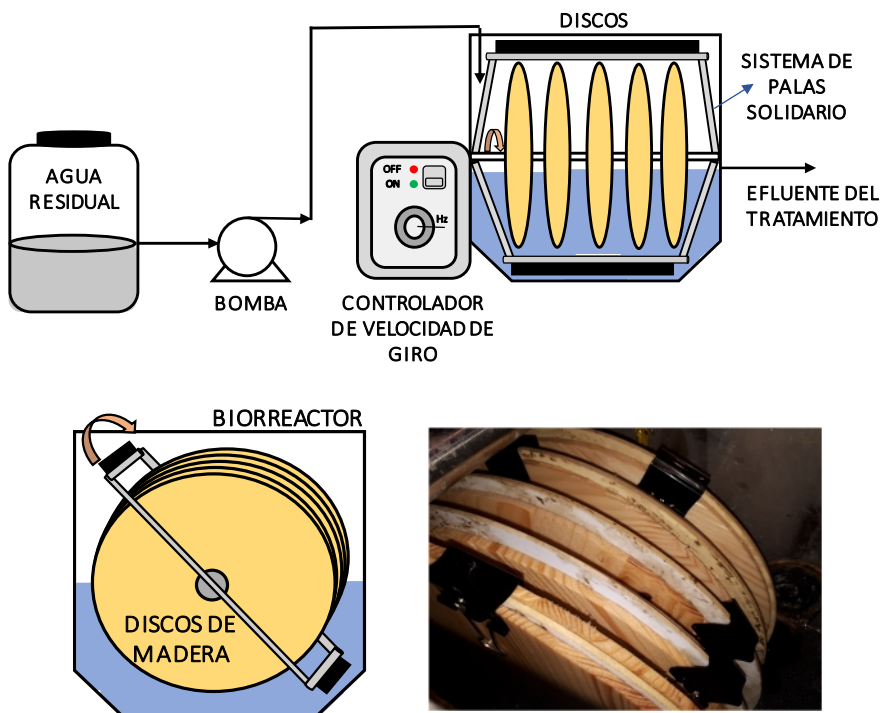


Figura 4.4. Instalación de contactores biológicos rotativos modificados con planchas de madera

4.3.2.2. Puesta en marcha de los CBRs modificados

En las unidades de CBRs modificadas con discos de madera se inmovilizó el *Trametes versicolor* siguiendo un procedimiento similar al de unidad convencional descrita anteriormente, aunque con algunas variaciones debido a las nuevas modificaciones técnicas.

La puesta en marcha de las dos unidades modificadas de CBRs se ha llevado a cabo de manera simultánea y se dividió en tres fases. Una primera fase de pretratamiento de los discos recubiertos de madera para comenzar la formación de la biopelícula de *Trametes versicolor* en una segunda fase de inmovilización y crecimiento y finalizar con una fase de aclimatación.

A. Fase de pretratamiento de la superficie de la madera

Los discos de madera se fijaron sobre los discos de polipropileno de los CBRs. A continuación, se llenó el reactor con 15 L de agua (equivalente a un porcentaje de sumergencia del disco del 60 %), manteniendo una velocidad de giro de 7,5 rpm durante 24 horas para eliminar las posibles impurezas presentes en el material.

B. Fase de inmovilización y crecimiento

Después del lavado de los discos de madera, se eliminó el agua del reactor y se substituyó por 15 L de agua ultrapura con 100 mL de biomasa triturada de *T. versicolor*, preparada según el procedimiento previamente descrito (apartado 4.2). Los discos se mantuvieron girando a 7,5 rpm durante 30 días con el fin de promover la inmovilización y el crecimiento de la biomasa fúngica sobre la madera, la cual actúa como sustrato natural (Torán y col., 2017).

Transcurridos los 30 días y una vez que la biomasa empieza a adherirse a los discos de madera, se replazan los 15 L de agua ultrapura por el mismo volumen de una disolución de 6,5 g/L de extracto de Malta a pH 4,5. Durante 40 días adicionales, se operó en discontinuo manteniendo un grado de sumergencia de los discos del 60 % y una velocidad de giro de 7,5 rpm. Durante este tiempo, la concentración de extracto de Malta se mantuvo entre 6,5 y 3,25 g/L (3 y 1,5 g/L de COT, respectivamente), siguiendo el mismo procedimiento previamente descrito para la puesta en marcha de los CBRs en el tratamiento de aguas residuales urbanas.

C. Fase de aclimatación

Una vez se alcanzó un recubrimiento homogéneo y estable del hongo sobre los discos de madera, se procedió a su aclimatación en cuatro etapas. En dichas etapas se fue variando de manera progresiva la matriz del agua, la carga de carbono y nitrógeno y el modo de operación, para asegurar una correcta aclimatación de la biopelícula de hongo a las características del agua residual hospitalaria (baja carga de carbono orgánico y elevada concentración de microcontaminantes farmacéuticos). A continuación, se indican las condiciones de operación de cada una de las etapas de aclimatación.

Etapas 1: se incorporó al biorreactor 5 L de agua hospitalaria y 5 L de una disolución de extracto de Malta con una concentración de 1 g/L. La sumergencia de los discos bajó al 40 %. La velocidad de giro del reactor se mantuvo en 7,5 rpm y el pH en 4,5. Esta etapa tuvo una duración de 4 días.

Etapas 2: se reemplazó el agua de las cubas por 5 L de agua hospitalaria y 5 L de un agua residual simulada de composición: 0,6 g/L de sacarosa, 37 mg/L de tartrato de amonio, 100 mL/L de macronutrientes y 10 mL/L de micronutrientes, en lugar de los 5 L de la disolución de extracto de malta. En esta etapa se siguieron manteniendo el resto de las condiciones de operación de la etapa 1 durante 2 días.

Etapas 3: se alimentó 10 L del agua residual hospitalaria enriquecida con fuentes de carbono y nitrógeno adicionales (0,6 g/L de sacarosa, 37 mg/L de tartrato de amonio, 100 mL/L de macronutrientes y 10 mL/L de micronutrientes). En esta etapa de 2 días de duración, se aumentó la velocidad de giro de los biodiscos hasta 12 rpm.

Etapas 4: finalmente se comenzó a alimentar en continuo el agua residual hospitalaria bruta con un aporte reducido de carbono y nitrógeno adicional de 0,12 g/L de sacarosa y 7 mg/L de tartrato de amonio. Los CBRs operaron durante 2 días en continuo con un TRH de 1 día, antes de pasar al tratamiento directo del agua residual hospitalaria.

4.3.2.3. Procedimiento de proceso del tratamiento

El agua residual hospitalaria utilizada en esta investigación procede de un hospital público de actividad moderada (400 camas, 15 quirófanos, 195 locales de consultas externas y 58 puestos hospitalarios de día) localizado en el sur de la Comunidad de Madrid. Este centro genera tres efluentes procedentes de diferentes unidades terapéuticas (áreas generales, rayos, digestivo, laboratorio, UVI, anatomía, esterilización y farmacología). Con el fin de recolectar muestras representativas de la

descarga diaria del hospital, el muestreo se realizó por agrupación de corrientes utilizando sistemas automáticos que recogen 330 mL (110 mL de cada efluente) de agua residual cada 10 minutos durante 7 días. Finalmente, estas tomas de muestreo se mezclan hasta conseguir volúmenes de agua de 1000 L. El procedimiento se realizó dos veces en enero y abril de 2018 para obtener suficiente agua para realizar toda la parte experimental de este trabajo de investigación. El agua hospitalaria acumulada no sufrió ningún pretratamiento previo antes de su almacenamiento.

El proceso de biooxidación avanzada con el agua hospitalaria se llevó a cabo en las dos unidades modificadas de CBR descritas previamente, operando en continuo con un TRH de 1 día, una sumergencia del 40 % y una velocidad de giro de 12 rpm durante 75 días. De nuevo, las concentraciones de los promotores del proceso de biooxidación avanzada fueron iguales a las utilizadas en el tratamiento de las aguas residuales urbanas descritas anteriormente, no hubo dopaje adicional de compuestos farmacéuticos y el pH inicial se ajustó a 4,5. En la Tabla 4.6 se resumen las condiciones de operación de las diferentes etapas de puesta de las unidades modificadas de CBRs con *Trametes versicolor* y el tratamiento posterior del agua residual hospitalaria.

El seguimiento de las concentraciones de COT, N-NH₄⁺, P-PO₄³⁻ y de los compuestos farmacéuticos en el agua residual de entrada como en el efluente de salida del tratamiento biológico fueron realizados diariamente. La demanda química de oxígeno total, el nitrógeno total Kjeldahl, la concentración de ácido gálico y de especies metálicas de hierro y manganeso se determinaron semanalmente en ambas corrientes. Además, se monitorizó el pH de entrada y salida del biorreactor, así como la concentración de oxígeno disuelto y la temperatura en la cuba del biorreactor.

Tabla 4.6. Condiciones de operación de la puesta en marcha y tratamiento del agua residual hospitalaria en las unidades modificadas de CBRs con *Trametes versicolor*

Fase	Tiempo	Características del medio o agua residual				Condiciones de operación CBRs modificados			
		Medio o agua residual	pH	Fármacos	Medio de operación	TRH	Sumergencia (%)	Velocidad (rpm)	
Pretratamiento	30 días	Agua ultrapura	-	-	Discontinuo	-	60 ± 10	7,5	
Inmovilización y crecimiento	40 días	Extracto de malta	4,5	-	Discontinuo	-	60 ± 10	7,5	
Acimatación									
Etapa 1	4 días	50 % en volumen extracto de malta	1 g/L	-	Discontinuo	-	40 ± 10	7,5	
		50 % en volumen agua residual hospitalaria bruta	COT: 75 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 40 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 3 mg/L	4,5	Discontinuo	-	40 ± 10	7,5	
		50 % en volumen agua residual simulada	Sacarosa: 0,6 g/L Tartrato de amonio: 37 mg/L Macronutrientes: 100 mL/L Micronutrientes: 10 mL/L	4,5	Discontinuo	-	40 ± 10	7,5	
Etapa 2	2 días	50 % en volumen agua residual hospitalaria bruta	COT: 75 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 40 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 3 mg/L	4,5	Discontinuo	-	40 ± 10	7,5	
		Agua residual hospitalaria enriquecida	Sacarosa: 0,6 g/L Tartrato de amonio: 37 mg/L Macronutrientes: 100 mL/L Micronutrientes: 10 mL/L	4,5	Discontinuo	-	40 ± 10	12	
		Agua residual hospitalaria enriquecida	Sacarosa: 0,12 g/L Tartrato de amonio: 7 mg/L Macronutrientes: 100 mL/L Micronutrientes: 10 mL/L	4,5	Continuo	1 día	40 ± 10	12	
Tratamiento del agua residual hospitalaria	75 días	Agua residual hospitalaria	4,5	-	Continuo	1 día	40 ± 10	12	
			COT: 75 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 40 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 3 mg/L Ácido gálico: 85 mg/L Oxalato de Fe (II): 145 mg/L Nitrato de Mn (II): 20 mg/L						

4.4. TRATAMIENTO DEL AGUA RESIDUAL HOSPITALARIA MEDIANTE OXIDACIÓN AVANZADA TIPO FENTON CON CATALIZADOR TIPO PEROVSKITA

El tratamiento del agua residual hospitalaria descrita anteriormente también se llevó a cabo mediante un proceso de oxidación avanzada Fenton con un catalizador heterogéneo tipo perovskita de composición $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$. Para ello, en primer lugar, se realizó la síntesis del catalizador en polvo y posteriormente se estudió el desarrollo de materiales porosos reticulados.

Se realizaron experimentos preliminares para evaluar la influencia de diferentes variables de operación sobre la actividad y la estabilidad del catalizador en polvo. Estos primeros ensayos se realizaron en un reactor discontinuo de tipo tanque agitado con el agua residual hospitalaria dopada con una concentración de carbamazepina de 15 mg/L, como microcontaminante farmacéutico modelo que apenas es eliminado en las estaciones depuradoras de aguas residuales.

La eficacia del material poroso reticulado como catalizador del proceso Fenton se evaluó en un reactor continuo de lecho fijo para la eliminación de 15 mg/L de carbamazepina dopados a la matriz de agua residual hospitalaria. Finalmente, bajo las condiciones óptimas de operación, se validó la aplicabilidad del proceso Fenton con el catalizador reticulado heterogéneo tipo perovskita como tratamiento descentralizado para la eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos presentes en el agua hospitalaria antes de su vertido al colector general de saneamiento.

4.4.1. Preparación y caracterización del catalizador

4.4.1.1. Preparación del material en polvo

La síntesis del material en polvo tipo perovskita $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ realizada en el presente trabajo se llevó a cabo mediante una adaptación del proceso de síntesis descrito previamente en bibliografía (Carrasco-Díaz y col., 2016). Este método consiste en una coprecipitación ácida de las especies metálicas disueltas con citrato en forma de sol-gel por el efecto de la temperatura. El procedimiento experimental de síntesis se esquematiza en la Figura 4.5:

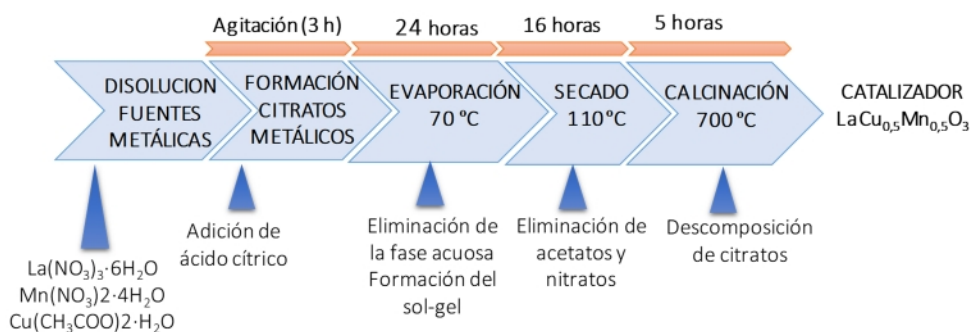


Figura 4.5. Procedimiento de síntesis directa del catalizador $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ en polvo

Para la síntesis del material se usaron nitrato de lantano (III) hexahidratado ($\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), nitrato de manganeso (II) tetrahidratado ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y acetato de cobre (II) hidratado ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) como fuentes metálicas. La síntesis se llevó a cabo mezclando los nitratos metálicos y el acetato de cobre en 100 mL de agua ultrapura con ácido cítrico, el cual se añadió hasta ajustar el pH a $2,5 \pm 0,3$. La suspensión resultante de la dispersión del ácido cítrico se sometió a una etapa de agitación vigorosa durante 3 horas hasta alcanzar la completa disolución de las sales metálicas. Transcurrido este tiempo, la mezcla líquida se calentó en un horno de calefacción convencional a 70°C hasta la evaporación de la fase acuosa consiguiendo así la formación de un gel viscoso. El sol-gel obtenido se calentó a 110°C durante 16 horas para la eliminación de los acetatos y nitratos presentes en la disolución. Finalmente, el sólido obtenido se muele y se calina en atmósfera de aire a 700°C durante 5 horas, para producir la descomposición del citrato empleado como agente precursor de la estructura de perovskita.

4.4.1.2. Preparación de los materiales porosos reticulados

La preparación de los materiales porosos reticulados de perovskita (RPP) a partir de la perovskita $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ sintetizada en polvo, se realizó mediante una modificación del procedimiento desarrollado para la fabricación de espumas de TiO_2 sobre soportes de poliuretano orgánico anteriormente descrito por Fey y col. (2017) y Haugen y col. (2004). Según este método, el material poroso reticulado se obtiene mediante impregnación de un soporte orgánico de poliuretano (de la casa comercial CRI 62, 40 ppi –poros por pulgada- y 20 mm de espesor) con una suspensión que contiene el material perovskita activo en polvo. La espuma de poliuretano actúa como soporte o estructura base para el conformado del material y finalmente se retira mediante calcinación.

En este trabajo, se ha modificado el tipo dispersante y se ha añadido un aglomerante inorgánico adicional respecto al procedimiento inicial descrito en bibliografía. Principalmente, debido al carácter hidrofóbico de la perovskita, se requiere un dispersante orgánico (etanol) que proporcione una mejor dispersión de las partículas en la suspensión catalítica empleada para la impregnación de la espuma de poliuretano. Por otro lado, la necesidad de mejorar la resistencia mecánica del material reticulado poroso requirió de un aglomerante inorgánico adicional.

La suspensión catalítica de perovskita se prepara dispersando el catalizador $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ en polvo y un 25 % de bentonita (en peso respecto a la masa inicial de perovskita) como aglomerante inorgánico en un 60 % de etanol (en peso respecto a la masa inicial de perovskita). A continuación, se adiciona un agente defloculante (Dolapix CE 64 en un 65 % en peso respecto a la masa inicial de perovskita) para estabilizar la dispersión y evitar la aglomeración de las partículas finas del catalizador. Posteriormente, se añade un 4 % en peso de Optapix PA 4 G disuelto en agua a 85 °C como aglomerante orgánico y, una vez enfriada la mezcla, un par de gotas de un antiespumante (Contraspum KWE). Consecutivamente, se sumerge una espuma de poliuretano de 40 ppi –poros por pulgada-, con unas dimensiones de 15 mm de ancho, 40 mm de largo y 40 mm de altura, a la suspensión catalítica que contiene perovskita durante 30 minutos y se deja secar durante 24 horas. Este procedimiento se realiza dos veces. Finalmente, el soporte de poliuretano se elimina por calcinación siguiendo el programa de temperaturas y tiempos mostrado en la Figura 4.6, hasta una temperatura de 700 °C. En esta investigación se estudió realizar un tratamiento térmico adicional para la sinterización del material poroso reticulado a 1000 y 1200 °C, donde se calienta con una rampa de 5 °C/min y se mantiene 2 horas. En la Tabla 4.7 se resumen las formulaciones y condiciones de los materiales preparados.

Tabla 4.7. Condiciones de preparación de los catalizadores porosos reticulados tipo perovskita $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$

Muestra (RPP)	Disolvente	Aglomerante inorgánico	Defloculante	Aglomerante orgánico	T ^a calcinación (°C)
	Etanol	Bentonita	Dolapix CE 64	Optapix PA 4 G	
% p/ρ _{LaCu_{0,5}Mn_{0,5}O₃}					
RPP-700	60	25	65 ± 1	4 ± 0,5	700 °C
RPP-1000	60	25	65 ± 1	4 ± 0,5	1000 °C
RPP-1200	60	25	65 ± 1	4 ± 0,5	1200 °C

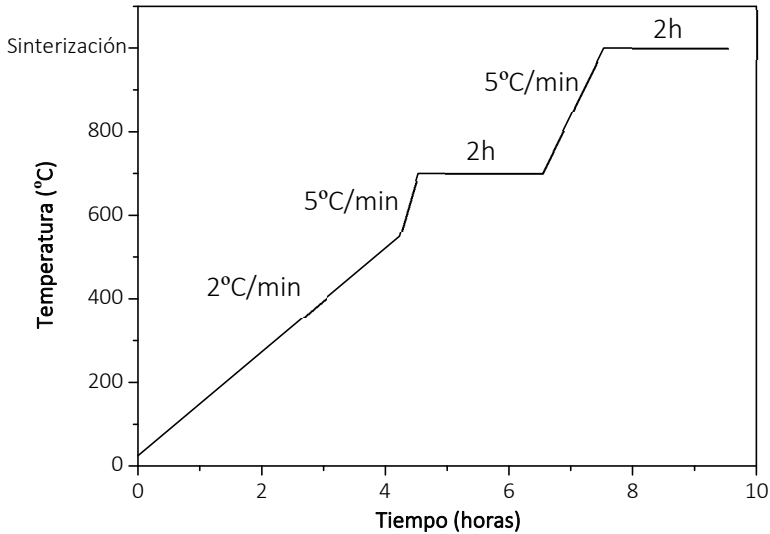


Figura 4.6. Programa de calcinación para la preparación catalizadores porosos reticulados tipo perovskita $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$

4.4.2. Actividad y estabilidad del catalizador

Se realizaron experimentos preliminares para evaluar la actividad y estabilidad del catalizador en polvo en diferentes condiciones de operación en un reactor discontinuo. Posteriormente, de acuerdo con esos resultados, se optimizaron las condiciones de operación en un reactor de lecho fijo continuo para la eliminación de carbamazepina presente en la matriz de agua hospitalaria.

4.4.2.1. Catalizador en polvo

Los ensayos se llevaron a cabo en un reactor discontinuo de vidrio de 1 L de tipo tanque agitado no presurizado con control de la temperatura y la velocidad de agitación. Para estos ensayos, se emplearon 600 mL del agua hospitalaria previamente descrita (apartado 4.3.2.3), pero dopada con 15 mg/L de carbamazepina como contaminante modelo. El pH del agua residual hospitalaria se ajustó al valor requerido para cada uno de los experimentos mediante adición de H_2SO_4 2N. La temperatura se controló en el valor requerido para cada ensayo y la agitación magnética se ajustó a una velocidad de 700 rpm para descartar problemas difusionales al trabajar con el catalizador en polvo.

Una vez que se alcanzó la temperatura deseada, la cantidad requerida de H₂O₂, valor estequiométrico para la mineralización total de la carga de COT del agua hospitalaria dopada (700 mg/L), y 0,6 g/L del catalizador en polvo se agregaron al reactor tomando ese instante como tiempo cero de reacción. El tiempo del experimento se extendió hasta que el peróxido de hidrógeno se consumió por completo. La evolución del pH, la concentración de carbamazepina, la descomposición del peróxido, la mineralización de carbono orgánico total y la concentración de metales disueltos a tiempo final fueron los parámetros monitorizados durante estos ensayos.

La temperatura (30, 50 y 70 °C) y el pH (3, 5,5 y natural -7,5-) fueron las variables estudiadas en los experimentos preliminares realizados en discontinuo con el catalizador en polvo. Además, se realizaron ensayos adicionales en ausencia de peróxido de hidrógeno y de catalizador con la finalidad de evaluar la capacidad oxidativa del H₂O₂ sin catalizador y la adsorción del contaminante sobre el catalizador. Finalmente, se estudió el efecto de la matriz sobre la mineralización del COT. En la Tabla 4.8 se resumen las condiciones de operación de los diferentes experimentos.

Tabla 4.8. Condiciones de reacción de los experimentos realizados con el catalizador tipo perovskita LaCu_{0,5}Mn_{0,5}O₃ en polvo en un reactor discontinuo de tanque agitado

Estudio	Matriz	T ^a (°C)	pH	H ₂ O ₂ (mg/L)	[catalizador] (g/L)
Blanco de adsorción catalizador	Hospitalaria	70	Natural (7,5)	0	0,6
Blanco de H ₂ O ₂ sin catalizador	Hospitalaria	70	Natural (7,5)	700	0
Efecto de la matriz	Agua ultrapura	70	Natural (7,5)	700	0,6
Influencia de temperatura y pH	Hospitalaria	70	Natural (7,5)	700	0,6
		50			
		30			
	Hospitalaria	70	3	700	0,6
		50			
		30			
Hospitalaria	70	5,5	700	0,6	
	50				
	30				

4.4.2.2. Catalizador reticulado conformado sobre espuma macroporosa

La eficacia del material poroso reticulado como catalizador del proceso Fenton para la eliminación de 15 mg/L de carbamazepina dopados a la matriz de agua residual hospitalaria se evaluó en un reactor continuo de lecho fijo a escala laboratorio (Figura 4.7). Esta instalación consta de cuatro partes:

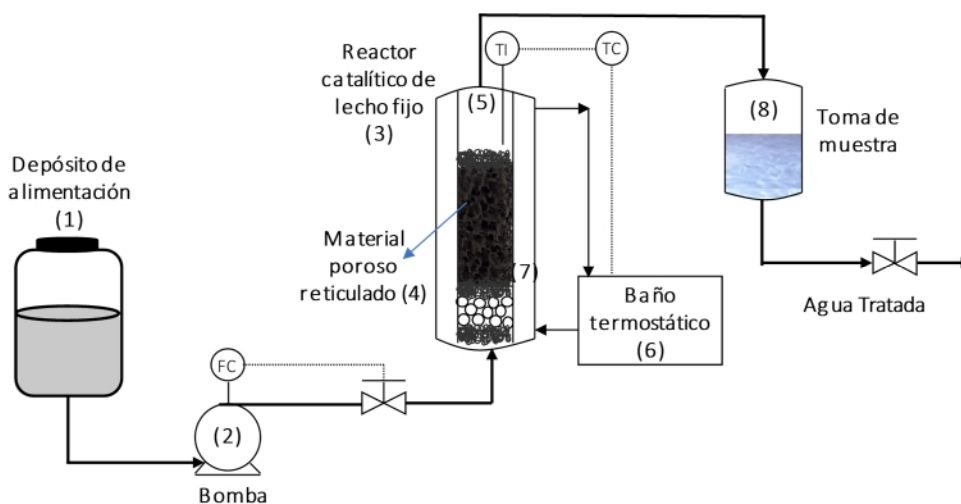


Figura 4.7. Reactor de lecho fijo a escala laboratorio

Tanque de alimentación y bomba de impulsión. El agua residual junto con el peróxido de hidrógeno se introduce en un tanque (1) y se alimentan al reactor de lecho fijo mediante una bomba peristáltica (2) de la casa comercial ProMinent GUGAL S.A. modelo DULCO®flex, la cual es capaz de suministrar caudales desde 1 mL/min hasta 12 L/h con una elevada presión.

Reactor de lecho fijo. Consta de un tubo de vidrio (3) de 1,5 cm de diámetro interno y 25 cm de longitud, en cuyo interior se aloja el catalizador poroso reticulado (4) soportado sobre un lecho de bolas de vidrio inertes y lana de vidrio, para mantenerlo estable en su posición. El agua residual se introduce al reactor con flujo ascendente.

Sistema de calefacción y control de la temperatura. La temperatura en el reactor se encuentra controlada por un termopar (5) colocado en la parte superior del reactor y cercano al lecho catalítico. Para mantener constante la temperatura en el reactor, se utiliza un baño termostático Polystat CC2 (6), que permite la circulación de una corriente de agua caliente a través de un espacio anular alrededor del reactor de vidrio (7).

Sistema de recogida de muestra (8). A la salida del reactor se dispone de un tanque de recogida donde se realiza la toma de muestra a diferentes tiempos de reacción.

Los experimentos realizados en este reactor se llevaron a cabo bajo diferentes temperaturas (50, 70 y 90 °C) y concentraciones de peróxido de hidrógeno (700 y 350 mg/L) con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de operación. Las condiciones iniciales de reacción se fijaron de acuerdo con los resultados previos obtenidos en el reactor discontinuo con el catalizador en polvo, y el trabajo previo publicado por Martínez y col. (2007 a y b) en el que se empleó el mismo tipo de reactor con un catalizador de Fe-SBA-15 para la eliminación de fenol.

Los ensayos se comenzaron colocando 3 gramos del catalizador poroso reticulado en el interior reactor entre dos lechos de bolas de vidrio y lana de vidrio. El agua hospitalaria dopada con 15 mg/L de carbamazepina, 700 o 350 mg/L de H₂O₂ y su pH ajustado se bombeó al reactor con un caudal de 1 mL/min generando un tiempo de residencia en el lecho de aproximadamente 3 minutos de acuerdo con la ecuación 4.1, donde V_L y ϵ son el volumen y porosidad del lecho del catalizador de perovskita conformado en forma de espuma. La temperatura del ensayo catalítico se controló usando el sistema de calefacción externo que permite la circulación de una corriente de agua caliente a través de un espacio anular alrededor del reactor de vidrio. El tiempo cero del ensayo catalítico se consideró una vez se alcanzaba la temperatura de reacción deseada en la corriente de salida del reactor.

$$t_R = \frac{\epsilon \cdot V_L}{Q} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Inicialmente se evaluó la actividad y estabilidad de los catalizadores conformados a varias temperaturas de calcinación (Tabla 4.7), y el efecto de la temperatura y la concentración de H₂O₂. Asimismo, se realizaron ensayos para estudiar la actividad del catalizador en ausencia de peróxido de hidrógeno y el poder oxidante del peróxido de hidrógeno sin catalizador. En todos estos ensayos se monitorizó durante el tiempo el pH, la concentración de carbamazepina y la descomposición del peróxido de hidrógeno. A tiempos finales de los ensayos donde se observó que se había alcanzado el régimen estacionario se analizó también la concentración de COT y la lixiviación de metales del catalizador. En la Tabla 4.9. se resumen las condiciones de operación de los diferentes ensayos catalíticos en continuo.

Tabla 4.9. Condiciones de operación de los ensayos realizados en continuo con el catalizador poroso reticulado tipo perovskita $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ en un reactor de lecho fijo

Estudio	Temperatura (°C)	pH	Matriz	Catalizador (T^{a} calcinación)	H_2O_2 (mg/L)
Blanco de catalizador sin H_2O_2	70	5,5	Hospitalaria	RPP-1000	0
Blanco de H_2O_2 sin catalizador	70	5,5	Hospitalaria	Bolas de vidrio	700
Pruebas catalíticas para los materiales porosos reticulados	70	5,5	Hospitalaria	RPP-1000 RPP-1200	700
Influencia de temperatura	90 70 50	5,5	Hospitalaria	RPP-1000	700
Influencia de concentración de H_2O_2	70	5,5	Hospitalaria	RPP-1000	350 700
Ensayo de durabilidad	70	5,5	Hospitalaria	RPP-1000	700

4.4.3. Actividad del catalizador reticulado en el tratamiento del agua residual hospitalaria

Finalmente, la eficacia del catalizador poroso reticulado tipo perovskita se evaluó para la eliminación de los compuestos farmacéuticos presentes en el agua hospitalaria en el rango de $\mu\text{g/L}$ a ng/L . Para ello, se operó en continuo en el reactor de lecho fijo bajo las condiciones óptimas obtenidas del estudio previo con el agua residual hospitalaria dopada con carbamazepina como contaminante modelo. De este modo, se evaluó la viabilidad del proceso de oxidación avanzada Fenton con un catalizador reticulado heterogéneo tipo perovskita $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ como tratamiento descentralizado para la eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos presentes en el agua residual hospitalaria antes de su vertido al colector general de saneamiento.

4.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

Las técnicas de caracterización empleadas en la presente investigación se han agrupado en tres bloques según la naturaleza de las muestras: i) catalizadores del proceso de oxidación avanzada Fenton, ii) muestras acuosas para el seguimiento de la eficacia de los tratamientos y iii) biomasa soportado sobre los discos de los sistemas de contactores biológicos rotativos para evaluar las poblaciones de microorganismos desarrolladas.

4.5.1. Catalizadores de oxidación Fenton

Los materiales en polvo y reticulado en forma de espumas macroporosas se caracterizaron mediante diferentes técnicas con el fin de determinar sus principales propiedades texturales, físicas y químicas.

4.5.1.1. Difracción de rayos X

Las fases cristalinas de materiales con estructura de tipo perovskita se determinaron por difracción de rayos X. Para obtener los difractogramas, se hace pasar un haz de rayos X de longitud de onda (λ) por la muestra de manera que ésta difracta elásticamente los haces de rayos X en ciertos ángulos originando un patrón de difracción según su estructura periódica. El ángulo de difracción 2θ está directamente relacionado por la ley de Bragg (ecuación 4.2) con el espacio interlamilar entre los planos (d), que son la base de la caracterización de fases y ordenamiento de un material. Así pues, por comparación de las distancias interlaminares de los planos con los difractogramas de referencia de los compuestos puros se pueden determinar las fases existentes en una muestra.

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \text{sen}(\theta) \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

Los ensayos de difracción de rayos X realizados durante la experimentación se han obtenido con un difractómetro de polvo Philips PW0340/00 XPert Pro utilizando la radiación $K\alpha$ del cobre. Los parámetros utilizados para el análisis se resumen en la Tabla 4.10:

Tabla 4.10. Parámetros de los análisis de difracción de rayos X

Parámetros	Valor (unidad)
Intervalo de barrido (2θ)	10-90 ($^\circ$)
Paso	0,04 ($^\circ$)
Toma de datos	Cada 2 segundos

4.5.1.2. Espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma acoplado por inducción (ICP-AES)

La fórmula molecular del material tipo perovskita fue determinada mediante análisis de espectroscopía de emisión atómica con acoplamiento inductivo de plasma (ICP-AES). En este caso la perovskita utilizada ($\text{LaCu}_{1-x}\text{Mn}_x\text{O}_{3-\delta}$) está sustituida parcialmente por un catión en la posición B. Esto hace que no se cumpla la estequiometría de oxígeno (δ) ya que para estabilizar los estados de oxidación de los cationes B, se generan defectos o excesos de oxígeno en la estructura. Para conocer la fórmula molecular real, se midió el contenido de los diferentes metales que constituye el material sintetizado en esta investigación. Con este valor, se estimó por diferencia el valor de oxígeno en la fórmula molecular. Los valores de δ inferiores a cero implican un defecto de oxígeno, por lo que se crean vacantes de oxígeno. Sin embargo, los valores de δ mayores que cero indican oxígeno sobre-estequiométrico

Antes de introducir la muestra en el equipo de ICP-AES es necesario realizar la digestión del sólido en un medio fuertemente ácido (HNO_3/HCl) para disolver la matriz cerámica donde se encuentran los metales. Posteriormente, una vez disuelto el catalizador tipo perovskita sólido en el agua regia, se lleva a una disolución acuosa. Esta muestra acuosa es la analizada en el ICP-AES de la casa comercial VARIAN y el modelo Vista AX Pro-720ES.

Este equipo registra la energía emitida por un átomo o un ion excitado cuando se relaja a su estado fundamental por absorción de energía de una fuente caliente. La radiación emitida dependerá de la cantidad de átomos diferentes presentes en la muestra y la intensidad de esta emisión permite medir la concentración de cada elemento. El análisis en el espectrómetro óptico se realiza en fase gaseosa, con la finalidad de asegurar la completa separación de los átomos y iones entre sí. Por lo tanto, en primer lugar, se realiza la atomización de la muestra que consiste en la excitación de los átomos utilizando un plasma de argón. Este plasma es una mezcla gaseosa conductora de argón, electrones y cationes de la muestra a analizar. Los análisis se llevaron a cabo a diferentes longitudes de onda según el elemento, siendo para el cobre de 324,754 y 327,395; para el lantano de 333,749; 379,082; 379,477 y 408,671 y para el manganeso de 257,610 y 259,372 nm.

4.5.1.3. Distribución del tamaño de partícula

Esta técnica (Dynamic Light Scattering, DLS) se empleó para determinar la distribución de tamaño de partículas a nivel nanométrico del material de perovskita en polvo. Este método se basa principalmente en el principio del movimiento

Browniano que poseen las partículas al estar contenidas en un líquido. Las características del líquido están relacionadas con el diámetro hidrodinámico (d_H) de la partícula por la ecuación de Stokes-Einstein (4.3) donde D es el coeficiente de difusión, K es la constante de Boltzmann, η es la viscosidad del líquido y T la temperatura.

$$D = \frac{K \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot d_H} \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

El equipo mide los cambios en la intensidad de la luz dispersada cuando las partículas son iluminadas por dos láseres. Así, las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada en el tiempo se autocorrelacionan con el coeficiente de difusión de las partículas en movimiento y con el radio hidrodinámico (d_H , ecuación Stokes-Einstein). Las fluctuaciones ocurrirán más rápido si las partículas son más pequeñas y de movimientos rápidos, por el contrario, ocurrirán más despacio si son más grandes y de movimientos lentos. Los resultados obtenidos reflejan un diámetro y un índice de polidispersión. El primero de ellos es un diámetro promedio de la población completa de partículas, mientras que el índice es una medida de la anchura de la distribución de tamaños.

En la presente investigación, las muestras sintetizadas de catalizador tipo perovskita en polvo se han analizado con el equipo Nano Plus DLS/ELS que mide en un rango de tamaño de partícula desde 0,1 nm hasta 12.000 nm.

4.5.1.4. Ensayos de rotura a compresión

Los análisis de rotura a compresión se han realizado sobre los materiales porosos reticulados tipo perovskita para determinar la resistencia de la estructura macroporosa a su rotura ante un esfuerzo de compresión. Este ensayo que ha sido realizado en el Instituto IMDEA Energía, consiste en aplicar a una probeta (muestra) una tensión o presión conocida en una determinada dirección hasta producir su rotura.

El proceso de medida se determinó utilizando un dinamómetro según la norma ASTM D 4179/2011. Este procedimiento consiste simplemente en colocar la probeta en el soporte del banco estandarizado y comenzar a aplicar manualmente una presión sobre el material reticulado en forma de espuma macroporosa. Los resultados leídos por el medidor digital de fuerza se recogen en Newtons.

Para la realización de este ensayo se ha utilizado un banco estandarizado de pruebas mecánicas (Chatillon Force Measurement Serie LTCM). Como se puede

observar en la Figura 4.8, éste cuenta con un soporte, una cruceta que ejerce la fuerza de compresión controlada manual o digitalmente indicando la velocidad de desplazamiento (5 a 500 mm/min) y un medidor digital de fuerza (Serie DFS II).



Figura 4.8. Banco estandarizado de pruebas mecánicas para ensayos de compresión.

4.5.1.5. Porosidad

La porosidad (ϵ) de los materiales porosos reticulados de perovskita se ha medido para conocer el grado de taponamiento de la estructura macroporosa. Cabe destacar que las estructuras sintetizadas se han utilizado para el tratamiento de aguas residuales, por lo que deben tener una porosidad suficiente para que el agua pueda pasar a través de ellas sin generar una alta pérdida de carga. En este caso, la porosidad de las muestras reticuladas se determinó por el volumen conocido de agua desalojada tras su inmersión en el líquido. Este parámetro se calculó siguiendo la ecuación 4.4 donde V_{H_2O} es el volumen de agua desalojada tras su inmersión y V_T es el volumen total de la estructura monolítica calculado tras la determinación experimental de sus dimensiones.

$$\epsilon = 1 - \frac{V_{H_2O}}{V_T} \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

4.5.2. Parámetros fisicoquímicos de aguas residuales

En este apartado se describen las técnicas de caracterización utilizadas para la caracterización tanto de las aguas residuales de entrada como de los efluentes obtenidos tras los tratamientos realizados mediante el proceso de biooxidación

avanzada con *Trametes versicolor* y del tratamiento de oxidación avanzada Fenton con el catalizador heterogéneo.

4.5.2.1. Carbono orgánico total (COT)

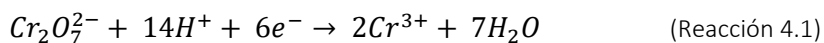
El contenido de carbono orgánico total se utiliza para medir el contenido total de carbono de los compuestos orgánicos disueltos en el agua. A lo largo de la experimentación, este parámetro ha sido utilizado como medida de la eficacia del proceso en la eliminación de materia orgánica del agua residual tratada.

La cuantificación del COT se realizó midiendo la concentración de carbono orgánico no purgable (NPOC- *Non-Purgable Organic Carbon*) presente en la muestra, mediante el método de oxidación por combustión y detección por infrarrojo no dispersivo. Para ello, se realiza una acidificación de la muestra con ácido clorhídrico para eliminar todo el carbono inorgánico purgable. Una vez que la muestra está acidificada, se inyecta en un tubo de combustión a 680 °C con un relleno catalítico de platino y en corriente continua de aire, donde todo el carbono orgánico no purgable es oxidado a dióxido de carbono, cuantificándose mediante un detector infrarrojo no dispersivo (NDIR). El equipo utilizado fue un TOC-Shimadzu-V, con muestreador automático de 68 posiciones.

4.5.2.2. Demanda química de oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno es la cantidad equivalente de oxígeno necesaria para oxidar toda la materia orgánica e inorgánica reducida presente en la muestra acuosa gracias a la acción de un oxidante químico fuerte, generalmente dicromato o permanganato potásico. En esta investigación, la DQO también se ha utilizado como parámetro para el seguimiento del grado de depuración del agua durante el proceso de biooxidación avanzada.

Para la cuantificación de este parámetro se ha empleado el método colorimétrico del dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$), el cual en presencia de un medio ácido (H_2SO_4) y elevada temperatura, oxida la materia oxidable presente en la muestra reduciendo el Cr^{6+} del dicromato a Cr^{3+} (5220D., APHA, 2005) según la reacción 4.1.



El método utiliza una solución digestora que contiene el dicromato potásico y sulfato de mercurio ($HgSO_4$), necesario para eliminar la interferencia creada por la

presencia del ion cloruro en la muestra acuosa, y una disolución catalizadora que contiene el ácido sulfúrico con sulfato de plata (Ag_2SO_4). Para un volumen de muestra de 2,5 mL, se añaden 1,5 mL de disolución digestora y 3,5 mL de disolución catalizadora, y se somete la mezcla a digestión durante 2 horas a 120 °C. Mediante mediciones fotométricas utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, se mide el cambio del color producido por la reducción del dicromato a ion cromo (III) (Cr^{+3}) tras la digestión (reacción 4.1). Para esta medida se ha utilizado un espectrofotómetro de la casa comercial y modelo UV/VIS Biochrom Libra S22. Las muestras deben ir acompañadas siempre de un blanco para medir el efecto de los reactivos, que se realiza utilizando 2,5 mL de agua ultrapura en lugar de la muestra. El método tiene un límite de detección de 900 mg/L de DQO. En caso de sobrepasar esa muestra, se produce saturación en la medida del espectrofotómetro y es necesario diluir la muestra.

4.5.2.3. Nitrógeno amoniacal

La determinación de nitrógeno amoniacal (NH_4^+) se llevó a cabo utilizando el test de amonio Spectroquant® de la casa comercial Merck Millipore, el cual determina tanto los iones amonio como el amoniaco disuelto mediante una medida fotométrica de azul de indofenol. El procedimiento seguido para la realización del mismo es análogo a las normas APHA (2005) 4500-NH₃ F, ISO 7150-1 y DIN 38406-5. A un pH alcalino entre 7 y 13, el amonio y amoniaco reaccionan con hipoclorito sódico y salicilato sódico en presencia de sodio nitroprusiato ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como catalizador para formar el azul de indofenol. Tras la reacción, la solución final del test, que presenta un color amarillo verdoso/verde debido a la formación de un compuesto cromóforo, se mide con una cubeta de plástico en un espectrofotómetro UV/VIS Biochrom Libra S22 con una longitud de onda de 690 nm.

4.5.2.4. Nitrógeno Kjeldahl

La determinación del nitrógeno total Kjeldahl (NTK), suma del nitrógeno orgánico más el nitrógeno amoniacal, se realizó siguiendo el método de digestión conocido como semi-micro Kjeldahl reconocido por la APHA 4500-N_{org} (2005).

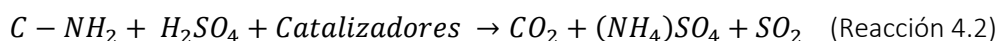
EL volumen de muestra a analizar, determinado en función del nitrógeno orgánico esperado (Tabla 4.11), se añade a un tubo de digestión con 20 mL de H_2SO_4 concentrado al 98 % y 10 mL de una disolución digestora que contiene los catalizadores de la digestión ácida (134 g/L K_2SO_4 , 7,3 g/L de CuSO_4 y 134 mL/L de H_2SO_4). Las muestras deben ir acompañadas siempre de un blanco para medir el

efecto de los reactivos, que consiste en añadir únicamente 10 mL de ácido sulfúrico y los respectivos catalizadores.

Tabla 4.11. Relación entre la cantidad de muestra y la concentración de nitrógeno orgánico

Nitrógeno orgánico en la muestra (mg/L)	Volumen de la muestra (mL)
5-10	250
10-20	100
20-50	50
50-100	25

Antes de llevar las muestras y el blanco al digestor se añaden al tubo 3 ó 4 piezas cerámicas para homogeneizar la ebullición. Finalmente, se realiza un calentamiento progresivo en tres etapas hasta llegar a 400 °C donde se completa la digestión transformando todo el nitrógeno orgánico en amoniacal a través de la reacción 4.2., obteniendo una disolución de un color verde pálido semitransparente.



A continuación, se realiza la destilación del líquido resultante en medio básico por la adición de hidróxido de sodio y agua al tubo que contiene la muestra digerida, permitiendo la transformación del amonio a amoníaco. El amoníaco generado durante la destilación se condensa para ser neutralizado con ácido bórico. Para ello, en el vaso donde se recogerá el condensado, se añaden inicialmente 60 mL de ácido bórico al 2 % en peso y se mide el pH inicial. Según la destilación avanza la cantidad de condensado en el vaso va aumentando por lo que consecuentemente aumenta el pH del medio. Cuando se termina la destilación, se mide el pH final y se añade ácido clorhídrico 0,1 N hasta alcanzar de nuevo el pH inicial. El proceso se repite con agua ultrapura, en lugar de muestra, y la concentración de nitrógeno total Kjeldahl se calcula mediante la ecuación 4.5.

$$\% NTK = 1,4007 \cdot \text{Normalidad del HCl} + \left(\frac{\text{consumo HCl} - \text{consumo HCl del blanco}}{\text{volumen inicial de la muestra}} \right) \quad (\text{Ecuación 4.5})$$

Todo el procedimiento se realiza de forma automatizada en un destilador automático modelo Vapodest, con valoración integrada, de la casa comercial Gerhardt.

4.5.2.5. Fosfatos

La determinación de fosfatos (PO_4^{3-}) se llevó a cabo utilizando el test de fosfatos Spectroquant® de la casa comercial Merck Millipore, el cual se basa en un procedimiento certificado análogo a las normas APHA (2005) 4500-P E y DIN EN ISO 6878. En solución ácida, los iones ortofosfato reaccionan con los iones molibdato, presentes en el molibdato de sodio, formando ácido molibdofosfórico. Este último, en presencia de ácido ascórbico, se reduce a un complejo de azul de fósforo de molibdeno (comúnmente llamado azul de molibdeno) que se determina colorimétricamente a una longitud de onda de 420 nm utilizando un espectrofotómetro de UV/VIS modelo Biochrom Libra S22.

4.5.2.6. Sólidos en suspensión totales y volátiles

Los sólidos en suspensión totales (SST) se determinaron según el procedimiento gravimétrico 2540D (APHA, 2005). Este método es una medida los sólidos que pueden quedar retenidos en un filtro. Para ello, un volumen conocido de muestra se pasa a través de un filtro de microfibras (Whatman Glass, microfiber filters) de 47 mm de diámetro y 1,5 μm de tamaño de poro. Posteriormente, el filtro con el sólido retenido se seca a una temperatura constante de 105 °C durante 24 horas. Trascurrido este tiempo, se realiza la pesada del filtro tras la completa evaporación del agua. La concentración de SST se determina en función de la diferencia de peso entre el filtro inicial antes de pasar la muestra y después de su filtrado y secado, según la ecuación 4.6.

$$SST \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{m_f - m_o}{V} \cdot 1000 \quad (\text{Ecuación 4.6})$$

donde: m_f es el peso del filtro tras secado a 105 °C (g), m_o es el peso inicial del filtro (g) y V (mL) es el volumen de muestra filtrado.

El contenido en sólidos en suspensión volátiles (SSV) determina la fracción de sólidos en suspensión totales (SST) que se volatilizan a temperaturas superiores a 550 °C (2540E, APHA, 2005). Para ello, los filtros usados para la retención y medida de los SST se calinan en mufla a 550 °C durante dos horas con una rampa de 10 °C/min. De este modo, la fracción orgánica que corresponde con los sólidos volátiles se elimina y en el filtro calcinado únicamente quedan las cenizas residuales (m_c), cuyo contenido está relacionado con los sólidos en suspensión fijos de naturaleza inorgánica. La determinación final de SSV se realiza aplicando la ecuación 4.7.

$$SSV \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{m_f - m_c}{V} \cdot 1000 \quad (\text{Ecuación 4.7})$$

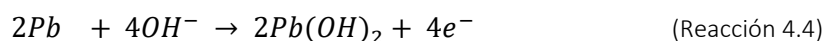
donde: m_f es el peso del filtro tras secado a 105 °C, m_c es el peso del filtro tras calcinado a 550 °C y V (mL) es el volumen de muestra filtrado inicialmente.

4.5.2.7. pH y oxígeno disuelto

El pH de las muestras acuosas se ha medido utilizando un pH-metro Crison Compact Titrator previamente calibrado con dos patrones correspondientes a pH 4 y 7 de la casa comercial LabKem.

Por otro lado, la concentración de oxígeno disuelto en el medio acuoso en el interior de los sistemas de CBRs se analizó mediante un sensor galvánico DurOx® 325 de la casa WTW, que conforma un sistema electrolítico donde se genera un voltaje proporcional a la concentración de oxígeno disuelto en el agua. El cátodo está formado por una bobina de alambre y el ánodo es de plomo. Ambos están sumergidos en una solución electrolítica salina y separados de la muestra por una membrana permeable.

El oxígeno disuelto en el agua pasa a la celda electroquímica a través de la membrana y se éste se reduce en el cátodo a iones hidróxidos los cuales oxidan el plomo del ánodo, generando así una corriente electroquímica entre ambos electrodos (reacciones 4.3 y 4.4). Cuanto más oxígeno contiene la muestra, mayor es la señal de corriente.



4.5.2.8. Ácido gálico

La determinación del ácido gálico, promotor del proceso de biooxidación avanzada, se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (*HPLC- High Performance Liquid Chromatography*). Para la separación cromatográfica del compuesto, el cromatógrafo Varian ProStar fue equipado con una columna Phenomenex C18 de 3 x 150 mm acoplada a una pre-columna (Phenomenex HPLC Guard Cartridge System), así como un detector de UV-Vis operando a una longitud de onda de 254 nm. La fase móvil empleada se compone de disolución de metanol calidad HPLC (49,5 %), agua ultrapura (49,5 %) y ácido acético glacial (1 %) con un pH aproximado de 2,5. Ésta se impulsa mediante una bomba de alta presión con un caudal constante de 0,15 mL/min y se inyecta junto con la muestra en la columna

rellena de fase estacionaria. En un cromatograma típico para la determinación de ácido gálico, dicho compuesto aromático se puede visualizar en el minuto 3-4 de análisis.

4.5.2.9. Carbamazepina

La concentración de carbamazepina en muestras acuosas se monitorizó durante el tratamiento del agua hospitalaria mediante el proceso de oxidación avanzada Fenton con la finalidad de evaluar la actividad y eficacia del catalizador tipo perovskita en la eliminación de fármacos. Para la determinación de este compuesto orgánico, tanto el cromatógrafo utilizado (Varian ProStar), como la columna más pre-columna (Phenomenex C18) y la fase móvil (metanol calidad HPLC, agua ultrapura y ácido acético glacial) son los mismos que los descritos previamente para el ácido gálico. Además, el detector UV-Vis también opera a una longitud de onda de 254 nm. Sin embargo, en este caso, la fase móvil se inyecta en la fase estacionaria con un caudal de 0,30 mL/min.

Se realizó un calibrado del equipo para la carbamazepina relacionando la respuesta del detector con la concentración conocida del patrón preparado. En un cromatograma típico para las reacciones Fenton realizadas, dicho compuesto farmacéutico se puede visualizar en el minuto 12-14 de análisis.

4.5.2.10. Metales

Las concentraciones de metales disueltos se midieron tanto en los efluentes acuosos del proceso de biooxidación avanzada como para el proceso Fenton. Para el proceso de biooxidación avanzada principalmente se determinaron las especies de hierro y manganeso residuales tras el tratamiento, ya que son usadas como promotores del proceso de biooxidación avanzada. Por otro lado, con el objetivo de evaluar la estabilidad del catalizador durante el proceso Fenton, se midió la concentración de lantano, manganeso y cobre en los efluentes finales.

Para ello, se ha utilizado la espectrometría de emisión atómica con acoplamiento inductivo de plasma ICP-AES, en un equipo Varian Vista AX Pro-720ES. Como se ha mencionado anteriormente, dicha técnica registra la energía emitida por un átomo o un ion excitado cuando se relaja a su estado fundamental por absorción de energía de una fuente caliente. La radiación emitida dependerá de la cantidad de diferentes átomos presentes en la muestra y la intensidad de esta emisión permite medir la concentración de cada elemento. Los análisis se llevaron a cabo a diferentes longitudes de onda según el elemento, siendo para el hierro 234,350; 238,204;

239,563 y 259,940 nm, para el manganeso de 257,610; 259,372; 260,568 y 294,921 nm, para el cobre de 324,754 y 327,395 y para el lantano de 333,749; 379,082; 379,477 y 408,671.

4.5.2.11. Peróxido de hidrógeno

La concentración de peróxido de hidrógeno se ha realizado con el objetivo de evaluar su concentración residual tras el proceso oxidación avanzada Fenton para el tratamiento descentralizado del agua hospitalaria. Su determinación se basa en la medición fotoeléctrica de intensidades de color tras la adición de una disolución comercial estandarizada al 1,9-2,1 % de oxisulfato de titanio (IV) (TiOSO_4) según la normativa DEV (H15).

El oxisulfato de titanio añadido a la muestra acuosa previamente filtrada, reacciona estequiométricamente con el H_2O_2 formando el complejo $[\text{TiO}(\text{H}_2\text{O}_2)]\text{SO}_4$, de color amarillo, que puede determinarse mediante espectroscopía UV a longitud de onda máxima de 410 nm en un equipo Biochrom Libra S22.

4.5.2.12. Compuestos farmacéuticos en niveles de baja concentración

La cuantificación de compuestos farmacéuticos en las aguas residuales reales y efluentes tratados se ha llevado a cabo en el laboratorio mixto Brucker- Universidad Rey Juan Carlos, mediante cromatografía de ultra alta resolución y espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS- Ultra High Performance Liquid Chromatography/ Mass Spectrometer).

Previamente al análisis, es necesario realizar un proceso de preparación de la muestra, el cual consiste en una etapa de extracción en fase sólida (EFS) de los compuestos farmacéuticos presentes en las aguas residuales en niveles de $\mu\text{g/L}$ y ng/L . Esta técnica preparativa ayuda a eliminar la matriz de agua real, limpiando o aislando la concentración de los microcontaminantes para su cuantificación. Durante esta experimentación, se han usado cartuchos de extracción de fase hidrofóbica reversa y base polimérica TELOS C18(EC) -200mg/6mL- como adsorbentes de la casa comercial Kinesis.

El procedimiento de EFS se lleva a cabo en una instalación de extracción a vacío como la que se muestra en la Figura 4.9, y consta de seis etapas que se describen a continuación.

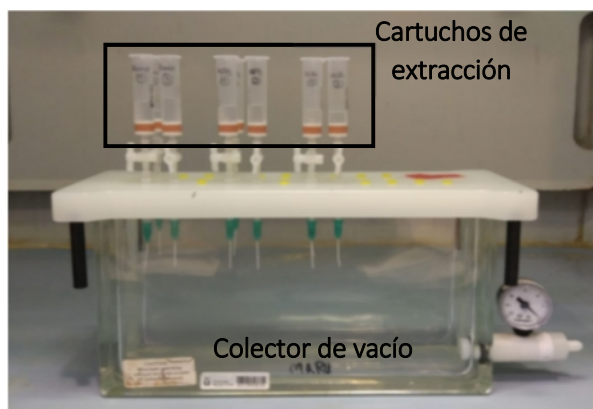


Figura 4.9. Instalación experimental para la EFS

- 1) Acondicionamiento del cartucho: para la activación del cartucho se hace pasar gota a gota un volumen de 4 mL de metanol (calidad LC-MS). Posteriormente, para la estabilización y equilibrado del cartucho se eluyen dos veces 4 mL de agua ultrapura.
- 2) Extracción de la muestra: 100 mL de muestra se hacen pasar por el cartucho con un caudal de 5 mL/min regulado gracias a una bomba de vacío. Al concluir la extracción, se pasa por el cartucho dos veces 4 mL de una disolución al 50 % en volumen de agua ultrapura y metanol (calidad HPLC) para arrastrar las últimas gotas retenidas en las paredes.
- 3) Secado de la fase sólida del cartucho: se seca a vacío durante una hora.
- 4) Elución de los compuestos extraídos en el cartucho: la elución se realiza gota a gota con 12 mL de metanol (calidad LC-MS) en tubos de ensayo de vidrio con fondo redondo (16 x 100 x1 mm).
- 5) Concentración de los compuestos eluidos: los tubos de ensayo con los analitos disueltos en 12 mL de metanol se introducen en un evaporador donde se elimina en su totalidad el disolvente.
- 6) Redilución de los compuestos: como paso final de preparación de la muestra, éstos se redisuelven añadiendo 1 mL de metanol (calidad LC-MS) en cada tubo de ensayo. De este volumen final de metanol es de donde se realizará la inyección en el equipo de UHPLC-MS/MS.

Una vez realizada la preparación de las muestras, la separación cromatográfica de los analitos en metanol se lleva a cabo inyectando 5 μl de la disolución obtenida en el paso 6 de la EFS en un equipo UHPLC Advance OLE, utilizando como fase estacionaria una columna Brucker Intensity Solo 2 C18 de 100 x 2,1 mm de 2 μm . Como fases móviles, se usaron una disolución acuosa de 0,04 % de ácido acético glacial (fase A) y acetonitrilo puro (fase B). Al inicio del análisis, se bombea 98 % de fase A. Por afinidad los analitos quedan retenidos en la columna, a la vez que se empieza a aumentar el gradiente de concentración de la fase B. Los fármacos eluyen a través de la columna hasta el detector a diferentes tiempos en función de la polaridad del compuesto y a distintos porcentajes de gradiente de la fase móvil B (primero compuestos polares y luego apolares). El programa completo de mezcla de las fases A y B se muestra en la Figura 4.10. Durante todo el análisis se trabajó con un flujo constante de 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ y una temperatura de columna de 40 $^{\circ}\text{C}$.

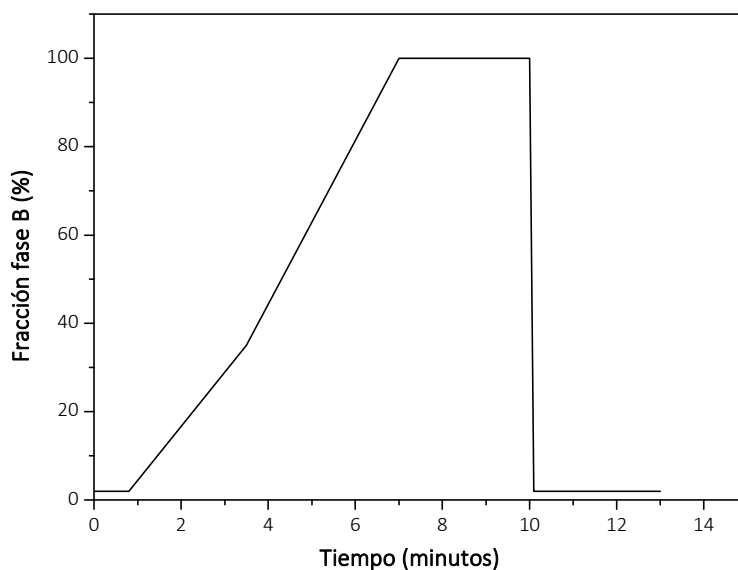


Figura 4.10. Gradiente de inyección de la fase móvil B en el UHPLC-MS/MS para la determinación de compuesto farmacéuticos

La detección de los distintos analitos obtenidos de la cromatografía de alta resolución se lleva a cabo en un detector de MS/MS triple cuádruplo EVOQ Elite con las condiciones especificadas en el Tabla 4.12.

Tabla 4.12. Condiciones de operación del detector MS/MS de triple cuádruplo para la determinación de compuestos farmacéuticos

Variable	Valor (unidad)
Voltaje de electro-espray	4.000 (V)
Temperatura de ajuga	350 (°C)
Temperatura de cono	300 (°C)
Caudal de gas en el cono	20 mL/min
Caudal de gas en la aguja	40 mL/min
Caudal de nebulizador	60 mL/min

Antes de pasar al detector, se produce una primera ionización del compuesto a 4000 V por electro-espray para conseguir la formación de un ion precursor. Tras esta primera ionización, la cual es positiva o negativa en función del compuesto, el ion precursor formado entra al primer cuadrupolo (Q_1) donde se filtra y se eliminan el resto de los iones tras neutralizarlos. Posteriormente, en el segundo cuadrupolo (Q_2), se aplica una nueva energía (energía de colisión) a tres voltajes diferentes (E_C' , E_C'' y E_C''') para conseguir así la formación de los iones cuantificadores (Q_3' , Q_3'' y Q_3'''), los cuales permite identificar inequívocamente cada compuesto.

En la Tabla 4.13, se recogen las características de detección de los 22 compuestos farmacéuticos analizados por este método. En ella se muestran, los tiempos de retención (t_R) a los que eluyen cada compuesto tras la separación cromatográfica y los pesos moleculares de los iones (Q_1 , Q_3' , Q_3'' y Q_3''') buscados en los cuadrupolos tras las ionizaciones a cada voltaje E_C' , E_C'' , E_C''' .

Tabla 4.13. Características de detección de los compuestos farmacéuticos

Compuesto	t _R (min)	Q ₁		Q ₃ '		Q ₃ ''		Q ₃ '''		
		P _M (g/mol)	Polaridad	P _M (g/mol)	E _C ' (V)	P _M (g/mol)	E _C '' (V)	P _M (g/mol)	E _C ''' (V)	
Antipirina	AAA	3,42	246	Positiva	104	38	228	74	83	51
Ácido clofíbrico	ACF	5,89	213	Negativa	126	14	84,8	12		
Atenolol	ATN	2,75	267	Positiva	144,9	25	189,9	17	116	17
Amoxicilina	AMX	3,46	366	Positiva	160	12	114	30		
Azitromicina	AZM	3,96	375	Positiva	83,2	12	158,1	17		
Cafeína	CFN	3,38	195	Positiva	138	16	110	20		
Ciclofosfamida	CPD	4,62	261	Positiva	140	18	106	14		
Carbamazepina	CZP	5,54	237	Positiva	194	14	152	34		
DEET	DEET	5,8	192	Positiva	118,9	13	72	15,5		
Diclofenaco	DCF	6,41	294	Negativa	249,9	8	213,9	17		
Estrona	EST	6,09	269	Negativa	145	37	183	30		
Gemfibrozilo	GFZ	6,98	249	Negativa	121	11	127	7		
Hidroclorotiazida	HCT	3,36	296	Negativa	268,6	25	77,9	25		
Ibuprofeno	IBP	6,59	205	Negativa	161	4	117	12	115	18
Iohexol	IHX	2,46	822	Positiva	803,6	14	374,8	39		
Iopamidol	IPM	1,96	778	Positiva	558,8	20	386,8	18		
Metoprolol	MTP	3,81	268	Positiva	74,2	18	116	15		
Metronidazol	MDZ	3	172	Positiva	128	10	82,2	20		
Progesterona	PGT	7,18	315	Positiva	109	20	97,1	17	297	14
Ranitidina	RNT	2,83	315	Positiva	176	18	130	18		
Sulfametoxazol	SMX	4,5	254	Positiva	155,9	14	92	26		
Sulpirida	SPD	2,93	342	Positiva	112	24	214	30		

4.5.3. Técnicas de caracterización microbiológica

En este apartado se describen las técnicas utilizadas para caracterizar cualitativa y cuantitativamente las poblaciones fúngicas y bacterianas desarrolladas en los contactores biológicos rotativos durante el tratamiento de diferentes aguas residuales.

4.5.3.1. Bioensayos de actividad microbiológica de la biomasa de los CBRs

Los ensayos de caracterización de la actividad microbiológica se realizaron para la biomasa soportada sobre el sistema de CBRs durante el tratamiento de las dos aguas residuales urbanas reales (Universidad Rey Juan Carlos y de la EDAR de Toledo). Éstos se llevaron a cabo con la finalidad de valorar la actividad del hongo frente a la de las poblaciones bacterianas autóctonas de las aguas residuales tratadas que se hubieran podido asentar en la biomasa soportada sobre los discos de los sistemas de CBRs. Asimismo, se evalúan los efectos de competencia o sinergia entre ellos.

Para ello, se desarrolló un método mediante el cual se evaluó la actividad de los hongos en una biomasa mixta, compuesta por hongos y bacterias. Principalmente, el procedimiento se basa en la monitorización del consumo de un sustrato fácilmente biodegradable por parte de la biomasa, cuando se añaden inhibidores selectivos de bacterias (bactericidas) y de hongos (fungicidas). De este modo, la contribución de la actividad bacteriana al sistema se determinó añadiendo una concentración mínima inhibitoria de nistatina, fungicida de amplio espectro. Por el contrario, para evaluar la contribución fúngica se añaden al sistema en su concentración mínima inhibitoria ampicilina y tetraciclina, bactericidas tipo Gram positivo y Gram negativo. En el caso de querer determinar la contribución de otros procesos no bioactivos, como la bioadsorción, se añaden tanto el fungicida como los bactericidas, en lo que se ha denominado ensayos de control abiótico del sistema.

Para la puesta a punto del método, se realizaron una serie de ensayos previos descritos en el anexo 7.2. Con ellos se determinaron tanto las condiciones de operación como la concentración mínima inhibitoria de cada inhibidor mencionado o el tipo de sustrato orgánico fácilmente biodegradable a emplear. La concentración mínima inhibitoria depende principalmente de la especie de microorganismo presente en el medio. Sin embargo, debido a que los biorreactores operan con aguas reales no esterilizadas, la diversidad de hongos y bacterias que pueden colonizarlos es desconocida. Así, esta experimentación previa fue necesaria para determinar los valores de concentración mínima inhibitoria (*MIC-minimal inhibitory concentration*) de fungicida y bactericidas adecuados para las muestras de biomasa recogidas. De este modo, aunque estudios previos con otros tipos de hongos y bacterias fijan concentraciones de ampicilina en 4 mg/L (Araya-Cloutier y col., 2017), tetraciclina en 128 mg/L (Mawabo y col., 2015) y nistatina en 100 mg/L (Han y col., 2012). En esta tesis se concluyó que para medir la actividad microbiológica de la biomasa obtenida durante los tratamientos de las aguas residuales urbanas es necesario duplicar la concentración de fungicida de 100 a 200 mg/L para conseguir la inhibición total de los microorganismos deseados presentes en una muestra inicial de biomasa de 0,2 g_{SSVseco}/L. Por el contrario, las concentraciones mínimas inhibitorias reflejadas en

bibliografía fueron suficientes en el caso de los dos bactericidas utilizados (ampicilina y tetraciclina) para la misma concentración inicial de biomasa del CBRs.

En la Tabla 4.14, se recogen las condiciones de operación utilizadas durante los bioensayos de caracterización de la actividad microbiológica. Como se puede observar, los experimentos han sido realizados a pH 4,5 coincidiendo con el pH inicial de agua residual tras su acidificación (como se ha descrito en apartados anteriores) ya que favorece la actividad fúngica. Además de a pH 7 como valor cercano al pH final del efluente de los CBRs y en el que la actividad bacteriana ya no se encuentra necesariamente limitada respecto a la actividad fúngica.

Tabla 4.14. Condiciones de operación para los bioensayos de caracterización de la actividad microbiológica

Sustrato orgánico	pH	Bactericidas		Fungicida
		Ampicilina	Tetraciclina	Nistatina
Acetato de sodio	4,5-7	4 mg/L	128 mg/L	200 mg/L

Los bioensayos se realizaron en modo discontinuo en botellas de vidrio con una capacidad de 200 mL. En ellas, se incubaron 0,2 g_{SSVseco}/L de biomasa en 100 mL de un medio sintético compuesto por un sustrato orgánico, fuentes de nitrógeno y fósforo y una mezcla de macronutrientes y micronutrientes (Tablas 4.1 y 4.2) durante cinco días a temperatura ambiente. Las muestras de biomasa fueron recogidas directamente del sistema de CBRs y se almacenaron a 2-5 °C hasta su utilización.

Como se puede observar en la Figura 4.11, donde se detalla el diseño experimental seguido, para cada muestra de biomasa se realizaron experimentos por triplicado estudiando las cuatro variables explicadas anteriormente:

- A) la actividad total (hongo y bacterias)
- B) la actividad fúngica (adición de bactericidas)
- C) la actividad bacteriana (adición de fungicida)
- D) la actividad abiótica con inhibición total microbiológica (adición de fungicida y bactericidas)

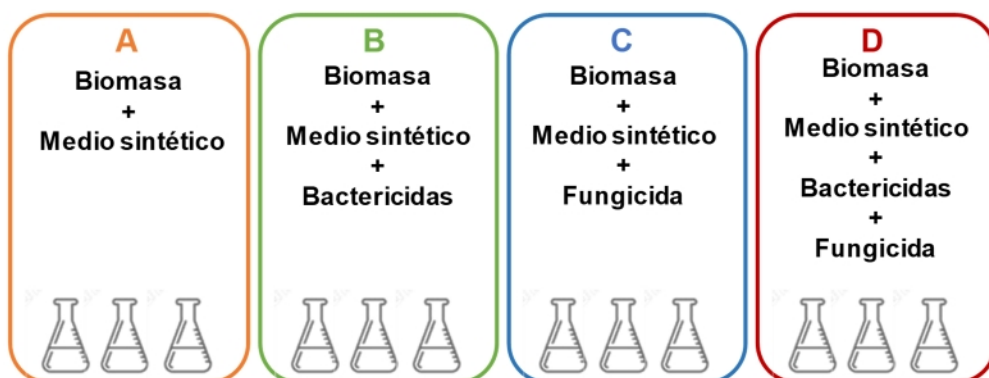


Figura 4.11. Diseño de los bioensayos para la caracterización de la actividad microbiológica

En la Figura 4.12, se muestra un esquema con los pasos que conforman el procedimiento experimental de los ensayos de actividad.

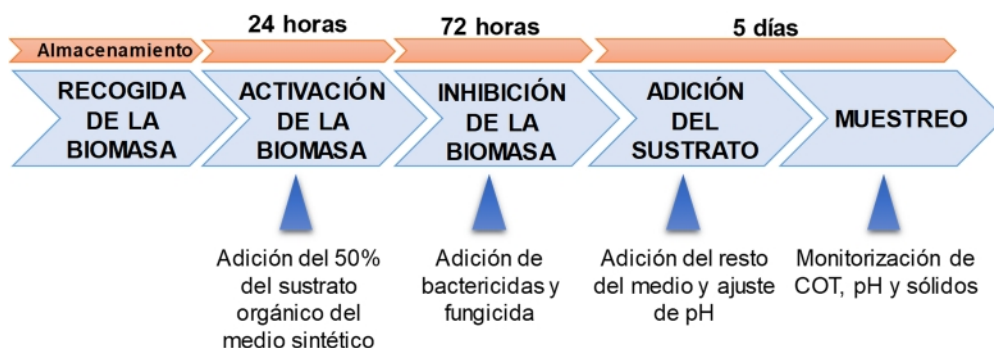


Figura 4.12. Esquema del procedimiento experimental para los bioensayos de caracterización de la actividad microbiológica

Recogida y almacenamiento de la biomasa

La recogida se ha realizado directamente del sistema de CBRs mediante raspado de la superficie de los biodiscos. Como ya se ha especificado anteriormente, estas muestras han sido almacenadas a 2-5 °C hasta su uso posterior.

Activación de la biomasa

Los bioensayos se realizaron utilizando 0,2 g_{SSVseco}/L de biomasa con un contenido en agua del 98 %. Para esta fase de activación tras el almacenamiento en frío, la biomasa se incubó durante 24 horas con agitación orbital, en un medio acuoso que contuvo el 50 % en peso del sustrato orgánico utilizado en el experimento (acetato de sodio en concentración en botella equivalente a 250 mg/L de COT)

Inhibición selectiva de la biomasa

Tras la fase de activación, se añadieron los inhibidores y se dejaron actuar durante 72 horas con agitación orbital y a temperatura ambiente. La inhibición selectiva de la biomasa se realizó acorde al diseño experimental presentado en la Figura 4.11. Para el estudio de la actividad fúngica (**B**), se realizó la inhibición bacteriana utilizando dos compuestos antibióticos: tetraciclina (inhibidor de bacterias Gram negativas) y ampicilina (inhibidor de las bacterias Gram positivas). Por el contrario, para conseguir la inhibición fúngica (**C**) se utilizó nistatina como compuesto antifúngico.

Adición del sustrato fácilmente biodegradable

Finalmente, se añadió el resto del medio sintético compuesto por las disoluciones de macronutrientes (100 mL/L) y micronutrientes (10 mL/L), así como por una disolución de nitrógeno y fósforo (37,4 mg/L de tartrato de amonio, 62 mg/L de fosfato de sodio monobásico y 121 mg/L de fosfato de sodio dibásico). Además, se añadió el 50 % restante del sustrato orgánico (acetato de sodio), obteniendo una concentración de COT inicial de 250 mg/L. El pH de todas estas disoluciones ha sido previamente ajustado al valor deseado (4,5 o 7) utilizando disoluciones de ácido sulfúrico 2 N y de hidróxido de sodio 10 M.

Monitorización del COT

Las botellas se incubaron en el agitador orbital a temperatura ambiente durante cinco días midiendo el COT diariamente. Además, los sólidos en suspensión volátiles se midieron a tiempo inicial y final.

4.5.3.2. PCR cuantitativa (qPCR) y secuenciación masiva

Los análisis de caracterización microbiológica de la biomasa durante el tratamiento del agua residual hospitalaria se realizaron mediante PCR cuantitativa (*Polymerase chain reaction*) y secuenciación masiva. Estas técnicas de análisis se realizaron de forma externa en la unidad técnica de Genómica y Secuenciación Masiva pertenecientes al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM). Gracias a estos análisis, se pudo determinar la evolución del *Trametes versicolor*, así como las relaciones hongo/bacteria y *T. versicolor*/hongos totales durante el tratamiento del agua residual hospitalaria.

Durante el tratamiento, se tomaron cuatro muestras de biomasa de ambos CBRs modificados a diferentes tiempos (día 0, 21, 46 y 75) y se realizó la extracción del ADN total. Para ello se utilizó un kit de aislamiento de ADN (Soil DNA Isolation Kit,

CANVAX, Córdoba, Spain) específico para muestras sólidas como suelos o fangos. El procedimiento estandarizado, se basa en la buena capacidad del ADN para unirse al gel de sílice en presencia de altas concentraciones de un agente caotrópico (sustancia que desorganiza una red tridimensional) como el tiocianato de guanidinio, el cual es utilizado como desnaturalizante de macromoléculas. Así, la muestra de ADN se une a la superficie de una membrana de sílice dispuesta en una columna de extracción. De manera que cuando se lava con agua ultrapura, el ADN se eluye de la membrana. El rendimiento de ADN extraído realizado por duplicado para las cuatro muestras recogidas de cada unidad de CBRs estuvo entre 104 y 676 ng_{ADN}/μL_{H₂O}.

Una vez realizada la extracción del ADN total, éste se caracterizó por PCR cuantitativa (qPCR) con la finalidad de obtener la cuantificación absoluta de *Trametes versicolor*, hongos y bacterias totales mediante la determinación del número de copias presentes en la muestra para los microorganismos seleccionados. La técnica se fundamenta en amplificar exponencialmente un determinado fragmento de ADN con la ayuda de amplicones, que son fragmentos sintéticos de ADN formados por una sola hebra complementaria al fragmento o región de ADN objetivo. En éstos se encuentran incluidos biomarcadores que emiten fluorescencia, lo que permite identificar fácilmente la formación de ADN producto (a mayor síntesis de ADN, mayor fluorescencia).

Los amplicones utilizados se han diseñado y purificado en base a tres estándares específicos para *Trametes versicolor* (ITS1 y ITS2- Badia-Fabregat y col., 2017), hongos totales (FR1 y FR390, Chemidlin Prevost-Boure y col., 2011) y bacterias totales (16S V3-V4, (Klindworth y col., 2013)) publicados anteriormente en bibliografía. En la Tabla 4.15, se recogen las características de los estándares utilizados:

Tabla 4.15. Características de los estándares utilizados para qPCR

Microorganismo	Estándares	Secuenciación de ADN	Tamaño
<i>Trametes versicolor</i>	ITS1 (directo) ITS2 (inverso)	CACGCTCTGCTCATCCACTCT GCAGAATGCTCCCGTTAAGG	75 pb
Bacterias totales	16S V3-V4 (directo) 16S V3-V4 (inverso)	CCTACGGGNGGCWGCAG GACTACHVGGGTATCTAATCC	464 pb
Hongos totales	FR1 (directo) FF390 (inverso)	AICCATTC AATCGGTAIT CGATAACGAACGAGACCT	349 pb

La formación de estos nuevos fragmentos de ADN se realiza a partir de una reacción en cadena catalizada por la enzima ADN-polimerasa, la cual en función de la temperatura produce la desnaturalización del ADN y su posterior hibridación con la hebra complementaria (amplicón). La qPCR se llevó a cabo en un termociclador capaz de realizar los ciclos térmicos rápidamente y de detectar por espectrofotometría la fluorescencia emitida por los bio-marcadores intercalados entre las nuevas hebras. En la Figura 4.13 se representa un esquema de la replicación o amplificación del ADN a partir de la técnica qPCR.

En este caso las reacciones de qPCR se llevaron a cabo con un volumen final de 10 μL compuestos por 4 μL de muestra de ADN extraído y diluido 1/400 más 6 μL de la matriz de reacción compuesta por 1 μL de amplicón (realizado a partir de la mezcla de 5 μL de cada estándar) y 5 μL de Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, CN 4367659) que incluye la enzima ADN-polimerasa (AmpliTaQ Gold[®]). Las reacciones se realizaron en un termociclador (CFX384 Real Time System C1000, Bio-Rad) utilizando placas para PCR (hard-Shell[®] 384-Well PCR Plates White Well Clear Shell, Bio-Rad CN HSP-3805).

Los ciclos de temperatura que se realizan en este procedimiento se pueden dividir principalmente en las cuatro partes que se describen en la Figura 4.13.

- a) Desnaturalización del ADN. En la primera etapa se produce el aumento de la temperatura hasta 95 °C durante 10 minutos para conseguir la desnaturalización del ADN, que consiste en la separación física de la doble cadena produciendo fragmentos de una sola hebra.
- b) Alineación. Durante el segundo ciclo, la temperatura se mantiene a 95 °C durante 15 minutos y posteriormente se reduce a 55 °C durante 30 minutos donde se produce la alineación entre las hebras separadas anteriormente y los amplicones complementarios diseñados específicamente para los microorganismos de interés.
- c) Hibridación y formación del ADN producto. La temperatura de esta etapa fue de 72 °C y su duración de 1 minuto. Durante esta etapa se produce la hibridación de las nuevas cadenas de ADN formadas, las cuales se utilizan como plantillas del fragmento a replicar. Además, se mide la fluorescencia que éstas emiten.
- d) Amplificación exponencial del ADN producto. Finalmente, se sintetizan nuevas cadenas complementarias de ADN a la cadena modelo obtenida en el paso anterior. En este caso, estos dos últimos ciclos se repitieron 40 veces.

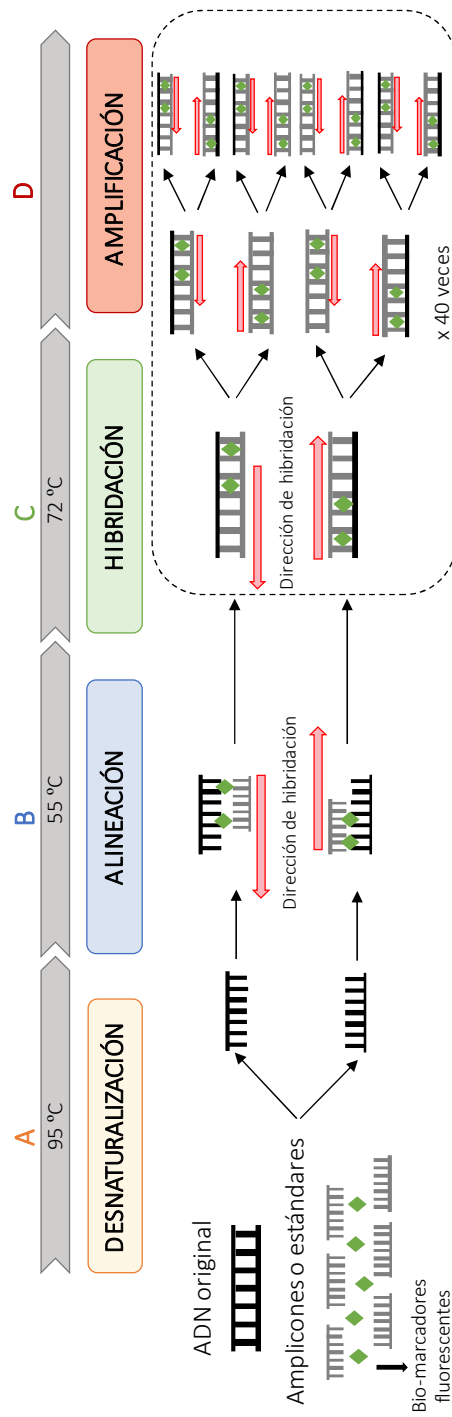


Figura 4.13. Replicación de ADN por qPCR

Con la finalidad de descartar una contaminación en los reactivos o estándares diseñados y purificados se realizaron ensayos control en ausencia de muestra problema. Además, todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado para todas las muestras de ADN extraídas de la biomasa anteriormente por duplicado. Finalmente, se realizó una validación del método de cuantificación mediante la preparación de seis patrones a partir de un conjunto de muestras. De este modo, se obtuvo una curva de calibrado que permitió evaluar la eficiencia individual de cada amplicón o estándar y estableció un rango cuantitativo para cada ensayo. En este caso, la curva obtenida mostró una buena correlación como se puede observar en la Tabla 4.16.

Tabla 4.16. Parámetros de la curva de calibrado para la qPCR

Microorganismo	Curva de eficiencia del amplicón		Curva de calibrado	
	r^2	Eficiencia	r^2	Eficiencia
<i>Trametes versicolor</i>	0,997	96,5	0,992	76,2
Bacterias totales	0,998	88	0,993	100
Hongos totales	0,998	83	0,990	98,9

La técnica de qPCR permite cuantificar de manera absoluta las especies objetivo, en este caso *Trametes versicolor*, hongos y bacterias totales y las relaciones entre ellas. Sin embargo, para poder realizar un estudio exhaustivo de detección e identificación de todas las especies presentes en la biomasa, se requiere de un análisis metagenómico mediante un proceso de secuenciación masiva del ADN producto de la qPCR. Esta técnica se basa en la determinación del orden de los nucleótidos dentro de los fragmentos de ADN, lo cual es característico de cada especie y permite identificarlas inequívocamente. Todas las tecnologías de secuenciación masiva previamente necesitan de una ampliación del fragmento de ADN, ya que no son aplicables a una única molécula. Por ello, esta técnica necesita complementarse de una replicación previa del ADN, como la realizada anteriormente con la qPCR.

En este trabajo, las muestras de ADN se secuenciaron utilizando un equipo Illumina-MiSeq el cual permite la lectura de fragmentos largos de hasta 2x300 pares de bases. Para esta técnica se utilizaron los mismos estándares que para qPCR para las bacterias totales y se cambiaron los de hongos totales a CS1-ITS4 (GACTACHVGGGTATCTAATCC) y ITS86F-CS2 (GTGAATCATCGAATCTTTGAA) (De Beek y col., 2014). Tras la secuenciación se realizaron análisis de calidad con lecturas utilizando el software Fast-QC. Así, aquellas lecturas pareadas se unieron en una sola secuencia utilizando el ensamblador PANDA-seq (Masella y col., 2012), lo cual permite corregir los errores de secuencia en la región de superposición y descartar los pares

que no se alinean entre ellos o que tienen una calidad baja (menos del 10 % de las lecturas unidas). Las lecturas ensambladas fueron la entrada para el análisis. Las bases de datos Green-Genes (bacterias) y UNITE (hongos) se utilizaron con un mínimo de 100.000 especies de referencia para mapear las lecturas de secuenciación 16S e ITS2, respectivamente, a través de las aplicaciones de software Qiime2 (Caporaso y col., 2010).

5. Resultados y Discusión

Como ha quedado reflejado en la introducción de esta memoria de investigación, el rápido desarrollo social junto con el uso inadecuado del agua ha desencadenado un aumento en la generación de aguas residuales. A este hecho, hay que sumarle la detección de nuevos contaminantes presentes en dichas aguas, llamados contaminantes emergentes los cuales en la actualidad no se encuentran legislados en la mayoría de los países europeos. Entre ellos, los compuestos farmacéuticos suscitan un gran interés entre la comunidad científica debido a su ineficaz eliminación en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs). En este contexto, es necesario realizar la búsqueda de procesos alternativos que sean eficaces tanto en el tratamiento del agua como en la eliminación de los compuestos farmacéuticos presentes en las mismas.

Uno de los tratamientos biológicos alternativos propuestos son los procesos de biooxidación avanzada con hongos ligninolíticos, los cuales son capaces de generar especies radicalarias oxidantes altamente reactivas que pueden oxidar aquellos contaminantes no biodegradables como los compuestos farmacéuticos. Durante los últimos años, los hongos ligninolíticos se han presentado como un proceso eficaz para el tratamiento de aguas residuales urbanas y la eliminación de compuestos farmacéuticos (Mir-Tutusaus y col., 2018 a). Sin embargo, hasta el momento, los trabajos publicados presentan una serie de limitaciones operacionales que dificultan su posterior escalado y cuestionan su viabilidad como tratamiento alternativo para la depuración de aguas residuales reales.

La necesidad de adición de sustratos fácilmente biodegradables, la existencia de problemas en el diseño de los biorreactores utilizados y su evaluación en procesos continuos, la competencia con los microorganismos autóctonos de las aguas residuales o la utilización de tiempos de residencia hidráulicos altos, son varios de los factores limitantes que impiden el avance hacia la escala industrial (Mir-Tutusaus y col., 2018 a). Todos ellos, hacen que se requiera de la realización de nuevos estudios donde se demuestre la viabilidad de trabajar con sistemas en continuo utilizando matrices de agua reales en condiciones no estériles.

Así pues, uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral es la evaluación de un proceso de biooxidación avanzada con hongos ligninolíticos (*Trametes versicolor*) como tratamiento continuo de aguas residuales urbanas y hospitalarias para la eliminación de contaminantes emergentes farmacológicos presentes en ella. Con la finalidad de proponer soluciones que den respuesta a los problemas descritos anteriormente, esta Tesis Doctoral se ha centrado en el tratamiento en continuo de diferentes aguas residuales reales (urbanas y hospitalarias) no estériles mediante un proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* en sistemas de contactores biológicos rotativos operando con tiempos de residencia hidráulicos de no más de 1 día.

Por otro lado, también se llevó a cabo la evaluación de un catalizador poroso reticulado tipo perovskita para el tratamiento descentralizado de aguas residuales procedentes de un hospital mediante un proceso continuo de tipo Fenton heterogéneo en un reactor de lecho fijo.

Con el objetivo de una discusión más ordenada de los resultados obtenidos, este capítulo se ha dividido en cuatro capítulos.

Capítulo 5.1. Evaluación del proceso de biooxidación avanzada para el tratamiento de un agua residual sintética y un agua real fortificadas con microcontaminantes farmacéuticos. Evaluación del proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* en un sistema de contactores biológicos rotativos para el tratamiento de un agua residual urbana sintética y un agua residual urbana real procedente de la depuradora a escala planta piloto situada en la Universidad Rey Juan Carlos, ambas dopadas con una concentración conocida de compuestos farmacéuticos.

Capítulo 5.2. Tratamiento biológico alternativo de aguas residuales urbanas y eliminación de microcontaminantes farmacéuticos mediante el proceso de biooxidación avanzada. Evaluación del sistema de biooxidación para el tratamiento biológico de aguas residuales urbanas de diversas características procedentes de la depuradora a escala planta piloto situada en la Universidad Rey Juan Carlos y de la

EDAR de Toledo. Influencia de la adición de promotores del proceso de biooxidación avanzada en la actividad del sistema, del tiempo de residencia hidráulico y de la composición inicial del agua residual (relaciones C: N y C:P). Caracterización de la actividad microbológica de la biomasa obtenida tras los tratamientos.

Capítulo 5.3. Proceso de biooxidación avanzada en contactores biológicos rotativos modificados con madera para el tratamiento descentralizado de aguas residuales hospitalarias con eliminación de microcontaminantes farmacéuticos. Evaluación y validación del proceso de biooxidación para el tratamiento biológico descentralizado de un agua residual hospitalaria en sistemas paralelos de CBRs modificados con planchas de madera. Análisis de la evolución de las comunidades fúngicas y bacterianas presentes en la biomasa del sistema de CBRs modificado tras el tratamiento del agua residual hospitalaria.

Capítulo 5.4. Proceso de oxidación Fenton con catalizadores reticulados tipo perovskita para la eliminación de microcontaminantes farmacéuticos en agua residuales hospitalarias. Preparación y caracterización del catalizador tipo perovskita en polvo y del material reticulado poroso. Evaluación de la actividad y estabilidad del material $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ en polvo como catalizador del proceso Fenton: influencia de la temperatura y del pH del agua residual. Evaluación de la actividad catalítica de los materiales porosos reticulados tipo perovskita como catalizadores heterogéneos en reactores continuos de lecho fijo. Eliminación de microcontaminantes farmacéuticos de un agua residual hospitalaria mediante un proceso Fenton en continuo utilizando un catalizador reticulado tipo perovskita.

5.1. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE BIOOXIDACIÓN
AVANZADA PARA EL TRATAMIENTO DE UN AGUA RESIDUAL
SINTÉTICA Y UN AGUA REAL FORTIFICADAS CON
MICROCONTAMINANTES FARMACÉUTICOS

En este primer capítulo de resultados se ha evaluado el proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* realizando el tratamiento de un agua residual sintética y un agua residual urbana procedente de la planta depuradora piloto de la Universidad Rey Juan Carlos, ambas fortificadas con una concentración conocida de compuestos farmacéuticos de diferentes familias terapéuticas.

El tratamiento en continuo se realizó en un sistema de contactores biológicos rotativos, el cual permite la inmovilización del hongo sobre sus discos. Además, se ha trabajado con un tiempo de retención hidráulico de 1 día, siendo el menor tiempo de residencia propuesto hasta el momento en bibliografía para la eliminación de contaminantes emergentes de origen farmacéutico con este tipo de hongo (Badia-Fabregat y col., 2016; Palli y col., 2017, 2016; Mir-Tutusaus y col., 2018 a, 2018 b, 2017). En todo momento se ha trabajado sin ningún tratamiento previo de esterilización del agua residual, comúnmente realizado en estudios con hongos de podredumbre blanca para evitar la competencia con otros microorganismos autóctonos del agua residual a tratar.

En este capítulo, se describe en primer lugar el proceso de puesta en marcha del reactor biológico de biooxidación avanzada. Durante la puesta en marcha, el principal objetivo fue promover el crecimiento de una biopelícula de hongos homogénea y de espesor constante sobre los discos de polipropileno del CBRs. A continuación, se realizó el tratamiento de las aguas residuales en ese biorreactor. En

primer lugar, se realizó el tratamiento de un agua residual sintética cuya formulación contuvo fuentes de carbono y nitrógeno fácilmente biodegradables, las cuales favorecen el crecimiento y actividad del hongo, así como compuestos farmacéuticos en concentración conocida. Consecutivamente, se realizó el tratamiento del agua residual urbana procedente de la depuradora a escala planta piloto de la Universidad Rey Juan Carlos fortificada con fármacos en concentración conocida, para estudiar el efecto de la matriz de agua residual en la eficacia del proceso de biooxidación avanzada para su depuración y eliminación de fármacos presentes.

5.1.1. Puesta en marcha de los contactores biológicos rotativos

El punto de partida para la puesta en marcha de la unidad de CBRs consiste en estimular el crecimiento y la inmovilización del *Trametes versicolor* sobre los biodiscos. Para ello, fue necesario acondicionar el sistema siguiendo las fases descritas en el apartado 4.3.1.2 del procedimiento experimental. Las condiciones de operación fueron seleccionadas de acuerdo a trabajos previos, en los cuales se estudiaron las condiciones de operación óptimas para promover la producción de exopolisacáridos (EPS) extracelulares por parte del hongo *T. versicolor* (Rau y col., 2009). Estas moléculas son las responsables de la capacidad de este tipo de hongos para adherirse sobre superficies. Además, también desempeñan otros papeles fundamentales, protegiendo al hongo de su deshidratación o contaminación por sustancias nocivas, y como agentes responsables de la disminución del estrés osmótico y de su agregación en estructuras micelares tridimensionales como los pellets (Manzoni y Rollini, 2001; Rau, 1997). Por otro lado, se seleccionó el extracto de Malta como medio para el crecimiento del hongo y la estimulación de la producción de EPS, de acuerdo a trabajos previos de Tavares y col. (2005), dado que una alta concentración de carbono en el medio y un pH entre 4 y 5,5 es fundamental para conseguir una alta producción de EPS coincidiendo con una alta tasa de crecimiento celular fúngico.

Así, la puesta en marcha se realizó en discontinuo en dos fases diferentes (Tabla 4.3 del procedimiento experimental). Una primera fase de inmovilización y crecimiento, donde se alimentó al biorreactor únicamente extracto de Malta durante 30 días y una segunda fase de aclimatación durante 20 días, en que se alimentó un agua residual sintética compuesto por sacarosa y tartrato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno. La cantidad de carbono orgánico total del agua sintética se mantuvo constante en 3 g/L. De este modo, debido al carácter discontinuo del sistema en ambas etapas, fue necesario renovar los sustratos a medida que éstos

fueron consumidos por el hongo. Para ello, la concentración de carbono orgánico total consumida por los microorganismos se monitorizó diariamente.

Tras estos 50 días de puesta en marcha se consiguió la inmovilización del hongo *Trametes versicolor* sobre los biodiscos, tal y como se muestra en las imágenes recogidas en la Figura 5.1.

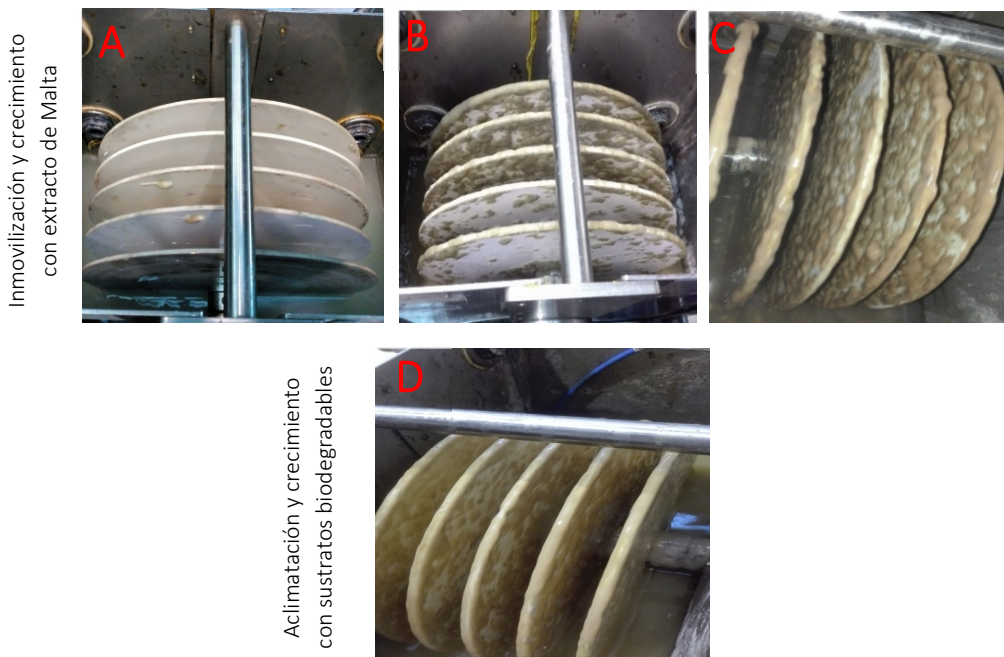


Figura 5.1. Evolución de la biomasa durante la fase de puesta en marcha del CBRs convencional: (A) inicio de la puesta en marcha; (B) 12 días; (C) 30 días; (D) 50 días

A la vista de las imágenes mostradas, cabe destacar que la inmovilización de la biomasa fue lenta durante la primera fase de la puesta en marcha, apreciándose únicamente a partir del día 12 un cierto grado de recubrimiento de los biodiscos (Figura 5.1.B). Sin embargo, al final de la puesta en marcha (50 días, Figura 5.1.D), se alcanzó un recubrimiento homogéneo con auto-renovación parcial periódica de la biopelícula mediante desprendimiento por gravedad, manteniéndose este proceso estable durante todo el tiempo de operación.

Además del análisis visual de la fijación y crecimiento de la biopelícula, también se monitorizó durante la puesta en marcha el consumo de carbono por parte del hongo presente en el biorreactor. En la Figura 5.2, se pueden observar los resultados obtenidos para el consumo de carbono orgánico total indicando los días correspondientes a las imágenes mostradas en la Figura 5.1.

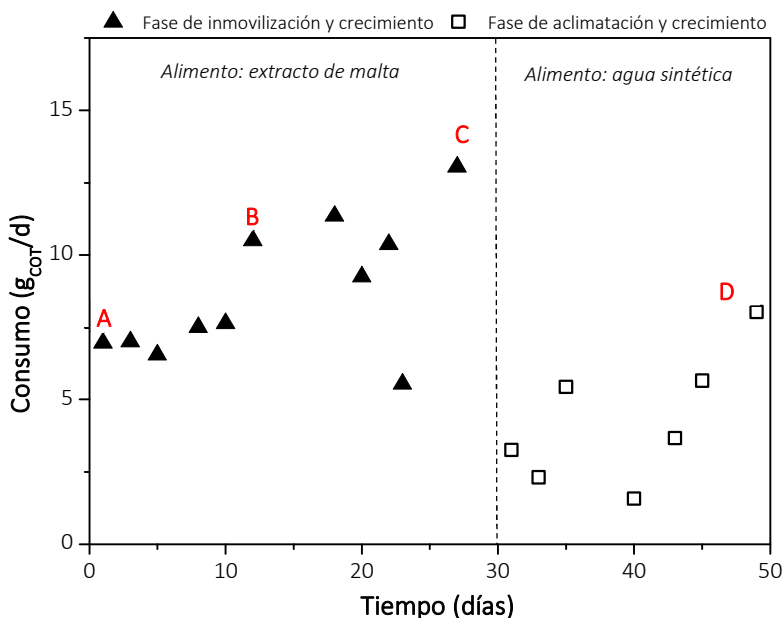


Figura 5.2. Consumo de COT durante la puesta en marcha del sistema de CBRs

El perfil de consumo en términos de COT obtenido durante la puesta en marcha del sistema muestra un mayor agotamiento de este sustrato durante la fase de inmovilización y crecimiento. Cabe destacar que dentro de los 30 días destinados a la inmovilización y crecimiento del hongo sobre los discos del sistema de CBRs, el consumo aumentó considerablemente a partir del día 12 de puesta en marcha, momento en que se empieza a adherir y formar la biopelícula.

Estos doce primeros días de consumo constante de COT corresponden con las imágenes 5.1.A y 5.1.B, donde apenas se aprecia biomasa soportada sobre la superficie de los discos. Debido a la tendencia marcada por el COT y el escaso grado de recubrimiento de los discos, se puede concluir que durante estos días se produjo la creación de nuevas hifas de *Trametes versicolor* suspendidas en el interior de la cuba del biorreactor, las cuales consumieron el extracto de Malta alimentado. Cuando las hifas creadas comenzaron a desarrollarse, el consumo de sustrato aumentó

considerablemente debido a la generación de una biomasa con la densidad suficiente para adherirse a los discos. Así, entre las imágenes 5.1.B y 5.1.C (del día 12 al 30), se aprecia una gran diferencia en el grado de recubrimiento de los discos, coincidiendo con los días que reflejan un mayor consumo de COT en la Figura 5.2. Finalmente, las imágenes 5.1.C y 5.1.D muestran gran similitud en la cantidad de biomasa inmovilizada. Durante la etapa de aclimatación, el extracto de Malta fue sustituido por otras fuentes de carbono y nitrógeno más complejos que limitan el crecimiento del hongo en la cuba del reactor, acercando el sistema a una situación de trabajo más próxima a la realidad, lo que se tradujo en una disminución de consumo de sustrato.

*Tras 50 días de puesta en marcha se ha alcanzado la inmovilización del hongo *Trametes versicolor* sobre los discos de la unidad CBRs, consiguiendo la formación de un recubrimiento homogéneo con renovación regular de la biopelícula desprendida y manteniéndose estable durante todo el tiempo de operación.*

5.1.2. Evaluación del proceso de biooxidación avanzada

Una vez puesto en marcha el sistema de CBRs, se procedió al tratamiento en continuo del agua residual sintética y el agua residual real procedente de la salida del tratamiento primario de la depuradora piloto localizada en la Universidad Rey Juan Carlos (URJC 1, Tabla 4.3 del procedimiento experimental), ambas fortificadas con compuestos farmacéuticos de diferentes familias terapéuticas. El tratamiento del agua residual sintética y del agua residual urbana procedente de la URJC se llevó a cabo en el sistema de contactores biológicos rotativos durante 120 y 35 días, respectivamente, y de forma consecutiva. Las características de las diferentes aguas residuales y las condiciones de operación del biorreactor se describen en el apartado 4.3.1.3 del procedimiento experimental de la presente memoria de investigación.

La formulación del agua residual sintética es una adaptación de la descrita por Marco-Urrea (Marco-Urrea y col. 2010 a y 2009) en la cual se incluyen fuentes de carbono y nitrógeno (sacarosa y tartrato de amonio), así como un mediador quinónico (ácido gálico) y sales de hierro y manganeso como promotores del proceso de biooxidación avanzada (Tabla 4.3 del procedimiento experimental). En este caso, la matriz del agua sintética fue dopada con ocho fármacos pertenecientes a diferentes familias terapéuticas con una concentración inicial de 50 µg/L de cada uno de ellos (Tabla 4.4 del procedimiento experimental). Estos compuestos fueron seleccionados debido a su alta presencia y potencial riesgo ambiental en los efluentes de las EDARs (Al Aukidy y col., 2012; Kay y col., 2017) y comprenden: compuestos analgésicos o

antiinflamatorios, como la antipirina (4-AAA) y el diclofenaco (DCF); fármacos reguladores lipídicos y del colesterol en sangre, como el ácido clofíbrico (ACF), el gemfibrozilo (GFZ) e hidroclorotiazida (HCT); carbamazepina (CZP) y cafeína (CFN), un antiepiléptico/antidepresivo y un estimulante, respectivamente; y el sulfametoxazol (SMX), que es un antibiótico de uso común utilizado contra infecciones bacterianas.

Una vez finalizado el tratamiento del agua residual sintética, se comenzó a alimentar al CBRs el agua residual urbana procedente de la URJC. De nuevo, a este agua residual se le añadió un mediador quinónico (ácido gálico) y sales de hierro y manganeso como promotores del proceso de biooxidación avanzada (Tabla 4.3 del procedimiento experimental). En este caso, durante el tratamiento del agua residual real procedente de la depuradora piloto de la URJC, se realizó una evaluación más exhaustiva de la eliminación de los fármacos que para el tratamiento anterior, incluyendo el seguimiento de cinco fármacos adicionales: el ibuprofeno (IBP) y la sulpirida (SPD), completaron la familia de los compuestos analgésicos/antiinflamatorios y psiquiátricos, respectivamente; mientras que como representantes de nuevas familias terapéuticas se añadieron ranitidina (RNT), progesterona (PGT) y atenolol (ATN), un antihistamínico, una hormona reguladora del sistema endocrino y un β -bloqueante usado principalmente para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. De nuevo, los trece compuestos farmacéuticos pertenecientes a diferentes familias terapéuticas se añadieron con una concentración inicial de 50 $\mu\text{g/L}$ de cada uno de ellos.

Durante el tratamiento de ambas aguas, el sistema de contactores biológicos rotativos operó en continuo con un TRH de 1 día, manteniendo para ello el caudal de entrada al biorreactor constante en 10 L/día. Además, se estableció una sumergencia y una velocidad de giro de los discos del 40 % y de 12 rpm, respectivamente. En ambos casos, el pH del agua residual real fue ajustado a 4,5. La eficacia del proceso de biooxidación avanzada para el tratamiento de ambas aguas residuales se evaluó considerando la reducción de la carga de carbono orgánico total, nitrógeno en forma de amonio y fósforo en forma de fosfatos, así como la eliminación de los compuestos farmacéuticos.

A. Eficacia en la eliminación de carbono, nitrógeno y fósforo

En la Figura 5.3, (a) y (b), se representan los resultados de carga (mg/d) de COT y N-NH_4^+ tanto para el agua residual de entrada como para el efluente obtenido del CBRs durante los 155 días de operación. El P-PO_4^{3-} no fue monitorizado continuamente a lo largo del tiempo de operación, recogiendo datos durante los

días 149, 151, 153 y 154, que corresponden al tratamiento del agua residual urbana procedente de la depuradora piloto de la URJC.

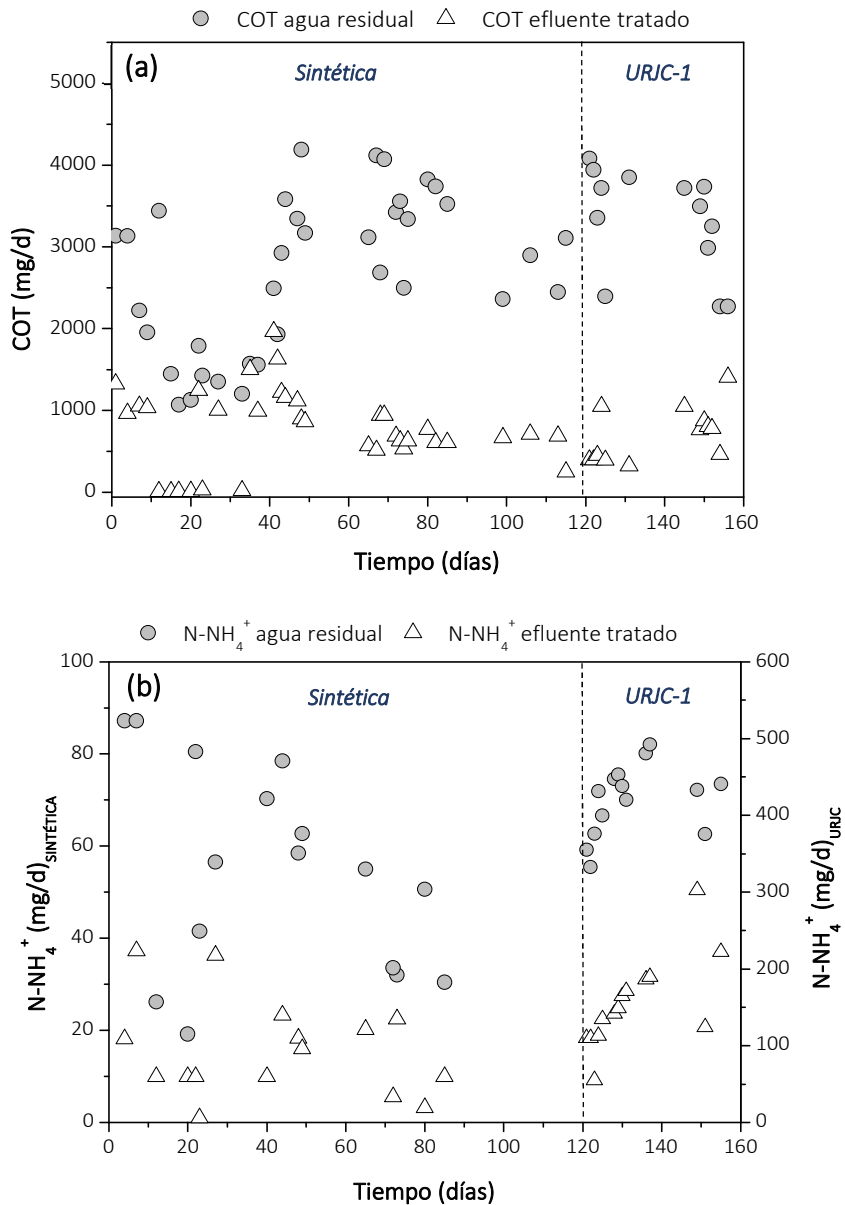


Figura 5.3. Evolución de la carga de (a) COT y (b) N-NH₄⁺ durante el tratamiento del agua residual sintética y del agua residual procedente de la depuradora URJC fortificadas con fármacos

Los resultados obtenidos de la monitorización del COT y N-NH_4^+ en la corriente de entrada y salida del CBR evidencian el buen rendimiento de eliminación de la biomasa fúngica durante los 155 días de operación. Durante el tratamiento de las dos aguas, se obtuvieron altas tasas de eliminación para los parámetros monitorizados una vez que se alcanzó el estado estacionario (a partir del día 45). En la Tabla 5.1, se muestra la relación COT:N y la composición media del agua inicialmente alimentada al sistema, así como la del efluente de salida del CBRs. Además, se muestran las tasas de eliminación medias para el carbono, nitrógeno y fósforo obtenidas durante ambos tratamientos.

Tabla 5.1. Caracterización del agua residual y del efluente y porcentajes de reducción obtenidos durante los tratamientos del agua residual sintética y de la URJC fortificadas

Tratamiento agua residual sintética			
	Agua residual (mg/L)	Efluente (mg/L)	Reducción (%)
COT	348 ± 49	76 ± 21	68 ± 25
N-NH_4^+	5 ± 2	1 ± 1	73 ± 22
Relación COT: N	70:1		
Tratamiento agua residual URJC fortificada (URJC-1)			
	Agua residual (mg/L)	Efluente (mg/L)	Reducción (%)
COT	414 ± 71	66 ± 26	82 ± 12
N-NH_4^+	46 ± 5	19 ± 6	61 ± 21
P-PO_4^{3-}	1,7 ± 0,4	0,5 ± 0,1	70 ± 5
Relación COT: N	9:1		

Las aguas residuales alimentadas al sistema mostraron relaciones COT: N de 70:1 y 9:1 para el agua residual sintética y el agua residual urbana procedente de la URJC, respectivamente. Durante el tratamiento del agua residual sintética se obtuvieron reducciones medias del 68 ± 25 % para el COT y del 73 ± 22 % para el N-NH_4^+ . Mientras que durante el tratamiento del agua residual urbana procedente de la URJC la eliminación de COT aumentó hasta un 82 ± 12 %, siendo de 61 ± 21 % para el N-NH_4^+ y el 70 ± 5 % para el P-PO_4^{3-} .

Este incremento en la tasa de reducción obtenida para el COT durante el tratamiento del agua residual urbana real podría estar relacionado con la contribución de la actividad microbiológica autóctona de las aguas residuales reales no esterilizadas, a pesar de la inhibición parcial bacteriana inducida por la acidificación

del medio a pH 4,5 (Yang y col., 2013). Al contrario que el COT, la tasa de eliminación para el N-NH_4^+ disminuyó desde un 73 ± 22 hasta un 61 ± 21 % durante el tratamiento del agua residual real. En este caso, el incremento de la concentración de nitrógeno en forma de amonio en el efluente puede estar relacionada con la autólisis celular del micelio fúngico bajo condiciones de hambruna provocada por la competencia con la fauna microbiana autóctona (Badia-Fabregat y col., 2016; Cruz-Morató y col., 2013; Zhang y Geißen, 2012). Anteriormente, otros autores ya reportaron bajas reducciones de nitrógeno amoniacal por parte del *Trametes versicolor*. Un estudio realizado para el tratamiento en continuo con este hongo de una agua residual real en un biorreactor de lecho fluidizado, alcanzó únicamente una reducción de nitrógeno amoniacal del 27% tras 7 días de operación (Mir-Tutusaus y col., 2018 b). Por lo tanto, el crecimiento de microorganismos autóctonos de las aguas residuales reales no esterilizadas en los biodiscos del sistema de CBRs y la competición de estos microorganismos con el hongo, generan una menor disponibilidad de carbono y nutrientes en el medio para el hongo, produciéndose así condiciones de hambruna y por consiguiente la autólisis celular del micelio y la liberación de nitrógeno amoniacal.

El proceso de biooxidación avanzada se propone como tratamiento biológico alternativo para el tratamiento de aguas residuales reales. La eliminación media obtenida para el COT (68 ± 25 y 82 ± 12 % para el agua sintética y real, respectivamente) se encuentra dentro del rango de los valores obtenidos con un sistema de fangos activos convencional (Tchobanoglus y col., 2003). Sin embargo, las tasas obtenidas para el N-NH_4^+ (73 ± 22 y 61 ± 21 % para el agua sintética y real, respectivamente) y P-PO_4^{3-} (70 ± 5 % para el agua real) son superiores a las encontradas en un estudio realizado sobre cinco depuradoras españolas en 2011, donde la tasa media de reducción alcanzada en los tratamientos de fangos activos fue de un 45 ± 24 % y 65 ± 20 %, respectivamente (Rodríguez-García y col., 2011).

Por todo ello, el proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* en un sistema de CBRs, operando con un TRH de 1 día, parece ser una buena alternativa para el tratamiento en continuo de aguas residuales urbanas reales. Además, las altas tasas de reducción obtenidas demuestran la buena capacidad de este hongo para asimilar las fuentes de carbono y nitrógeno propias del agua residual a pesar de contener otros compuestos no biodegradables, como los compuestos farmacéuticos (Palli y col., 2017). A diferencia de este proceso, la mayoría de los trabajos mostrados en bibliografía que utilizan este tipo de hongos requieren de la adición de glucosa o nitrógeno amoniacal para mantener su actividad durante el proceso continuo de tratamiento (Mir-Tutusaus y col., 2018). Finalmente, cabe destacar la buena adaptación del sistema al cambio de agua residual, ya que el sistema se mantuvo activo durante los 155 días de tratamiento. De este modo, se

puede concluir que la modificación de una matriz sintética a una real, con diferentes relaciones COT:N no afectó a la estabilidad de la biomasa fúngica soportada y, por tanto, al buen desarrollo del proceso de biooxidación avanzada.

Finalmente, otros de los parámetros monitorizados durante el proceso de biooxidación avanzada fueron el pH y la concentración de oxígeno disuelto en la cuba del sistema de CBRs. Como se observa en la Figura 5.4, el pH en la corriente de entrada al biorreactor se mantuvo en torno a 4,5 con la finalidad de favorecer la actividad fúngica sobre la bacteriana (Lú-Chau y col., 2004; Pazarlioğlu y col., 2005). Los hongos pueden crecer en ambientes ácidos (Woo-Sik y col., 2010), sin embargo la acidificación del medio ralentiza el metabolismo bacteriano generando una falta de nutrientes en estos microorganismos que conduce a su autólisis celular (Yang y col., 2013). Por el contrario, el pH de salida del biorreactor aumentó desde el inicio del tratamiento a un valor de 6 aproximadamente. En concordancia con estos resultados, Cruz-Morató y col. (2013) y Rodríguez-Rodríguez y col. (2010) ya vieron un incremento del pH en un tratamiento biológico discontinuo con *Trametes versicolor*, correspondiente con la eliminación total de la glucosa. La concentración de oxígeno disuelto en el interior del sistema del biorreactor se mantuvo aproximadamente constante durante los tratamientos de ambas aguas residuales ($3 \pm 0,5$ y $3,1 \pm 1,1$ mg/L, para el agua sintética y el agua residual real de la URJC, respectivamente) operando con un 40 % de sumergencia de los discos y una velocidad de rotación de 12 rpm. Los hongos ligninolíticos necesitan condiciones estrictamente aerobias (Woo-Sik y col., 2010; Robles-Hernández y col., 2018), ya que una limitación de oxígeno dentro de las hifas fúngicas pueden llevar a la autólisis celular (El-Enshasy, 2007) y con ello a la pérdida de biomasa en el sistema. Los resultados obtenidos para el pH y el oxígeno disuelto demuestran que el sistema de contactores biológicos propuesto ha mantenido las condiciones de operación adecuadas para el buen desarrollo del proceso de depuración.

Es importante destacar también que, a diferencia de otros trabajos donde se operó con el hongo en un lecho fluidizado con un flujo de aire continuo (Badia-Fabregat y col., 2016; Ferrando-Climent y col., 2015; Jelic y col., 2012; Mir-Tutusaus y col., 2018 y 2017), no ha sido necesario realizar la renovación o purga parcial de biomasa del biorreactor, airear el reactor para mantener la concentración apropiada de oxígeno disuelto, ni realizar el control de temperatura del biorreactor, siendo ésta la correspondiente a la ambiental en los meses de operación (Enero-Abril). Todos estos resultados abren la posibilidad de aplicar este tipo de procesos para tratamientos a gran escala, donde se opere con altos caudales de agua, ya que se consigue realizar una reducción destacada de la carga contaminante del agua residual

en el sistema de CBRs operando con un TRH de tan solo 1 día, como se ha comentado previamente.

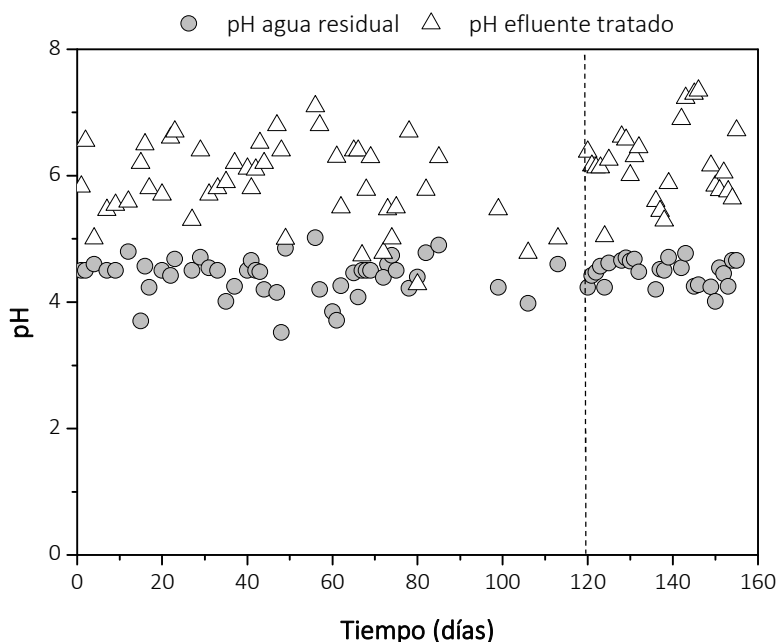


Figura 5.4. Evolución del pH durante el tratamiento del agua residual sintética y del agua residual procedente de la URIC ambas fortificadas con fármacos

B. Eficacia en la eliminación de compuestos farmacéuticos

La eficacia del proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* para el tratamiento del agua residual sintética y urbana procedente de la URIC, no solo se ha evaluado respecto a la reducción de carbono, nitrógeno y fósforo sino también respecto a las tasas de eliminación de los compuestos farmacéuticos dopados en una concentración de 50 µg/L.

En la Figura 5.5 (a), se muestran los porcentajes de eliminación de los ocho compuestos farmacéuticos durante el tratamiento del agua residual sintética en el sistema de CBRs (4-AAA, ACF, CFN, CZP, DCF, GFZ, HCT y SMX). Los resultados muestran el valor mínimo y máximo, así como el valor medio de eliminación para siete muestras (días 49, 57, 72, 74, 81, 108 y 114), calculados a partir del valor medio de concentración de cada fármaco a la entrada del biorreactor.

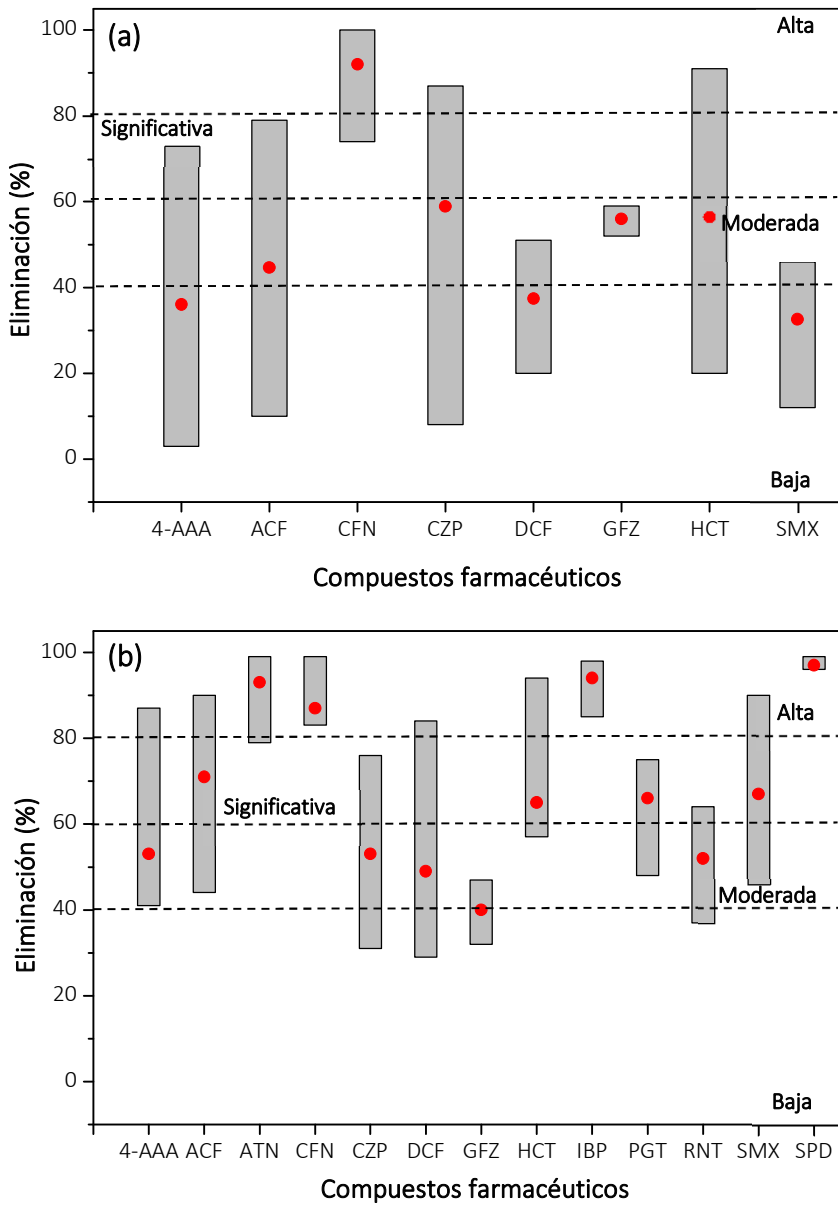


Figura 5.5. Intervalos de eliminación de los compuestos farmacéuticos durante el tratamiento (a) del agua residual sintética y (b) del agua residual procedente de la URJC, ambas fortificadas con compuestos farmacéuticos (punto rojo: valor medio)

De acuerdo con los valores medios alcanzados durante el tratamiento del agua residual sintética, se obtuvieron eficiencias de eliminación moderadas, aproximadamente entre el 30 (SMX) y el 60 % (CZP y GFZ), a excepción de la CFN que obtuvo un porcentaje de eliminación superior al 90 %. La mitad de ellos, 4-AAA, ACF, CZP y HCT; mostraron una considerable fluctuación durante el tiempo de operación. Independientemente de este hecho, los resultados obtenidos durante el tratamiento del agua residual sintética mediante el proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* obtuvieron tasas similares o ligeramente superiores a otros resultados ya publicados con este tipo de hongo de podredumbre blanca (Vasiliadou y col. 2016; Cruz-Morató y col. 2014; Nguyen y col. 2013; Cruz-Morató y col. 2013; Yang y col. 2013 a; Jelic y col. 2012).

Vasiliadou y col., (2016) reportaron valores de eliminación inferiores al 20 % para la 4-AAA, CFN, CZP, HCT y SMX e inferior al 30 % para el ACF en ensayos discontinuos durante 7 días de incubación trabajando con un medio sintético en condiciones estériles. Jelic y col. (2012) obtuvo una eliminación similar para la CZP (54 %) trabajando en un reactor de lecho fluidizado operando en continuo, pero con un TRH de 3 días y únicamente usando este compuesto como contaminante modelo, con una concentración inicial de 200 µg/L, en una matriz del agua sintética. Otros trabajos obtuvieron menores eficacias de eliminación para CZP y CFN en experimentos en discontinuo tras 8 días de incubación bajo condiciones estériles (Cruz-Morató y col., 2013 y 2014) o en biorreactores de membrana operando con un TRH de 2 días (Nguyen y col., 2013). Finalmente, Yang y col. (2013 a) consiguieron una eliminación de DCF (55 %) similar a la obtenida en este trabajo (51 %) durante el tratamiento de un agua residual sintética, pero trabajando en un biorreactor en continuo con un TRH superior de 2 días.

Un estudio más exhaustivo de la eliminación de fármacos mediante biooxidación avanzada se llevó a cabo durante el tratamiento del agua residual real de la URJC, entre los días 121 a 155. En la Figura 5.5 (b), se muestran los porcentajes de eliminación obtenidos para los trece fármacos añadidos a la matriz de agua residual (4-AAA, ACF, ATN, CFN, CZP, DCF, GFZ, HCT, IBP, PGT, RNT, SMX y SPD), durante el tratamiento, operando el biorreactor de la misma manera que con el agua residual sintética. Los resultados corresponden al valor mínimo y máximo, así como a la tasa media obtenida para cinco muestras (125, 136, 139, 153 y 155).

Los trece fármacos estudiados se clasifican en cuatro grupos en función de las eficacias de eliminación promedio obtenidas durante el tratamiento del agua residual: baja reducción (0-40 %), reducción moderada (40-60 %), reducción significativa (60-80 %) y alta reducción (80-100 %). De acuerdo con esta clasificación, ATN, CFN, IBP y SPD obtuvieron altas eliminaciones; ACF, HCT y SMX tuvieron

reducciones significativas y 4-AAA, CZP, DCF, GFZ y RNT eliminaciones moderadas. Ninguno de los trece fármacos estudiados obtuvo una tasa por debajo del 40 %.

Además, es interesante destacar que las tasas de eliminación alcanzadas para el tratamiento del agua residual urbana real son superiores (4-AAA, ACF, DCF, HCT y SMX) o similares (CFN, CZP, GFZ) a las obtenidas durante el tratamiento del agua residual sintética para los fármacos estudiados en ambas etapas. La Figura 5.6 recoge los resultados por rangos de eliminación y en función del número de fármacos que obtuvieron eliminaciones dentro de cada uno de los cuatro rangos descritos anteriormente. Como se puede observar, durante el tratamiento del agua residual real todos los fármacos estudiados consiguieron tasas de eliminación superiores al 40 %, mientras que durante el tratamiento del agua residual simulada los resultados de eliminación de tres de los ocho fármacos fueron inferiores al 40 %.

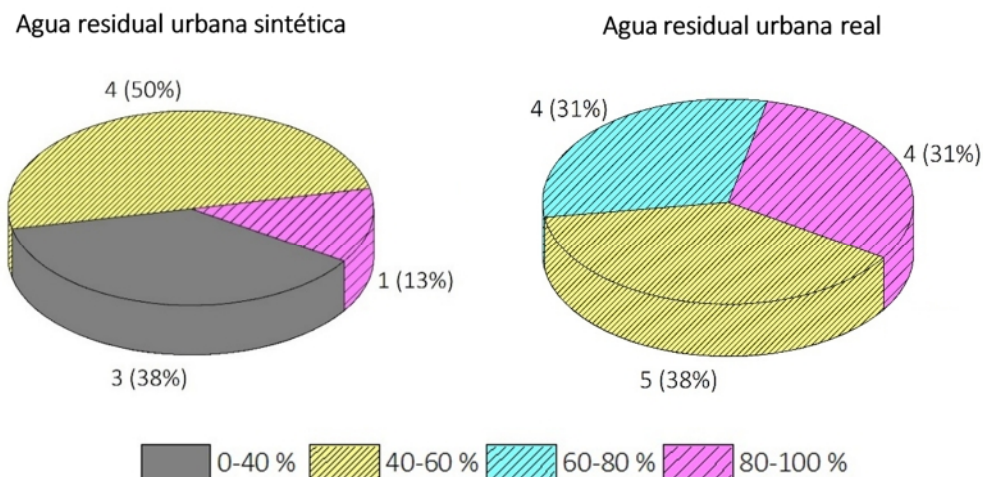


Figura 5.6. Distribución de rangos de eliminación de compuestos farmacéuticos en el tratamiento de las dos aguas residuales fortificadas: sintética y urbana URJC

De nuevo, este incremento en la eficacia de eliminación de los fármacos pueda deberse a la posible actividad microbiana de microorganismos autóctonos de las aguas residuales reales, los cuales han podido crecer junto con el hongo durante el tratamiento en continuo bajo condiciones no estériles. Así, igual que ocurrió con las reducciones de COT, estos microorganismos pueden contribuir parcialmente a la reducción de los microcontaminantes (Badia-Fabregat y col., 2016, 2017).

Anteriormente, otros trabajos utilizando hongos ligninolíticos ya estudiaron la eliminación de contaminantes farmacéuticos en aguas urbanas reales no esterilizadas y fortificadas con una concentración inicial de fármacos. Palli y col.

(2017) utilizaron un hongo (*P. ostreatus*) de la misma familia que el *T. versicolor*, consiguiendo una completa eliminación del DCF. Sin embargo, vieron una degradación nula para el ATN en el tratamiento continuo realizado en un reactor fluidizado que operó con un TRH de 1,63 días y con una matriz de agua residual fortificada con 10 mg/L de cada fármaco. De manera similar que en este trabajo, Mir-Tutusaus y col. (2016) obtuvieron una eliminación completa para el IBP trabajando con *T. versicolor* de nuevo en un reactor fluidizado, pero que operó en continuo con un TRH de 3 días y con una matriz de agua fortificada con una concentración superior de 20 mg/L de este fármaco. Estos valores son ligeramente inferiores o iguales a los alcanzados por el proceso de biooxidación estudiado en la presente tesis doctoral, llevado a cabo en un sistema de CBRs con un TRH de tan solo 1 día. Además, cabe destacar de nuevo que, a diferencia de los estudios mencionados, este trabajo se realizó bajo condiciones donde no se adicionaron fuentes de sustratos fácilmente biodegradables (glucosa y amonio) y no se realizó la renovación periódica de la biomasa presente en el biorreactor.

El proceso de biooxidación avanzada se propone como tratamiento biológico alternativo para el tratamiento de aguas residuales reales. Por ello, las eficiencias obtenidas en este sistema se han comparado con las tasas de reducción de los tratamientos biológicos convencionales de las estaciones depuradoras (fangos activos, fangos activos anóxicos/aerobios, biodegradación anaerobia/aerobia A2O multietapa). En la Tabla 2.13 recogida en la introducción de la presente memoria de investigación, se muestra un resumen de las eliminaciones para todos los fármacos estudiados (Thiebault y col., 2017; Han-Tran y col., 2017; Verlicchi y col., 2013 a; Martín y col., 2012; Deblonde y col., 2011; Jelic y col., 2011; Rosal y col., 2010 a; Vieno y col., 2007; Metcalfe y col., 2003). Los valores bibliográficos encontrados, tras realizar una comparativa para quince EDARs, muestran una gran variabilidad entre las diferentes plantas. Esta diferencia es debida a las características de iniciales de las aguas residuales alimentadas y las condiciones de operación (TRH, tiempo de retención celular y el tipo de tratamiento biológico utilizado).

En cualquier caso, como se puede observar en la Figura 5.7, las plantas depuradoras convencionales consiguen elevadas eliminaciones de IBP y CFN, con rangos entre el 75 - 100 %. En el proceso de biooxidación avanzada con hongos en el sistema CBRs se obtuvieron tasas de eliminación similares (95 y 87 % para IBP y CFN, respectivamente). En el caso, del ATN la eficacia de eliminación fue muy superior en el proceso de biooxidación avanzada, obteniendo un 93 % frente al rango de reducción obtenido en las depuradoras con tratamientos de fangos activos convencionales (15 – 60 %) (Deblonde y col., 2011; Jelic y col., 2011; Vieno y col., 2007). Lo mismo ocurre para la SPD, con la que el proceso de biooxidación avanzada

propuesto obtuvo una tasa de eliminación media del 95 %, superior a la encontrada en los tratamientos convencionales de fangos activos, entre el 0 - 84 % (Bollmann y col., 2016; Han-Tran y col., 2017). El tratamiento con *Trametes versicolor* también mostró una mayor eliminación para el SMX y PGT, con un 70 % de eliminación, respectivamente, frente a valores entre 17 - 52 % o 30 - 60 % en un sistema de fangos activos con nitrificación/desnitrificación (Verlicchi y col., 2013). Por el contrario, el 4-AAA, GFZ, ACF y HCT lograron tasas de eliminación tras el tratamiento con hongos (53, 40, 71 y 65, respectivamente) muy similares a los rangos presentados en los sistemas convencionales (9 - 65 % para el 4-AAA; -7 - 83 % para GFZ; 40 - 80% para ACF y 50 - 60 % para HCT) (Rosal y col., 2010 a; Verlicchi y col., 2013 a). Finalmente, las tasas de eliminación de los compuestos más refractarios a los tratamientos convencionales, como RNT (18 - 30 %), DCF (-15 - 40 %) y CZP (-21 - 20 %) mejoraron considerablemente en el tratamiento de biooxidación avanzada propuesto en este trabajo (entre el 50 y 60 %, respectivamente).

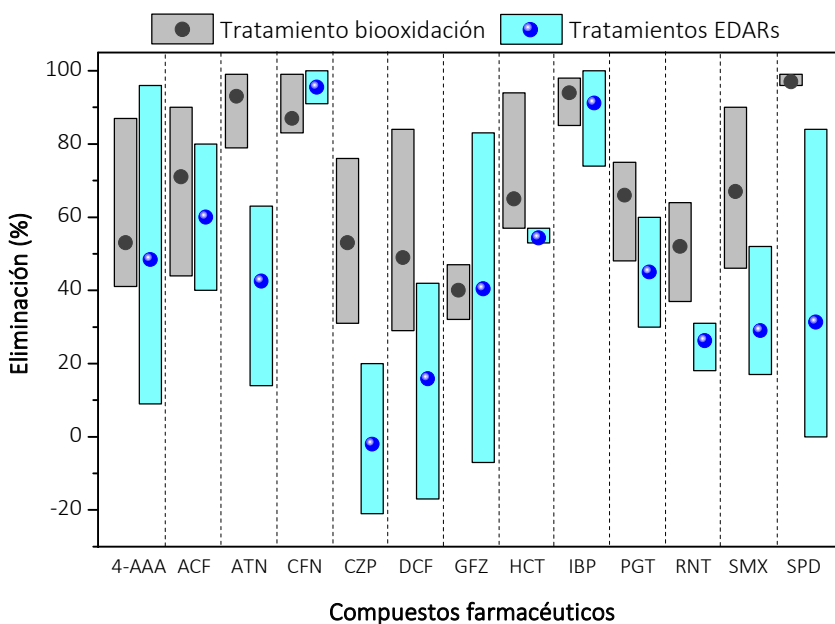


Figura 5.7. Comparativa de la eliminación de compuestos farmacéuticos en el tratamiento de aguas residuales urbanas por biooxidación avanzada y en los tratamientos convencionales de las EDARs

Aunque el mecanismo de eliminación por biooxidación está basado en la capacidad del hongo para la generación de radicales hidroxilo, éste se desarrolla cercano a la superficie de la biomasa fúngica, por lo que su interacción con las moléculas de fármacos puede tener un papel fundamental en su eliminación. Así, el carácter más o menos refractario de los compuestos farmacéuticos analizados está íntimamente ligado a su estructura molecular, peso molecular, carácter hidrofóbico/hidrófilo y especiación química en el medio acuoso. (Yang y col., 2013 b). En la Tabla 7.2 del capítulo de anexos se recogen estas características fisicoquímicas para los trece compuestos estudiados.

En primer lugar, desde el punto de vista de su estructura molecular, la presencia de grupos funcionales aceptores o dadores de electrones puede afectar a la interacción entre el fármaco y la biomasa, así como al ataque oxidativo por parte de los radicales hidroxilo (Yang y col., 2013 b). Así, la presencia de grupos electro-atractores, como amidas (-CONR₂), grupos carboxílicos (-COOH), halógenos (-X) y grupos nitro (-NO₂), hacen que el resto de la estructura molecular esté desprovista de electrones haciendo que los fármacos sean más resistentes a una acción oxidativa del metabolismo fúngico. Por el contrario, los compuestos que tienen grupos dadores de electrones, como aminas (-NH₂), alcoholes (-OH), grupos alcoxi (-OR) o carbonilos (-COR) y alquilos (-R); muestran una mayor facilidad a su biooxidación debido a que presentan electrones disponibles en su estructura molecular.

Habitualmente, la mayoría de los compuestos farmacéuticos tienen ambos tipos de grupos funcionales en su estructura, lo que hace que su comportamiento no sea fácil de predecir. De todos los fármacos estudiados, CZP es el único que presenta solo grupos funcionales aceptores de electrones en su estructura (grupo carbamida), atribuyendo a este compuesto un importante carácter biorefractario a los tratamientos biológicos. En este caso, la CZP obtuvo una tasa de eliminación moderada del 55 % mediante el proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor*. El resto de los compuestos estudiados, poseen tanto grupos dadores como aceptores por lo que su comportamiento podría no regirse prioritariamente por esta propiedad, ya que no solamente depende de la presencia de estos grupos sino de la contribución sinérgica que éstos realizan, mostrando así diversidad en sus eficacias de eliminación. Compuestos como IBP con un grupo carboxilo (aceptor de electrones) y un grupo metilo (donador de electrones) y SMX con un grupo sulfonamida (aceptor de electrones) y un grupo amina (donador de electrones), obtuvieron altos porcentajes de eliminación durante este trabajo (95 y 67 %, respectivamente); similares a los obtenidos anteriormente en otros trabajos (Cruz-Morató y col., 2014; Mir-Tutusaus y col., 2017). Sin embargo, DCF, que presenta un grupo dador de electrones (amina) y varios grupos aceptores (grupos carboxílico y cloro), únicamente

obtuvo una tasa de eliminación moderada del 50 %, similar a las conseguidas anteriormente por Yang y colaboradores (2013). Este hecho, permite concluir que el tipo de grupos funcionales afecta a la eliminación de los compuestos farmacéuticos, pero existen otros factores que también pueden contribuir en su eliminación.

En este sentido, la hidrofobicidad de los compuestos farmacéuticos puede promover su afinidad con la biomasa fúngica, desarrollando un proceso de bioadsorción complementario para los fármacos con carácter hidrofóbico. Así, si el logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) es mayor de 3, los compuestos tienen carácter hidrófobo (Grandclément y col., 2017; Moreno-González y col., 2016) y tendrán una mayor afinidad por la biomasa fúngica. De los trece compuestos farmacéuticos estudiados, únicamente IBP, GFZ y PGT tienen un $\log K_{ow} > 3$ (3,97, 4,77 y 3,87, respectivamente). Estos compuestos han obtenidos tasas de eliminación del 95, 40 y 66 %, respectivamente. En estos casos, la bioadsorción del fármaco sobre la biomasa fúngica podría ser factible o al menos tener una contribución importante. Sin embargo, estudios previos donde se evaluó la contribución del proceso de bioadsorción sobre la biomasa en la eliminación de estos compuestos farmacéuticos demostraron que ésta fue insignificante. Vasiliadou y col. (2016) observaron una baja contribución de este mecanismo en la eliminación de GFZ, IBP, DCF, SMX o SPD. Recientemente, un trabajo más exhaustivo enfocado al papel de la bioadsorción en los procesos de eliminación de compuestos farmacéuticos con diferentes cepas de hongos ligninolíticos, indicó que únicamente un 7 % de la reducción, como valor medio para cuatro compuestos estudiados (carbamazepina, diclofenaco, iopromida y venlafaxina), es debida a la bioadsorción con la biomasa fúngica (Lucas y col., 2018).

Por otro lado, los compuestos con un carácter más hidrófilo ($\log K_{ow} < 3$) pueden tener una mayor o menor afinidad con la biomasa fúngica en función de su especiación química. La mayoría de los fármacos tienen grupos ácidos o bases débiles que permiten su ionización en una fase acuosa. La forma no ionizada de los compuestos suele ser lipofílica, por lo que podría crear una afinidad positiva con la biomasa fúngica. Por el contrario, la forma ionizada es muy hidrofílica y tienden a disolverse en el medio acuoso. En estos casos, el compuesto podría no generar esa afinidad con la biomasa.

La fracción de forma no ionizada presente en el medio depende de la relación entre su pK_a y el pH del medio. Así, cuando el $pK_a > pH$ del medio, el fármaco está mayoritariamente en su forma no-ionizada creando una atracción positiva con las paredes celulares de la biomasa fúngica. Sin embargo, si el $pK_a < pH$, el compuesto está parcialmente ionizado disolviéndose más fácilmente en el agua y creando menor interacción con la superficie de la biomasa fúngica (Vasiliadou y col., 2013).

Consecuentemente, compuestos hidrofílicos cuyo pKa sea menor que el pH del medio (Figura 5.4: 4,5–6) como 4-AAA, ACF, DCF o RNT (pKa iguales a 1,56, 3,46, 4,14 y 0,3, respectivamente) han obtenido eliminaciones moderadas (53, 71, 49, 52 %, respectivamente). Por el contrario, compuestos hidrofílicos cuyo pKa ha sido muy superior al pH del medio, como ATN, CFN y SPD (pKa iguales a 9,6, 14 y 9, respectivamente) obtuvieron altas tasas de eliminación superiores al 80 % (93, 87 y 97 %).

*El proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* en un sistema de contactores biológicos rotativos se ha mantenido activo durante 155 días para el tratamiento en continuo de un agua residual sintética y un agua residual urbana, fortificadas con compuestos farmacéuticos. El sistema mostró un buen rendimiento en términos de reducción de COT, $N-NH_4^+$ y $P-PO_4^{3-}$, alcanzando eliminaciones del 82, 61 y 70 % durante el tratamiento del agua residual real operando con un TRH de 1 día.*

Estos resultados demuestran la buena adaptación de la biomasa al cambio en las características de la matriz de agua residual. El sistema ha mantenido similares valores de reducción de carga orgánica con aguas residuales con relaciones COT: N muy diferentes, aunque la presencia de microorganismos autóctonos del agua residual influye en la reducción de amonio o los microcontaminantes emergentes farmacéuticos.

En términos de eliminación de los compuestos farmacéuticos 12 de los 13 compuestos estudiados se eliminaron entre un 50 y 97 % operando con un TRH de 1 día. Entre ellos, compuestos como DCF, CZP o RNT los cuales presentan un carácter muy biorefractarios en los tratamientos convencionales de depuración, se eliminaron en un 50, 55 y 52 % respectivamente.

Además, cabe destacar que el sistema propuesto se ha mantenido activo durante 155 días de tratamiento sin la necesidad de añadir sustratos adicionales fácilmente biodegradables, sin la renovación o purga parcial de la biomasa fúngica, sin la dosificación específica de aire, ni el control de temperatura.

5.2. TRATAMIENTO BIOLÓGICO ALTERNATIVO DE AGUAS RESIDUALES URBANAS Y ELIMINACIÓN DE MICROCONTAMINANTES FARMACÉUTICOS MEDIANTE EL PROCESO DE BIOOXIDACIÓN AVANZADA

En este segundo capítulo se ha evaluado el proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* en el sistema de contactores biológicos rotativos como tratamiento biológico alternativo para la depuración de aguas residuales urbanas procedentes de distintas depuradoras y para la eliminación de microcontaminantes de tipo farmacéutico.

El estudio se realizó con las aguas residuales urbanas procedentes del tratamiento primario de la depuradora a escala planta piloto situada en el Campus de Móstoles de la Universidad Rey Juan Carlos (Madrid) y de una EDAR urbana situada en la provincia de Toledo. El tratamiento de ambas aguas se llevó a cabo en el sistema de CBRs sin aporte adicional de sustratos fácilmente biodegradables y sin la renovación periódica de la biomasa. Se evaluó la influencia de la adición de los promotores del proceso biooxidación avanzada (ácido gálico y sales de hierro y manganeso), el tiempo de residencia hidráulico (TRH) y la composición del agua residual en el rendimiento de la depuración del agua y la eficacia de eliminación de microcontaminantes farmacéuticos.

En este capítulo, no se describe la puesta en marcha del CBRs, ya que coincide con la llevada a cabo en el apartado 5.1.1 del bloque de resultados.

5.2.1. Tratamiento del agua residual urbana de la planta depuradora a escala piloto de la Universidad Rey Juan Carlos

En primer lugar, se realizó el tratamiento en continuo del agua residual urbana procedente de la salida del tratamiento primario de la depuradora a escala planta piloto localizada en el Centro de Apoyo Tecnológico del Campus de Móstoles de la Universidad Rey Juan Carlos (URJC). En este caso, las características de la depuradora y del agua residual utilizada se muestran en el procedimiento experimental dentro del apartado 4.3.1.3.

El tratamiento del agua residual urbana se dividió en tres etapas realizadas de manera consecutiva en el tiempo. Una primera etapa, donde se llevó a cabo el tratamiento del agua residual en la unidad de biodiscos sin añadir los sustratos promotores del proceso de biooxidación avanzada. Durante esta etapa, el sistema de contactores biológicos rotativos (CBRs) operó en continuo con TRH de 1 día manteniendo el caudal de entrada constante en 10 L/día durante 65 días. Además, se estableció un grado de sumergencia y una velocidad de giro de los discos del 40 % y de 12 rpm, respectivamente. El pH del agua residual real fue modificado a 4,5 con una disolución de ácido sulfúrico 2 N (Tabla 4.3, *URJC 2-Fúngico*).

Posteriormente, en una segunda etapa, el agua residual procedente de la depuradora de la URJC se trató durante 30 días en la unidad de CBRs operando bajo las mismas condiciones que en el caso anterior, pero añadiendo los sustratos promotores del proceso de biooxidación avanzada: 85 mg/L de ácido gálico, 145 mg/L oxalato de hierro (III) hexahidratado y 20 mg/L nitrato de manganeso (II) tetrahidratado (Tabla 4.3, *URJC 3-Fúngico + Biooxidación*).

Finalmente, se realizó una última etapa de tratamiento durante 20 días, alimentando el agua residual con los mediadores del proceso de biooxidación avanzada, pero disminuyendo el tiempo de residencia hidráulico hasta 0,5 días (Tabla 4.3, *URJC 4-TRH 0,5 días*).

La eficacia del tratamiento del agua residual urbana se evaluó considerando la reducción de la carga de carbono orgánico total, el nitrógeno en forma de amonio, el fósforo en forma de fosfatos y los compuestos farmacéuticos detectados en el agua residual.

En la Figura 5.8, se representan los resultados de carga diaria (mg/d) de COT, N-NH₄⁺ y P-PO₄³⁻ del agua residual bruta de entrada al biorreactor y del efluente obtenido durante los 115 días de operación total.

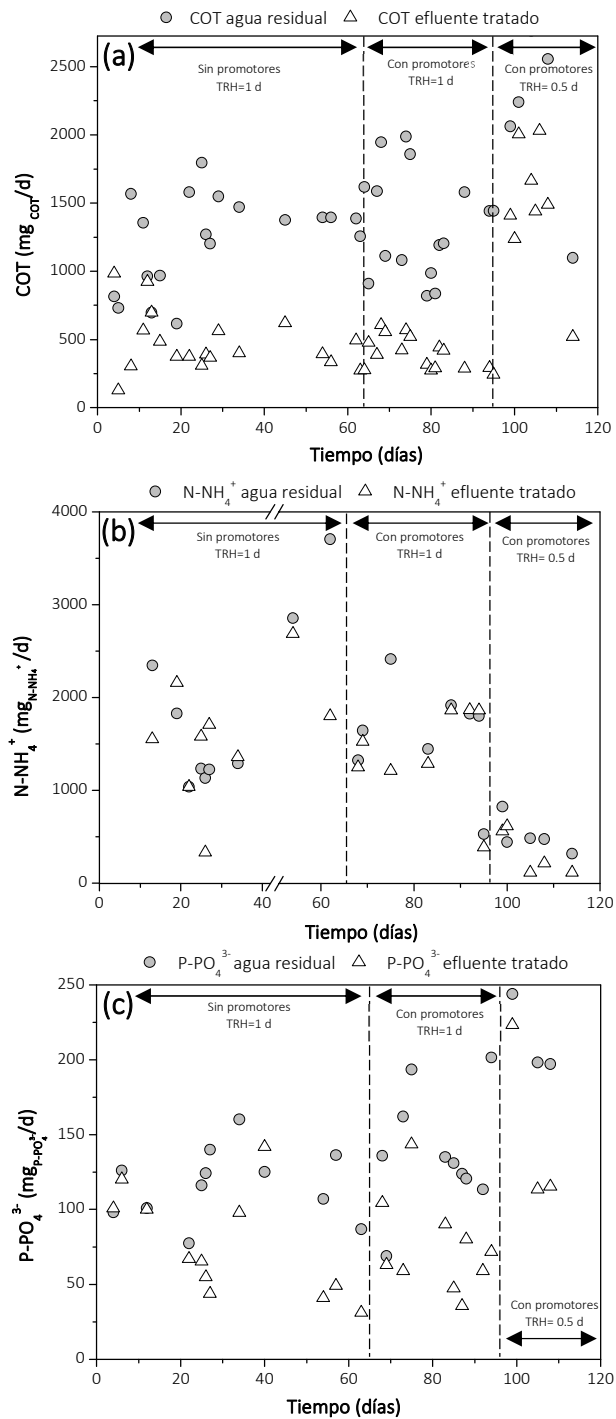


Figura 5.8. Evolución de la carga de (a) COT, (b) N-NH₄⁺ y (c) P-PO₄³⁻ durante el tratamiento en continuo del agua residual urbana URJC

Los perfiles obtenidos para los tres parámetros macroscópicos analizados durante el tratamiento mostraron una cierta variabilidad en las cargas de entrada al biorreactor durante los 115 días de experimentación debidas a las propias fluctuaciones que sufre el efluente de la depuradora del Campus de Móstoles (URJC) a lo largo de muestreo. El agua residual mostró una importante disminución de la carga de nitrógeno en forma de amonio, de 1500 a 500 mg/d, durante los últimos 20 días de tratamiento. Esta disminución puede atribuirse a una menor cantidad de urea en la composición inicial del agua, debido a la época del año en que se realizó la experimentación. El periodo de mayor concentración se corresponde con los meses de marzo, abril y mayo cuando la población universitaria se encuentra a tiempo completo en el Campus, mientras que la última etapa se desarrolló durante el mes de junio, coincidiendo con el período de exámenes y vacacional donde la población universitaria no se encuentra en su totalidad en el Campus, y el uso de los sanitarios se ve reducido.

A continuación, se muestran los resultados de eliminación de COT, N-NH_4^+ y P-PO_4^{3-} , así como de los compuestos farmacéuticos detectados para cada una de las etapas y se analiza la influencia de añadir los promotores de biooxidación avanzada y del tiempo de residencia hidráulico en la eficacia del tratamiento del agua residual procedente de la URJC.

A. Influencia de los promotores de biooxidación avanzada en la actividad del *Trametes versicolor*

Como ha quedado reflejado en la introducción de la presente memoria de investigación, los hongos ligninolíticos de podredumbre blanca como el *Trametes versicolor* poseen diversas rutas para la eliminación de moléculas orgánicas complejas. Estas rutas incluyen tanto procesos enzimáticos como no enzimáticos, entre los que se encuentran la bioadsorción, biodegradación enzimática extracelular e intracelular y la biooxidación avanzada. Todas estas rutas son complementarias (Olicón-Hernández y col., 2017) y conviven con la co-bioasimilación de moléculas orgánicas fácilmente biodegradables presentes en el agua residual, que los microorganismos adsorben a través de su fina pared celular como fuente de energía para mantener su actividad metabólica y para su crecimiento celular.

La ruta de biodegradación enzimática es aquella mediante la cual los contaminantes se transforman en moléculas más simples gracias a la acción directa de enzimas intra y extracelulares (citocromo P450, peroxidasas y oxido-reductasas) que oxidan directamente compuestos orgánicos complejos. Mientras que el proceso de biooxidación avanzada es aquel por el cual estos hongos son capaces de generar

radicales hidroxilo que oxidan estos contaminantes. Para desencadenar este proceso es necesario la presencia de sustratos quinónicos o derivados en el medio, así como de sales de Fe^{3+} y Mn^{2+} . Éstos desencadenan procesos Fenton mediante reacciones radicalarias conducidas por los ciclos de oxidación/reducción del sustrato quinónico.

Actualmente, existen muchos trabajos que basan la eliminación de fármacos y el tratamiento de las aguas residuales en las rutas de bio-asimilación y biodegradación enzimática, mostrando aún limitaciones en la eliminación de los compuestos más bio-refractarios (Mir-Tutusaus y col., 2016, 2017 y 2018 a y b; Palli y col., 2017 y 2016; Lucas y col., 2016; Vasiliadou y col. 2016; Ferrando-Climent y col., 2014 y 2015; Zhang y col. 2012; Jelic y col., 2012; Marco-Urrea et al., 2009 y 2010 a). En este trabajo para poder aumentar la eliminación los microcontaminantes farmacéuticos se va a promover el proceso de biooxidación avanzada para producir radicales hidroxilo.

Para evaluar la contribución del mecanismo de bio-asimilación y biodegradación enzimática a la eficacia global del proceso propuesto, se contrastaron los resultados obtenidos durante las dos primeras etapas del tratamiento del agua residual procedente de la URJC. Cabe recordar que, durante los 65 primeros días, se realizó el tratamiento del agua residual sin añadir las fuentes promotoras del proceso de biooxidación avanzada que aumenten la generación de radicales hidroxilo. Así, durante esta primera etapa, únicamente se consideró el tratamiento del agua mediante la propia actividad biológica del hongo *Trametes versicolor*. En segundo lugar, se realizó el tratamiento del mismo agua residual (del día 65 al 96), pero añadiendo al agua, ácido gálico y las sales de hierro y manganeso que promueven el proceso de biooxidación avanzada. Ambos tratamientos, se llevaron a cabo en el sistema de CBRs operando bajo las mismas condiciones descritas anteriormente (12 rpm, 40 % sumergencia de los discos y TRH de 1 día).

En la Figura 5.9, se muestra una comparativa de las tasas de reducción alcanzadas para los tres parámetros macroscópicos estudiados durante ambos tratamientos. Como se puede observar, se obtuvieron significativas tasas de reducción de COT y P-PO_4^{3-} (70 ± 8 y 37 ± 29 %, respectivamente) en el tratamiento únicamente con *Trametes versicolor*. Por el contrario, la reducción de nitrógeno en forma de amonio fue prácticamente nula en el tratamiento con el hongo. Por otro lado, en el tratamiento donde se añadieron los precursores del proceso de biooxidación avanzada se obtuvieron tasas de eliminación similares de COT (71 ± 6 %) y ligeramente superiores para el N-NH_4^+ y P-PO_4^{3-} (7 ± 7 y 54 ± 15 %, respectivamente), aunque estas variaciones no fueron significativas.

La capacidad de este tipo de hongo para reducir el COT ya ha sido demostrada en bibliografía (Palli y col., 2017). Sin embargo, la alta eliminación obtenida en este trabajo es muy destacable dada las bajas relaciones de carbono a nitrógeno en el medio (entre 0,6 y 1,2) muy inferiores al rango teóricamente óptimo reportado en bibliografía, entre 7 y 10 (Mir-Tutusaus y col., 2018). Asimismo, las tasas de reducción de carga orgánica son muy similares a las obtenidas en el tratamiento secundario de la depuradora a escala planta piloto de la URJC, conformado por tres biodiscos en serie con microorganismos bacterianos. Durante el mismo tiempo que se recogió agua de la salida del primario para la realización de este trabajo, la depuradora obtuvo eliminaciones del 57 % en términos de DQO total, similares al 46 % obtenido por el proceso de biooxidación avanzada propuesto. De este modo, se puede concluir que la biomasa fúngica soportada sobre el sistema de CBRs ha mostrado una eficacia comparable a la de un CBRs bacteriano en términos de reducción de DQO.

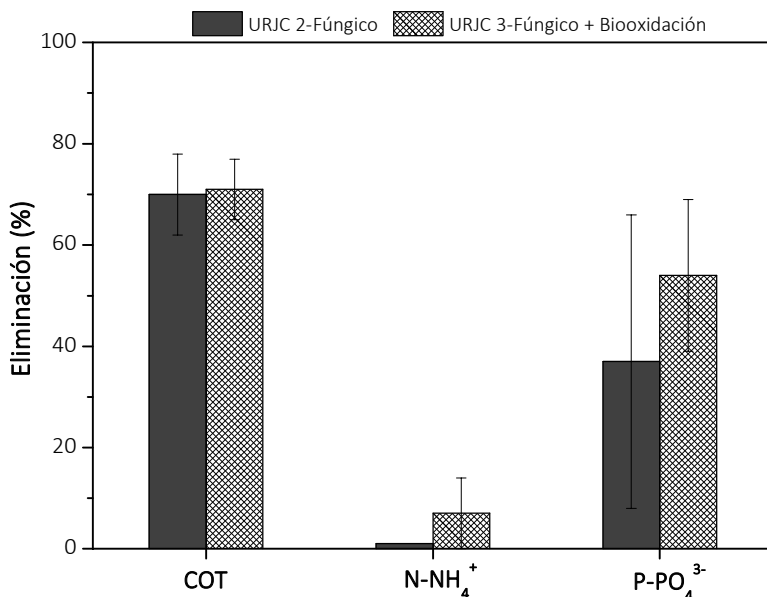


Figura 5.9. Tasas de reducción obtenidas de los tratamientos con y sin promotores de biooxidación avanzada para el agua residual urbana de la depuradora piloto de la URJC

Por el contrario, la baja eliminación de nitrógeno en forma de amonio puede deberse al bajo consumo de nitrógeno por parte de este tipo de hongos, el cual es muy inferior al consumo de COT (Mir-Tutusaus y col., 2018; Cruz-Morató y col., 2013). Además, esta eliminación tan moderada también puede deberse al proceso de

amonificación producido por este tipo de hongos ligninolíticos (Geisseler y col., 2010). En este proceso se libera amonio al medio como resultado de la degradación de los compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular disueltos en el mismo (Romillac, 2019), pudiendo ser el caso de la urea, la cual está presente en el agua residual en una elevada proporción.

Cuando el contenido de carbono en el medio es bajo, los hongos empiezan a degradar los compuestos orgánicos nitrogenados presentes en el medio como fuente de carbono. En este caso, el *Trametes versicolor* tiene una capacidad de asimilación del nitrógeno amoniacal muy baja con respecto a sus altos requerimientos de carbono. De este modo, este tipo de hongos comienzan a degradar compuestos orgánicos nitrogenados cuando la relación C:N del medio es inferior a 30:1 (Hodge y col., 2000). En este caso, la baja relación C:N del agua residual puede justificar la amonificación de la urea para obtener una fuente de carbono asimilable con la consecuente liberación de amonio y reduciendo así la tasa de eliminación de $N-NH_4^+$.

Por último, el pH de entrada al biorreactor se mantuvo cercano a valores de 4,5; favoreciendo así la actividad fúngica frente a la bacteriana. Sin embargo, el pH en el efluente final del tratamiento ascendió hasta un valor de 6, posiblemente debido a la liberación de amonio mencionada anteriormente. La concentración de oxígeno disuelto en el interior de la cuba del sistema de CBRs también se monitorizó de forma continua durante el tratamiento, oscilando en valores entre 3 y 5 mg/L durante toda la operación

La eficacia del tratamiento del agua residual urbana procedente de la URJC en ambas etapas también se evaluó en función de las eliminaciones obtenidas para los compuestos farmacéuticos detectados en el agua residual. En la Figura 5.10, se muestran las tasas de eliminación alcanzadas de forma individual para cada compuesto detectado, clasificadas en cuatro grupos en función de las eficiencias de eliminación promedio obtenidas tras el tratamiento con *Trametes versicolor*: baja reducción (< 0-40 %), reducción moderada (40-60 %), reducción significativa (60-80 %) y alta reducción (80-100 %).

Como se puede observar, en el tratamiento con el hongo sin promotores de biooxidación avanzada se obtuvieron tasas de eliminación bajas con valores inferiores al 40 % para siete de los nueve fármacos detectados. Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de determinados grupos funcionales en la estructura molecular del fármaco, el carácter hidrofóbico/hidrófilo o la especiación química son propiedades que pueden afectar significativamente a su eliminación (Yang y col., 2013 b). Así, los fármacos que contienen grupos dadores de electrones (aminas ($-NH_2$), alcoholes ($-OH$), grupos alcoxi ($-OR$) o acilos ($-COR$) y alquiles ($-R$)) son más

susceptibles de ser biológicamente degradados por el catabolismo oxidativo fúngico. Por el contrario, los fármacos que contienen grupos aceptores de electrones son menos susceptible de ser biooxidados. Así, la presencia de grupos aceptores de electrones como el grupo amida o el grupo yodo en IHX, prevalece sobre la de los grupos dadores de electrones impidiendo su oxidación biológica.

Por otro lado, la hidrofobicidad juega un papel crítico en la bioadsorción de los microcontaminantes sobre el hongo, pudiendo mejorar su eliminación de la fase acuosa. Así, fármacos con carácter hidrofóbico, como el GFZ ($\log K_{OW} > 3$), son fácilmente eliminados por el hongo (Grandclément y col., 2017). Por el contrario, aquellos que tienen carácter hidrófilo dependen también de otros factores como sus grupos funcionales y su especiación química. Este último depende principalmente de la relación entre el pK_a del compuesto farmacéutico y el pH del medio. Así, si el $pK_a < pH$, el compuesto está parcialmente ionizado, se disuelve más fácilmente en el agua y hace más difícil su eliminación (Vasiliadou y col., 2013). De este modo, compuestos farmacéuticos como el 4-AAA, AMX, MDZ y SMX, los cuales presentan un carácter más hidrófilo ($\log K_{OW} < 3$) y se encuentran en su forma ionizada en el medio ($pK_a < pH$; $pK_{a4-AAA}=1,56$, $pK_{aAMX}=2,8$, $pK_{aMDZ}=2,4$, $pK_{aSMX}=5,6$), mostraron eliminaciones inferiores al 40 %. Sin embargo, otros como HCT, el cual también muestra un carácter más hidrófilo ($\log K_{OW} < 3$), pero que se encuentra en el medio en su forma molecular ($pK_a < pH$; $pK_{aHCT}=7$), mostró una baja eliminación debido a la alta presencia de grupos aceptores de electrones (sulfonamidas y grupos cloro) en su estructura molecular, lo que dificulta su oxidación biológica.

El comportamiento recalcitrante de compuestos como IHX, AMX y 4-AAA, los cuales obtuvieron eliminaciones negativas, ya ha sido observado anteriormente en otros trabajos para otros compuestos (Collado y col., 2014), atribuyéndolo a diferentes factores: i) la conversión de los metabolitos conjugados de esos compuestos que están en el agua a su forma original, ii) la posible liberación del fármaco bioadsorbido en la biomasa, iii) variaciones en la concentración debido al muestro cuando se trabaja con altos TRH y iv) las limitaciones de las técnicas analíticas para medir la bajas concentración de dichos compuestos en las aguas residuales (Spina y col., 2019; Zorita y col., 2009).

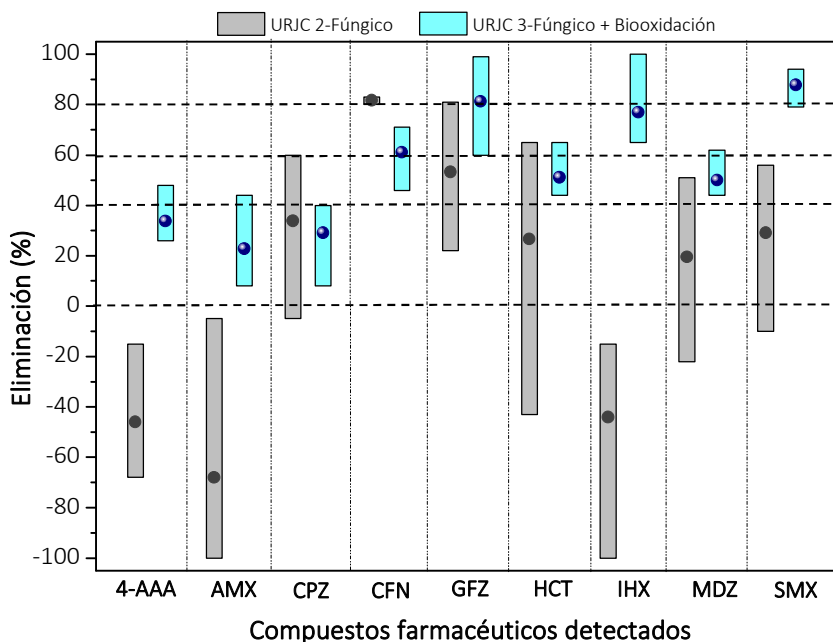


Figura 5.10. Eliminación de los compuestos farmacéuticos detectados durante el tratamiento con y sin promotores de biooxidación avanzada del agua residual urbana de la depuradora piloto de la URJC (puntos: valor medio)

En el tratamiento con promotores de biooxidación avanzada se observó un importante incremento en la eliminación de siete de los nueve microcontaminantes farmacéuticos detectados. Así, 4-AAA, AMX, IHX, los cuales no se eliminaron durante el tratamiento con hongos, alcanzaron tasas de eliminación del 34, 23 y 77 % con el tratamiento de biooxidación avanzada. Otros como el GFZ, HCT y MDZ aumentaron su reducción hasta un 81, 51 y 50 %; mientras que el SMX consiguió un incremento del 60 % con una tasa final de eliminación del 88 %.

En la Figura 5.11, se presenta de forma gráfica la mejora del proceso de biooxidación avanzada teniendo en cuenta los cuatro rangos de eliminación establecidos anteriormente. Como se puede observar, durante el tratamiento sin añadir los promotores del proceso de biooxidación, siete de los nueve fármacos detectados en el agua residual obtuvieron bajas tasas de eliminación, inferiores al 40%. Por el contrario, estos resultados mejoraron notablemente con la adición de los promotores de biooxidación avanzada, obteniendo tasas de eliminación superiores al 40 % para 6 de los nueve fármacos, con dos de ellos entre el 60 – 80 y otros dos por encima del 80 %.

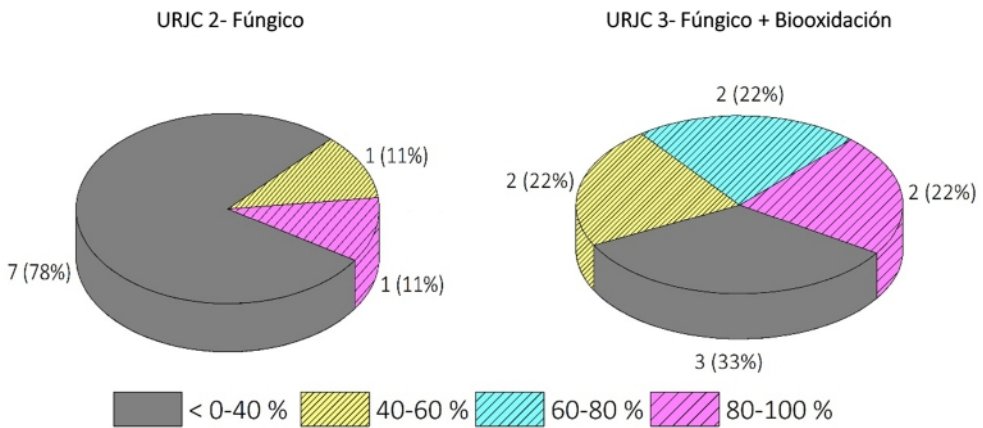


Figura 5.11. Rangos de eliminación de compuestos farmacéuticos en el tratamiento sin y con promotores de biooxidación avanzada del agua residual urbana de la depuradora de la URJC

Cabe resaltar que las tasas de eliminación alcanzadas por la mayoría de los fármacos detectados fueron prácticamente iguales a las obtenidas en el tratamiento del agua residual procedente de la URJC cuando se dopó con una carga adicional de 50 $\mu\text{g/L}$ de compuestos farmacéuticos (capítulo de resultados 5.1.2). Incluso en algunos casos, como GFZ, su eliminación aumentó en un 40 %, o SMX que mejoró ligeramente desde un 73 hasta un 88 %. A pesar de que el agua residual tratada tuvo la misma procedencia, ésta sufrió cambios en su composición inicial que pudieron afectar al rendimiento del sistema. La importante disminución de COT en la carga inicial de entrada alimentada al biorreactor (de 414 a 115 mg/L) hace que no se favorezca el crecimiento y actividad del hongo, disminuyendo consecuentemente la producción de enzimas involucradas en el proceso de producción de los radicales hidroxilos. Por otro lado, la concentración inicial de los compuestos farmacéuticos fue considerablemente menor que cuando se realizó el tratamiento de esta agua dopada con una concentración de 50 $\mu\text{g/L}$ para cada fármaco. En este caso, el fármaco que fue detectado en mayor concentración fue la CFN con un valor de 21 $\mu\text{g/L}$; seguida por el 4-AAA, AMX, SMX, HCT y GFZ (4,2; 3,5; 0,9; 0,9 y 0,3 $\mu\text{g/L}$, respectivamente).

Las tasas de eliminación alcanzadas han mostrado también una mejora respecto a otros estudios realizados con *Trametes versicolor* en bibliografía para el tratamiento de aguas residuales urbanas con concentraciones de fármacos similares, pero sin la utilización de precursores del proceso de biooxidación avanzada. De este modo, ni CZP ni MDZ se eliminaron en el tratamiento de un agua residual previamente esterilizada procedente de una depuradora a escala planta piloto en Castell-Platja d'Aro (Cataluña, España), con una concentración inicial de CZP de 0,5 $\mu\text{g/L}$ y 0,2 $\mu\text{g/L}$ de MDZ, utilizando este hongo ligninolítico en un biorreactor fluidizado con pulsos de

aire tras 7 días de incubación (Badia-Fabregat y col., 2015). En este mismo trabajo HCT se eliminó en un 46 %, de manera similar que durante este tratamiento con un 50 % para una concentración inicial de 0,6 µg/L. Este mismo grupo de investigación, posteriormente continuó su trabajo de investigación con el mismo agua residual en el biorreactor fluidizado con pulsos de aire, pero trabajando en continuo con un HRT de 2 días (Badia-Fabregat et al., 2017). Igual que en nuestro trabajo con la unidad de contactores biológicos rotativos, obtuvieron altas eliminaciones para el SMX y GFZ (88 y 99 %) operando con concentraciones iniciales de 23 y 1 ng/L, respectivamente. Sin embargo, CPZ e HCT fueron eliminados en una mayor extensión por los CBRs con un TRH de 1 día (30 y 50 %), respecto a los resultados obtenidos en el biorreactor fluidizado con 2 días de TRH que mostraron eliminaciones del 2 y 9 % para unas concentraciones iniciales de 0,8 y 1 µg/L, respectivamente.

Las eficiencias de eliminación de fármacos alcanzadas en los CBRs mostraron también una mejora en comparación con las tasas de reducción obtenidas para algunos de los compuestos detectados en los tratamientos secundarios de fangos activos de las estaciones depuradoras. Los cambios más notables se han visto reflejados en GFZ y CZP con un 81 y 30 % de eliminación durante el tratamiento con *T. versicolor*, mientras que con el resto de los procesos biológicos en muchos casos se obtuvieron tasas negativas (Thiebault y col., 2017; Martín y col., 2012, Tabla 2.13 de la introducción). Por otro lado, SMX también mostró una importante mejora con un 88 % conseguido en este trabajo, frente al 52 % obtenido como valor máximo en un tratamiento de fangos activos (Verlicchi y col., 2013 a). El IHX categorizado como un agente de contraste con una alta concentración en las aguas residuales urbanas de algunos estudios (Han-Tran y col., 2017), obtuvo una significativa eliminación del 77 % frente al variable rango de eliminación alcanzado en un sistema de fangos activos convencional (7-70 %). Finalmente, HCT se mantuvo en el mismo valor (Rosal y col., 2010 a), mientras que MDZ mejoró ligeramente desde un 39 % conseguido en un sistema biológico multietapa (zona anaerobia, anóxica y óxica) hasta un 50 % que obtuvo con el tratamiento con *Trametes versicolor* (Verlicchi y col., 2013 a; Deblonde y col., 2011).

Todos estos resultados permiten concluir que la adición de un mediador quinónico y las sales de hierro y manganeso como promotores del proceso de biooxidación avanzada para la formación de radicales hidroxilo aumentan la eficacia del tratamiento de agua residual, en particular la eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos, consiguiendo eliminar fármacos como 4-AAA, AMX e IHX que no se eliminan en el tratamiento sin los promotores. Estos resultados ponen de manifiesto que estos compuestos no biodegradables pueden eliminarse en gran medida por el mecanismo oxidativo de los radicales hidroxilo.

B. Influencia de la disminución del tiempo de residencia hidráulico

El tratamiento del agua residual procedente de la URJC también se llevó a cabo en el sistema de contactores biológicos rotativos con un tiempo de retención hidráulico de 12 horas. Como ya se ha indicado en la introducción de esta Tesis Doctoral los procesos biológicos con hongos requieren de TRH relativamente elevados para mantener valores elevados de eliminación de los microcontaminantes emergentes en diferentes tipos de matrices de aguas residuales. Hasta el momento, los TRH estudiados en bibliografía utilizando *Trametes versicolor* en tratamientos continuos son superiores a los utilizados para sistemas de fangos activos, y oscilan en un rango de entre 1,65 y 3,3 días (Badia-Fabregat y col., 2016; Palli y col., 2017, 2016; Mir-Tutusaus y col., 2018a, 2018b, 2017).

En este trabajo de investigación, se propuso operar en el biorreactor con un TRH máximo de 1 día, con la finalidad de evaluar la viabilidad del proceso a un TRH cercano al de un sistema biológico convencional en una depuradora urbana de cara a una futura implantación a mayor escala. Además, con vistas a evaluar la flexibilidad del sistema, se redujo aún más el TRH, realizando una última etapa del tratamiento aumentando el caudal de entrada hasta conseguir un TRH de 12 horas, siendo entre 12 horas y 1 día un rango realista de los TRH utilizados en sistemas de fangos activos convencionales. Durante ambas etapas se añadieron los sustratos promotores del proceso de biooxidación avanzada (ácido gálico y las sales de hierro y manganeso) y se mantuvieron el resto de las condiciones de operación en el sistema, con una sumergencia de los biodiscos del 40 % y una velocidad de giro de 12 rpm.

En la Figura 5.12, se muestran las tasas de reducción medias alcanzadas de COT, $N-NH_4^+$ y $P-PO_4^{3-}$ durante el tratamiento del agua residual urbana procedente de la URJC con ambos TRH. Como se puede observar, las tasas de eliminación variaron al reducir el TRH de 1 día a 12 horas para los tres parámetros estudiados. Esta variación del TRH afectó notablemente a la reducción de COT bajando del 71 al 44 % al reducir el TRH. La tasa de eliminación del fósforo en forma de fosfatos también disminuyó ligeramente al cambiar el TRH, desde un 54 % hasta a un 44 %. Por el contrario, el nitrógeno amoniacal experimentó un ligero aumento de la tasa de eliminación con la disminución del TRH a 12 horas. Este hecho se atribuye a una menor liberación de $N-NH_4^+$ en el proceso de amonificación debido al poco tiempo de reacción en el sistema CBRs con 12 horas de TRH (Ryzhakov y col., 2010).

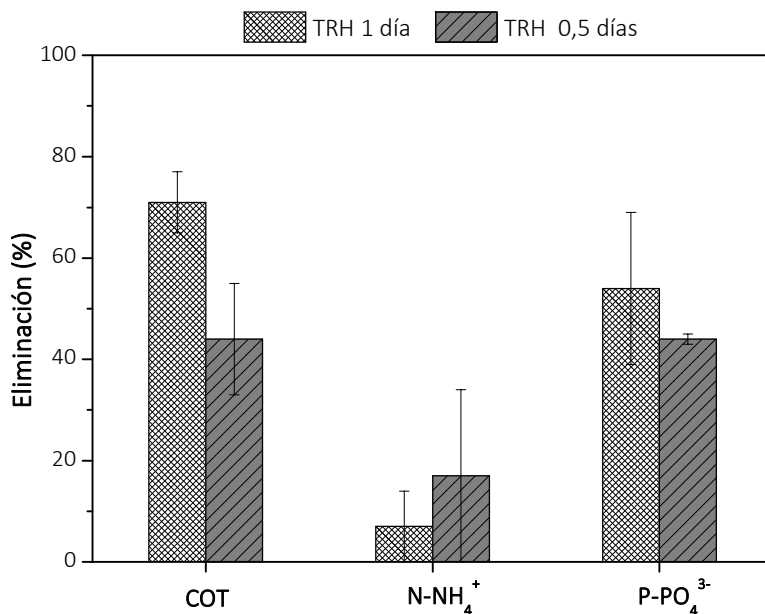


Figura 5.12. Tasas de reducción obtenidas en el tratamiento del agua residual urbana de la depuradora piloto de la URJC con dos TRH

El efecto del TRH es también notable en las tasas de eliminación alcanzadas de los microcontaminantes farmacéuticos. Como se observa en la Figura 5.13, donde se representan las tasas obtenidas por los compuestos de manera individual, la eliminación de fármacos como 4-AAA, CPZ y sobre todo CFN y SMX, se redujo drásticamente al operar con un TRH de 12 horas, mostrando incluso valores negativos debido a los factores mencionados anteriormente en el tratamiento del agua residual sin promotores de biooxidación avanzada. El resto de los fármacos sufrieron también reducciones en sus tasas de eliminación, pero de una manera más moderada. GFZ e IHX bajaron de 82 al 68 % y del 77 al 60 % respectivamente, mientras que HCT y MDZ pasaron aproximadamente de un 50 % a un 26 y 22 %, respectivamente.

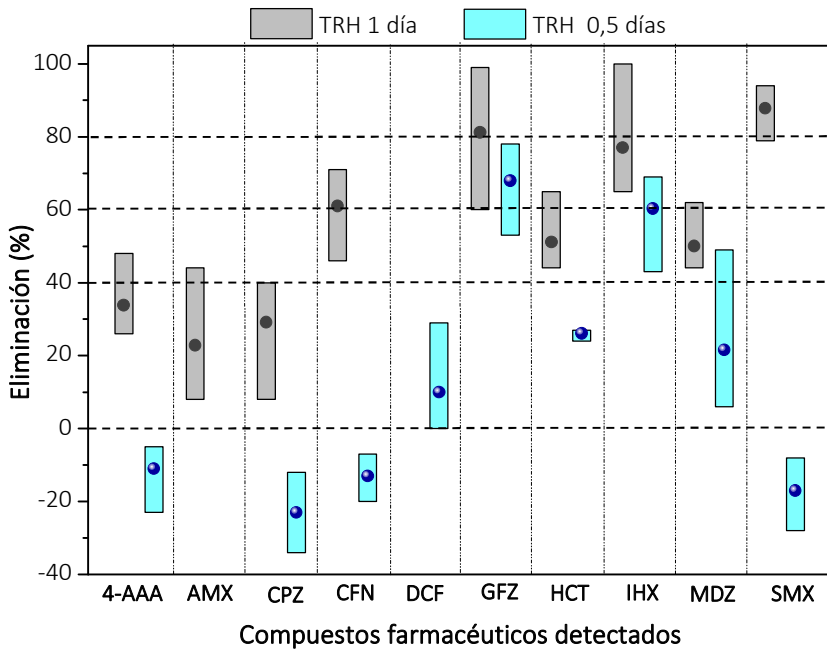


Figura 5.13. Eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos detectados en el tratamiento del agua residual urbana de la depuradora piloto de la URJC con dos TRH (puntos: valor medio)

Considerando la clasificación establecida en cuanto a los rangos de eliminación para los microcontaminantes farmacéuticos (Figura 5.14), siete de los nueve fármacos detectados en este agua residual mostraron una baja eliminación (< 0-40 %) con el TRH de 12 horas, a diferencia de los únicamente tres que se obtuvieron para el TRH superior de 1 día.

Estos resultados indican que un TRH de 12 horas reduce significativamente las tasas de eliminación para los microcontaminantes farmacéuticos, mientras que un TRH de 1 ha permitido conseguir reducciones de los microcontaminantes estudiados con valores entre el 50 y 90 % para seis de los nueve fármacos detectados, siendo hasta el momento el tiempo más bajo utilizado para este tipo de tratamiento. Este hecho, junto con el buen desarrollo del sistema de CBRs, muestra un claro avance respecto a las limitaciones habituales para tratamientos biológicos fúngicos, abriendo la posibilidad de aplicar este tipo de procesos para tratamientos a gran escala.

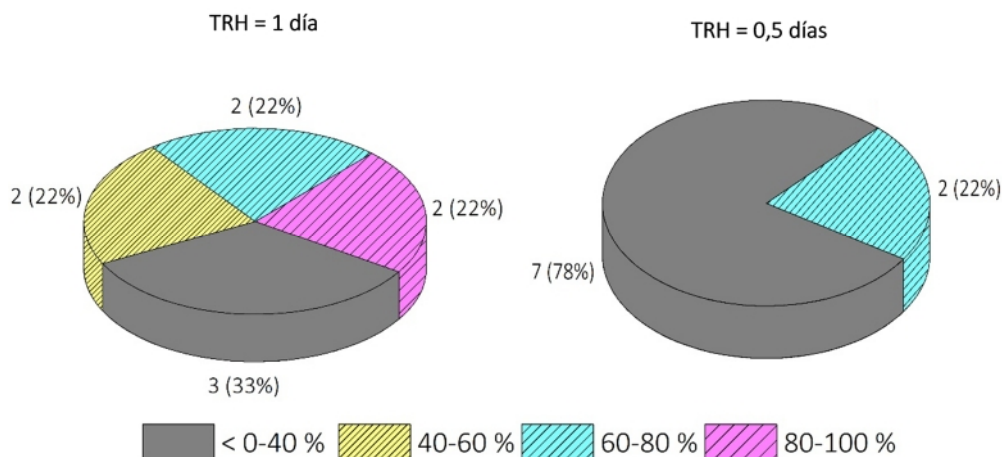


Figura 5.14. Rangos de eliminación de compuestos farmacéuticos en el tratamiento del agua residual urbana procedente de la depuradora piloto de la URJC con dos TRH

El tratamiento biológico en continuo del agua residual urbana procedente de la depuradora de la URJC mediante un proceso de biooxidación avanzada con *T. versicolor* en el sistema de CBRs operando con un TRH de 1 día mostró un buen rendimiento en términos de reducción de COT y $P-PO_4^{3-}$, obteniendo eliminaciones del 71 y 54 % respectivamente. Por otro lado, durante este tratamiento la reducción de $N-NH_4^+$ obtenida fue inferior al 10 % debido al desarrollo de un proceso de amonificación en el sistema que produce la liberación de este nutriente al agua. La eliminación de los nueve microcontaminantes farmacéuticos osciló entre el 23 y el 88 %, obteniendo destacadas tasas de eliminación para CZP (30 %) y GFZ (81 %) superiores a las obtenidas en los tratamientos convencionales de fangos activos. El compuesto que ha conseguido la mayor tasa de eliminación fue SMX (88 %). El sistema de CBRs se mantuvo activo durante los 115 días de operación alcanzando reducciones estables del COT, $N-NH_4^+$ y $P-PO_4^{3-}$ en las condiciones estudiadas y sin cargas adicionales de sustratos adicionales fácilmente biodegradables para su mantenimiento. Finalmente, la disminución del TRH de la unidad de CBRs de 1 día a 12 horas reduce significativamente la eficacia del tratamiento para la eliminación de los compuestos farmacéuticos estudiados, así como del COT y $P-PO_4^{3-}$ del agua residual.

C. Caracterización de la actividad microbiológica de la biomasa durante el proceso de biooxidación avanzada

La utilización de aguas no estériles puede generar el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos no inoculados inicialmente en el biorreactor, provocando la competencia entre el hongo *Trametes versicolor* y otros microorganismos bacterianos por la asimilación de las fuentes de sustrato presentes en el agua residual. Así, una limitación de las fuentes de nutrientes disponibles en el medio, podría hacer que éstas sean insuficientes para el hongo y puedan llegar a producir su muerte celular (Badia-Fabregat y col., 2016). Además, la aparición de estos microorganismos podría hacer que la actividad obtenida durante el tratamiento esté relacionada con una población mixta y no solamente con el hongo ligninolítico inoculado.

Badia-Fabregat (Badia-Fabregat y col., 2017, 2016) realizaron una caracterización microbiológica de la población microbiana existente en la biomasa utilizada durante el tratamiento de un agua residual veterinaria no estéril con *T. versicolor* mediante técnicas de microbiología molecular como la extracción de ADN, análisis de ácidos grasos fosfolípidos (*Phospholipid fatty acid analysis-PLFA*), electroforesis en gel de gradiente desnaturante (*Denaturing gradient gel electrophoresis-DGGE*) y PCR cuantitativa (*Quantitative PCR- qPCR*). En este trabajo demostraron la coexistencia de varios tipos de microorganismos durante el tratamiento del agua residual veterinaria. Sin embargo, no evaluaron la contribución realizada por cada tipo en el tratamiento del agua residual.

En el presente trabajo de investigación, se ha evaluado la contribución a la actividad total del sistema de otros microorganismos autógenos de las aguas residuales urbanas reales que puedan proliferar en el biorreactor. Para ello, se realizaron bio-ensayos en discontinuo donde se analizó la actividad de cada tipo de microorganismo según su capacidad de eliminación de acetato de sodio como sustrato fácilmente biodegradable. Los bio-ensayos se llevaron a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 4.5.3.1. Como se muestra en las Figuras 4.11 y 4.12 del procedimiento experimental, se monitorizó la eliminación de este sustrato en términos de carbono orgánico total (COT) tras añadir inhibidores selectivos de bacterias (determinación de la actividad fúngica) y de hongos (determinación de la actividad bacteriana). Además, se realizaron bio-ensayos con inhibición total de la biomasa por adición simultánea de bactericidas y fungicida (control) y bio-ensayos sin inhibición de la biomasa que permitieron evaluar la actividad de toda la población microbiana en las condiciones del bio-ensayo (actividad total). Cabe destacar que durante la realización de estos bio-ensayos, no se añaden los sustratos promotores

del proceso de biooxidación avanzada para así evitar la formación de radicales hidroxilo que puedan enmascarar la actividad biológica real de los microorganismos.

El inóculo de biomasa caracterizado se recogió tras la completa realización del tratamiento del agua residual URJC. Cabe destacar que los bio-ensayos se realizaron a dos valores de pH diferentes debido a la evolución que sufre este parámetro durante el tratamiento. De este modo, un pH de 4,5 representa la corriente de entrada al biorreactor y un pH aproximadamente neutro representa el valor del efluente tras el tratamiento.

En la Figura 5.15 se muestran los resultados obtenidos para la evolución del COT (a) y de la concentración de sólidos volátiles (b) a tiempo inicial y final de los bioensayos realizados durante 4 días de experimentación a un pH de 4,5. Como se observa en la gráfica 5.15 (a), la disminución del sustrato biodegradable en términos de COT por parte de las bacterias (ensayo de actividad bacteriana con fungicida) fue prácticamente nula coincidiendo con el perfil del experimento control. Por el contrario, los hongos (ensayo de actividad fúngica con bactericidas) obtuvieron una eliminación de COT de casi un 80 %. Estos resultados, permiten afirmar que, a un pH de 4,5, el cual favorece el metabolismo fúngico y ralentiza el bacteriano, los hongos presentes en la biomasa muestran una alta actividad en la eliminación de los compuestos orgánicos presentes en el medio. Por el contrario, no se observó una actividad bacteriana significativa a pH 4,5. Además, el perfil del bioensayo realizado sin fungicida ni bactericidas (actividad total) coincide con el perfil de eliminación del bioensayo con bactericidas (actividad fúngica). Este hecho, permite deducir que la actividad fúngica del *Trametes versicolor* es la principal contribución en el tratamiento biológico llevado a cabo con el agua residual en el sistema de CBRs.

Si se evalúa la variación de la concentración de sólidos volátiles como medida del crecimiento fúngico o bacteriano alcanzado (Figura 5.15.b), se puede observar un elevado crecimiento de la biomasa fúngica cuando éstos no se encuentran inhibidos, ya que son los microorganismos responsables del consumo de nutrientes añadidos al medio. Por el contrario, el crecimiento bacteriano es despreciable coincidiendo con la baja eliminación de COT del bio-ensayo con el fungicida (actividad bacteriana).

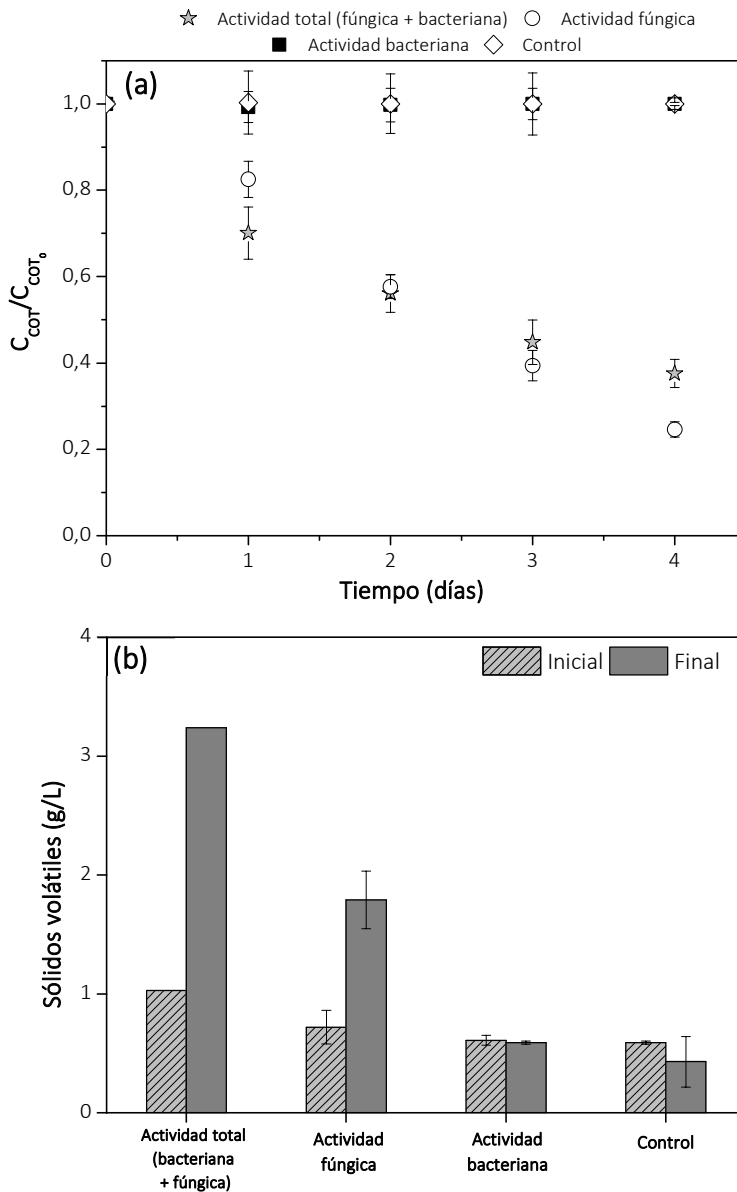


Figura 5.15. Caracterización de la actividad microbiológica a pH 4,5 de la biomasa tras del tratamiento del agua residual urbana URJC: evolución del (a) COT y (b) sólidos volátiles

Estos mismos bioensayos se realizaron a un valor de pH 7. En la Figura 5.16, se muestran los perfiles obtenidos en términos de reducción de COT (a) y sólidos volátiles a tiempo inicial y final (b). Como se puede observar en la Figura 5.16 (a), en este caso trabajando con pH neutro, la actividad bacteriana resulta más significativa

con una reducción del 15 % de COT. Este bajo porcentaje se consiguió trabajando a un valor de pH que favorece su actividad, podría estar relacionada con la alta carga de nitrógeno amoniacal presente en el agua, la cual inhibe el crecimiento bacteriano (Rousk y Bååth, 2007). En relación con la actividad fúngica, se observa una reducción del 40 % aproximadamente a tiempo final, significativamente menor que la alcanzada a pH 4,5.

Sin embargo, cabe destacar una mayor eliminación de COT del bioensayo con bactericidas (actividad fúngica) que el realizado sin ningún tipo de inhibidor (actividad total). Esta menor actividad del bioensayo sin inhibidores podría estar relacionada con la presencia de bacterias procedentes del agua residual como las *Enterobacterias sp.* y *Burkholderia sp.*, las cuales pueden llegar a inhibir el comportamiento del hongo y ralentizar su actividad (Badia-Fabregat y col., 2017). Como se puede observar en la Figura 5.16, esta disminución de la actividad se ve reflejada también en el crecimiento mostrado por el inóculo introducido en términos de concentración de sólidos volátiles, el cual es menor en comparación con los obtenidos para los bio-ensayos con inhibición fúngica (actividad bacteriana) o bacteriana (actividad fúngica). Finalmente, se observa que, en ambas condiciones de pH, el experimento control con inhibición total no mostró ni eliminación de COT, ni crecimiento de los sólidos volátiles, lo que demuestra el efecto inhibidor de los bactericidas y fungicida.

Como conclusión se puede afirmar que, la biomasa inmovilizada en los CBRs tras el tratamiento del agua residual de la depuradora piloto de la URJC está constituida no solo por el hongo sino también por microorganismos bacterianos. Al pH real del proceso en el sistema de CBRs, más próximo al pH neutro que al pH 4,5 de entrada del influente, la actividad microbiana no puede descartarse y es evidente, pero su contribución resulta mucho menor que la del hongo en base a los perfiles de actividad de los bioensayos realizados.

Los hongos han mostrado a ambos pH una mayor actividad que las bacterias desarrolladas como consecuencia del tratamiento del agua residual urbana de la depuradora localizada en la URJC no esterilizada. Esto demuestra que las especies fúngicas presentan una contribución muy importante a los resultados de eliminación de carbono, nitrógeno, fósforo y de los compuestos farmacéuticos obtenidos en la unidad de CBRs, a pesar de coexistir con microorganismos bacterianos que proliferan a pH cercanos a 7.

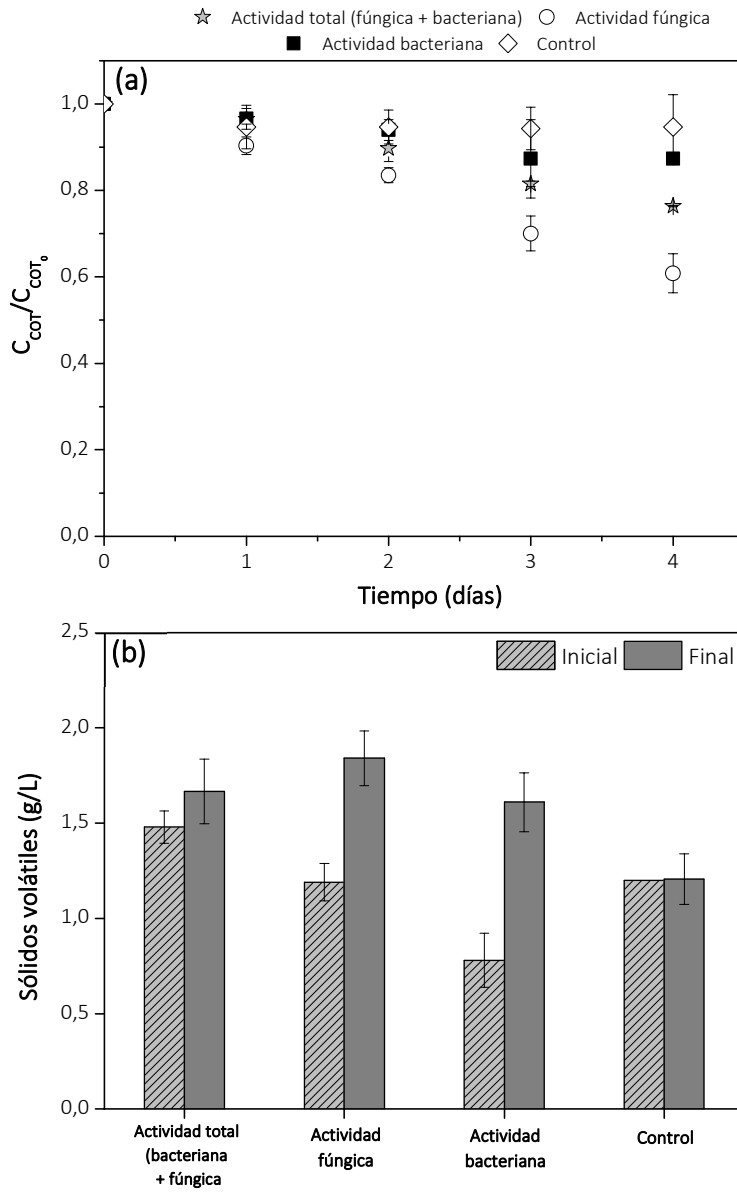


Figura 5.16. Caracterización de la actividad microbiológica a pH 7 de la biomasa del tratamiento del agua residual urbana URJC: evolución del (a) COT y (b) sólidos volátiles

5.2.2. Tratamiento del agua residual urbana de una estación depuradora de aguas residuales de Toledo

Una vez realizado el tratamiento en continuo de un agua residual real procedente de la salida de la depuradora a escala planta piloto localizada en la URJC, se procedió al tratamiento del agua residual urbana procedente de la salida del tratamiento primario de una EDAR de la provincia de Toledo. Las características de la estación depuradora y del agua residual se muestran en el procedimiento experimental dentro del apartado 4.3.1.3.

De acuerdo con los tratamientos realizados anteriormente, el sistema de CBRs operó en continuo con un TRH de 1 día (caudal de entrada igual a 10 L/día), un grado de sumergencia del 40 % y una velocidad de giro de los discos de 12 rpm. El pH del agua residual real fue ajustado a 4,5 y se le añadieron los sustratos promotores del proceso de biooxidación avanzada (ácido gálico como mediador quinónico y sales de hierro y manganeso).

A. Eficacia en la eliminación de carbono, nitrógeno y fósforo

Durante el tratamiento del agua residual urbana procedente de la EDAR de Toledo, se analizó la reducción de la carga orgánica de carbono, nitrógeno amoniacal y fósforo en forma de fosfatos. En la Figura 5.17; se representan los resultados de carga diaria (mg/d) de COT, $N-NH_4^+$ y $P-PO_4^{3-}$ tanto para el agua residual de entrada al biorreactor como del efluente obtenido durante los 22 días de operación. El tratamiento de este agua residual se utilizaron dos lotes de agua diferentes que tuvieron diferente carga de COT, $N-NH_4^+$ y $P-PO_4^{3-}$. Un primer lote entre los días 1 y 15 de experimentación (Tabla 4.3, *Toledo – 1*), donde las cargas medias alcanzadas fueron de 760, 290 y 130 mg/d para el COT, $N-NH_4^+$ y $P-PO_4^{3-}$ respectivamente. Posteriormente, una segunda etapa comprendida entre los días 15 y 22 de experimentación (Tabla 4.3, *Toledo – 2*) donde las cargas medias de entrada aumentaron para el COT y el $N-NH_4^+$ a 1160 y 410 mg/d, mientras que el $P-PO_4^{3-}$ disminuyó a 23 mg/d. Estas variaciones son habituales en las entradas de las EDARs las cuales sufren considerables fluctuaciones de carga a lo largo de su operación.

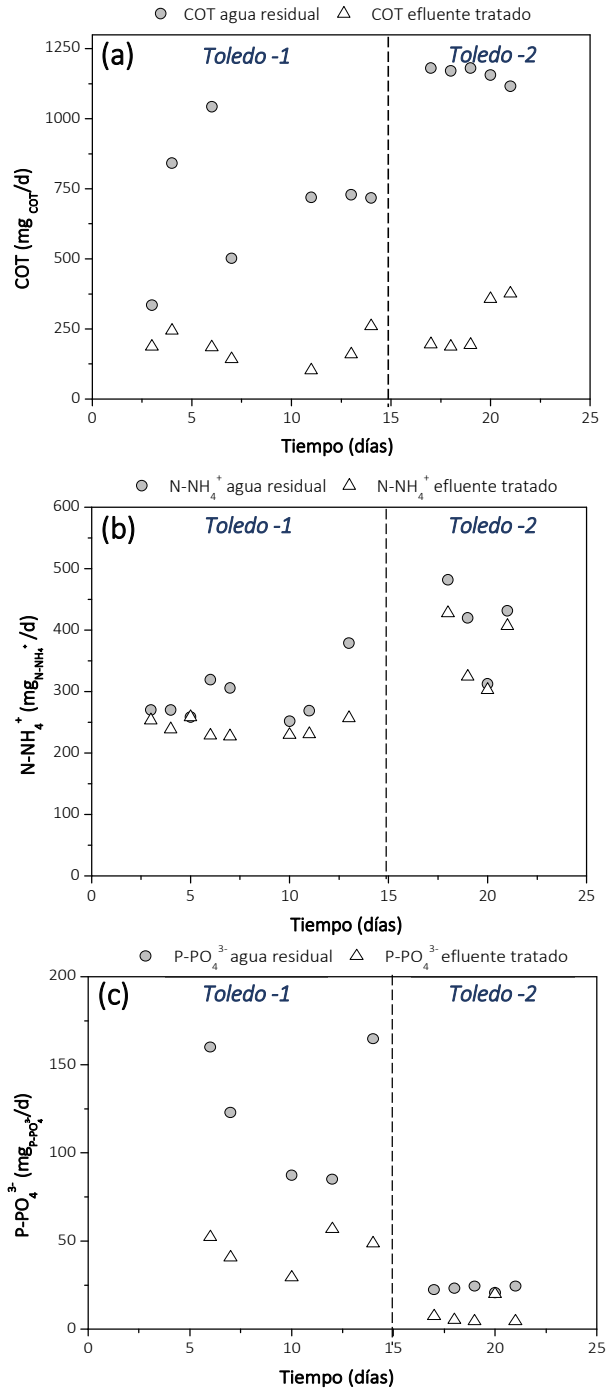


Figura 5.17. Evolución de la carga de (a) COT, (b) N-NH₄⁺ y (c) P-PO₄³⁻ durante el tratamiento en continuo del agua residual urbana de la EDAR de Toledo

Los resultados conseguidos durante el tratamiento del agua residual urbana procedente de la EDAR de Toledo reflejan un perfil del efluente de salida estable de COT, $N-NH_4^+$ y $P-PO_4^{3-}$. Así, a pesar de las diferencias en las cargas de entrada al biorreactor, los valores de salida del sistema de CBRs fueron constantes durante todo el tratamiento independientemente de la carga inicial del agua residual.

En la Tabla 5.2, se muestra la composición del agua residual alimentada al sistema de CBRs, así como la del efluente de salida del sistema junto con la relación C:N:P. Las tasas de reducción en ambas etapas se calcularon en base a un valor medio de concentración a la entrada del biorreactor.

Tabla 5.2. Caracterización del influente y del efluente obtenido del tratamiento del agua residual de la EDAR de Toledo en ambas etapas

Tratamiento agua residual de Toledo (<i>Toledo -1</i>)			
	Agua residual	Efluente	Reducción (%)
COT (mg/L)	76 ± 18	18 ± 6	76 ± 8
DQO _{TOTAL} (mg/L)	359 ± 201	271 ± 160	40 ± 23
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	29 ± 5	24 ± 1	19 ± 5
P-PO ₄ ³⁻ (mg/L)	13 ± 4	5 ± 1	64 ± 9
C:N:P	6:2:1	4:5:1	

Tratamiento agua residual de Toledo (<i>Toledo -2</i>)			
	Agua residual	Efluente	Reducción (%)
COT (mg/L)	116 ± 3	26 ± 10	77 ± 8
DQO _{TOTAL} (mg/L)	416 ± 81	169 ± 18	60 ± 4
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	41 ± 7	37 ± 6	16 ± 9
P-PO ₄ ³⁻ (mg/L)	2,3 ± 0,2	0,8 ± 0,6	64 ± 29
C:N:P	50:18:1	33:46:1	

Durante ambos intervalos de tiempo, se obtuvieron altas tasas de reducción para tres de los parámetros macroscópicos estudiados (COT, DQO_{TOTAL} y P-PO₄³⁻). Asimismo, las desviaciones estándar calculadas para estas tasas indican una reducción estable del carbono y fósforo durante todo el tratamiento. Respecto al tratamiento realizado anteriormente para el agua residual urbana de la URJC en el sistema de CBRs operando con TRH de 1 día y añadiendo los sustratos promotores del proceso de biooxidación avanzada (*URJC 3-Fúngico + Biooxidación*), las tasas de reducción aumentaron ligeramente para los tres parámetros monitorizados (COT, N-NH₄⁺ y P-PO₄³⁻).

De nuevo, el nitrógeno en forma de amonio obtuvo bajas reducciones, en este caso inferiores al 20 %. Como ya se ha explicado anteriormente, esta baja eliminación se atribuye al proceso de amonificación de este tipo de hongos ligninolíticos (Geisseler y col., 2010). Este proceso libera amonio al medio como resultado de la degradación de los compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular disueltos en el mismo (Romillac, 2019), como puede ser el caso de la urea la cual está presente en las aguas residuales en una elevada proporción.

La cantidad limitada de carbono orgánico presente en el agua residual hace que tenga una relación C:N (3:1) muy inferior a los requerimientos óptimos de carbono del *Trametes versicolor* (30:1), justificando la amonificación como proceso de obtención de carbono asimilable. Consecuentemente, durante este proceso se produce la liberación de un exceso de amonio al medio que el hongo no puede asimilar, disminuyendo la tasa de reducción de $N-NH_4^+$.

Otros parámetros monitorizados durante los 22 días de tratamiento del agua residual procedente de la EDAR de Toledo fueron el pH y el oxígeno disuelto presente en el agua del interior del biorreactor. Como se puede apreciar en la Figura 5.18, los valores de pH tanto en la corriente de entrada como de salida al biorreactor mostraron la misma tendencia que durante el tratamiento del agua residual de la depuradora piloto de la URJC. El valor de entrada se mantuvo aproximadamente en 4,5; mientras que el pH a la salida del biorreactor aumento hasta un valor promedio de 6 debido al consumo de los sustratos orgánicos presentes en el agua residual bruta. Por otro lado, la concentración de oxígeno disuelto en la cuba (valor medio de 3,7 mg/L) permitió concluir que el proceso se mantuvo bajo condiciones aerobias durante todo el tratamiento. De nuevo los resultados obtenidos, muestran que el tratamiento del agua residual procedente de la EDAR de Toledo en el sistema de CBRs se llevó a cabo bajo las condiciones de operación necesarias para realizar un correcto proceso de biooxidación avanzada con hongos ligninolíticos.

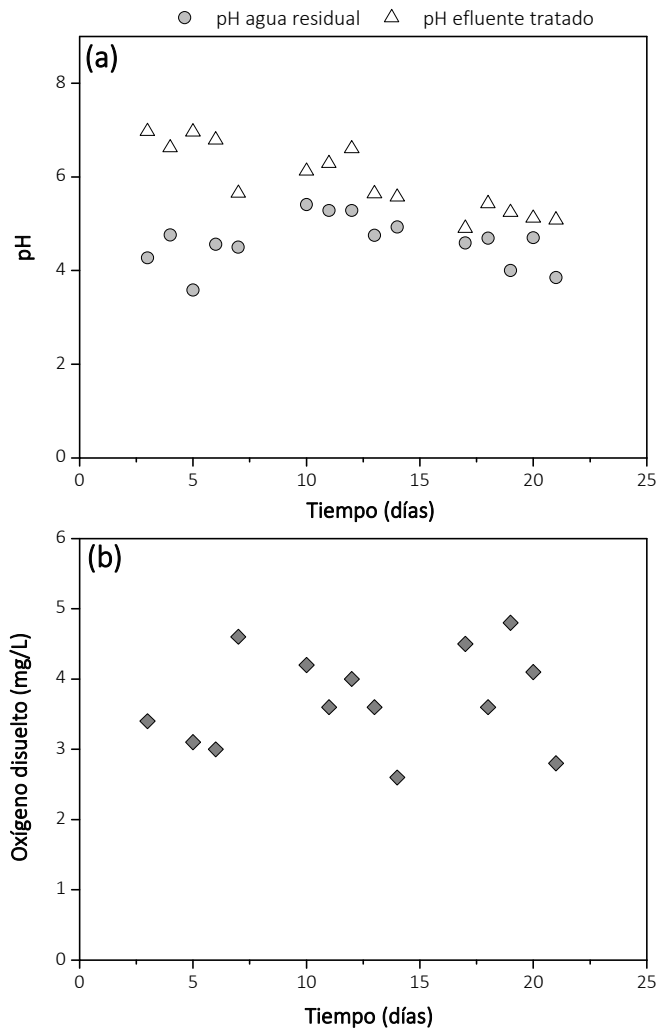


Figura 5.18. Evolución del (a) pH y (b) oxígeno disuelto durante el tratamiento en continuo del agua residual urbana de la EDAR de Toledo

B. Eficacia en la eliminación de compuestos farmacéuticos

La eficacia del tratamiento del agua residual urbana procedente de la EDAR de Toledo mediante el proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor* también se ha evaluado en función de las tasas de eliminación conseguidas para los compuestos farmacéuticos presentes en el agua bruta. En la Figura 5.19, se muestran las tasas de reducción obtenidas, calculadas considerando un valor medio de la concentración a la entrada biorreactor. En el anexo 7.4 aparecen recogidas las

concentraciones medidas en el agua residual inicial y en el efluente de salida para cada etapa.

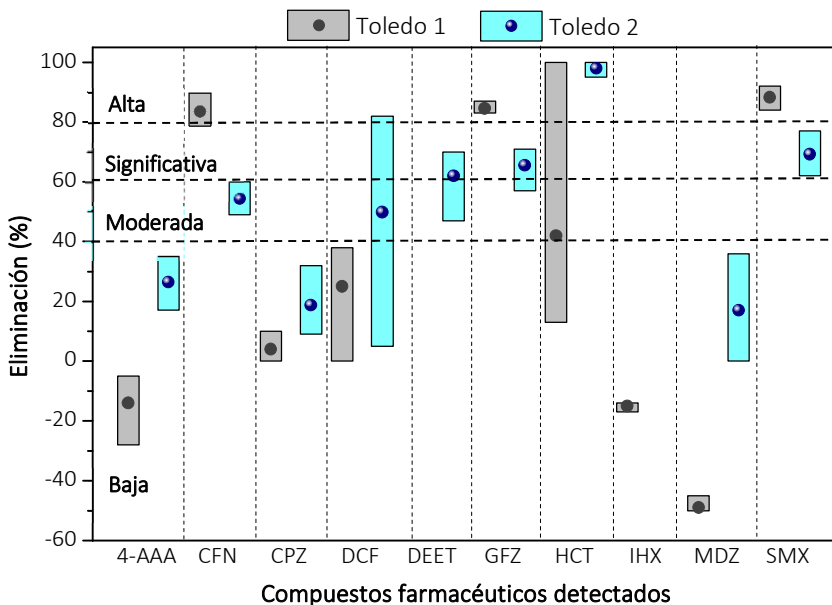


Figura 5.19. Eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos detectados en el tratamiento del agua residual de la EDAR de Toledo para los dos lotes (puntos: valor medio)

De los veintidós compuestos farmacéuticos analizados en el agua residual, diez fueron detectados (4-AAA, CFN, CPZ, DCF, DEET, GFZ, HCT, IHX, MDZ y SMX). De todos ellos, DEET únicamente se detectó durante el tratamiento del agua residual *Toledo 1*, mientras que IHX no fue detectado durante el tratamiento del lote 2 (*Toledo 2*). Además, solamente DEET (N, N-Dietil-meta-toluamida) no se estudió anteriormente durante los tratamientos de las matrices de agua fortificadas y el agua residual de la depuradora piloto de la URJC. Este compuesto generalmente se utiliza como pesticida, pero también se encuentran los repelentes de insectos para uso humano que se aplican de manera cutánea.

Como se puede observar en la Figura 5.19, las tasas de eliminación obtenidas para los microcontaminantes emergentes no mostraron grandes variaciones durante el tratamiento de los dos lotes de agua residual urbana de la EDAR de Toledo. En ambos casos, 4-AAA, CPZ y MDZ obtuvieron bajas tasas de eliminación entre -14 y 27, 4 y 19 y -49 y 17 %, respectivamente. Por otro lado, DCF, GFZ y SMX también obtuvieron eliminaciones similares para ambos lotes entre el 30 y 50 para DCF y entre

70 y 80 % para GFZ y SMX. CFN e HCT fueron los microcontaminantes donde se observaron mayores diferencias. Además, cabe remarcar las tasas de eliminación alcanzadas para GFZ, HCT y SMX durante el tratamiento del lote 2 (**Toledo 2**) con eliminaciones muy significativas de 65, 98 y 70 %, respectivamente.

Como la tendencia de reducción mostrada por todos los compuestos fue discutida para el tratamiento del agua residual de la depuradora piloto de la URJC, en este caso, únicamente se discutirán los dos nuevos fármacos detectados con el agua procedente de Toledo: DCF y DEET.

El DCF es un compuesto antiinflamatorio de carácter hidrófilo ($\log K_{ow}=0,7$) que se encuentra en el medio en su forma ionizada ($pK_a=4,14$) y generalmente suele presentar un carácter bio-refractario a los tratamientos biológicos convencionales de fangos activos debido a la presencia predominante de grupos aceptores de electrones en su estructura molecular como grupos halógenos, aminas o ácidos carboxílicos (Thiebault y col., 2017; Han-Tran, y col., 2017; Verlicchi y col., 2013 a; Rosal y col., 2010 a). En este caso, se ha obtenido una tasa de eliminación moderada del 25 al 50 % para un valor de concentración inicial de 0,4 y 0,7 $\mu\text{g/L}$. Este dato supone una mejora respecto a estudios anteriores con *T. versicolor* donde se observó incluso un incremento de la concentración (tasa de reducción del -177 %) durante el tratamiento continuo de un agua residual veterinaria donde la concentración inicial fue 0,11 $\mu\text{g/L}$. Como se ha mencionado anteriormente, este hecho podría deberse a la reversión de metabolitos conjugados a la molécula original de DCF. En ese caso, se trabajó sin añadir los sustratos promotores del proceso de biooxidación avanzada, pero se añadieron fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo fácilmente biodegradables. Además, se operó en un reactor de lecho fluidizado con pulsos de aire con un TRH de 3,3 días reponiendo la biomasa fúngica cada 2-5 días de operación (Badia-Fabregat y col., 2016).

El DEET también es un compuesto de carácter hidrófilo ($\log K_{ow}=2,18$) que en este caso se encuentra en el medio en su forma no ionizada ($pK_a=14$) y en su estructura molecular presenta grupos funcionales aceptores (amida) y dadores (metilo) de electrones. A pesar de tener un grupo funcional amida predominante en su estructura, este compuesto habitualmente alcanza altas tasas de eliminación en los tratamientos con fangos activos (88-95 %) (Han-Tran y col., 2017). Sin embargo, en trabajos anteriores donde se realizó el tratamiento con *Trametes versicolor* de un agua residual urbana dopada con 350 $\mu\text{g/L}$ en un sistema discontinuo durante 12 horas no consiguieron una significativa eliminación para este compuesto (Shreve y col., 2016). En este caso, su eliminación durante el tratamiento del agua procedente de la EDAR de Toledo con *Trametes versicolor* fue significativa consiguiendo un 62 % de reducción.

*El tratamiento en continuo del agua residual urbana procedente de la EDAR de Toledo mediante un proceso de biooxidación avanzada con *T. versicolor* en el sistema de CBRs operando con un TRH de 1 día mostró una reducción estable de COT y P-PO₄³⁻ durante los 22 días de operación, alcanzado eliminaciones del 75 y 64 %, respectivamente. Las tasas de eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos más destacables fueron las mostradas para GFZ, HCT y SMX con valores de 65, 98 y 70 %, respectivamente. Además, cabe mencionar la tasa de eliminación obtenida para el DCF (50 %), compuesto altamente refractario a los tratamientos convencionales de fangos activos.*

5.2.3. Influencia de la composición del agua residual al proceso de biooxidación avanzada

La evaluación y validación del proceso de biooxidación avanzada en un sistema de CBRs para una futura implementación a nivel industrial en una planta convencional de depuración de aguas residuales requiere de su evaluación con diferentes tipos de agua residual urbana. En este contexto, la variabilidad en la composición inicial de las aguas residuales urbanas tratadas en el sistema de CBRs con un TRH de 1 día mediante un proceso de biooxidación avanzada con *T. versicolor* ha permitido realizar este estudio sobre cómo influye en la eficacia del proceso operar con diferentes relaciones C:N y C:P. En este apartado, se van a evaluar de manera comparativa la reducción de COT, N-NH₄⁺ y P-PO₄³⁻ y los compuestos farmacéuticos detectados para los tratamientos de las aguas residuales urbanas de la depuradora piloto de la URJC y la EDAR de Toledo.

En la Tabla 5.3, se recoge una recopilación de la caracterización de las diferentes aguas residuales tratadas en el sistema de CBRs con un TRH de 1 día y añadiendo los mediadores promotores del proceso de biooxidación avanzada. Cabe recordar que todas las aguas residuales fueron recogidas tras el tratamiento primario de las instalaciones de depuración. Como se puede observar, las dos aguas residuales recogidas de la EDAR de Toledo (*Toledo-1* y *Toledo-2*) muestran una relación COT: N-NH₄⁺ similar (3:1), siendo superior al de las muestras recogidas de la depuradora de la Universidad Rey Juan Carlos (*URJC 3-Fúngico + Biooxidación*, 1:1,5). Sin embargo, las relaciones COT: P-PO₄³⁻ fueron diferentes en los dos lotes procedentes de la EDAR de Toledo (6:1 y 50:1), siendo el primero de ellos similar a la relación del agua URJC (8:1).

Tabla 5.3. Caracterización de las aguas residuales urbanas procedentes de la depuradora piloto de la URJC y de la EDAR de Toledo

	Agua residual depuradora <i>URJC 3-Fúngico + Biooxidación</i>	Agua residual EDAR de Toledo - 1	Agua residual EDAR de Toledo - 2
COT (mg/L)	115 ± 29	76 ± 18	116 ± 3
DQO _{TOTAL} (mg/L)	480 ± 44	359 ± 201	416 ± 81
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	175 ± 21	29 ± 5	41 ± 7
P-PO ₄ ³⁻ (mg/L)	14 ± 3	13 ± 4	2,3 ± 0,2
COT: N-NH ₄ ⁺	1: 1,5	3: 1	3: 1
COT: P-PO ₄ ³⁻	8:1	6:1	50:1

En la Figura 5.20, se observa como la variación de la relación COT:P-PO₄³⁻ en la composición del agua de la EDAR de Toledo no modificó la eficacia del tratamiento biológico durante la operación. Durante el tratamiento del lote 1 (*Toledo-1*) se obtuvieron eliminaciones del 76 ± 8, 19 ± 5 y 64 ± 9 para el COT, N-NH₄⁺ y P-PO₄³⁻, respectivamente, iguales a las obtenidas durante el tratamiento del lote 2 (77 ± 8 %, 16 ± 9 % y 64 ± 29 % para el COT, N-NH₄⁺ y P-PO₄³⁻, respectivamente). Estos resultados indican que un bajo contenido de fósforo en el agua residual no limita el buen desarrollo del proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor*.

En cuanto a la influencia de la relación COT:N-NH₄⁺ en el rendimiento del proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor*, el agua de la depuradora de la URJC muestra una relación de COT:N-NH₄⁺ inicial de 1:1,5; mientras que ambos lotes de la EDAR de Toledo tienen un valor de COT:N-NH₄⁺ de 3:1. Como se puede observar en la Figura 5.20, las tasas de eliminación fueron ligeramente superiores para COT, N-NH₄⁺ y P-PO₄³⁻ cuando se realizó el tratamiento con el agua residual procedente de la EDAR de Toledo donde la relación COT:N-NH₄⁺ fue de 3:1. Este hecho probablemente se debe al buen desarrollo del proceso biológico con *Trametes versicolor* cuando las relaciones COT: N-NH₄⁺ son mayores. Altas relaciones C:N en el medio imitan a las condiciones óptimas de los hongos ligninolíticos de podredumbre blanca para la degradación natural de la lignina presente en los sustrato lignocelulósico (Elgueta y col., 2016; D'Agostini y col., 2011; Rousk y col., 2007). Normalmente, está reportado en bibliografía que la relación C:N óptima para asegurar el mantenimiento y crecimiento del hongo bajo condiciones no estériles está en un rango de 7 a 10 veces más de carbono que nitrógeno (Mir-Tutusaus y col., 2018 a y b; Woo-Sik y col., 2010).

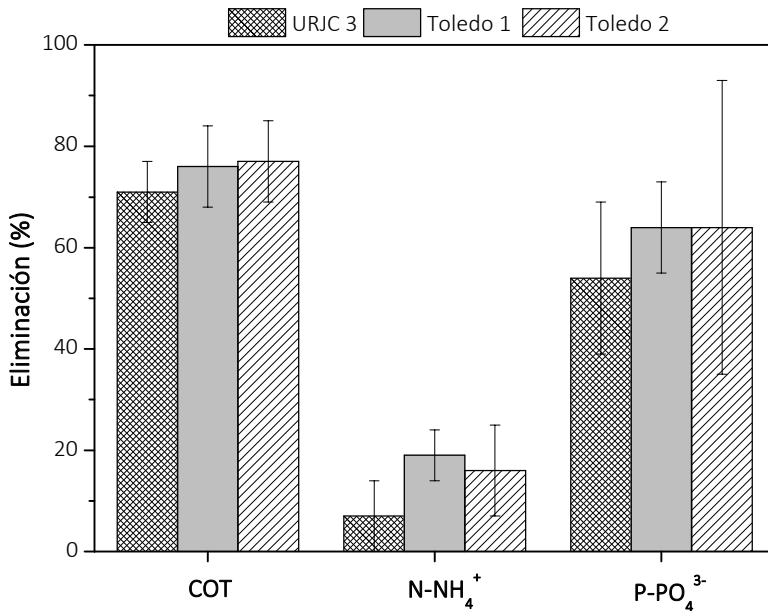


Figura 5.20. Tasas de reducción para COT, N-NH₄⁺ y P-PO₄³⁻ durante el tratamiento de las dos aguas residuales: URJC y Toledo

Por otro lado, la influencia de la relación COT: N-NH₄⁺ también se estudió en función de las tasas de reducción obtenidas para los microcontaminantes farmacéuticos (Figura 5.21). En este caso, como anteriormente las tasas obtenidas durante el tratamiento de los dos lotes del agua residual de la EDAR de Toledo no mostraron diferencias significativas (Figura 5.19), se muestran de manera comparativa los resultados obtenidos para el agua residual de la depuradora piloto URJC y el agua del lote 2 (*Toledo-2*). En referencia a los microcontaminantes farmacéuticos detectados en las aguas residuales debe recordarse que AMX e IHX solamente se detectaron durante el tratamiento del agua residual de depuradora piloto de la URJC, mientras que DCF y DEET solo se detectaron durante el tratamiento del agua de la EDAR de Toledo (*Toledo-2*). En la Tabla 7.4 del bloque de Anexos aparecen recogidas las concentraciones medidas en el agua residual inicial y en el efluente de salida para cada caso.

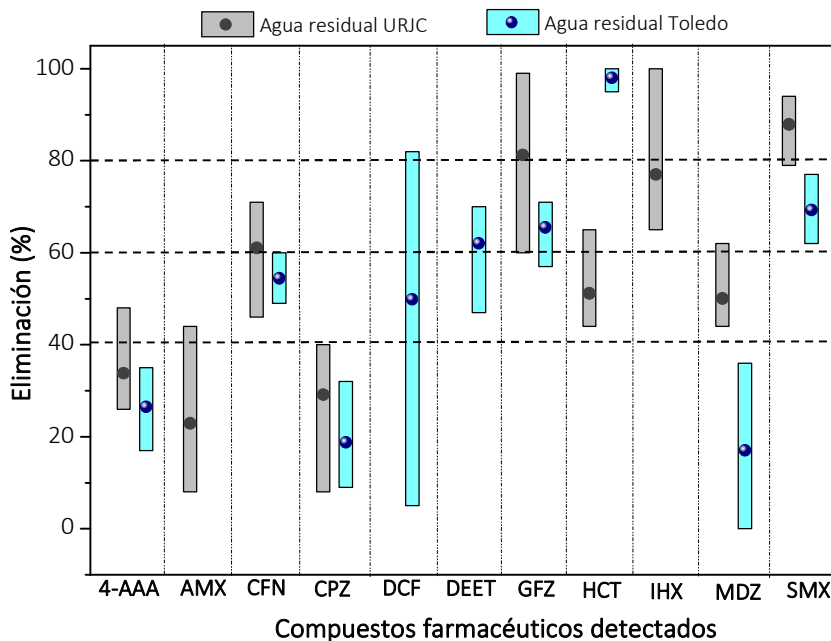


Figura 5.21. Eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos detectados en el tratamiento del agua residual urbana procedente de la depuradora de la URJC y Toledo (puntos: valor medio)

Las eliminaciones de los microcontaminantes farmacéuticos mostraron eficacias similares para el 4-AAA, CFN, CPZ y GFZ durante el tratamiento de las dos aguas residuales (URJC y Toledo). No obstante, la eliminación de los antibióticos (MDZ y SMX) fue ligeramente inferior durante el tratamiento del agua residual de Toledo. Por lo tanto, la ligera mejora en el rendimiento del proceso de biooxidación avanzada en términos de COT, N-NH_4^+ y P-PO_4^{3-} no se corresponde con una mayor eficacia en la eliminación de compuestos farmacéuticos. Sin embargo, cabe destacar que la concentración total de fármacos durante el tratamiento del agua de Toledo-2 (59 $\mu\text{g/L}$, aproximadamente) fue considerablemente superior que la concentración de estos compuestos en el agua residual de la depuradora piloto de la URJC (32 $\mu\text{g/L}$, aproximadamente). Teniendo en cuenta estos datos, la eficacia de los tratamientos para la eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos puede verse afectada por esta carga inicial.

Estos resultados indican que la relación COT:N-NH_4^+ ha sido un parámetro influyente en términos de reducción de COT, N-NH_4^+ y P-PO_4^{3-} ; afectando también al proceso de eliminación de los compuestos farmacéuticos. Así, mayores relaciones COT:N-NH_4^+ en aguas residuales no estériles aseguran el crecimiento y

mantenimiento fúngico. Sin embargo, puede promover la proliferación de bacterias las cuales compiten con el hongo por los sustratos fácilmente asimilables que hay disponibles en el agua y, consecuentemente pueden reducir la eficacia del proceso de biooxidación avanzada para la eliminación de fármacos.

Con la finalidad de evaluar el predominio del hongo frente a las comunidades bacterianas en el sistema de CBRs, se realizaron bioensayos en discontinuo donde se evaluó la actividad de cada tipo de microorganismo utilizando como inóculo la biomasa obtenida tras el tratamiento del agua residual de Toledo (*Toledo-2*). Igualmente, que, para los ensayos realizados para la biomasa final obtenida tras el tratamiento del agua residual de la depuradora piloto de la URJC, éstos se hicieron tras la adición de inhibidores selectivos de bacterias (actividad fúngica) y de hongos (actividad bacteriana). Además, se realizaron bio-ensayos con inhibición total de la biomasa por adición simultánea de bactericidas y fungicida (control) y bioensayos sin inhibición de la biomasa que permitieron evaluar la actividad de toda la población microbiana (actividad total). Los bio-ensayos se realizaron a dos valores de pH diferentes debido a la evolución que sufre este parámetro durante el tratamiento, como se ha mostrado en la Figura 5.18 (a). De este modo, un pH de 4,5 representa la corriente de entrada al biorreactor y un pH aproximadamente neutro representa el valor del efluente tras el tratamiento.

La Figura 5.22 (a) y (b) muestra una comparativa de los resultados obtenidos en los bioensayos de actividad realizados tanto para el inóculo final del agua residual procedente de la URJC (*URJC 3-Fúngico + Biooxidación*) y del agua residual de Toledo (*Toledo-2*), las cuales muestran diferentes relaciones COT:N-NH₄⁺ (1:1,5 y 3:1, respectivamente). Como se puede observar en la Figura 5.22 (a), el inóculo procedente del tratamiento del agua residual de Toledo fue más activo que el del agua residual de la URJC. En presencia de fungicida (actividad bacteriana), el inóculo del agua residual de Toledo mostró una eliminación de COT del 25 %, aproximadamente; en contraste con una nula eliminación de COT por parte del inóculo procedente del tratamiento del agua de la URJC. Además, estos resultados indican el predominio de la actividad fúngica frente a la bacteriana en ambos tratamientos.

Por otra parte, en la Figura 5.22 (b) se observa como a pH 7, el inóculo del tratamiento del agua de la URJC fue menos activo cuando no se añadieron ni el fungicida ni los bactericidas en comparación con los resultados a pH 4,5. Este hecho podría ser consecuencia de que este valor de pH es más favorable para las comunidades bacterianas y deceleran el metabolismo de las comunidades fúngicas. Además, la actividad bacteriana incrementó hasta un 37 y 15 % para los inóculos del agua residual de Toledo y de la URJC, respectivamente.

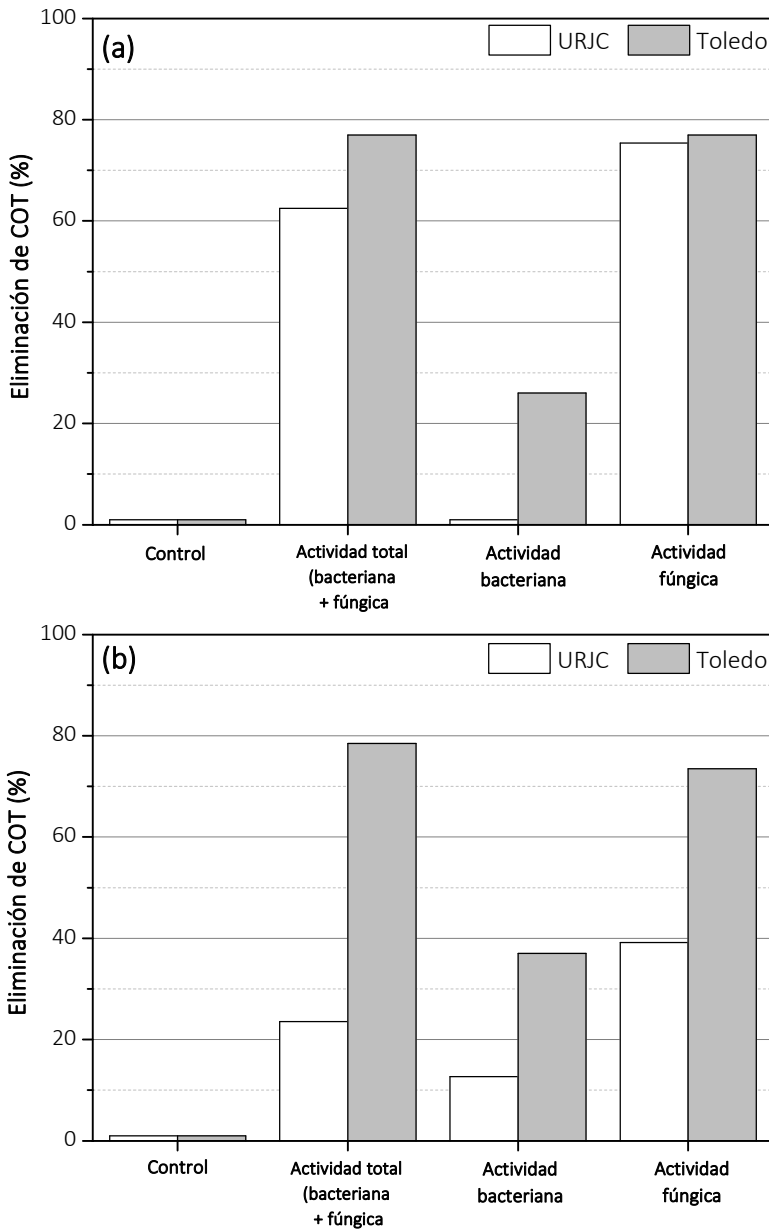


Figura 5.22. Caracterización de la actividad microbológica a (a) pH 4,5 y (b) pH 7 de la biomasa tras del tratamiento del agua residual de la depuradora piloto de la URJC y la EDAR de Toledo

Aunque la actividad fúngica sigue siendo predominante en ambos tratamientos con un 70 y 30 % de eliminación de COT, respectivamente, los resultados

evidencian que el desarrollo de comunidades bacterianas se produjo durante ambos tratamientos, siendo más importante para el caso del agua residual de la EDAR de Toledo. Además, si se comparan las eliminaciones obtenidas entre el experimento control (sin fungicidas, ni bactericidas) y el bioensayo realizado para la actividad fúngica se puede observar una ligera disminución en la actividad del inóculo del tratamiento de Toledo. Este resultado confirma que la alta proporción de bacterias en este inóculo reduce la actividad del hongo, probablemente debido a la competencia por los sustratos fácilmente biodegradables dispuestos en el agua residual. Esto a su vez se puede relacionar con que el agua residual de Toledo presenta una relación COT:N-NH₄⁺ mayor que el agua de la URJC.

En conclusión, se puede decir que la presencia de comunidades bacterianas en el sistema de CBRs contribuye al desarrollo del proceso de biooxidación avanzada. Una mayor presencia de bacterias en el sistema aumenta la competencia por el consumo de los sustratos fácilmente biodegradables haciendo que esto pueda conducir a la desestabilización de la biomasa fúngica. Consecuente, una pérdida de hongo en el sistema podría reducir la eficacia del proceso en la eliminación de los microcontaminantes emergentes. Por eso, como el sistema de CBRs ha sido menos colonizado por comunidades bacterianas durante el tratamiento del agua residual de la URJC, se obtuvieron mayores tasas de eliminación para algunos compuestos, como los antibióticos. Una mayor presencia de hongo en el sistema incrementará la producción de radicales hidroxilo mediante el proceso de biooxidación avanzada y mejorará la eliminación de los microcontaminantes más biorefractarios.

*La relación COT: P-PO₄³⁻ no es un parámetro significativo para el tratamiento del agua residual urbana con *Trametes versicolor*. Los resultados muestran que un bajo contenido de fósforo en el agua residual no limita el buen desarrollo del proceso de biooxidación avanzada. La relación COT: N-NH₄⁺ sí parece ser un parámetro significativo para el tratamiento del agua residual urbana mediante un proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor*. Una mayor relación COT: N-NH₄⁺ mejora ligeramente las tasas de eliminación de COT, N-NH₄⁺ y P-PO₄³⁻. Sin embargo, también promueve el desarrollo de comunidades bacterianas que pueden inhibir parcialmente la actividad fúngica reduciendo su eficacia en la eliminación de los contaminantes farmacéuticos.*

5.3. PROCESO DE BIOOXIDACIÓN AVANZADA EN CONTACTORES BIOLÓGICOS ROTATIVOS MODIFICADOS CON MADERA PARA EL TRATAMIENTO DESCENTRALIZADO DE AGUAS RESIDUALES HOSPITALARIAS CON ELIMINACIÓN DE MICROCONTAMINANTES FARMACÉUTICOS

Los hospitales o entornos hospitalarios son posiblemente las instalaciones de servicios públicos que más aguas residuales generan, estimándose que aproximadamente el 80 % del agua que requieren en un día (500 - 1.100 L/cama/día) se transforma y vierte al colector principal (Ergueta Acebey, 2016). A pesar de esta situación, actualmente los hospitales no están sujetos a ninguna ley de vertido en particular, limitándose a diluir sus efluentes con el resto de las corrientes que llegan a las estaciones depuradoras (EDARs). Aunque su contribución es pequeña respecto al volumen total de agua tratada diariamente en las EDARs, su composición presenta una concentración de compuestos químicos y agentes microbianos patógenos muy superior a la de las aguas residuales de carácter doméstico (Rodríguez-Mozaz y col., 2015). Dentro de los principales grupos de agentes químicos contaminantes se encuentran los compuestos farmacéuticos.

El agua es un componente fundamental para el desarrollo de los centros hospitalarios. Así, aunque se han instaurado diferentes planes de ahorro y de gestión de este recurso, su crítica composición y su uso va a continuar siendo siempre superior al realizado en los hogares. Dentro de este contexto, numerosos estudios ya recogen la necesidad de realizar un pre o co-tratamiento de estas aguas en origen, antes de juntarlas con los vertidos domésticos en los colectores municipales (Rodríguez-Narvaez y col., 2017; Verlicchi y col., 2012; Pauwels y Verstraete, 2006).

En este tercer capítulo del presente trabajo de investigación se aborda el tratamiento continuo del agua residual de un hospital situado en la Comunidad de Madrid mediante un proceso de biooxidación avanzada con *Trametes versicolor*. En este caso, el tratamiento del agua hospitalaria se ha llevado a cabo de manera paralela en dos sistemas de CBRs modificados donde los discos de polipropileno se recubrieron con planchas de madera de pino con un espesor de 0,5 cm. Esta modificación se introduce con el objetivo de incorporar un sustrato lignocelulósico que promueva el crecimiento del hongo y su fijación a los discos (Shin y col., 2002). De esta forma, puede actuar como fuente selectiva de nutrientes previniendo la proliferación y crecimiento en el reactor de bacterias autóctonas de las aguas residuales (Torán y col., 2017). El tratamiento del agua residual hospitalaria se realizó en ambas unidades simultáneamente con la finalidad de evaluar la reproducibilidad del proceso de biooxidación avanzada en el sistema de CBRs y así validarlo como tratamiento biológico descentralizado alternativo para este tipo de aguas.

Con el fin de evaluar la viabilidad del proceso, este capítulo se ha dividido en tres secciones:

1. Puesta en marcha de los sistemas de contactores biológicos rotativos modificados con el recubrimiento de madera de los discos.
2. Evaluación y validación del proceso de biooxidación avanzada para el tratamiento del agua residual hospitalaria en los CBRs modificados.
3. Evolución de las comunidades fúngicas y bacterianas desarrollados en la biomasa durante el tratamiento del agua residual hospitalaria en los CBRs.

5.3.1. Puesta en marcha de los contactores biológicos rotativos modificados

La puesta en marcha de las dos unidades de CBRs se dividió en tres fases diferentes. Inicialmente, un primer pretratamiento de los biodiscos recubiertos con madera, una fase posterior de inmovilización y crecimiento del hongo inoculado y finalmente una fase de aclimatación a las características del agua residual hospitalaria que se va a tratar en continuo. En la Tabla 4.6 del procedimiento experimental se describe la metodología llevada a cabo para conseguir el recubrimiento de los mismos.

En primer lugar, se fijaron los discos de madera en el biorreactor y estos fueron sumergidos al 60 % en agua (15 L) con una velocidad de giro de 7,5 rpm durante 24 horas para eliminar las posibles impurezas presentes en el material. Posteriormente, se comenzó la fase de inmovilización y crecimiento. Para ello, se

eliminó el agua y se añadió al biorreactor 15 L de agua ultrapura con 100 mL de biomasa triturada de *T. versicolor*, preparada según el procedimiento descrito en el apartado 4.2. Tras 30 días, una vez que la biomasa comenzó a adherirse a los discos de madera, se remplazaron los 15 L de agua ultrapura por el mismo volumen de una disolución de 6,5 g/L de extracto de Malta (equivalente a 3 g/L de COT) a pH 4,5. Durante los 40 días que duró esta fase de crecimiento de la puesta en marcha, se operó en discontinuo manteniendo un grado de sumergencia de los discos del 60 ± 10 % y una velocidad de giro de los discos de 7,5 rpm. Durante esta etapa, se monitorizó la concentración de carbono orgánico total consumida por el hongo. Así, cuando la concentración de extracto de malta se redujo por debajo de 1,5 g/L de COT, un litro del medio del interior de la unidad de contactores biológicos rotativos se remplazó por 1 L de una disolución de extracto de Malta con la concentración adecuada para recuperar la concentración inicial alimentada (equivalente a 3 g/L de COT).

Tras la fase de inmovilización y crecimiento, cuando se alcanzó una biopelícula fúngica estable y homogénea sobre los discos de madera, se pasó a la fase de aclimatación de la biomasa al agua residual real procedente de un hospital. Por ello, la fase de aclimatación se dividió en cuatro etapas (Tabla 4.6) en las cuales se modificó de manera progresiva la matriz del agua y la concentración de carbono y nitrógeno para alcanzar condiciones semejantes a las características del agua residual hospitalaria. Las condiciones de la fase de inmovilización y crecimiento fueron seleccionadas de acuerdo con trabajos realizados previamente en los cuales se determinaron las condiciones de operación óptimas para incentivar la producción de exopolisacáridos (EPS) extracelulares por parte del *T. versicolor*. Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores, los EPS son los responsables de la capacidad de este tipo de hongos para inmovilizarse sobre determinadas superficies rugosas (Rau y col., 2009).

En la primera etapa de la fase de aclimatación, se incorporaron al reactor 5 L de la matriz de agua hospitalaria y 5 L de una disolución de extracto de Malta con una concentración de 1 g/L durante un tiempo de 4 días. Posteriormente, la disolución de extracto de Malta se remplazó por 5 L de un agua residual sintética cuya composición fue: 0,6 g/L de sacarosa, 37 mg/L de tartrato de amonio, 100 mL/L de macronutrientes y 10 mL/L de micronutrientes. En tercer lugar, se sustituyó completamente el medio sintético por 10 L de agua residual hospitalaria enriquecida con los sustratos adicionales de carbono y nitrógeno mencionados previamente. Finalmente, se redujo la concentración de los sustratos adicionales de carbono y nitrógeno que enriquecieron el agua a 0,12 g/L de sacarosa y 7 mg/L de tartrato de amonio, y a partir de este momento se empezó a operar en los CBRs en continuo con un TRH de 1 día.

Tras 80 días de puesta en marcha (pretratamiento, 30 días de inmovilización, 40 días de crecimiento y 10 días de aclimatación), se consiguió la inmovilización del *Trametes versicolor* sobre los biodiscos de madera en ambos sistemas de CBRs, como muestra en las imágenes recogidas en la Figura 5.23.



Figura 5.23. Evolución de la biomasa durante la puesta en marcha de los CBRs modificado: pretratamiento (A) 0 días; fase de inmovilización y crecimiento (B) 31 días y (C) 57 días; fase de aclimatación (D) 71 días y (E) 80 días

Cabe destacar que la inmovilización de la biomasa sobre la madera generó una biopelícula de mayor espesor y estabilidad que la obtenida para la unidad de CBRs con discos de polipropileno (Figura 5.1). El recubrimiento de la superficie del disco con madera permitió tener en el sistema un sustrato que promueve la fijación del hongo. Además, utilizar este material lignocelulósico como superficie de inmovilización, el cual tiene una rugosidad y porosidad mayor que el polipropileno, no solo estimuló el crecimiento del hongo obteniendo una biopelícula de mayor espesor, sino que también mejoró su fijación a los discos evitando su desprendimiento.

El perfil del consumo de COT durante la puesta en marcha de las dos unidades de CBRs se muestra en la Figura 5.24. Como se puede observar, igual que para el sistema de CBRs convencional, existió un mayor consumo de carbono orgánico durante la fase de crecimiento respecto a la fase de aclimatación de la biomasa. Además, el consumo de COT en ambas etapas para los dos sistemas de biodiscos modificados con planchas de madera fue inferior que el obtenido para el sistema convencional (Figura 5.2), a pesar de alimentar la misma concentración inicial de extracto de Malta. Este hecho podría estar relacionado con el recubrimiento de madera de los biorreactores modificados, la cual se utiliza como sustrato complementario, produciendo un menor consumo del carbono disuelto en el agua para su crecimiento.

Relacionando las Figuras 5.23 y 5.24, se puede observar cómo los primeros días de consumo de COT (Figura 5.24) se corresponden con el período transcurrido entre las fotografías B y C, donde se observa un crecimiento del hongo soportado sobre los discos. La tendencia marcada por el COT y el grado de recubrimiento de los discos permitió concluir que durante estos primeros días de crecimiento se produjo la creación de nuevas hifas de *T. versicolor*. Cuando éstas comenzaron a desarrollarse, el consumo de COT aumentó debido a la generación de una biomasa de mayor densidad. Así, entre la fotografía C y D (del día 57 al 71), se puede apreciar un completo recubrimiento de los discos. Las fotografías D y E muestran gran similitud en la cantidad de hongo inmovilizado coincidiendo con la fase de aclimatación, donde el consumo de COT se reduce considerablemente. Como ya se ha mencionado anteriormente, durante los últimos días de la puesta en marcha, se alimenta el agua residual hospitalaria por lo que se redujo notablemente la carga orgánica (0,07-0,09 g_{COT}/L). Este hecho hace que el consumo de carbono disuelto tras alcanzar el recubrimiento completo de los discos sea menor en esos días, debido a la menor carga de sustratos introducidos al sistema de CBRs.

Tras 80 días de puesta en marcha se ha conseguido la inmovilización del hongo *Trametes versicolor* sobre los discos de madera de las dos unidades de CBRs modificadas, logrando un recubrimiento homogéneo de toda su superficie.

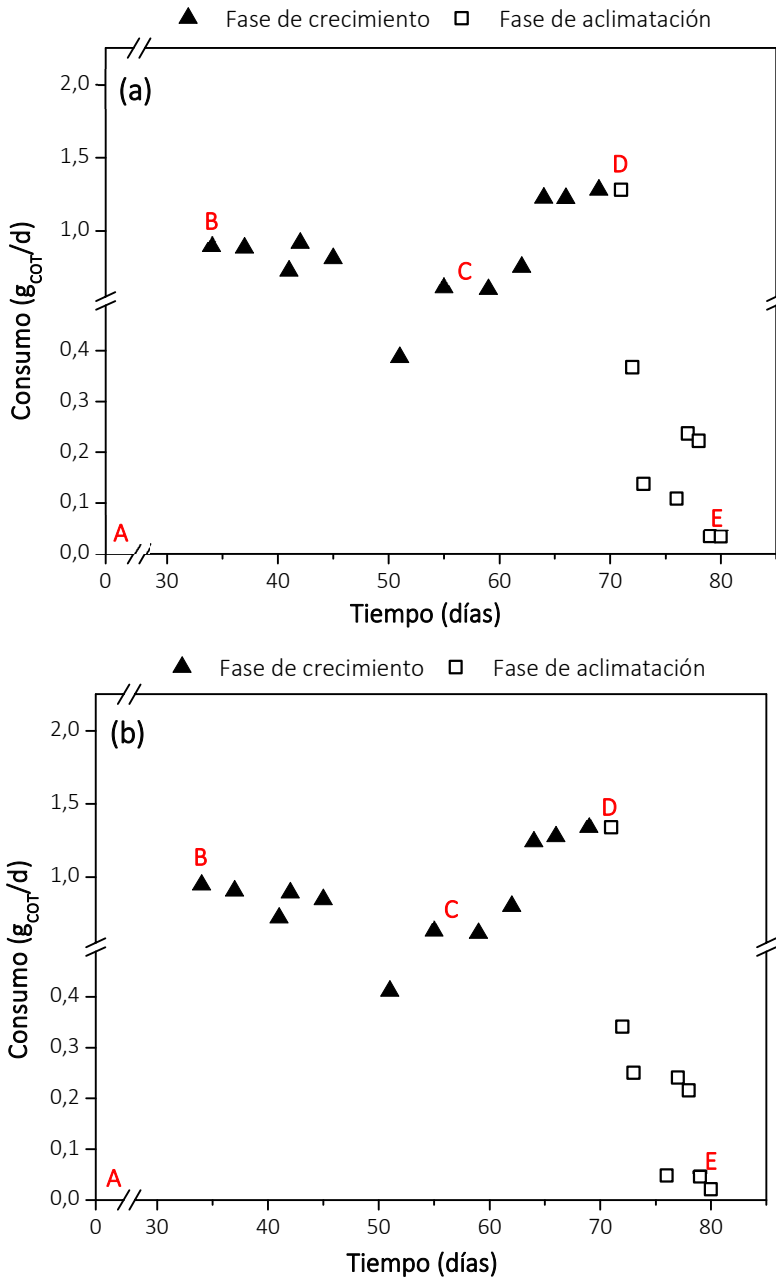


Figura 5.24. Consumo de COT durante la puesta en marcha de las unidades de CBRs modificados: (a) biorreactor 1 (b) biorreactor 2

5.3.2. Tratamiento del agua residual hospitalaria en CBRs modificados con madera

El tratamiento en continuo del agua residual procedente de la salida del colector principal de un hospital de la Comunidad de Madrid se realizó en dos unidades de CBRs donde sus discos estuvieron recubiertos con planchas de madera de pino. Como ya se ha explicado anteriormente, ambas unidades operaron en paralelo con la finalidad de estudiar la reproducibilidad del proceso de biooxidación avanzada y así validarlo como tratamiento biológico descentralizado alternativo a los convencionales presentes en las depuradoras.

Las características del muestreo del agua hospitalaria se muestran en el procedimiento experimental dentro del apartado 4.3.2.3. De acuerdo con los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, ambas unidades de CBRs operaron en continuo con un TRH de 1 día manteniendo el caudal de entrada al biorreactor constante en 10 L/día. Además, se estableció una sumergencia y una velocidad de giro de los discos del 40 % y de 12 rpm, respectivamente. El pH del agua residual de entrada a los bio-reactores fue ajustado a 4,5 y se añadió un mediador quinónico (ácido gálico) y sales de hierro y manganeso como promotores del proceso de biooxidación avanzada (85 mg/L de ácido gálico, 145 mg/L de oxalato de hierro (III) hexahidratado y 20 mg/L de nitrato de manganeso (II) tetrahidratado). De nuevo, la eficacia del tratamiento del agua residual hospitalaria se evaluó considerando la reducción de la carga de carbono orgánico total, el nitrógeno (Kjedahl y amoniacal), el fósforo en forma de fosfatos y los microcontaminantes farmacéuticos detectados.

A. Eficacia en la eliminación de carbono, nitrógeno y fósforo

La reducción de carbono orgánico total, nitrógeno Kjeldahl y amoniacal y fósforo en forma de fosfatos se monitorizó durante los 75 días de tratamiento del agua residual hospitalaria. En la Figura 5.25 se representan, para las dos unidades de CBRs que operaron en paralelo, los resultados de carga diaria (mg/d) de COT, N-NH₄⁺, P-PO₄³⁻ y nitrógeno total Kjeldahl (NTK) tanto del agua residual de entrada al biorreactor como del efluente obtenido.

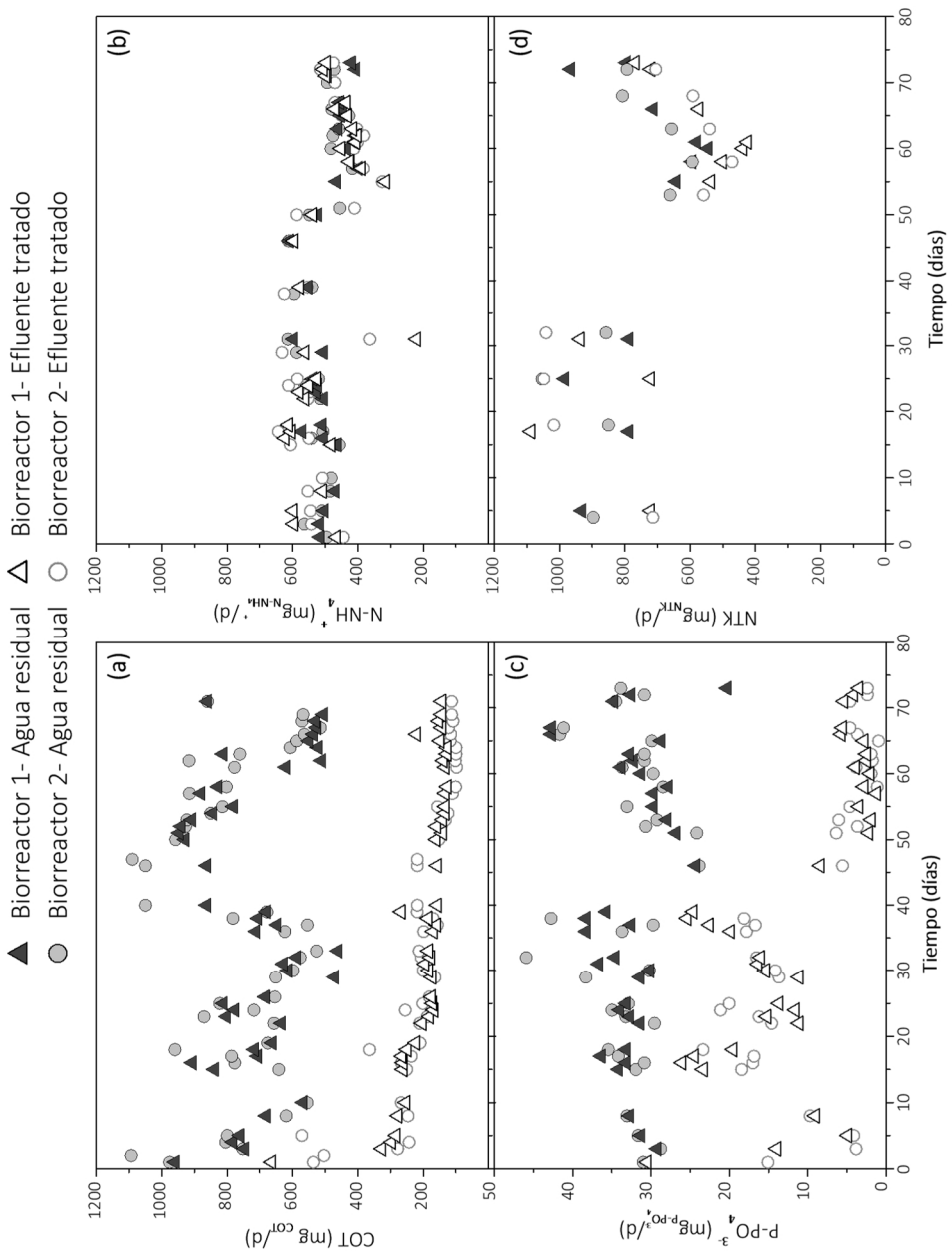


Figura 5.25. Evolución de la carga de (a) COT, (b) N-NH₄⁺, (c) P-PO₄³⁻ y (d) NTK durante el tratamiento del agua residual hospitalaria en dos biorreactores de CBRs modificados

Los perfiles de estos parámetros muestran un comportamiento estable en el efluente de salida obtenido para ambos sistemas durante los 75 días de tratamiento, independientemente de las fluctuaciones del influente del agua residual. En este caso, no hubo grandes variaciones en la carga inicial del agua residual, ya que el tratamiento biológico se realizó a partir de un volumen de agua acumulada procedente del muestreo realizado en el hospital. El comportamiento de las dos unidades de CBRs evidencia la robustez del biorreactor propuesto e indica la buena adaptación de la biomasa al tratamiento de la matriz de agua hospitalaria real donde la concentración de micro-contaminantes y de microorganismos patógenos es superior que en un agua residual urbana procedente del tratamiento primario de una EDAR. Finalmente, cabe destacar que los perfiles obtenidos para ambas unidades son prácticamente iguales, demostrando la buena reproducibilidad del proceso propuesto.

En la Tabla 5.4, se muestra la composición del agua residual y del efluente de salida procedente de las unidades de CBRs modificadas una vez que se alcanzó el estado estacionario (a partir del día 30 de operación), así como las tasas de reducción correspondientes.

Tabla 5.4. Caracterización del agua residual y del efluente y resultados del tratamiento del agua residual hospitalaria

Biorreactor 1			
	Agua residual	Efluente	Reducción (%)
COT (mg/L)	71 ± 17	16 ± 3	78 ± 4
DQO _{TOTAL} (mg/L)	181 ± 40	68 ± 41	65 ± 21
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	47 ± 6	45 ± 9	10 ± 10
NTK (mg/L)	74 ± 16	63 ± 17	26 ± 15
P-PO ₄ ³⁻ (mg/L)	3,2 ± 0,5	0,8 ± 0,8	73 ± 25
Biorreactor 2			
	Agua residual	Efluente	Reducción (%)
COT (mg/L)	77 ± 18	15 ± 5	82 ± 6
DQO _{TOTAL} (mg/L)	195 ± 49	88 ± 56	61 ± 22
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	49 ± 8	47 ± 9	10 ± 10
NTK (mg/L)	77 ± 16	71 ± 24	15 ± 15
P-PO ₄ ³⁻ (mg/L)	3,4 ± 0,7	0,9 ± 0,7	75 ± 22

Durante este periodo de tiempo se obtuvieron altas tasas de reducción para el COT en ambas unidades de CBRs, consiguiendo eliminaciones de un 78 ± 4 y 82 ± 6 % para cada uno de ellos. Además, se obtuvieron concentraciones en la corriente de salida de DQO total de 68 ± 41 y 88 ± 56 mg/L, las cuales son inferiores al límite de

descarga (125 mg/L) establecido para este parámetro por la Directiva actual (Directiva 91/271/CEE, Tabla 2.12). El fósforo en forma de fosfatos también se eliminó eficientemente hasta concentraciones por debajo de 1 mg/L en los efluentes de ambos biorreactores, cumpliendo también con el límite de vertido establecido por la Directiva actual para zonas sensible propensas a eutrofización.

Con respecto al nitrógeno NTK y N-NH_4^+ , apenas se vieron afectados durante el tratamiento, con porcentajes de eliminación inferiores al 20 %. Los hongos ligninolíticos están adaptados fisiológicamente para usar la madera como fuente natural de nutrientes, la cual es rica en carbono pero pobre en nitrógeno con relaciones C:N de hasta 1250:1 (Watkinson y col., 2006). Por lo tanto, estos microorganismos han desarrollado diferentes estrategias para la conservación y reciclaje de nitrógeno (Paustian y Schnürer, 1987). Además, los hongos ligninolíticos tienen la capacidad de seleccionar y captar nitrógeno de entre una gran variedad de fuentes nitrogenadas diferentes (Marzluf, 1996; Lilly y col., 1991). Por lo tanto, la eficiencia para la eliminación de nitrógeno en los biorreactores se ve limitada.

Aunque el efluente de salida de los biorreactores se ha mantenido estable durante el tratamiento, a partir del día 30 de operación, se observaron ligeros cambios en los perfiles de los parámetros monitorizados. Por un lado, se observó un ligero aumento en la carga de COT alimentada a ambos biorreactores. Sin embargo, este aumento no afectó al efluente, manteniendo la misma carga de COT a la salida. Además, a partir del día 30, la eliminación de P-PO_4^{3-} aumento significativamente, ya que como se puede observar en el perfil, su carga en el efluente de salida disminuyó considerablemente (Figura 5.25.c).

Como se puede ver en la Figura 5.26, donde se recogen los valores de (a) temperatura en el agua de los CBRs, (b) la concentración de oxígeno disuelto y (c) el pH, las condiciones de operación también sufrieron un continuo cambio durante el tratamiento. Los reactores estuvieron en funcionamiento ininterrumpidamente desde finales de febrero (periodo de puesta en marcha, crecimiento y aclimatación) hasta finales de junio, donde se produce un incremento considerable de la temperatura ambiente en Madrid.

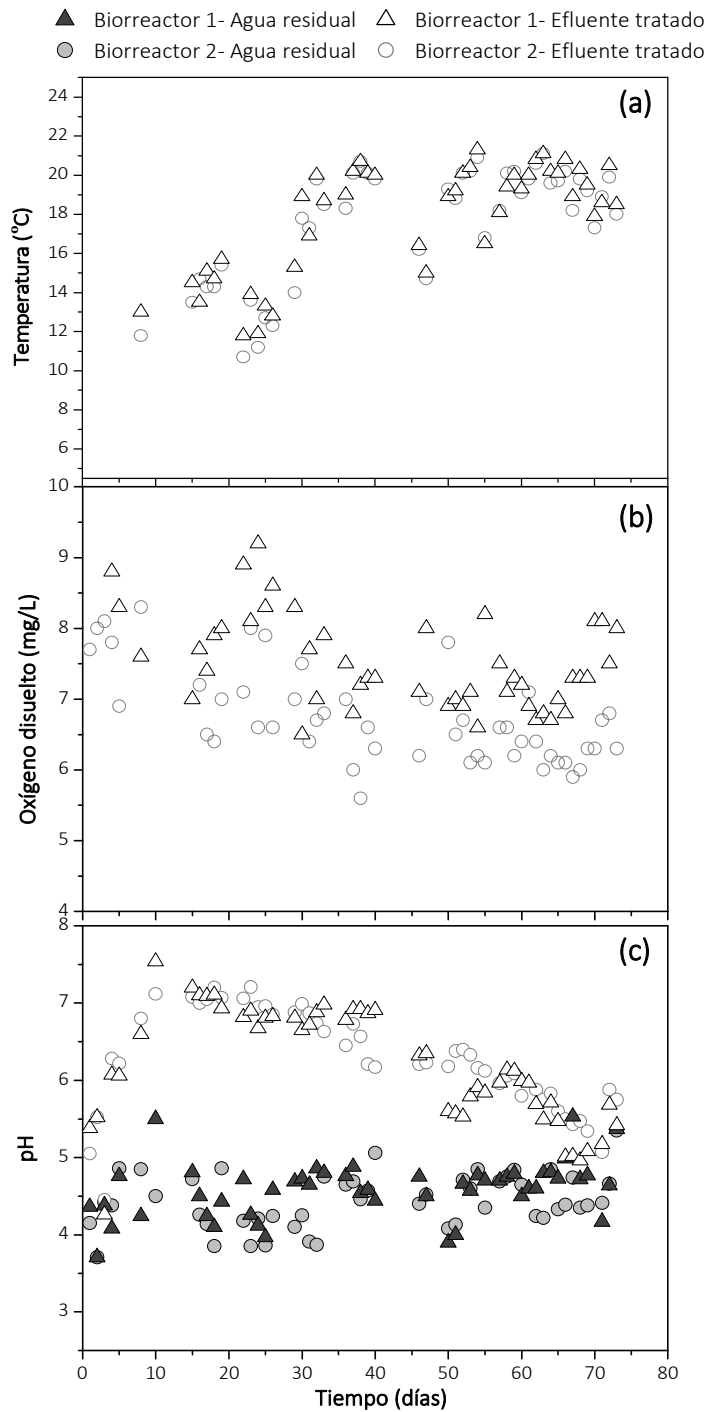


Figura 5.26. Evolución de (a) temperatura, (b) oxígeno disuelto y (c) pH durante el tratamiento del agua residual hospitalaria en dos biorreactores de CBRs modificados

Como los sistemas de CBRs son reactores abiertos y funcionan a temperatura no controlada, este parámetro sufrió un aumento continuo desde 11 °C en los primeros días hasta los 18-22 °C especialmente a partir del día 30 de operación (Figura 5.26 a). Un aumento de la temperatura puede acelerar las reacciones bioquímicas dentro de los biorreactores, lo que justifica el ligero aumento en la eliminación de P-PO_4^{3-} en estos últimos días de tratamiento. Ambos factores (aumento de temperatura y de la actividad) se reflejan también en una reducción continua de oxígeno disuelto, aproximadamente de 8 a 6,5 mg / L (Figura 5.26 b). El ligero aumento en el pH del efluente hasta valores de 7-7,5 (Figura 5.26 c) en los primeros 15 días de operación podría ser consecuencia de la liberación de amonio durante esos días.

Finalmente, se han analizado también las concentraciones de los promotores del proceso de biooxidación avanzada empleados durante el tratamiento del agua residual hospitalaria en el efluente de salida: el ácido gálico y las sales de oxalato de Fe^{3+} y nitrato de Mn^{2+} en concentraciones de 85, 145 y 20 mg/L, respectivamente. Según el mecanismo de reducción-oxidación planteado en la Figura 5.27, el ácido gálico se transforma completamente en un compuesto semiquinónico, por lo que teóricamente puede ser consumido en su totalidad durante el proceso de biooxidación avanzada propuesto. Este hecho, se confirma en los resultados de ácido gálico analizado en quince muestras obtenidas durante el tratamiento del agua hospitalaria en ambos biorreactores (Figura 5.28). Así, para una concentración media de ácido gálico a la entrada de los dos CBRs de 85 ± 18 y 82 ± 20 mg/L respectivamente, la concentración en los efluentes tratados fue inferior a 2 mg/L en ambos casos, la cual se corresponde con una reducción del 98 %.

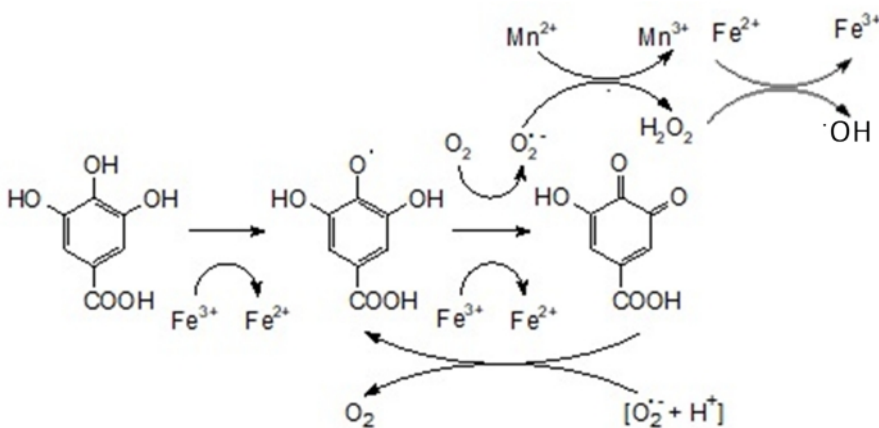


Figura 5.27. Esquema de las principales reacciones involucradas en el proceso de biooxidación avanzada utilizando como mediador quinónico ácido gálico

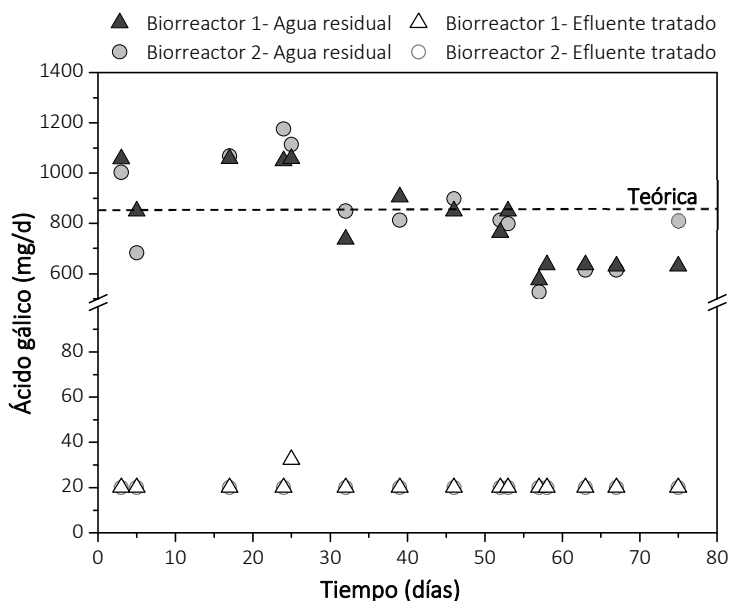


Figura 5.28. Evolución de la carga de ácido gálico durante el tratamiento del agua residual hospitalaria en dos biorreactores de CBRs modificados

Por otro lado, el oxalato de hierro se alimentó al sistema de CBRs en una concentración de 145 mg/L que corresponde a una concentración de hierro de 16,7 mg_{Fe}/L (carga de 0,17 g/d). Mientras que, el nitrato de manganeso se añadió en una concentración de 20 mg/L, correspondiente a una concentración de Mn de 5,5 mg/L (carga de 0,06 g/d). Los análisis del efluente tratado revelaron que la concentración de manganeso fue similar a la añadida al agua residual inicial, mientras que la concentración de hierro fue inferior a 1 mg/L durante todo el tratamiento. Este hecho parece indicar que la acumulación de este metal en la biomasa fúngica inmovilizada en el sistema o como consecuencia de su precipitación debido a la oxidación del oxalato y el pH neutro alcanzado en el interior de los reactores. Los análisis realizados para la biopelícula fúngica de los CBRs mostraron elevados valores de hierro acumulado, con concentraciones superiores a 12 mg_{Fe}/g_{Biomasa}.

Anteriormente, diversos autores ya han demostrado la capacidad de los hongos ligninolíticos para retener metales pesados mediante diferentes mecanismos sin generar ningún efecto tóxico sobre ellos (Sanglimsuwan y col., 1993). En algunas ocasiones han sido incluso utilizados como agentes adsorbentes para eliminar iones presentes en aguas residuales o suelos contaminados (Bayramoğlu y col., 2003). Estos hongos han sido especialmente capaces de acumular Cd, Zn, Cu y Fe, y en menor medida Mn y Pb (Tyler, 1982). Otros artículos reportaron que la presencia de ciertas

especies metálicas, como el Fe y Mn, estimulan el crecimiento y la actividad de los hongos de podredumbre blanca, ya que están involucrados en los procesos de descomposición de la celulosa y hemicelulosa. Por ejemplo, el manganeso participa en el ciclo de reacción de las manganeso-peroxidasa (MnP), el cual se encarga de oxidar compuestos orgánicos reducidos y de comenzar el mecanismo de biooxidación avanzada. Este hecho hace que la interacción entre los metales pesados y las enzimas ligninolíticas extracelulares de hongos de podredumbre blanca sea particularmente importante para los procesos bio-tecnológicos (biodegradación y biooxidación avanzada), utilizados comúnmente en la eliminación de microcontaminantes emergentes.

Finalmente, cabe destacar que las concentraciones de hierro y manganeso introducidas en el agua residual a las unidades de CBRs (16 y 5,5 mg/L, respectivamente) están por debajo de los límites tóxicos reportados para metales pesados en hongos (Baldrian y col., 2003), descartándose posibles efectos negativos tales como la inhibición del crecimiento fúngico, cambios morfológicos y fisiológicos o afecciones en la reproducción de basidiomicetos, entre otros.

El tratamiento en continuo del agua residual hospitalaria mediante un proceso de biooxidación avanzada en dos unidades de CBRs modificadas con biodiscos recubiertos de madera mostró significativas reducciones de COT y P-PO₄³⁻ (80 y 75 % respectivamente), mientras que para el NTK se observó una mínima reducción del 20 % aproximadamente. Además, el ácido gálico introducido como promotor quinónico de biooxidación avanzada fue consumido completamente, mientras que la fuente de hierro quedando acumulada en gran medida sobre la biomasa inmovilizada en los CBRs.

Las dos unidades de CBRs estudiadas mostraron resultados similares, demostrando la reproducibilidad del tratamiento en continuo estudiado. Con estas conclusiones se puede validar el proceso de biooxidación avanzada como pretratamiento in situ de los efluentes de aguas residuales del hospital antes de descargar en la red de alcantarillado. Ambos sistemas de CBRs se mantuvieron estables durante los 75 días de operación sin la necesidad de añadir sustratos adicionales fácilmente biodegradables. Además, no fue necesario realizar renovaciones parciales de biomasa, dosificar aire o controlar la temperatura, que son las principales limitaciones de los tratamientos biológicos fúngicos para una posible implementación como tratamiento de aguas residuales a gran escala.

B. Eliminación de compuestos farmacéuticos

El proceso de biooxidación avanzada con *T. versicolor* no solamente ha sido evaluado para la reducción del carbono, nitrógeno y fósforo del agua residual hospitalaria, sino que otro punto crítico estudiado ha sido la eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos. Durante el tratamiento del agua residual hospitalaria en ambos biorreactores se detectaron 18 de los 22 compuestos farmacéuticos analizados (Tabla 5.5.).

Tabla 5.5. Concentración de los microcontaminantes farmacéuticos del agua residual hospitalaria

Concentraciones ($\mu\text{g/L}$)			
Compuestos farmacéuticos	Abreviatura	Biorreactor 1	Biorreactor 2
Antipirina	4-AAA	20 \pm 5	22 \pm 3
Atenolol	ATN	5.038 \pm 1.237	5.193 \pm 304
Amoxicilina	AMX	18 \pm 4	19 \pm 5
Azitromicina	AZM	405 \pm 163	339 \pm 217
Cafeína	CFN	54 \pm 23	43 \pm 18
Carbamazepina	CZP	0,14 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01
Ciclofosfamida	CPD	10.539 \pm 2.990	10.582 \pm 645
Diclofenaco	DCF	0,140 \pm 0,003	0,140 \pm 0,004
Gemfibrozilo	GFZ	1,79 \pm 0,9	1,50 \pm 0,31
Hidroclorotiazida	HCT	0,6 \pm 0,3	0,4 \pm 0,3
Ibuprofeno	IBP	6,8 \pm 2,9	5,9 \pm 2,2
Iohexol	IHX	159 \pm 29	121 \pm 24
Metronidazol	MDZ	0,032 \pm 0,002	0,09 \pm 0,002
Metoprolol	MTP	0,57 \pm 0,45	0,23 \pm 0,20
Progesterona	PGT	0,3 \pm 0,2	1,03 \pm 2,07
Ranitidina	RNT	1,8 \pm 0,4	2,9 \pm 1,6
Sulfametoxazol	SMX	1,4 \pm 0,5	1,4 \pm 0,8
Sulpirida	SPD	338 \pm 103	397 \pm 163

Atenolol (ATN) y ciclofosfamida (CPD) con concentraciones en torno a 5.000 y 10.000 $\mu\text{g/L}$, fueron los fármacos que se detectaron con mayor carga en el agua residual. Estos compuestos se utilizan comúnmente en hospitales para el tratamiento de problemas cardiovasculares o hipertensión y quimioterapia, respectivamente. En segundo lugar, se encuentran los antibióticos y los agentes de contraste como azitromicina (AZM), iohexol (IHX) y sulpirida (SPD) con concentraciones más bajas entre 200 y 400 $\mu\text{g/L}$. Anteriormente, ya se detalló que éstos son los grupos terapéuticos predominantes en estos efluentes acuosos (Santos y col., 2013). El resto de los compuestos se encuentran en niveles de concentración mucho menores. En el

anexo 7.4 aparecen recogidas las concentraciones medidas en el agua residual inicial y en el efluente de salida para cada biorreactor (Tabla 7.5 y 7.6).

En la Figura 5.29, se muestran las tasas de reducción obtenidas en ambos biorreactores para los fármacos detectados en el agua residual hospitalaria.

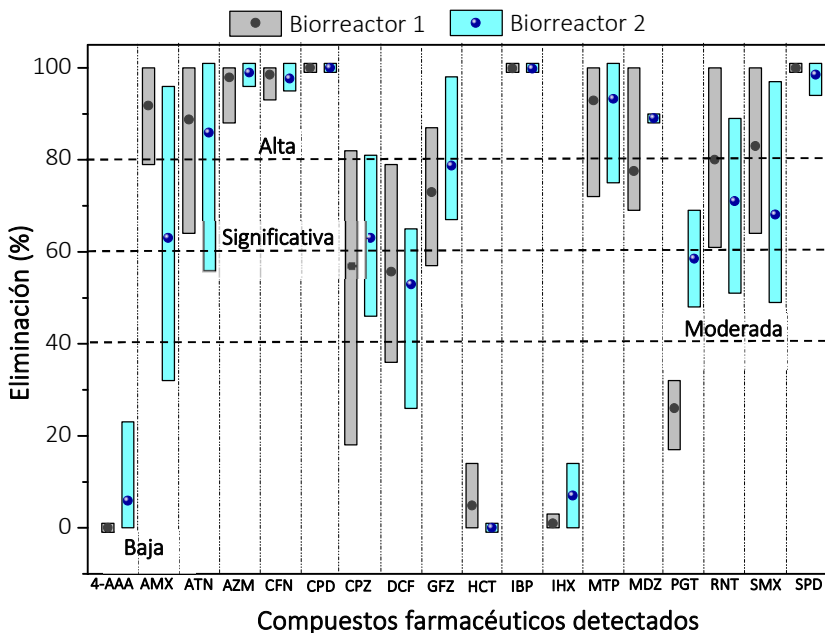


Figura 5.29. Eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos detectados durante el tratamiento del agua residual hospitalaria en dos biorreactores de CBRs modificados

En primer lugar, cabe destacar que las tasas de eliminación alcanzadas para los 18 compuestos estudiados fueron muy similares en ambos biorreactores. Únicamente, amoxicilina (AMX) y progesterona (PGT) mostraron resultados dispares con eliminaciones del 92 y 26 % en el biorreactor 1, frente a 63 y 58 % del biorreactor 2. Este hecho confirma la buena reproducibilidad del proceso propuesto, ya observada anteriormente para la reducción de carbono, nitrógeno y fósforo. Además, 8 de los compuestos estudiados (ATN, AZM, CFN, CPD, IBP, MTP, MDZ y SPD) obtuvieron tasas de eliminación iguales o superiores al 80 % en ambos biorreactores. Mientras que únicamente cuatro de ellos (4-AAA, HCT, IHX y PGT) se redujeron por debajo del 40 %.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 5.29, los compuestos detectados en mayor concentración muestran una eliminación prácticamente completa durante el tratamiento del agua hospitalaria mediante el proceso de

biooxidación avanzada. Así, se consigue una eliminación superior al 98 % para CPD y AZM en ambos biorreactores, resultado similar a SPD (99 %) y ATN (89-86 % para el biorreactor 1 y 2, respectivamente). Por otro lado, 4-AAA, HCT e IHX fueron los productos farmacéuticos más refractarios durante el tratamiento del agua de hospital en los sistemas CBRs modificados. Como ya se ha visto anteriormente para el tratamiento de las aguas residuales urbanas, estos compuestos (4-AAA y HCT) generalmente sufren bajas eficacias de eliminación debido a su comportamiento hidrofílico ($\log K_{ow}$ -0.13 y -0.07, respectivamente) y su parcial ionización en el medio acuoso ($pK_a < pH_{medio}$; Tabla 7.2: $pK_a = 1,56$ y 7 respectivamente) lo que hace que sean altamente biorefractarios al metabolismo fúngico. Además, los compuestos detectados a baja concentración en el agua residual hospitalaria, como HCT (0,6-0,4 $\mu\text{g} / \text{L}$) son más susceptibles a errores de muestreo y análisis (Collado y col., 2014). Finalmente, en el caso de IHX, la presencia de los grupos aceptores de electrones fuertes de amida y yodo (menos susceptibles de ser oxidados biológicamente por el catabolismo oxidativo de los hongos) prevalece sobre sus grupos hidroxilo dadores de electrones, lo que dificulta su oxidación biológica.

Todos los compuestos detectados, a excepción de AZM, CPD y metoprolol (MTP), se estudiaron anteriormente durante los tratamientos de las aguas residuales urbanas (depuradora URJC y EDAR Toledo). Estos tres nuevos fármacos están categorizados en las familias de los antibióticos, anticancerígenos y β -bloqueantes, respectivamente. Cabe destacar que dos de los antibióticos (AZM y AMX) se encuentran dentro de la última lista de observación de las sustancias prioritarias del agua publicada tras la Decisión de Ejecución de la Unión Europea 2018/840. Otros como el DCF fueron incluidos en listas de observación anteriores por la Comisión Europea en la Decisiones de Ejecución (UE) 2015/495 y en la Directiva 2008/105/CE respectivamente.

Como ya se ha mencionado, estos compuestos, AZM, CPD y MTP alcanzaron una eliminación prácticamente completa (98, 99 y 93 %, respectivamente) en el proceso de biooxidación avanzada. Entre estos compuestos, AZM se encuentra principalmente en su forma no ionizada en el medio ($pK_{aAZM} = 8,7 > pH$). Además, posee un carácter hidrofóbico ($\log K_{ow} = 4,02$) y su estructura molecular contiene grupos dadores de electrones (aminas, alcoxi y alquilos). Como ya se ha concluido en capítulos anteriores, todos estos factores hacen que presente una eficacia de eliminación de casi el 100 %. Además, su baja eliminación en los tratamientos convencionales de depuración, siendo prácticamente nula para el tratamiento de fangos activos con nitrificación/desnitrificación (Verlicchi y col., 2013 a), hace que sea muy destacable la eliminación alcanzada en este trabajo de investigación mediante el proceso de biooxidación avanzada propuesto.

Por otra parte, CPD y MTP son fármacos que tienen un comportamiento más hidrófilo ($\log K_{OW} = 0,63$ y $1,8$ respectivamente) y tienen tanto grupos aceptores como dadores de electrones en su esqueleto molecular. Sin embargo, en ambos casos, se encuentran en el medio principalmente en su forma no ionizada ($pK_{a_{CPD}} = 12,78$; $pK_{a_{MTP}} = 9,6$) y por lo tanto muestra mayor tendencia a biooxidarse. La eliminación para estos compuestos mediante el proceso de biooxidación (99 y 93 %, respectivamente) es destacable frente a otros datos bibliográficos, donde únicamente se han conseguido bajas eliminaciones del 7 al 50 % para MTP y nula para CPD en tratamientos convencionales de hongos activos (Verlicchi y col., 2013 a; Deblonde y col., 2011; Rosal y col., 2010 a).

Actualmente, existen trabajos previos con *Trametes versicolor* que consiguen destacadas eliminaciones para microcontaminantes farmacéuticos presentes en aguas residuales hospitalarias. Inicialmente, estos trabajos evaluaron la capacidad del hongo en biorreactores fluidizados con aire pulsado para el tratamiento de un agua hospitalaria procedente del Hospital de Girona (Cruz-Morató y col., 2014) y un agua veterinaria procedente de la clínica Veterinaria localizada en la Universidad Autónoma de Barcelona (Bellatera, España) (Badia-Fabregat y col., 2016). En ellos, se obtuvieron destacables tasas de eliminación para compuestos como GFZ, IBP, DCF, MDZ y SMX con eficacias medias del 97, 100, 100, 75 y 93 %, respectivamente. Por otro lado, otros compuestos como ATN, AZM y CFN obtuvieron eliminaciones medias del 26, 40 y 35 %, respectivamente. La CZP y MTP obtuvieron incluso eliminaciones negativas probablemente por la conversión de los metabolitos formados al compuesto inicial.

Estos sistemas también se han probado en el tratamiento en continuo de un agua residual hospitalaria procedente del Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona, España) (Mir-Tutusaus y col., 2017) y para el agua veterinaria descrita anteriormente (Badia-Fabregat y col., 2016). Ambos tratamientos se llevaron a cabo en biorreactores fluidizado con aire pulsado donde se disminuyó el TRH a 3 y 3,3 días. Para algunos fármacos (GFZ, IBP, MDZ y SMX), las eficacias de eliminación no disminuyeron significativamente respecto a los tratamientos discontinuos descritos anteriormente (78, 58, 40 y 78 %). Comparando estos resultados con los obtenidos en la presente Tesis Doctoral, la inmovilización del hongo *Trametes versicolor* sobre el sistema de contactores biológicos rotativos ha permitido alcanzar eliminaciones de microcontaminantes farmacéuticos del mismo orden y en algún caso incluso más elevadas, a pesar de trabajar con un tiempo de residencia hidráulico tres veces menor al propuesto en ese trabajo (TRH de 1 día en lugar de 3 días), sin la renovación parcial de la biomasa y sin la adición de fuentes fácilmente biodegradables de carbono y nitrógeno. En este sentido, cabe destacar los resultados obtenidos para ATN, AZM,

IBP y MDZ, donde se han alcanzado eliminaciones del 89, 98, 99 y 80 % en el proceso de biooxidación avanzada propuesto frente al 68, -96, 58 y 40 % obtenido durante el tratamiento del agua veterinaria.

Las eficacias de eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos fueron muy similares en ambas unidades de CBRs, lo que confirma la reproducibilidad del proceso propuesto como tratamiento biológico alternativo para la eliminación de compuestos farmacéuticos presentes en aguas residuales reales.

Las eliminaciones de ocho de los dieciocho compuestos farmacéuticos detectados en el agua hospitalaria fueron superiores al 80 %. Mientras que, únicamente cuatro de los fármacos estudiados sufrieron eliminaciones inferiores al 40 % operando en el sistema de CBRs modificado mediante el proceso de biooxidación avanzada. Cabe destacar las altas tasas de eliminación alcanzadas para IBP, CFN, SPD, CPD y AZM superiores al 98 % en ambos biorreactores.

5.3.3. Evolución de las comunidades fúngicas y bacterianas presentes en la biomasa el sistema de CBRs modificado tras el tratamiento del agua residual hospitalaria

Los resultados de caracterización de actividad biológica obtenidos anteriormente para las aguas residuales urbanas procedentes de la depuradora a escala planta piloto de la URJC y de la EDAR de Toledo permitieron concluir que la actividad fúngica se mantiene y es predominante sobre la bacteriana durante el tratamiento de los efluentes del tratamiento primario de ambas depuradoras. Sin embargo, con los bioensayos de actividad microbiológica propuestos no se pudieron identificar las especies de microorganismos presentes en el sistema, ya que en estos resultados se consideran en su totalidad todas las especies de hongos y bacterias.

En este contexto, es importante identificar las cepas fúngicas y bacterianas presentes en la biomasa ya que muchas de ellas pueden producir la inhibición del *Trametes versicolor* o viceversa. Así, aunque la presencia de *T. versicolor* puede llegar a inhibir el crecimiento de otras especies fúngicas, ascomicetos y basidiomicetos pueden crecer en el biorreactor y contribuir al tratamiento del agua tanto en la reducción de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo como en la eliminación de los microcontaminantes emergentes. Anteriormente, Badia-Fabregat y col. (2017, 2016) ya detectaron el crecimiento de diferentes especies de hongos como *Fusarium*

spp. y *Trichoderma spp.* en la biomasa del biorreactor tras el tratamiento de un agua residual veterinaria con *T. versicolor*. Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, la presencia de algunas bacterias comunes en las aguas residuales urbanas (*Enterobacterias sp.* y *Burkholderia sp.*) pueden estar involucradas en la degradación de los fármacos o incluso pueden producir la lisis celular del *T. versicolor* (Badia-Fabregat y col., 2017, 2016).

Por ello, durante este tratamiento se llevó a cabo un análisis más exhaustivo de las especies soportadas sobre ambas unidades de CBRs modificados. Diferentes técnicas de microbiología molecular como la PCR cuantitativa (qPCR) y la secuenciación masiva permitieron identificar y cuantificar la evolución con el tiempo de operación de las diferentes comunidades microbiológicas presentes en el biorreactor. Esta caracterización se realizó con la finalidad de determinar la distribución de *Trametes versicolor*, hongos totales y bacterias totales mediante la cuantificación del número de copias de ADN replicadas de los microorganismos seleccionados presentes en cuatro muestras de biomasa recogidas en cada biorreactor a diferentes tiempos: i) después de la aclimatación de la biomasa inmovilizada durante la puesta en marcha de las unidades de CBRs modificados (día 0), ii) después de 21 y 46 días de tratamiento del agua hospitalaria y iii) al final del tratamiento (día 75).

En la Figura 5.30 se recoge la evolución obtenida en la caracterización por qPCR de las cuatro muestras. Como se puede observar, después del período de aclimatación de la puesta en marcha de las dos unidades de CBRs (tiempo 0 días), la biomasa ya está colonizada por especies bacterianas y fúngicas diferentes al *Trametes versicolor*. Las bacterias son probablemente los microorganismos más comunes que habitan en la madera, incluso antes que los hongos descomponedores de la lignina (Clausen, 1996). De este modo, las comunidades bacterianas proliferan en mayor medida sobre este sustrato lignocelulósico debido a que poseen un metabolismo más acelerado que los hongos como el *T. versicolor* y, por lo tanto, predominan en la biomasa de en ambos biorreactores durante todo el tratamiento del agua residual hospitalaria.

Este comportamiento contrasta con los resultados previamente publicados para biorreactores fúngicos basados en *T. versicolor*, donde tras el tratamiento de aguas residuales reales no esterilizadas, continúa el predominio de hongos sobre bacterias (Badia-Fabregat y col., 2017) y particularmente *T. versicolor* (Mir-Tutusaus y col., 2017). Sin embargo, cabe destacar que las diferencias en las condiciones de operación utilizadas en esta tesis doctoral frente a las propuestas en esos trabajos justifican el predominio de *T. versicolor* en esos biorreactores. La adición de fuentes suplementarias de carbono y nitrógeno fácilmente biodegradables en una relación

optimizada para el predominio de hongos y el reemplazo de 1/3 de la biomasa cada 5-7 días por biomasa fresca de *T. versicolor* (renovación parcial de biomasa) hacen que se mantenga constante la distribución microbiana en el biorreactor y la actividad del hongo *T. versicolor*.

Por otro lado, los hongos descomponedores de la madera son conocidos por ser altamente competitivos con otras especies de hongos y pueden llegar a tener un impacto fuerte y determinante en la composición de la comunidad microbiana del biorreactor (Kielak y col., 2016; Boddy, 2000), desplazando el crecimiento del hongo *T. versicolor* inoculado inicialmente.

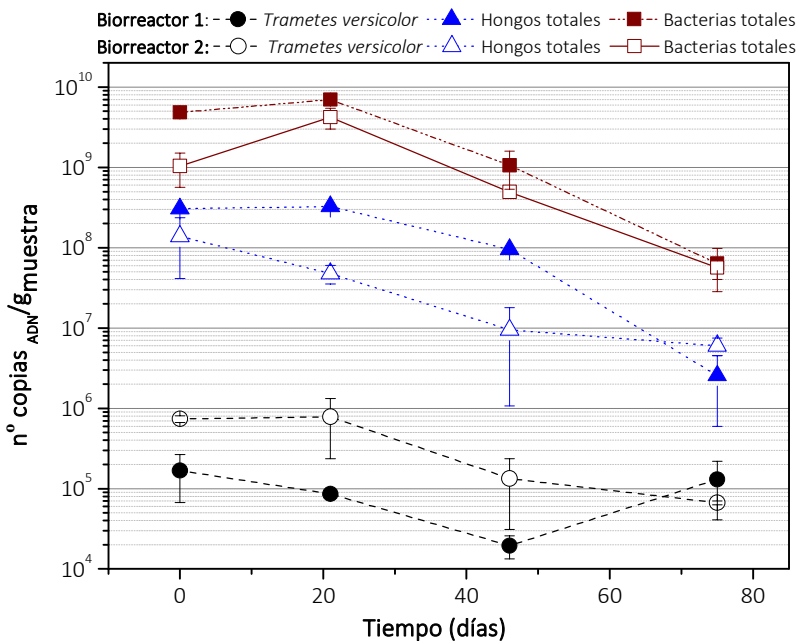


Figura 5.30. Evolución de la concentración total de bacterias, hongos y *T. versicolor* durante el tratamiento del agua residual hospitalaria en dos biorreactores de CBRs modificados

Durante el tratamiento del agua residual hospitalaria, la población de hongos y bacterias totales sufre una disminución constante a medida que avanza el tratamiento del agua hospitalaria. Sin embargo, aunque las proporciones iniciales son diferentes en el biorreactor 1 y 2, las poblaciones evolucionan en ambos biorreactores hasta lograr unas proporciones muy similares después de los 75 días de operación. Además, cabe destacar que el hongo *T. versicolor* es una de las especies fúngicas presentes durante los 75 días de tratamiento del agua hospitalaria en ambos biorreactores.

A. Análisis de la comunidad bacteriana

La clasificación taxonómica de los análisis metagenómicos realizados por secuenciación masiva y posterior lectura con Illumina se muestran en la Figura 5.31 y 5.32. Las *Proteobacterias*, particularmente las α -*proteobacterias* (orden *Sphingomonadales*, 64,5 %) son la división dominante en el biorreactor 1 al comienzo del tratamiento. Sin embargo, la población bacteriana de éste evoluciona después de los 75 días disminuyendo la presencia de la división α -*proteobacterias* (orden *Sphingomonadales*: 20 %), aumentando la contribución de las divisiones de β -*proteobacterias* (orden *Burkholderiales*: 15 %), *Firmicutes* (orden *Clostridiales*: 20 %), *Acidobacterias* (7,5 %) y *Actinobacterias* (5 %).

La evolución de ambos biorreactores fue similar independientemente de que la distribución de la población bacteriana fuese diferente al comenzar el tratamiento. El dominio de esas divisiones de bacterias (*Acidobacterias*, α y β -*Proteobacterias*, *Firmicutes* y *Actinobacterias*) es característico en el proceso de descomposición de la madera, especialmente el pino (Kielak y col., 2016). Además de las anteriores, también se deben destacar que las divisiones de *Bacteroidetes* y *Cyanobacterias* han sido detectadas previamente en el tratamiento biológico de aguas residuales hospitalarias reales con *Trametes versicolor* (Mir-Tutusaus y col., 2017).

La presencia de estas divisiones de bacterias puede contribuir sinérgicamente al tratamiento o por el contrario generar un efecto inhibitorio. Dentro de la división de las α -*proteobacterias*, se ha demostrado previamente que las especies pertenecientes a la orden de las *Sphingomonadales* y *Rodhospirillales* son también responsables de la degradación de la lignina en el proceso de descomposición de la madera (Kielak y col., 2016). Además, otros ordenes como *Burkholderiales* (perteneciente a la división β -*proteobacterias*) y *Rizhobiales* (perteneciente a la división *Acidobacterias*) también se conoce que trabajan de manera sinérgica con especies fúngicas para eliminar compuestos ligninolíticos tóxicos (Christofides y col., 2019) o para fijar nitrógeno (Kielak y col., 2016). Sin embargo, las especies englobadas dentro del orden de las bacterias *Clostridiales* (perteneciente a la división *Firmicutes*) favorecen la lisis celular de ciertas comunidades fúngicas para aumentar su actividad propia en el proceso de descomposición de celulosa. Por lo tanto, este orden generalmente aparece como depredador de determinados hongos, inhibiendo su crecimiento y actividad (Christofides y col., 2019).

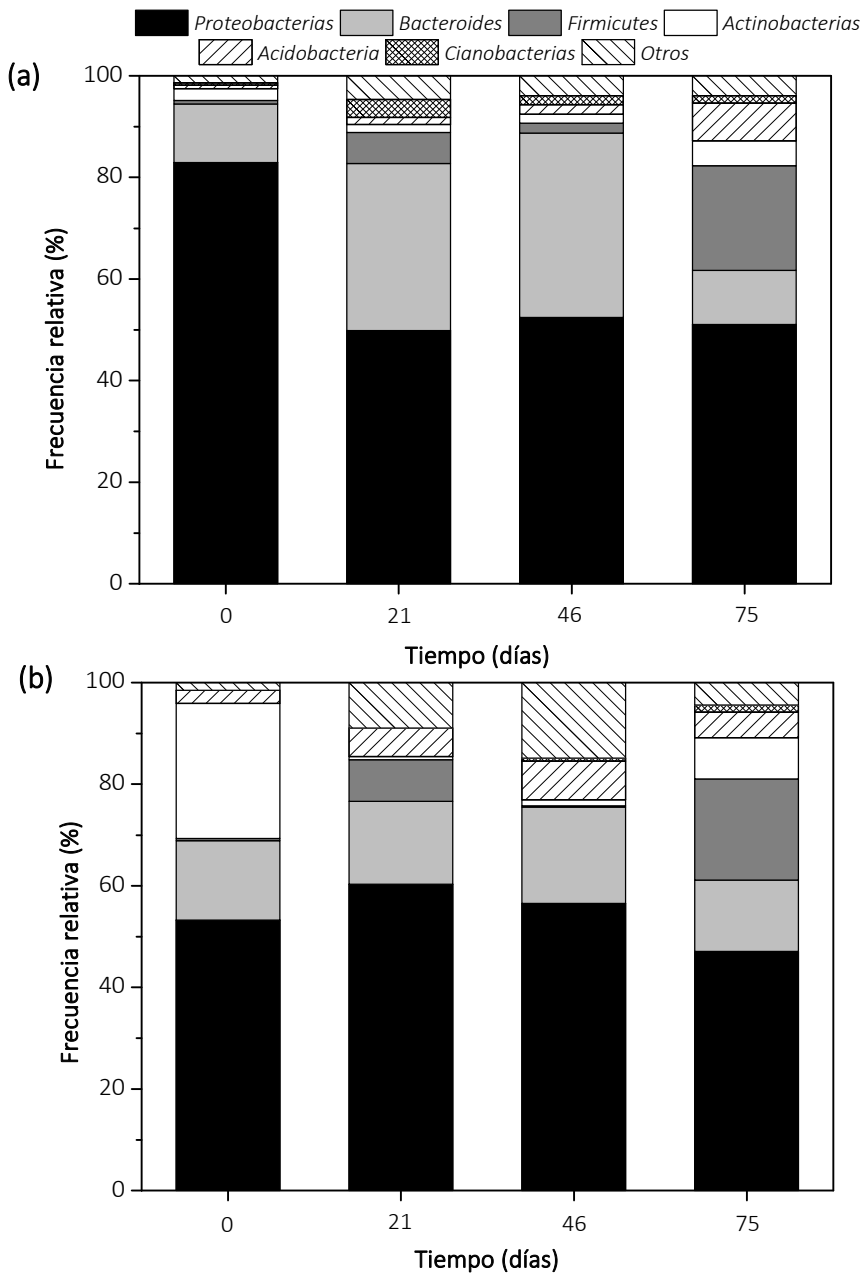


Figura 5.31. Evolución de la comunidad bacteriana presentes en la biomasa de los sistemas de CBRs (a) biorreactor 1 y (b) biorreactor 2 según su frecuencia relativa a nivel taxonómico de división

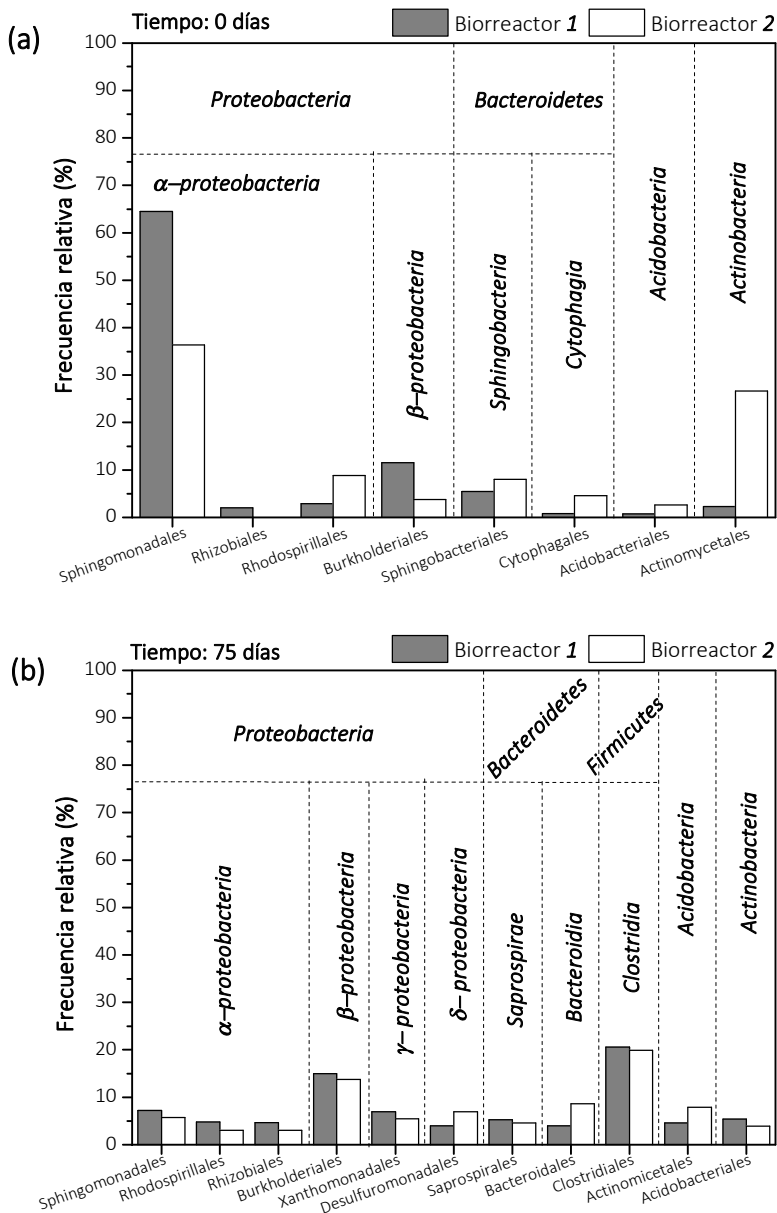


Figura 5.32. Clasificación de la comunidad bacteriana en las dos unidades de CBRs según el nivel taxonómico orden para (a) tiempo inicial y (b) final del tratamiento del agua hospitalaria

B. Análisis de la comunidad fúngica

El análisis de las lecturas por Illumina de las comunidades fúngicas reveló un gran porcentaje de familias no identificadas en los biorreactores, en proporción diferente en cada uno de ellos, pero que fue disminuyendo y evolucionando hasta alcanzar valores similares al final de la operación, desde una frecuencia relativa de $20 \pm 3,3 \%$ ($t = 0$ días) a $34 \pm 2,8 \%$ ($t = 75$ días) en el biorreactor 1 y de $61 \pm 2,1 \%$ ($t = 0$ días) a $28 \pm 1,4 \%$ ($t = 75$ días) en el biorreactor 2. Estos resultados no son sorprendentes, ya que se ha demostrado que la capacidad de codificación de ADN basada en Illumina para identificar especies fúngicas en muestras mixtas difiere enormemente entre estudios, y actualmente es aún limitada ya que numerosas secuencias de amplificación (ITS) a menudo no están disponibles en las bases de datos de referencia (Heeger y col., 2019). En consecuencia, las secuencias de referencia existentes en la base de datos utilizada (UNITE) están incompletas para muchos taxones fúngicos, lo que dificulta la clasificación total de las especies pertenecientes a este reino (Heeger y col., 2019).

Las afiliaciones taxonómicas identificadas para las lecturas fúngicas que han sido identificadas con éxito se muestran en la Figura 5.33. Al igual que con las comunidades bacterianas, la evolución de ambos biorreactores es similar en términos de distribución de las diferentes divisiones y clases de hongos. Sin embargo, a diferencia de las bacterias, sí que existen desviaciones más apreciables en la distribución respecto al género de los hongos en ambos reactores después de los 75 días de tratamiento.

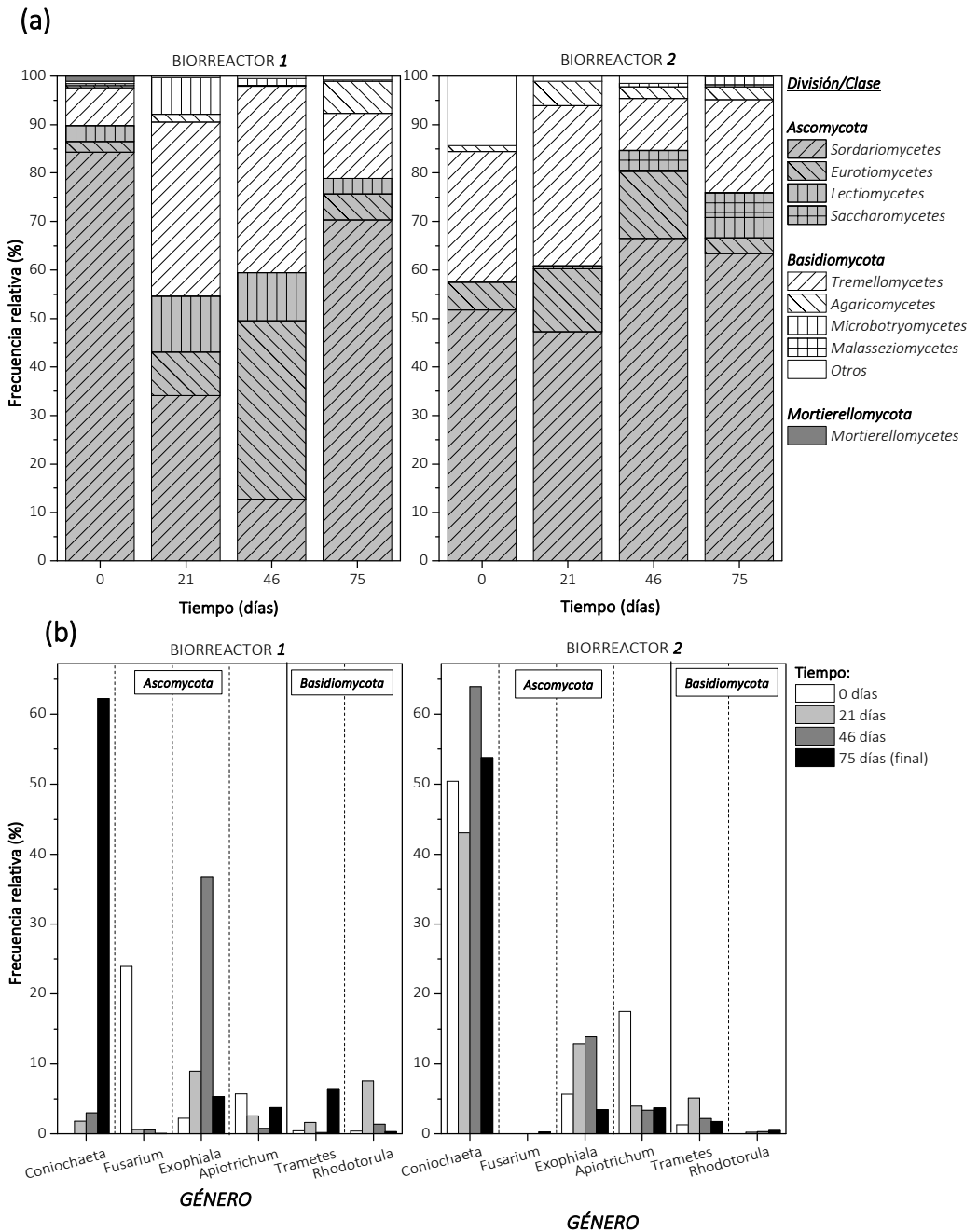


Figura 5.33. Evolución de las comunidades fúngicas presentes en la biomasa de las dos unidades de CBRs según su frecuencia relativa a nivel taxonómico de (a) división/clase y (b) género

Como se puede observar en la Figura 5.33 (a), la mayoría de las especies presentes en los biorreactores pertenecen a la división de los ascomicetos (o *Ascomycota*), donde principalmente predominan las clases *Sordariomycetes* y *Eurotiomycetes*. Seguidamente, la división de los basidiomicetos (o *Basidiomycota*), a la cual pertenece el *Trametes versicolor*, también tiene una notable presencia durante todo el tratamiento. Esta distribución microbiana es muy similar a la reportada en un estudio donde se analizó la biodiversidad fúngica sobre árboles reales (pinos y robles) en proceso de su descomposición. Este estudio ya reveló que durante el proceso de pudrición de la madera la división mayoritaria de hongos fue la *Ascomycota* con predominancia de las clases *Sordariomycetes* y *Eurotiomycetes*, seguido por los hongos pertenecientes a la *Basidiomycota* (Yuan y col., 2017).

Hasta el momento, la mayoría de las especies fúngicas que se han clasificado como hongo ligninolítico descomponedor de la lignina pertenecen a la división de los basidiomicetos. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado la capacidad que tienen diferentes especies pertenecientes a la división de los ascomicetos para generar procesos biooxidativos que descomponen la lignina en compuestos celulósicos más simples (Krueger y col., 2016). Estos hongos pertenecientes a la división de la *Ascomycota* reciben el nombre de pseudo hongos de podredumbre blanca u hongo de pudrición blanca tipo II (Hatakka y Hammel, 2011). Entre ellos, especialmente, cabe destacar las especies de hongos pertenecientes al género *Coniochaeta* (Figura 5.33 b), microorganismos de los cuales se ha demostrado que pueden utilizar compuestos aromáticos originados durante la descomposición de la madera (Ravindran y col., 2012)

Como ya se ha mencionado anteriormente, los hongos descomponedores de la madera son conocidos por ser altamente competitivos, por lo que finalmente cabe remarcar la consolidación y supervivencia del género *Trametes*, aunque a baja frecuencia relativa, durante el tratamiento del agua hospitalaria. Independientemente de la proporción de *Trametes* en los biorreactores, la presencia de otros hongos ligninolíticos, como los pertenecientes al género *Coniochaeta* o *Fusarium* (Markakis y col., 2017; Ravindran y col., 2012), son capaces de degradar moléculas orgánicas complejas y por lo tanto pueden ser responsables de la actividad del sistema. Además, ya se ha demostrado que la capacidad para producir radicales hidroxilo a partir del ciclo redox de la quinona, y por lo tanto conseguir la eliminación de contaminantes orgánicos, no es único de los hongos ligninolíticos de podredumbre blanca, sino también para lo pueden originar otras especies pertenecientes a la división *Basidiomycota* o incluso *Ascomycota* (Krueger et al., 2016). Por lo tanto, la presencia de estas especies que colonizan parcialmente los CBRs, promueven la eliminación de compuestos farmacéuticos incluso en condiciones donde el *Trametes*

no es el género predominante en el biorreactor. En resumen, se puede concluir que los resultados obtenidos en los biorreactores 1 y 2 después de 75 días de operación demostraron que la diversidad de comunidades de bacterias y hongos evoluciona hasta obtener una estructura comunitaria estable, altamente activa para la eliminación de una fracción importante de la materia orgánica soluble, así como de los microcontaminantes farmacéuticos.

La biomasa inmovilizada sobre los sistemas de CBRs modificados después del tratamiento del agua residuales hospitalaria ha evolucionado hacia especies que se encuentra típicamente en los procesos de descomposición natural de la madera, como las especies bacterianas pertenecientes a la orden de las Sphingomonadales y Rodhospirillales y las especies de hongos ligninolíticos pertenecientes al género Coniochaeta, pero manteniéndose el Trametes versicolor.

La diversidad de las comunidades bacteriana y fúngica parece estabilizarse en ambas unidades de CBRs durante los 75 días de tratamiento del agua residual hospitalaria, resultando ser muy activa tanto para la reducción de la materia orgánica soluble como para la degradación de moléculas orgánicas complejas, como los microcontaminantes farmacéuticos.

5.4. PROCESO DE OXIDACIÓN FENTON CON CATALIZADORES RETICULADOS TIPO PEROVSKITA PARA LA ELIMINACIÓN DE MICROCONTAMINANTES FARMACÉUTICOS EN AGUAS RESIDUALES HOSPITALARIAS

Como se ha mencionado en el anterior capítulo, los hospitales son las instalaciones de servicios públicos que más aguas residuales generan. Actualmente, no están sujetos a ninguna ley de vertido en particular, por lo que se limitan a diluir sus efluentes con el resto de las corrientes que llegan a las estaciones de depuradoras. El problema de estos centros no solamente radica en el volumen de agua residual que vierten, sino también en la crítica composición de los efluentes donde se encuentran altas concentraciones de microcontaminantes emergentes en comparación con los valores presentes en aguas residuales domésticas. Dentro de este contexto, numerosos estudios ya recogen la necesidad de realizar un pre o co-tratamiento de estas aguas en origen, antes de juntarlas con los efluentes domésticos (Rodríguez-Narvaez y col., 2017; Verlicchi y col., 2012; Verlicchi y col., 2010; Pauwels y Verstraete, 2006).

En este último capítulo de resultados, se realizará la preparación y evaluación de un material reticulado poroso tipo perovskita $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ para su aplicación como catalizador en procesos Fenton heterogéneos destinados a la eliminación de compuestos farmacéuticos presentes en aguas residuales hospitalarias. Inicialmente, se optimizará el método de conformado de los materiales porosos reticulados tipo perovskita ($\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ -RPP). De manera paralela, se evaluará la influencia de la temperatura, la dosificación de peróxido de hidrógeno y del pH sobre la actividad y estabilidad del catalizador utilizando aguas residuales hospitalarias fortificadas con

carbamazepina como compuesto farmacéutico modelo. La carbamazepina (CZP) es un medicamento antiepiléptico común que puede generar importantes efectos disruptores endocrinos sobre los organismos acuáticos (Ekpeghere y col., 2018) y que no se elimina de manera efectiva en los tratamientos convencionales de depuración de aguas residuales (Zhang y col., 2008). Finalmente, se evaluará la eficacia del material reticulado poroso para la eliminación de diecisiete compuestos farmacéuticos detectados en el agua residual hospitalaria mediante el proceso Fenton en un reactor continuo de lecho fijo.

Con el fin de realizar una discusión más ordenada de los resultados, este capítulo se divide en cuatro secciones:

1. Preparación y caracterización del material tipo perovskita en polvo y del catalizador reticulado poroso.
2. Actividad y estabilidad del material $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ en polvo: influencia de la temperatura y del pH del agua residual.
3. Actividad catalítica de materiales porosos reticulados tipo perovskita ($\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ -RPP) en reactores de lecho fijo para procesos Fenton.
4. Proceso Fenton con catalizador de perovskita soportado en un material poroso reticulado para la eliminación de microcontaminantes farmacéuticos de un agua residual hospitalaria.

5.4.1. Preparación y caracterización del material tipo perovskita en polvo y del catalizador poroso reticulado

El material en polvo tipo perovskita ($\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$) se preparó mediante una adaptación del proceso de síntesis directa descrito previamente en bibliografía (Carrasco-Díaz y col., 2016). Este método consiste en una coprecipitación de los precursores metálicos con la posterior descomposición del citrato amorfo formado. La metodología seguida se esquematiza en el apartado 4.4.1.1 del procedimiento experimental de la presente memoria de investigación.

Tras la síntesis del catalizador tipo perovskita ($\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$) se obtuvo un material en polvo con un tamaño de partícula entre 236 y 254 nm. Su composición, determinada mediante ICP-AES, fue de $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,49}\text{O}_{3-0,21}$. Esta fórmula molecular indica que la perovskita sintetizada tiene un pequeño defecto de oxígeno en su estructura. Gracias a esta caracterización se pudo determinar el factor de Goldschmidt o factor de tolerancia mediante el cual se puede predecir la simetría de una estructura en base a la relación del tamaño de los radios iónicos, siendo una

medida indirecta de su formabilidad (medida de cantidad de deformación). Para ello, se utilizó la ecuación 5.1 (Ksepko y col., 2018):

$$t = \frac{R_A - R_B}{\sqrt{2} \cdot (R_A + R_O)} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

Donde R_A , R_B y R_O corresponde con los radios iónicos del La (A), Cu y Mn (B) y del oxígeno.

En una perovskita ideal el catión A se encuentra rodeado por 12 aniones formando un cubo-octaedro, mientras que el catión B se sitúa en el centro de un octaedro. Los aniones de oxígeno están coordinados a dos cationes B y a cuatro A (Figura 2.11). Por ello, cuando el valor del factor de tolerancia (t) es 1 cabe esperar que no haya distorsión en la celda unidad de la perovskita ideal simple y, por lo tanto, exista una simetría cúbica. A medida que este valor va disminuyendo o aumentando, la estructura se va distorsionando. Así, valores de $t > 1$ indican una compresión de los enlaces B-O y elongación de los enlaces A-O, dando lugar a la adopción de estructuras hexagonales. Por el contrario, valores $t < 1$ significan una elongación de los enlaces B-O y compresión de los enlaces A-O dando lugar a estructuras tetragonales ($1 > t > 0,97$) y ortorrómbicas ($t < 0,97$) (Kayser González, 2014). En este caso, para el material sintetizado, el valor t calculado fue de 0,86, por lo que la estructura de la perovskita sintetizada se considera ortorrómbica.

Una vez realizada la síntesis del material en polvo se procedió al conformado de los materiales porosos reticulados tipo perovskita sobre espumas de poliuretano orgánico siguiendo el método utilizado para fabricar espumas de TiO_2 descrito por Fey y col. (2017) y Haugen y col. (2004). Como ya se ha mencionado en el procedimiento experimental, este método se basa en la impregnación de una espuma de poliuretano con una suspensión que contiene el material perovskita en polvo. La espuma actúa como soporte o estructura base para el conformado del material y finalmente se retirará mediante calcinación.

En base a este método, se realizaron varios experimentos preliminares para determinar la composición óptima de la suspensión que contiene el material perovskita en polvo. En estos experimentos, se estudió la incorporación de bentonita y Optapix PA 4G, como aglutinantes inorgánico y orgánico, además de Dolapix CE 64 como agente defloculante. La adición de estos componentes dio lugar a una pasta fluida con una viscosidad óptima para conseguir un buen recubrimiento de la espuma de poliuretano que se va a impregnar por inmersión. Experimentalmente, se determinó que la formulación de la pasta debía contener un 25 % en peso de bentonita, un 4 % en peso de Optapix PA 4G y un 65 % en peso de Dolapix CE 64 (calculados en base a la masa inicial de perovskita en polvo). Gracias a esta

formulación no solamente se consiguió obtener el completo llenado de la porosidad de la estructura macroporosa de la espuma de poliuretano, sino también una eliminación controlada del soporte polimérico durante su secado y calcinación final.

La eliminación de la espuma de poliuretano por descomposición térmica a una velocidad de calentamiento controlada fue otra variable estudiada para obtener el material poroso reticulado. A partir del análisis termogravimétrico, se estableció una temperatura de 700 °C y una velocidad de calentamiento de 5 °C/min para lograr una descomposición lenta y completa del poliuretano orgánico. Asimismo, se estudió un tratamiento térmico adicional posterior para la sinterización del material poroso reticulado y alcanzar una mayor resistencia mecánica. La Tabla 5.6 muestra los datos de porosidad (ϵ) y resistencia mecánica obtenidos para los diferentes materiales porosos reticulados tipo perovskita ($\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ -RPP) obtenidos después de la primera calcinación a 700 °C (RPP-700) y la segunda calcinación a 1000 y 1200 °C (RPP-1000 y RPP-1200).

Tabla 5.6. Porosidad y resistencia mecánica de las diferentes estructuras porosas reticuladas tipo perovskita $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ formuladas

Muestra RPP	T ^a _{final} (°C)	ϵ	Resistencia (N)
RPP-700	700 °C	Estructura no estable	
RPP-1000	1000 °C	0,60	14 ± 3
RPP-1200	1200 °C	0,30	23 ± 3

Como se recoge en la Tabla 5.6, a 1000 °C se logró un material poroso reticulado estable con una resistencia mecánica de 14 N y una porosidad de 0,6. El aumento de la temperatura en la segunda calcinación hasta 1200 °C mejoró considerablemente la resistencia mecánica hasta 23 N, sin embargo, disminuyó la porosidad hasta 0,3. Probablemente, se deba a la contracción y el colapso parcial de la estructura con la temperatura. Por otro lado, se demostró que una temperatura de calcinación de 700 °C resulta insuficiente para obtener un material poroso reticulado con la resistencia mecánica adecuada. La Figura 5.34 muestra imágenes de los diferentes materiales RPP calcinados a 700, 1000 y 1200 °C.

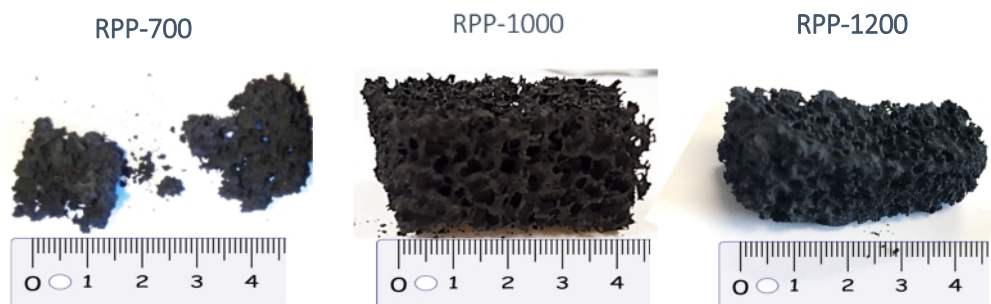


Figura 5.34. Imágenes de los materiales porosos reticulados calcinados a 700, 1000 y 1200 °C

Finalmente, se evaluaron los patrones difracción de rayos-X obtenidos para los diferentes materiales porosos reticulados conformados después de su trituration (RPP-700, RPP-1000 y RPP-1200), y se compararon con el difractograma obtenido tras la síntesis directa de la perovskita $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ en polvo. Como se puede observar en la Figura 5.35, el material RPP-700 mostró los picos de difracción característicos a $22,6^\circ$, $32,2^\circ$, $39,8^\circ$, $46,2^\circ$ y $57,4^\circ$, correspondientes a planos (101), (121), (220), (202) y (240) de la estructura ABO_3 estándar de los materiales tipo perovskita (archivo JCPDS: 37–1493). El material RPP-1000 conserva la estructura típica de perovskita ABO_3 , aunque en su difractograma aparecen señales de difracción a 30° , que se atribuyen a la presencia de bentonita. En el caso del material RPP-1200, la intensidad de las señales características de la estructura tipo perovskita ABO_3 disminuyó considerablemente. Además, se observaron picos de difracción adicionales que se atribuyen a la segregación de bentonita (28° - 30°), óxidos de cobre ($\sim 35^\circ$) y óxidos de manganeso y lantano ($\sim 43^\circ$ - 47°). Estos resultados evidenciaron que la temperatura de calcinación de 1200°C promovió la conversión parcial de la estructura de perovskita a otras fases cristalinas.

Una temperatura de calcinación de 1000°C (RPP-1000) resulta ser la mejor opción para obtener un material poroso reticulado con una considerable resistencia mecánica a la rotura por compresión y una la estructura cristalina tipo perovskita ortorrómbica ABO_3 .

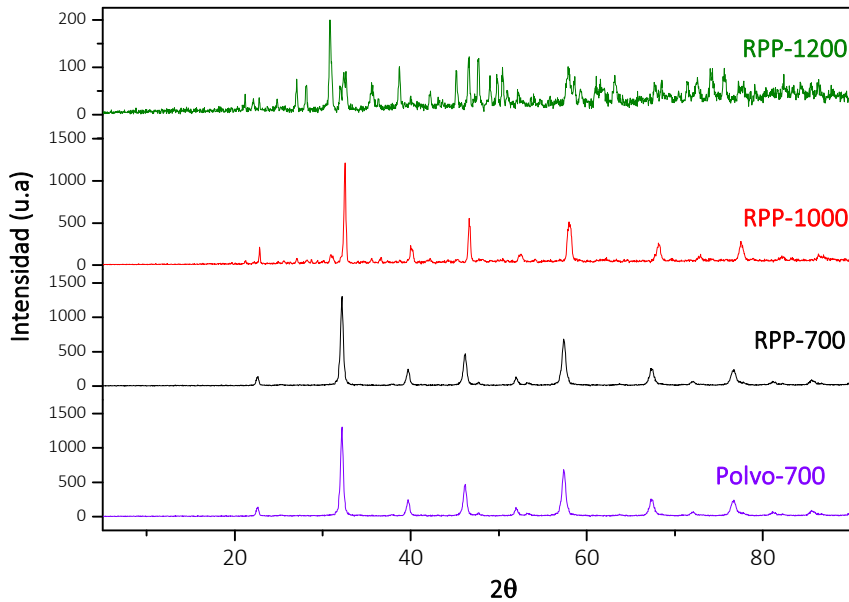


Figura 5.35. DRX de los materiales porosos reticulados y de la síntesis de la perovskita $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ en polvo

5.4.2. Actividad y estabilidad del material $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ en polvo

Una vez realizada la síntesis y caracterización del material $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ en polvo, se realizaron experimentos preliminares en discontinuo con la finalidad de evaluar la influencia de la temperatura y el pH del agua residual en el tratamiento de un agua residual hospitalaria dopada con 15 mg/L de CZP como contaminante farmacéutico modelo (Pariente y col., 2013; Martínez y col., 2007). Estos experimentos se realizaron en un reactor discontinuo de tanque agitado no presurizado bajo las condiciones de reacción recogidas en la Tabla 4.8 (apartado 4.4.2.1 del procedimiento experimental). Como ya se mencionó anteriormente, la actividad catalítica se analizó en términos de conversión de peróxido de hidrógeno y eliminación de CZP. Asimismo, la estabilidad del catalizador se evaluó teniendo en cuenta la lixiviación de las especies metálicas presentes en el material durante la reacción.

La temperatura (30, 50 y 70 °C) y el pH (3, 5,5 y natural: 7,5) fueron las variables estudiadas en los experimentos en discontinuo trabajando con una concentración de 700 mg/L de H_2O_2 , 0,6 g/L de perovskita en polvo y 700 rpm de

agitación para eliminar 15 mg/L de carbamazepina dopados a la matriz de agua hospitalaria. La Figura 5.36 muestra la conversión de H_2O_2 y la eliminación de CZP de los experimentos realizados a diferentes valores de pH (3, 5,5 y natural: 7,5) y a tres temperaturas de 30, 50 o 70 °C. Cabe recordar que los experimentos en discontinuo se llevaron a cabo hasta un tiempo final donde el peróxido de hidrógeno se consumió por completo.

Las Figuras 5.36 (a) y (b) muestran la conversión de H_2O_2 y la eliminación de CZP obtenidas durante los ensayos catalíticos realizados a un valor de pH inicial de 7,5, el cual corresponde con el valor del pH natural del agua residual hospitalaria, a 30, 50 y 70 °C de temperatura. Como se puede observar en esas Figuras, la velocidad de descomposición del oxidante aumenta claramente con la temperatura, logrando una conversión completa a 220 min, 180 min y 120 min para 30, 50 y 70 °C, respectivamente. Asimismo, las tasas de eliminación de CZP también aumentaron significativamente con la temperatura, alcanzando eliminaciones del 5 %, 75 % y 100 % al final de cada reacción a 30, 50 y 70 °C, respectivamente

Por otra parte, se realizaron dos blancos de reacción se realizaron a 70 °C y al pH natural del agua residual hospitalaria: i) en ausencia de catalizador para determinar la capacidad oxidativa del peróxido de hidrógeno; y ii) en ausencia de oxidante para estudiar la capacidad de adsorción de la perovskita. Estos ensayos revelaron una baja eliminación de CZP (< 25 %) por la acción combinada del H_2O_2 y la temperatura y una adsorción despreciable de la CZP sobre el catalizador (Figura 5.37). Finalmente, se evaluó también la mineralización del carbono orgánico total (COT) de los ensayos realizados a 30, 50 y 70 °C con el pH natural del agua residual hospitalaria, observándose una baja disminución para todas las temperaturas estudiadas. La composición de la matriz del agua residual hospitalaria, en la cual hay una importante cantidad de urea, puede ser la responsable de esta baja mineralización de COT (Muñoz y col., 2016). El efecto de la matriz sobre la mineralización del carbono orgánico total se confirmó tras la realización de una reacción a 70 °C con CZP en agua ultrapura en lugar del agua hospitalaria (Figura 5.38). Como se puede observar, en este caso, se obtuvo una mineralización notable del COT de aproximadamente un 40 % tras 120 min de reacción.

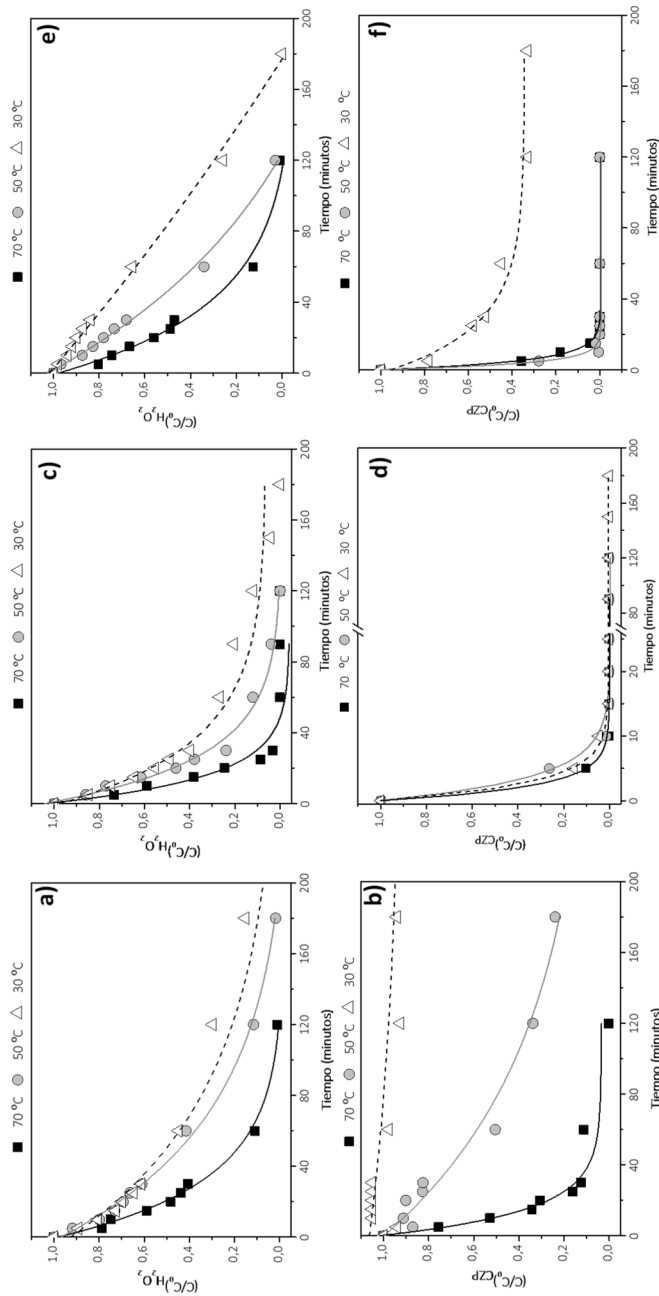


Figura 5.36. Perfiles de concentración normalizada de peróxido de hidrógeno y carbamazepina obtenida durante los test catalíticos a valores iniciales de pH de 7,5 (a) y (b), 3 (c) y (d), 5,5 (e) y (f) para diferentes temperaturas de reacción (30, 50 y 70 °C) operando en discontinuo con la perovskita $LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O_3$ en polvo a: $[H_2O_2]_0 = 700$ mg/L, $[catalizador] = 0,6$ g/L, $[CZP] = 15$ mg/L en agua hospitalaria y una agitación =700 rpm

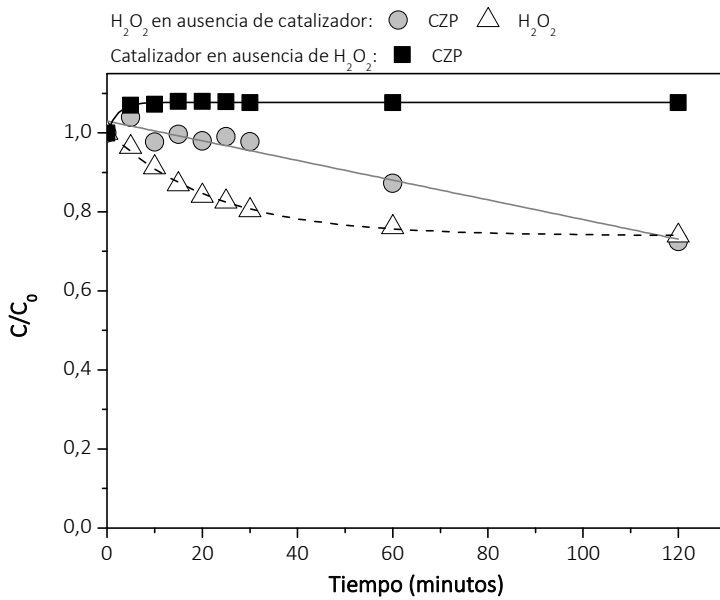


Figura 5.37. Perfiles de concentración normalizada obtenidos para los blancos de reacción en discontinuo a pH 7,5, 70 °C, 700 rpm y 15 mg/L de CZP en agua hospitalaria operando en ausencia de catalizador: [H₂O₂]₀ = 700 mg/L y en ausencia de peróxido de hidrógeno: [LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O₃] polvo = 0,6 g/L

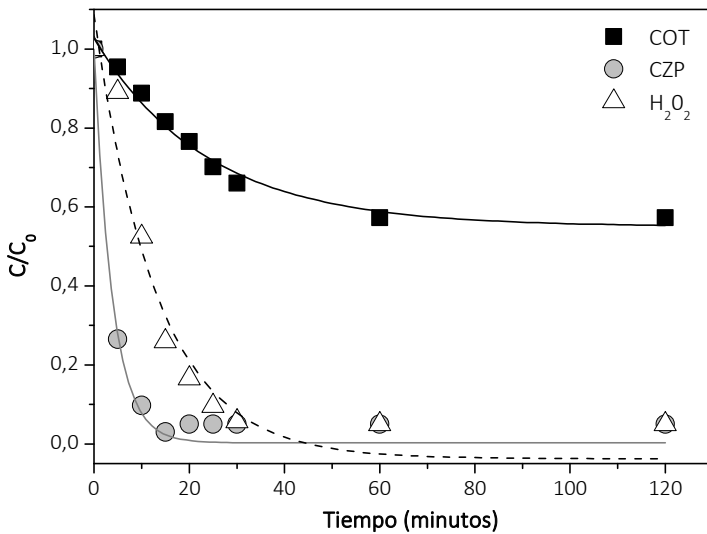


Figura 5.38. Perfiles de concentración normalizada para COT, CZP y H₂O₂ obtenidos para los experimentos en discontinuo a pH 7,5, 70 °C, 700 rpm, [H₂O₂]₀ = 700 mg/L, [LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O₃] polvo = 0,6 g/L y 15 mg/L de CZP en agua ultrapura

La estabilidad del catalizador $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ durante las reacciones realizadas se evaluó mediante el análisis de la concentración de iones metálicos disueltos a tiempo final en el medio de reacción. En la Tabla 5.7 se recogen los resultados obtenidos, los cuales mostraron que la lixiviación de las especies metálicas que conforman el catalizador fue insignificante operando a un pH de 7,5, con valores de concentración para el La y Mn por debajo del límite de detección ($< 0,2$ mg/L) e inferiores a $0,7$ mg/L para Cu (lo que corresponde a menos del 1 % del contenido de Cu del catalizador).

Table 5.7. Concentración de las especies metálicas disueltas en el agua en los ensayos realizados a diferentes temperaturas y pH con el catalizador $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ en polvo

pH	Tª (°C)	Concentración de lixiviado final en el medio (mg/L)		
		La*	Cu*	Mn*
7,5	70	$< 0,2$ ($< 0,06$ %)	$0,37 \pm 0,06$ (0,5 %)	$< 0,2$ ($< 0,3$ %)
	50	$< 0,2$ ($< 0,06$ %)	$0,48 \pm 0,07$ (0,6 %)	$< 0,2$ ($< 0,3$ %)
	30	$< 0,2$ ($< 0,06$ %)	$0,67 \pm 0,06$ (0,9 %)	$< 0,2$ ($< 0,3$ %)
5,5	70	$0,60 \pm 0,02$ (0,2 %)	$1,24 \pm 0,90$ (1,6 %)	$1,39 \pm 0,09$ (2,1 %)
	50	$1,10 \pm 0,03$ (0,3 %)	$1,57 \pm 0,91$ (2 %)	$3,66 \pm 0,07$ (5,5 %)
	30	$0,97 \pm 0,03$ (0,3 %)	$1,27 \pm 0,90$ (1,6 %)	$1,11 \pm 0,095$ (1,7 %)
3	70	94 ± 1 (28 %)	19 ± 1 (25 %)	21 ± 1 (31 %)
	50	113 ± 3 (33 %)	22 ± 1 (28 %)	25 ± 1 (37 %)
	30	87 ± 1 (26 %)	18 ± 1 (23 %)	20 ± 1 (30 %)

* Valores entre paréntesis: porcentaje de metal lixiviado respecto a su masa inicial

La acidificación del agua residual hospitalaria hasta un valor de pH inicial de 3 mostró un aumento significativo en la conversión de peróxido de hidrógeno y en la eliminación de CZP incluso para una temperatura de 30 °C (Figura 5.36 (c) y (d)). Una eliminación completa de CZP se alcanzó en menos de 20 minutos a esta temperatura, siendo necesario menos de 10 minutos al operar con 50 y 70 °C. Por otro lado, la eliminación de COT también aumentó a pH 3, logrando valores de 19, 31 y 36 % para 30, 50 a 70 °C, respectivamente. Sin embargo, cabe destacar que la lixiviación de las especies metálicas del catalizador $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ aumentó considerablemente, obteniendo concentraciones de La, Cu y Mn a tiempo final de reacción entre 87-113, 18-22 y 20-25 mg/L, respectivamente (Tabla 5.7). Por lo tanto, se puede concluir que la acidificación del agua residual hasta un valor de pH de 3 afecta significativamente la estabilidad del material tipo perovskita $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$, limitando su aplicación como catalizador tipo Fenton heterogéneo.

Los experimentos con la matriz de agua residual hospitalaria acidificada a 5,5 (Figura 5.36 (e) y (f)) también mostraron una buena actividad catalítica de la

perovskita $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$, alcanzando altas tasas de conversión de peróxido de hidrógeno y eliminación de carbamazepina. Se lograron eliminaciones de CZP superiores al 95 % en menos de 15 minutos a 50 y 70 °C. Cuando la temperatura se fijó a 30 °C, la eliminación de CZP fue significativamente mayor que la obtenida a un pH de 7,5. Sin embargo, a dicha temperatura, su eliminación siguió siendo inferior al 70 % tras 180 minutos de reacción. Por lo tanto, los resultados parecen indicar que una temperatura mínima de 50 °C es necesaria para obtener una degradación rápida de CZP. Con respecto a la estabilidad del catalizador (Tabla 5.7), la concentración de metales de La, Cu y Mn después de la reacción estuvo en el rango de 0,6-1,1, 1,2-1,6, 1,1-3,7 mg/L, respectivamente. Estas concentraciones corresponden a porcentajes de lixiviación de los metales del catalizador inferiores al 6 % en todos los casos. Por otra parte, la temperatura no mostró una influencia significativa sobre la estabilidad del catalizador. Estos resultados de la lixiviación de los metales de la perovskita $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ demuestran una mayor estabilidad del Cu en comparación con otros catalizadores que contienen cobre que operan en condiciones de reacción análogas (Melero y col., 2006; Sotelo y col., 2004; Ovejero y col., 2001), lo que hace que el catalizador tipo perovskita propuesto se considere un material prometedor para su aplicación en procesos Fenton.

En resumen, se puede concluir que la actividad del material perovskita $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ en términos de eliminación de CZP aumentó progresivamente con la disminución del pH. Sin embargo, la acidificación del medio afectó considerablemente a la estabilidad del catalizador. Los mejores resultados, donde se alcanzó un compromiso entre actividad y estabilidad del catalizador, se obtuvieron operando a un valor de pH de 5,5 y una temperatura de 50 °C. Este pH es el valor mínimo en el que la lixiviación de especies metálicas y, en consecuencia, la pérdida de fase activa fue insignificante. Al mismo tiempo que 50 °C fue la temperatura mínima requerida para obtener una alta actividad catalítica en términos de eliminación de CZP y consumo de peróxido de hidrógeno. A 50 °C y un pH inicial de 5,5, se alcanzó una eliminación total de CZP en apenas 10 minutos y una mineralización de COT aproximadamente del 22 % después de 120 minutos de reacción. Además, cabe destacar que estos resultados se obtuvieron utilizando una carga de catalizador (0,6 g/L) y una concentración de peróxido de hidrógeno (0,7 g/L), concentraciones que son inferiores a las empleadas en otros trabajos en bibliografía para la eliminación de CZP a través de procesos Fenton homogéneos y heterogéneos. Sun y col. (2013) apenas lograron un 3 % de eliminación de 15 mg/L de CZP tras 180 minutos de reacción trabajando con un catalizador homogéneo de Fe^{III} a pH neutro, temperatura ambiente y 0,6 g/L de H_2O_2 (Sun y col., 2013 a). Posteriormente, consiguieron mejorar la eliminación de CZP hasta un 86 % a pH neutro y temperatura ambiente, pero utilizando un catalizador heterogéneo de nano-partículas de Fe_3O_4 con una

concentración de 1,8 g/L y 20 g/L de H₂O₂ (Sun y col., 2013 b). Sin embargo, con este mismo catalizador una disminución de la concentración de catalizador y H₂O₂ hasta 1 g/L y a 3,4 g/L, respectivamente, disminuyó drásticamente la actividad del catalizador, obteniendo únicamente una eliminación de CZP del 6 % tras 120 minutos (Sun y col., 2014). Micropartículas de CuFeO₂ también se probaron para la eliminación de CZP en agua, consiguiendo un 31 % de eliminación del contaminante tras 60 minutos de reacción a temperatura ambiente y pH neutro, pero utilizando concentraciones de H₂O₂ de 7 g/L y de catalizador de 1 g/L (Ding y col., 2016), las cuales son muy superiores a las descritas en este trabajo (0,7 g/L y 0,6 g/L, respectivamente).

La actividad y estabilidad de la perovskita LaCu_{0,5}Mn_{0,5}O₃ como catalizador heterogéneo del proceso Fenton se estudió para la eliminación de carbamazepina presente en una matriz de agua hospitalaria. La perovskita en polvo mostró una eliminación completa de CZP tras 120 minutos de reacción con valores bajos de lixiviación de metales (< 1 mg/L) trabajando al pH natural del agua residual (7,5) y a 70 °C. A un valor de pH 3, la estabilidad de la perovskita disminuyó drásticamente. Sin embargo, la acidificación del agua hasta un valor de pH de 5,5 permite una eliminación completa de CZP en 20 minutos con una mejora notable de la estabilidad del catalizador.

5.4.3. Actividad catalítica de materiales porosos reticulados tipo perovskita LaCu_{0,5}Mn_{0,5}O₃ en reactores de lecho fijo para procesos Fenton

Los dos materiales porosos reticulados RPP-1000 y RPP-1200, en los que se obtuvo una estructura con suficiente resistencia mecánica, se probaron en un reactor de lecho fijo catalítico para la eliminación de 15 mg/L de CZP dopada a un agua residual hospitalaria. Estos ensayos se realizaron a 70 °C, un valor de pH inicial de 5,5 y concentración de peróxido de hidrógeno de 700 mg/L. Como se puede observar en la Figura 5.39, el material calcinado a 1200 °C (RPP-1200) presentó una menor actividad que el calcinado a 1000 °C (RPP-1000), alcanzando aproximadamente una conversión de H₂O₂ del 20 % y una eliminación de CZP del 65 %. Por el contrario, el material RPP-1000 alcanzó una conversión total de oxidante con una eliminación de CZP superior al 90 %. El menor rendimiento catalítico del material calcinado a 1200 °C (RPP-1200) se atribuye a la pérdida de la fase activa de la perovskita, así como a baja porosidad de la estructura reticulada con el aumento de la temperatura de calcinación final. Finalmente, cabe destacar que ambos materiales mantuvieron la estructura porosa reticulada tras las 5 horas de tratamiento del agua residual con un

tiempo de residencia hidráulico de 3 min. Además, la lixiviación global de las especies metálicas del catalizador perovskita fue prácticamente despreciable.

Con la finalidad de evaluar la influencia de la temperatura en la eficacia del proceso Fenton realizado en el reactor de lecho fijo y utilizando como catalizador el material poroso reticulado seleccionado (RPP-1000), se realizaron dos ensayos adicionales a las temperaturas de 50 y 90 °C. Estos experimentos se realizaron manteniendo la acidificación del agua residual hospitalaria a un valor de 5,5, la cantidad de H₂O₂ dosificada 700 mg/L y el tiempo de residencia a los 3 min. La Figura 5.40 muestra la conversión de peróxido de hidrógeno y la eliminación de CZP después de 5 horas de operación en continuo a 50, 70 y 90 °C. En el anexo 7.6 se recogen los perfiles de H₂O₂ y CZP obtenidos en estos ensayos durante el tiempo de reacción (Figura 7.5). A 50 °C, una vez alcanzado el estado estacionario, se eliminó el 82 % de CZP. Sin embargo, no se utilizó todo el peróxido de hidrógeno alcanzando un 74 % de conversión del oxidante. El aumento de temperatura hasta 90 °C permitió una conversión total del H₂O₂, aumentando también la eliminación de CZP hasta un 92 %. De nuevo, cabe destacar que la estabilidad del material de perovskita poroso reticulado no se vio afectada por la variación de la temperatura, con concentraciones de La, Cu y Mn en el efluente final en un rango de 0,2-3,8 mg/L, 1-2,3 mg/L y 3,2-5,9 mg/L, respectivamente. La lixiviación global de las especies metálicas presentes en el catalizador sólido después de 5 horas de operación fue en todos los casos inferior al 8 %, lo que indica que el material poroso reticulado presenta una alta estabilidad.

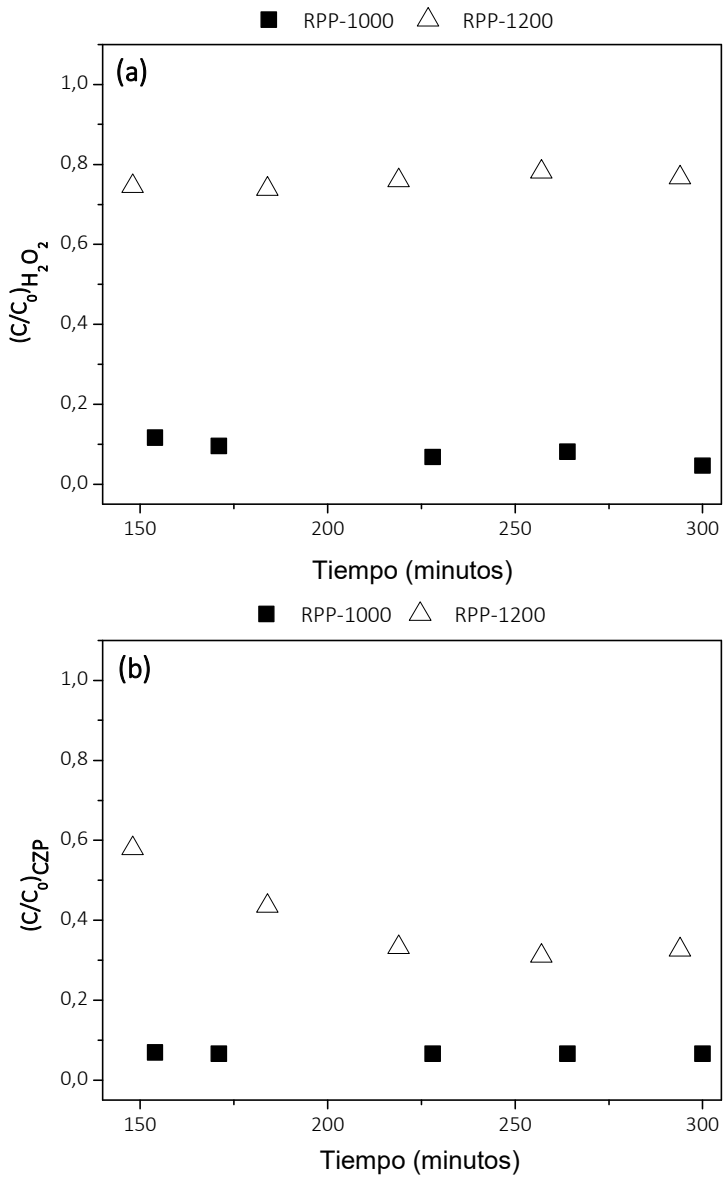


Figura 5.39. Concentración normalizada de (a) H₂O₂ y (b) carbamazepina de los ensayos catalíticos realizados con los catalizadores RPP-1000 y RPP-1200 (Condiciones de reacción: 70 °C, pH 5,5, 700 mg/L de H₂O₂, 3 g de espuma y 15 mg/L de CZP)

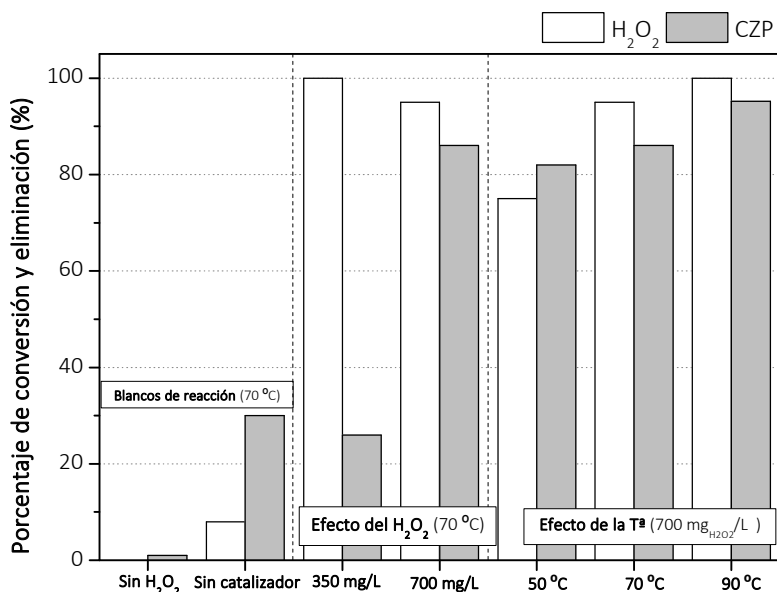


Figura 5.40. Influencia de la temperatura y de la concentración de H₂O₂ en la eficacia del proceso Fenton continuo utilizando el catalizador poroso reticulado en el reactor de lecho fijo (Condiciones de reacción: 3 g de RPP-1000, pH 5,5, 15 mg/L de CZP en la matriz de agua hospitalaria y tiempo de residencia de 3 minutos)

Por otro lado, se evaluó la influencia de la concentración inicial de H₂O₂ reduciendo su concentración de 700 a 350 mg/L a 70 °C, para evaluar la actividad del catalizador poroso reticulado tipo perovskita con una dosis menor de oxidante (Figura 5.42), ya que cabe destacar que el consumo de peróxido de hidrógeno es el coste de operación más significativo en los procesos tipo Fenton. En el anexo 7.6 se recogen los perfiles de H₂O₂ y CZP obtenidos en estos ensayos durante las 5 horas de tratamiento (Figura 7.6). Como se puede observar en la Figura 5.40, la eliminación de carbamazepina disminuyó del 86 % al 32 % tras 5 horas de operación, lo cual resultó una reducción muy drástica de actividad poniendo de manifiesto la necesidad de una mayor concentración del oxidante.

Adicionalmente, se realizó un ensayo en ausencia de peróxido de hidrógeno que mostró una eliminación insignificante de CZP, evidenciando la importancia del oxidante en la producción de radicales hidroxilo y consecuentemente en la oxidación de carbamazepina. El catalizador monolítico fue muy estable incluso trabajando a 90 °C. La temperatura intermedia de 70 °C permitió una alta eliminación de CZP (más del

80 %) con una conversión del oxidante prácticamente completa (93 %). Por otra parte, los resultados de la reacción realizada en ausencia de catalizador (Figura 5.40), donde se reemplazó la estructura RPP-1000 por un volumen equivalente de esferas vítreas de 1 mm de diámetro, alcanzó únicamente un 30 % de eliminación de CZP por la acción oxidante del peróxido de hidrógeno a la temperatura que se utilizó de 70 °C. Estos resultados remarcan el importante papel del catalizador en la descomposición del peróxido de hidrógeno para la formación de radicales hidroxilo.

Actualmente, pocos trabajos han abordado el estudio de procesos continuos tipo Fenton utilizando sistemas catalíticos heterogéneos durante largos períodos de operación. Shao y col., (2018) obtuvieron una alta conversión de fenol (> 90 %) trabajando con nanopartículas de hierro soportadas sobre un catalizador de carbono mesoporoso en un reactor continuo tipo lecho fijo con un caudal entre 2 a 6 mL/min y una altura del lecho de 1 a 3 cm. Sin embargo, observaron disminuciones en la actividad catalítica tras 39 horas de reacción. Un catalizador heterogéneo de Fe-Al₂O₃ altamente disperso (6 % de Fe en peso) obtuvo altos niveles de mineralización de fenol (mineralización de COT > 70 %) durante 70 horas de reacción en un reactor de lecho fijo con flujo ascendente. Sin embargo, vieron una pérdida acumulativa de un 20 % del Fe que inicialmente se cargó al reactor (Di Luca y col., 2018). En este trabajo, el catalizador tipo perovskita LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O₃ en forma de estructura porosa reticulada (RPP-1000) se probó durante 70 horas a una temperatura de 70 °C, pH 5,5 y 700 mg/L de concentración de H₂O₂ en el tratamiento continuo de un agua residual hospitalaria. La Figura 5.41 muestra los resultados de la conversión de oxidante y eliminación de CZP a lo largo del tiempo de operación. Cabe destacar que la eliminación de CZP aumentó después de 10 horas acompañada de un consumo completo de peróxido de hidrógeno. Posteriormente, el catalizador mantuvo su actividad durante las 70 horas con una eliminación total de CZP y una descomposición completa del peróxido de hidrógeno. Asimismo, el catalizador mantuvo su estructura reticular porosa su resistencia mecánica a un pH moderado.

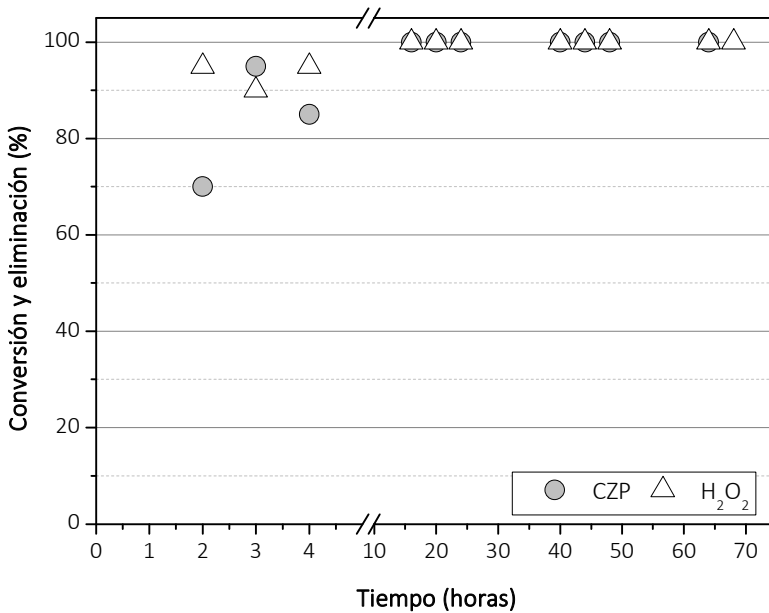


Figura 5.41. Ensayo de durabilidad y estabilidad del catalizador poroso reticulado (RPP-1000) para el tratamiento en continuo de un agua residual hospitalaria en un reactor de lecho fijo (Condiciones de reacción: 70 °C, 700 mg/L H₂O₂, 3 g de RPP-1000, pH 5,5, y 15 mg/L de CZP en la matriz de agua hospitalaria y tiempo de residencia de 3 minutos)

El material poroso reticulado de perovskita $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ a 1000 °C ha resultado muy estable en el tratamiento de un agua residual hospitalaria a un pH de 5,5 en un rango de temperaturas de 50 a 90 °C. Aunque su actividad aumente significativamente con la temperatura, a 70 °C se obtuvo la eliminación completa de CZP y una conversión total cuando este catalizador se probó durante 70 horas de operación en continuo en un reactor de lecho fijo. La disminución de la concentración de peróxido mostró una drástica disminución de la eliminación de CZP.

5.4.4. Proceso Fenton con catalizador de perovskita soportado en un material poroso reticulado para la eliminación de microcontaminantes farmacéuticos de un agua residual hospitalaria

Para concluir este capítulo de resultados, se evaluó el tratamiento del agua residual hospitalaria utilizando el material poroso reticulado tipo perovskita $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$, sin la adición de CZP como microcontaminante modelo. En esta agua residual, se detectaron 17 microcontaminantes farmacéuticos de la lista de los 22 analizados. La Figura 5.42 muestra la concentración de los compuestos farmacéuticos antes y después, así como su porcentaje de eliminación tras el tratamiento mediante el proceso Fenton utilizando como catalizador el material poroso reticulado RPP-1000 en el reactor de lecho fijo.

De igual manera que durante el tratamiento de esta agua hospitalaria mediante el proceso de biooxidación avanzada, la ciclofosfamida (CPD), fue el fármaco detectado en mayor concentración, seguido de 4-antiprina (4-AAA), amoxicilina (AMX), azitromicina (AZM), cafeína (CFN), iohexol (IHX) y sulpirida (SPD) fueron los compuestos más abundantes con concentraciones que varían de 10 a 390 $\mu\text{g/L}$. Gemfibrozilo (GFZ), ibuprofeno (IBP), ranitidina (RNT) y sulfametoxazol (SMX), los cuales actúan como regulador lipídico, antiinflamatorio y antibiótico respectivamente, se detectaron en concentraciones entre 1 y 10 $\mu\text{g/L}$. El resto de los compuestos como carbamazepina (CZP), diclofenaco (DCF), hidroclorotiazida (HCT), metoprolol (MTP), metronidazol (MDZ) y progesterona (PGT), se detectaron en concentraciones mucho más bajas ($< 0,5 \mu\text{g/L}$). Estos resultados están de acuerdo con la caracterización típica de estos efluentes donde los analgésicos, antibióticos y agentes de contraste son algunos de los principales grupos terapéuticos contribuyentes (Santos y col., 2013)

El catalizador poroso reticulado mostró una alta eficacia en la eliminación de 8 de los microcontaminantes detectados con concentraciones después del tratamiento por debajo de los límites de detección (AMX, DCF, GFZ, IBP, MDZ, PGT, RNT y SMX). Todos los compuestos más abundantes (CPD, AZM, IHX, SPD, AMX, 4-AAA y CFN) fueron eliminados con eficiencias entre 97 y 100 %. Solo algunos compuestos detectados a bajas concentraciones, como carbamazepina (CZP: $0,13 \pm 0,01 \mu\text{g/L}$) o metoprolol (MTP: $0,42 \pm 0,45 \mu\text{g/L}$) mostraron tasas de eliminación más bajas. La baja eficiencia de eliminación de estos compuestos puede deberse su menor concentración.

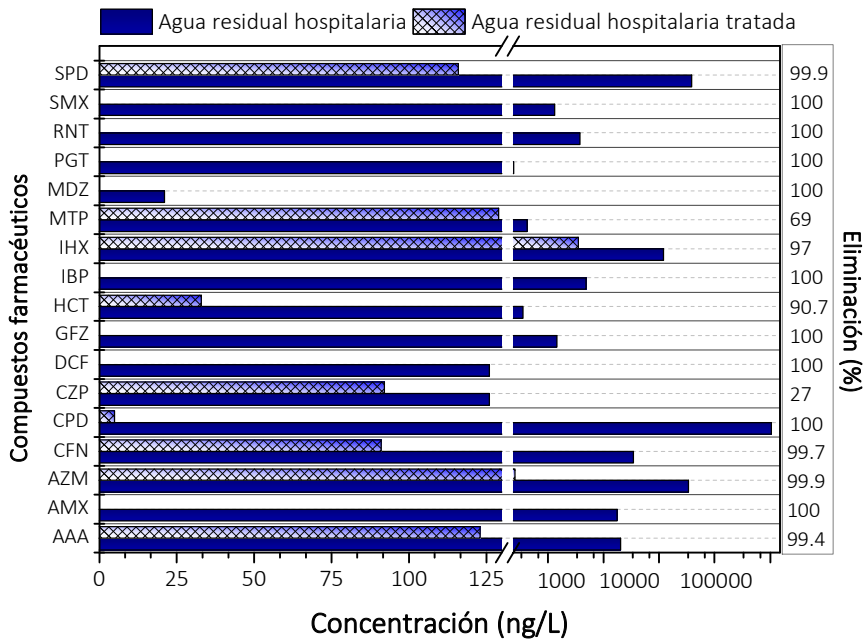


Figura 5.42. Concentración de los compuestos farmacéuticos detectados en el agua hospitalaria y tras el tratamiento en continuo tipo Fenton con el catalizador poroso reticulado en el reactor de lecho fijo (Condiciones de reacción: 70 °C, 700 mg/L H₂O₂, pH 5,5, 3 g de RPP-1000 y tiempo de residencia de 3 minutos)

Finalmente, cabe destacar que la concentración residual de compuestos farmacéuticos presentes en el agua tras el tratamiento de oxidación Fenton (4-AAA = 0,12; AZM = 0,26; CFN = 0,091; CZP = 0,092; HCT = 0,033; IHX = 3; MTP = 0,13 y SPD = 0,12 µg/L) son menores que las concentraciones mínimas que causa un efecto de toxicidad crónica (EC50) o aquella que es letal (LC50) sobre uno de los tres niveles tróficos analizados: algas, *Daphnia* y peces (4-AAA = 2 - 7 mg/L; AZM = 19 µg/L; CFN = 40 mg/L; CZP = 200 mg/L; HCT = 298 mg/L; IHX > 250 mg/L y MTP = 6 mg/L). Por lo tanto, puede descartarse cualquier riesgo sobre los organismos acuáticos después de este tratamiento tipo Fenton.

Los compuestos farmacéuticos detectados en mayor concentración en el agua residual hospitalaria (CPD, 4-AAA, AMX, AZM, CFN, IHX y SPD) obtuvieron altas tasas de eliminación entre un 95 y 100 %. Únicamente, dos de los compuestos detectados inicialmente en bajas concentraciones (CZP y MTP < 1 µg/L) mostraron una disminución de sus tasas de eliminación. La actividad catalítica y estabilidad de la perovskita

LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O₃ en forma material poroso reticulado operando a condiciones de temperatura y pH moderadas hacen de este material un catalizador prometedor para su futura aplicación en procesos Fenton usando reactores de lecho fijo.

6. Conclusiones y recomendaciones

Como resultado del trabajo de investigación llevado a cabo sobre el tratamiento de aguas residuales reales y la eliminación de los compuestos farmacéuticos presentes en ellas mediante un proceso de biooxidación con *Trametes versicolor* y un proceso de oxidación avanzada con catalizadores porosos reticulados tipo perovskita se han extraído las siguientes conclusiones.

CAPÍTULO I

1. El proceso de biooxidación avanzada con *T. versicolor* en un sistema de contactores biológicos rotativos permitió el tratamiento en continuo del agua residual sintética y del agua residual real procedente de la depuradora a escala planta piloto de la URJC fortificadas con una concentración conocida de compuestos farmacéuticos. Durante los tratamientos se alcanzaron altas tasas de eliminación de COT (68 y 82 %), N-NH₄⁺ (73 y 61 %), P-PO₄³⁻ (70 %) y los compuestos farmacéuticos estudiados durante los 120 y 35 días de operación, respectivamente.

El cambio de la matriz de agua sintética al agua real no afectó a la eficacia del proceso, manteniendo una actividad similar en ambos casos. El sistema de CBRs se mantuvo activo durante los tratamientos operando bajo condiciones no estériles, sin renovación de la biomasa soportada en el sistema, sin la dosificación externa de oxígeno y sin control de la temperatura.

CAPÍTULO II

2. La adición del mediador quinónico y de las sales de hierro y manganeso intensifica el proceso de biooxidación avanzada por el cual se promueve la producción de radicales hidroxilo y, por consiguiente, mejora la eficacia obtenida para la eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos.

3. La disminución del TRH de la unidad de CBRs por debajo de 1 día reduce significativamente la eficacia del tratamiento del agua residual urbana, siendo especialmente relevante la disminución en las tasas de eliminación para los compuestos farmacéuticos estudiados.

4. La relación COT: P-PO₄³⁻ no es un parámetro significativo para el tratamiento del agua residual urbana con *Trametes versicolor*. Los resultados muestran que un bajo contenido de fósforo en el agua residual no limita el buen desarrollo del proceso de biooxidación avanzada. Por el contrario, la relación COT: N-NH₄⁺ presenta una influencia relevante en el proceso, mejorando ligeramente las tasas de eliminación de COT, N-NH₄⁺ y P-PO₄³⁻ al incrementarse dicha relación. Sin embargo, también promueve el desarrollo de comunidades bacterianas que pueden inhibir parcialmente la actividad fúngica reduciendo su eficacia en la eliminación de los contaminantes farmacéuticos.

5. El tratamiento en continuo de las diferentes aguas residuales urbanas procedentes de la depuradora a escala planta piloto de la URJC y de la EDAR de Toledo mediante un proceso de biooxidación avanzada con *T. versicolor* en el sistema de CBRs operando con un TRH de 1 día mostró un buen rendimiento en términos de reducción de COT y P-PO₄³⁻ (71-76 y 54-64 % respectivamente). Sin embargo, durante este tratamiento la reducción de N-NH₄⁺ obtenida fue inferior al 10-20 % debido al desarrollo de un proceso de amonificación en el sistema que produjo la liberación de este compuesto al agua. El sistema presenta elevadas eficacias de eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos presentes en las aguas residuales urbanas, destacando las tasas de eliminación obtenidas para la carbamazepina, gemfibrozilo, hidroclorotiazida y sulfametoxazol, muy superiores a las obtenidas en los tratamientos de fangos activos. Además, el sistema es capaz de eliminar parcialmente el diclofenaco, compuesto altamente refractario a los tratamientos convencionales de fangos activos. Cabe destacar que el sistema de CBRs se mantuvo activo durante los tratamientos operando bajo condiciones no estériles, sin la necesidad de añadir sustratos adicionales fácilmente biodegradables, sin renovación de la biomasa soportada en el sistema, sin la dosificación externa de oxígeno y sin control de la temperatura.

6. A pesar de la proliferación de otras especies en el bioreactor como consecuencia del tratamiento del agua residual real en condiciones no estériles, las especies fúngicas presentan una contribución mayoritaria a los resultados de depuración del agua residual y a la eliminación de los microcontaminantes farmacéuticos obtenidos en el proceso de biooxidación avanzada en sistema de CBRs.

CAPÍTULO III

7. El tratamiento en continuo del agua residual hospitalaria mediante un proceso de biooxidación avanzada en dos unidades de CBRs modificado con planchas de madera como soporte para la biomasa permitió alcanzar reducciones de COT y $P-PO_4^{3-}$ del 80 y 75 % respectivamente, mientras que para el NKT se observó una mínima reducción del 20 % aproximadamente. Además, el ácido gálico introducido como mediador quinónico se elimina completamente durante el proceso, mientras que las sales de hierro son bioadsorbidas por la biomasa inmovilizada en los CBRs sin efectos perjudiciales. Además, se consiguen elevadas eliminaciones de los dieciocho compuestos farmacéuticos detectados inicialmente en agua residual hospitalaria, con tasas de eliminación superiores al 80 % para la mitad de los compuestos estudiados.

8. La presencia del sustrato de madera para inmovilización de la biomasa promueve la aparición de especies bacterianas y fúngicas típicas de la descomposición natural de la madera. Así, aunque el hongo *Trametes versicolor* se ve parcialmente desplazado por otras especies, esto no afecta a la eficacia del proceso, manteniendo los valores de depuración y eliminación de contaminantes farmacéuticos durante toda la operación. El funcionamiento de dos sistemas idénticos en paralelo confirmó la reproducibilidad de los resultados obtenidos, permitiendo proponer el proceso de biooxidación avanzada en el sistema de CBRs como un tratamiento alternativo eficaz para el tratamiento descentralizado de aguas residuales hospitalarias.

CAPÍTULO IV

9. La perovskita $LaCu_{0,5}Mn_{0,5}O_3$ mostró una elevada actividad y estabilidad como catalizador heterogéneo del proceso Fenton en un amplio rango de pH y temperatura, siendo 5,5 y 70 °C los valores óptimos para maximizar la eliminación de CZP como contaminante modelo y minimizando la lixiviación de las especies metálicas presentes en el catalizador.

10. El método de impregnación y réplica con calcinación final a temperatura de 1000 °C permite obtener un material poroso reticulado de considerable resistencia mecánica, manteniendo la estructura cristalina de la perovskita inicial.

11. El material poroso reticulado de perovskita $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ a $1000\text{ }^\circ\text{C}$ ha resultado muy estable en el tratamiento de un agua residual hospitalaria a un pH de 5,5 en un rango de temperaturas de 50 a $90\text{ }^\circ\text{C}$. La disminución de la concentración de peróxido mostró una drástica disminución de la eliminación de CZP.

12. El reactor de lecho fijo con un relleno catalítico de material perovskita macroporoso permitió la eliminación total (entre 90 y 100%) de los microcontaminantes farmacéuticos detectados en mayor concentración en el agua residual hospitalaria (CPD, 4-AAA, AMX, AZM, CFN, IHX y SPD). Únicamente, dos de los compuestos detectados inicialmente en bajas concentraciones (CZP y MTP $< 1\text{ }\mu\text{g/L}$) mostraron una disminución de sus tasas de eliminación. La elevada actividad catalítica y estabilidad de la perovskita $\text{LaCu}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{O}_3$ en forma de material poroso reticulado operando a condiciones de temperatura y pH moderadas hacen de este material un catalizador prometedor para su futura aplicación en procesos Fenton usando reactores de lecho fijo.

De la discusión de resultados y conclusiones obtenidas en el desarrollo de este trabajo de investigación se sugieren las siguientes recomendaciones para completar y avanzar en el trabajo hasta ahora realizado.

- Evaluación de la formación de metabolitos durante el proceso de eliminación de los compuestos farmacéuticos.
- En función de los resultados obtenidos, realizar estudios de ecotoxicidad del efluente tras el tratamiento de biooxidación y oxidación avanzada.
- Realización de un estudio tecno-económico y medioambiental que permita estudiar la viabilidad de implantar los tratamientos propuestos a escala industrial, ya sea cómo tratamiento biológico alternativo o como una planta descentralizada a la salida de un hospital antes de verter las aguas a los sistemas de saneamiento municipales.

7. Anexos

7.1. VALORES DE pK_a DE COMPUESTOS FARMACÉUTICOS DETECTADOS EN LOS INFLUENTES DE LAS DEPURADORAS

Tabla 7.1. Valores de pK_a para los compuestos farmacéuticos

Compuesto farmacéutico	pK_a	Referencia
Ácido clorifébrico	3,46	Muñoz y col. 2008
Antipirina	1,56	Muñoz y col. 2008
Atenolol	9,6	Muñoz y col. 2008; Ahuja, 2009
Amoxicilina	2,8	Demirezen y col., 2019
Azitromicina	8,7	Tasic y col., 2018
Bisfenol A	9,6	Thiebault y col., 2017
Cafeína	14	Vasiliadou y col. 2016
Carbamazepina	7	Vasiliadou y col. 2016; Ahuja, 2009
Ciclofosfamida	12,78	Muñoz y col. 2008
Ciprofloxacina	8,9	Muñoz y col. 2008
Claritromicina	8,9	Muñoz y col. 2008
Diclofenaco	4,14	Muñoz y col. 2008; Ahuja, 2009
Eritromicina	3,6	Ahuja, 2009
Furosemda	3,9	Muñoz y col. 2008
Gemfibrozilo	4,5	Muñoz y col. 2008
Hidroclorotiazida	7	Muñoz y col. 2008
Ibuprofeno	4,9	Muñoz y col. 2008; Ahuja, 2009
Iohexol	>13 (11,7)	Mendoza y col., 2015
Iopamidol	>13 (10,7)	Mendoza y col., 2015
Ketoprofeno	4,5	Muñoz y col. 2008; Ahuja, 2009
Metronidazol	2,4	Muñoz y col. 2008
Metoprolol	14,09 - 9,6	Muñoz y col. 2008; Ahuja, 2009
Naproxeno	4,2	Thiebault y col., 2017; Ahuja, 2009
Ofloxacina	7,9	Muñoz y col. 2008
Paracetamol	9,4	Muñoz y col. 2008; Ahuja, 2009
Propranolol	9,4	Muñoz y col. 2008; Ahuja, 2009
Ranitidina	0,3-6,7	Ahuja, 2009; Gómez-Canela y col. 2019
Sulfametoxazol	5,6	Muñoz y col. 2008; Ahuja, 2009
Sulpirida	9	Vasiliadou y col. 2016

7.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LOS BIOENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA

Previamente a la realización de los bioensayos de caracterización de la actividad microbiológica fue necesario realizar varios estudios previos donde se determinaron las condiciones de operación adecuadas para el desarrollo de un nuevo método que permitiera medir la actividad microbiológica de la biomasa obtenida durante los diferentes tratamientos realizados. De este modo, fue necesario seleccionar el sustrato orgánico y las concentraciones de bactericidas y fungicida utilizados.

Selección del sustrato orgánico biodegradable

El sustrato seleccionado debe ser fácilmente biodegradable por ambos tipos de microorganismos. Inicialmente, los compuestos seleccionados fueron metanol y acetato de sodio. En la Figura 7.1 se muestran los resultados de COT monitorizados durante los bioensayos de actividad realizados con los dos sustratos.

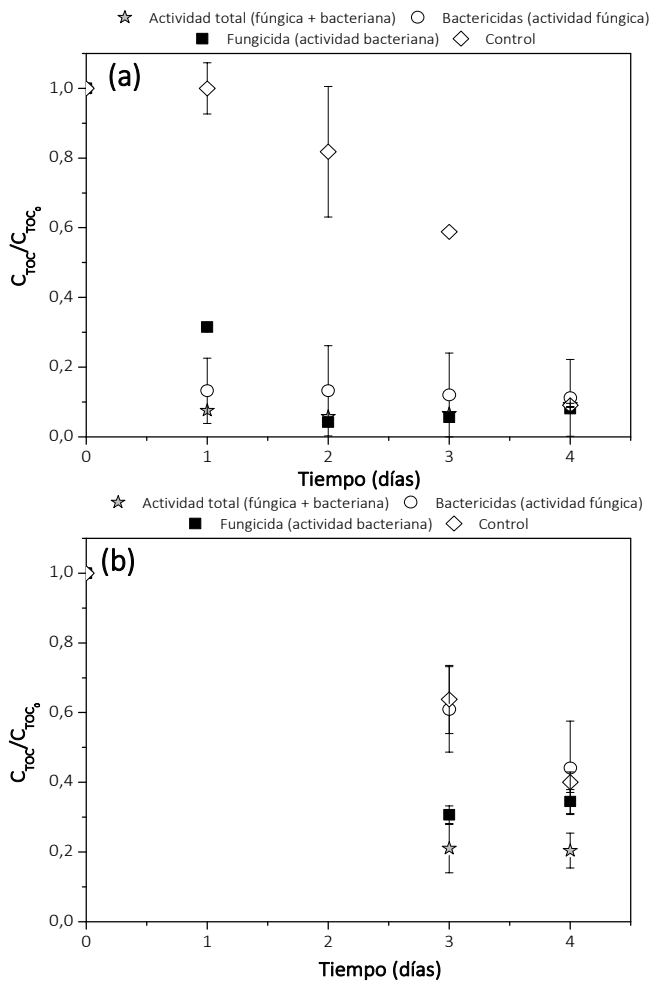


Figura 7.1. Determinación de las condiciones de operación para los ensayos de caracterización de la actividad biológica: evolución del COT durante el bioensayo con (a) acetato de sodio y (b) metanol

Como se puede observar en la Figura 7.1, los dos tipos microorganismos muestran tasas de eliminación de COT mayores cuando se trabaja con el acetato de sodio. Con el uso del metanol, el metabolismo de ambos se ralentiza especialmente para los hongos. Por ello, finalmente se seleccionó el acetato de sodio como sustrato adecuado para llevar a cabo los experimentos.

Selección de la concentración inhibitoria de bactericidas y fungicida

Los compuestos utilizados como inhibidores y los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC-*minimal inhibitory concentration*) se escogieron según estudios previos publicados, fijando la concentración de Ampicilina en 4 mg/L (Araya-Cloutier y col., 2017), Tetraciclina en 128 mg/L (Mawabo y col., 2015) y Nistatina en 100 mg/L (Han y col., 2012). De este modo, teniendo en cuenta estos valores, se realizó un primer bioensayo con estos valores con la finalidad de estudiar se son suficientes para inhibir completamente la actividad microbiana.

Como se puede observar en la Figura 7.2, donde se muestra la eliminación de COT para este primer bioensayo, estos valores de concentración de bactericidas y fungicida no fueron suficientes para inhibir la actividad de los microorganismos, ya que en el bioensayo donde se añadieron los tres reactivos (tetraciclina, ampicilina y nistatina) para inhibir completamente la actividad de la biomasa se obtuvo eliminación de COT tras 4 días.

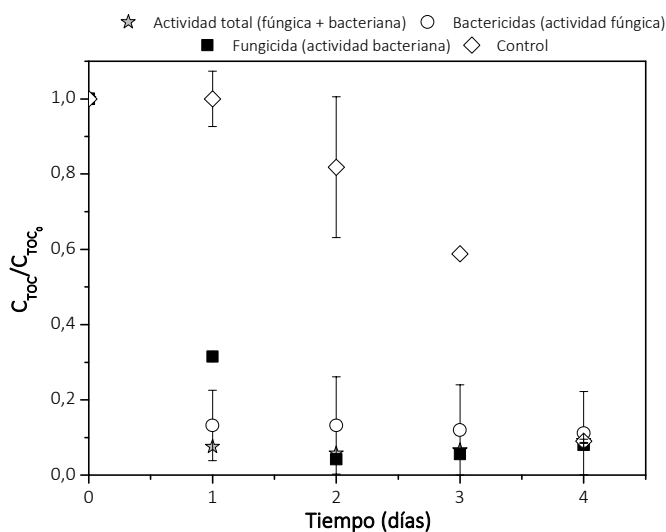


Figura 7.2. Determinación de las condiciones de operación para los ensayos de caracterización de la actividad biológica: evolución del COT durante el bioensayo con 4 mg/L de ampicilina, 128 mg/L de tetraciclina y 100 mg/L de nistatina

Por ello, en un siguiente bioensayo, se duplicó la concentración añadida de estos tres inhibidores. En la Figura 7.3 se muestran las eliminaciones de COT alcanzadas. En este caso, control sin actividad no muestra eliminación de carbono orgánico lo que demuestra que se ha realizado la completa inhibición de la actividad de la biomasa.

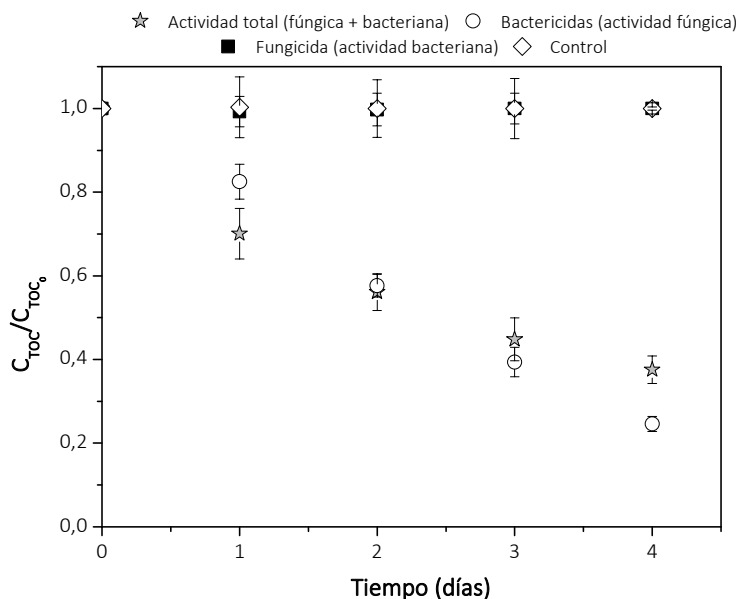


Figura 7.3. Determinación de las condiciones de operación para los ensayos de caracterización de la actividad biológica: evolución del COT durante el bioensayo con 8 mg/L de ampicilina, 256 mg/L de tetraciclina y 200 mg/L de nistatina

En esta gráfica se puede ver como los hongos sí que muestran eliminación de COT, mientras que cuando actúan únicamente las bacterias hay una eliminación nula. De este modo, se planteó un último bioensayo donde se volvió a reducir la concentración de bactericidas a la recogida en bibliografía y se mantuvieron los 200 mg/L de nistatina.

En la Figura 7.4 se muestran los resultados de eliminación de COT para este bioensayo. Como se puede observar con estas concentraciones de bactericidas, también se consiguió una eliminación nula de COT durante el experimento donde se añadieron todos los inhibidores de actividad.

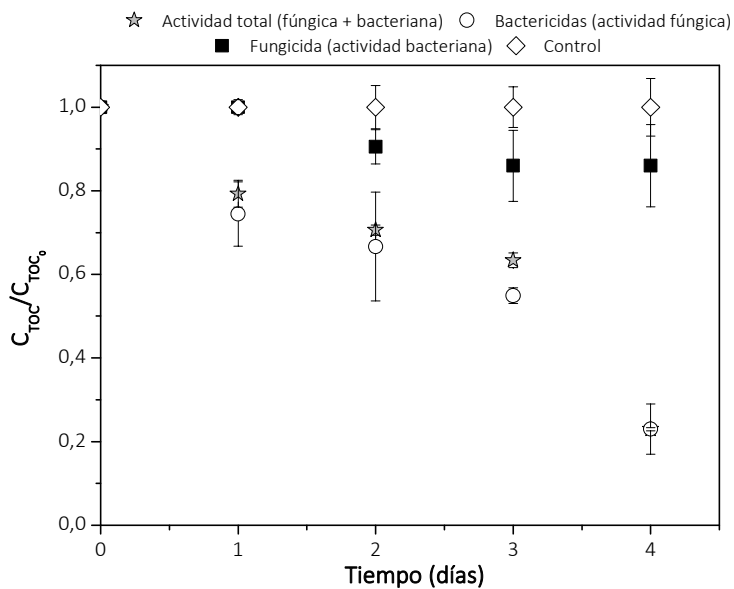


Figura 7.4. Determinación de las condiciones de operación para los ensayos de caracterización de la actividad biológica: evolución del COT durante el bioensayo con 4 mg/L de ampicilina, 128 mg/L de tetraciclina y 200 mg/L de nistatina

Con todo ello, se concluyó que para medir la actividad microbiológica de la biomasa obtenida durante los tratamientos de las aguas residuales urbanas fue necesario duplicar la concentración de fungicida para conseguir inhibir la actividad de los hongos en su totalidad. Por el contrario, las concentraciones mínimas inhibitorias reflejadas en bibliografía fueron suficientes en el caso de los dos bactericidas utilizados (Ampicilina y Tetraciclina).

7.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS FARMACÉUTICOS FORTIFICADOS DURANTE EL TRATAMIENTO DE LAS AGUAS RESIDUALES URBANAS

Tabla 7.2. Características fisicoquímicas de los compuestos farmacéuticos dopados al agua residual urbana procedente de la URJC

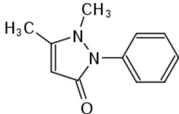
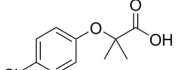
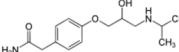
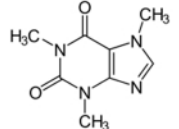
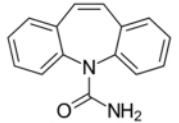
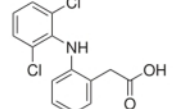
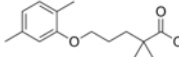
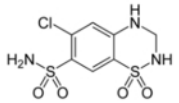
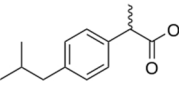
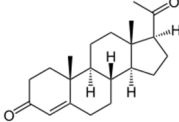
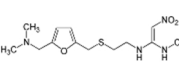
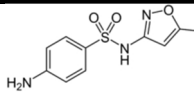
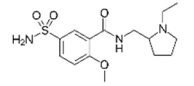
Compuesto farmacéutico	pKa	Log Kow	Peso molecular (g/mol)	Estructura
4-AAA	1,56	-0,13	188	
ACF	3,46	2,57	214	
ATN	9,6	0,16	266	
CFN	14	-0,07	194	
CZP	7	2,45	236	
DCF	4,14	0,7	296	
GFZ	4,5	4,77	250	
HCT	7	-0,07	297	
IBP	4,9	3,97	206	
PGT	8,5	3,87	315	
RNT	0,3	0,27	314	

Tabla 7.2. (continuación) Características fisicoquímicas de los compuestos farmacéuticos dopados al agua residual urbana procedente de la URJC

Compuesto farmacéutico	pKa	Log Kow	Peso molecular (g/mol)	Estructura
SMX	5,6	0,89	253	
SPD	9	0,57	341	

7.4. CONCENTRACIONES DE MICROCONTAMINANTES FARMACÉUTICOS DETECTADOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS AGUAS RESIDUALES URBANAS MEDIANTE BIOOXIDACIÓN AVANZADA

A continuación, se recogen los resultados de concentración medidos en las aguas residuales urbanas y en los efluentes de tras el tratamiento de biooxidación avanzada. Durante el tratamiento del agua residual de la depuradora piloto de la URJC, las concentraciones mostradas son un valor medio calculado para tres muestras recogidas a diferentes días en cada etapa (primera etapa: días 22, 27 y 34; segunda etapa: días 76, 79 y 88; tercera etapa: días 100, 105 y 108 de operación). Por otro lado, durante el tratamiento del agua residual de la EDAR de Toledo, las concentraciones medias de entrada se calcularon para tres muestras de cada lote (*Toledo-1*: días 7, 12 y 14; *Toledo-2*: días 17, 19 y 21).

Tabla 7.3. Concentración de fármacos detectados en el tratamiento del agua residual URJC

Fármacos	Concentración (ng/L)							
	URJC 2- biológica		URJC 3-biooxidación		URJC 4 -TRH 12 horas			
	Agua residual	Efluente	Agua residual	Efluente	Agua residual	Efluente	Agua residual	Efluente
4-AAA	1.952 ± 661	2.846 ± 539	4.279 ± 1.293	2.834 ± 539	1.326 ± 294	1.477 ± 137		
AMX	4.263 ± 2.145	8.697 ± 3.668	3.536 ± 1.303	2.729 ± 673	ND	ND		
CPZ	114 ± 88	75 ± 39	73 ± 29	52 ± 13	157 ± 1	239 ± 85		
CFN	89.241 ± 1.070	16.344 ± 1.576	21.514 ± 2.551	6.600 ± 2269	12.492 ± 2.161	14.103 ± 871		
DCF	ND	ND	ND	ND	71,6 ± 4,4	137 ± 96		
GFZ	888 ± 351	415 ± 261	311 ± 79	160 ± 99	977	319 ± 132		
HCT	548 ± 141	402 ± 352	924 ± 229	389 ± 199	78 ± 1	58 ± 1		
IHX	29 ± 13	44 ± 18	47 ± 27	11 ± 9	227	90 ± 33		
MDZ	57 ± 19	46 ± 21	92 ± 31	44 ± 8	724 ± 100	568 ± 173		
SMX	950 ± 439	493 ± 237	931 ± 479	87 ± 56	99 ± 14	115 ± 10		

Tabla 7.4. Concentración de fármacos detectados en el tratamiento del agua residual Toledo

Fármacos	Concentración (ng/L)			
	Toledo - 1		Toledo - 2	
	Agua residual	Efluente	Agua residual	Efluente
4-AAA	15.376 ± 1.105	17.604 ± 1.842	17.194 ± 5.500	12.640 ± 1.619
CFN	36.781 ± 525	5.950 ± 1.924	35.882 ± 8.652	16.354 ± 1.923
CPZ	195 ± 41	189 ± 12	206 ± 47	168 ± 24
DCF	392 ± 39,6	333 ± 151	691 ± 70,8	346 ± 279
DEET	ND	ND	3.631 ± 1.011	1.377 ± 482
GFZ	2.446 ± 565	377 ± 42	239	82 ± 19
HCT	77 ± 15	45 ± 39	105 ± 26	ND
IHX	70 ± 5	98 ± 30	ND	ND
MDZ	685 ± 443	1.748 ± 345	477 ± 81	358 ± 72
SMX	1.217 ± 120	142 ± 49	620 ± 255	191 ± 46

7.5. CONCENTRACIONES DE MICROCONTAMINANTES FARMACÉUTICOS DETECTADOS EN EL TRATAMIENTO DEL AGUA RESIDUAL HOSPITALARIA MEDIANTE BIOOXIDACIÓN AVANZADA^c

A continuación, se recogen los resultados de concentración medidos en el agua residual hospitalaria y en los efluentes de ambas unidades de CBRs tras el tratamiento de biooxidación avanzada. Durante el tratamiento del agua residual hospitalaria, las concentraciones mostradas son un valor medio calculado para siete muestras recogidas en ambas unidades de CBRs los días 58, 61, 63, 66, 68, 72 y 74 de operación.

Tabla 7.5. Concentración de fármacos detectados en el tratamiento del agua residual hospitalaria en el biorreactor 1

Biorreactor 1			
Compuestos farmacéuticos	Abreviatura	Agua residual (µg/L)	Efluente (µg/L)
Antipirina	4-AAA	20 ± 5	24 ± 13
Atenolol	ATN	5.038 ± 1.237	568 ± 725
Amoxicilina	AMX	18 ± 4	8,2 ± 8,2
Azitromicina	AZM	405 ± 163	0,002 ± 0,002
Cafeína	CFN	54 ± 23	0,83 ± 1
Carbamazepina	CZP	0,14 ± 0,01	0,092 ± 0,092
Ciclofosfamida	CPD	10.539 ± 2.990	0,0023 ± 0,0017
Diclofenaco	DCF	0,14 ± 0,003	0,084 ± 0,084
Gemfibrozilo	GFZ	1,8 ± 0,9	0,41 ± 0,27
Hidroclorotiazida	HCT	0,6 ± 0,3	0,59 ± 0,48
Ibuprofeno	IBP	6,8 ± 2,9	0,009 ± 0,008
Iohexol	IHX	159 ± 29	137 ± 67
Metronidazol	MDZ	0,032 ± 0,002	0,007 ± 0,005
Metoprolol	MTP	0,57 ± 0,45	0,11 ± 0,11
Progesterona	PGT	0,3 ± 0,16	0,18 ± 0,13
Ranitidina	RNT	1,8 ± 0,4	0,74 ± 0,60
Sulfametoxazol	SMX	1,4 ± 0,5	0,23 ± 0,17
Sulpirida	SPD	338 ± 103	0,15 ± 0,15

Tabla 7.6. Concentración de fármacos detectados en el tratamiento del agua residual hospitalaria en el biorreactor 2

Biorreactor 2			
Compuestos farmacéuticos	Abreviatura	Agua residual ($\mu\text{g/L}$)	Efluente ($\mu\text{g/L}$)
Antipirina	4-AAA	22 ± 3	22 ± 4
Atenolol	ATN	5.193 ± 304	145 ± 209
Amoxicilina	AMX	19 ± 5	$6,8 \pm 5,0$
Azitromicina	AZM	339 ± 217	$3,9 \pm 3,9$
Cafeína	CFN	43 ± 18	$1,0 \pm 0,7$
Carbamazepina	CZP	$0,16 \pm 0,01$	$0,059 \pm 0,024$
Ciclofosfamida	CPD	10.582 ± 645	$0,0035 \pm 0,0015$
Diclofenaco	DCF	$0,140 \pm 0,004$	$0,0067 \pm 0,0018$
Gemfibrozilo	GFZ	$1,50 \pm 0,31$	$0,32 \pm 0,16$
Hidroclorotiazida	HCT	$0,4 \pm 0,3$	$0,69 \pm 0,069$
Ibuprofeno	IBP	$5,9 \pm 2,2$	$0,011 \pm 0,001$
Iohexol	IHX	121 ± 24	115 ± 139
Metronidazol	MDZ	$0,09 \pm 0,002$	$0,001 \pm 0$
Metoprolol	MTP	$0,23 \pm 0,2$	$0,015 \pm 0,015$
Progesterona	PGT	$1,03 \pm 2,07$	$0,43 \pm 0,08$
Ranitidina	RNT	$2,9 \pm 1,6$	$1,1 \pm 0,6$
Sulfametoxazol	SMX	$1,4 \pm 0,8$	$0,44 \pm 0,23$
Sulpirida	SPD	397 ± 163	6 ± 6

7.6. TRATAMIENTO DEL AGUA RESIDUAL HOSPITALARIA MEDIANTE EL PROCESO TIPO FENTON

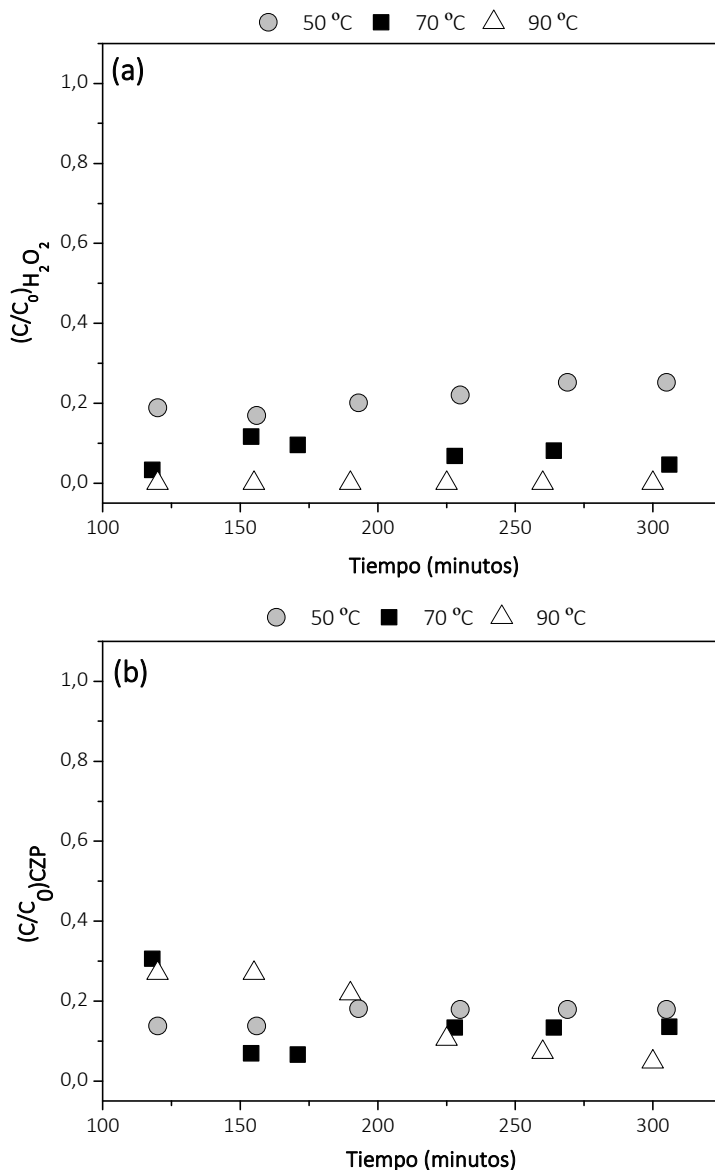


Figura 7.5. Perfiles de concentración normalizada de (a) H₂O₂ y (b) carbamazepina obtenidos durante los ensayos Fenton en continuo con el catalizador en forma de espuma en el reactor de lecho fijo a diferentes temperaturas (Condiciones de reacción: 700 mg/L de H₂O₂, 3 g de LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O₃ en forma de espuma, pH 5,5, caudal = 1 mL/min y 15 mg/L de CZP)

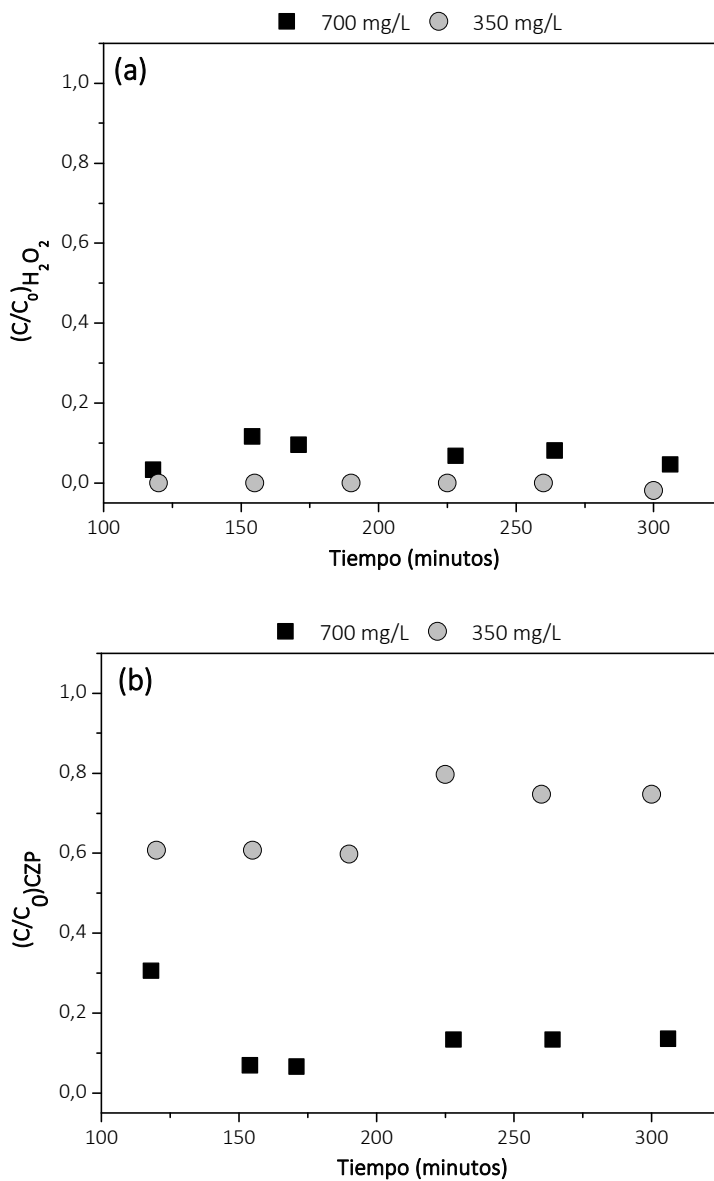


Figura 7.6. Perfiles de concentración normalizada de (a) H₂O₂ y (b) carbamazepina obtenidos durante los ensayos Fenton en continuo con el catalizador en forma de espuma en el reactor de lecho fijo a diferentes concentraciones de oxidante (Condiciones de reacción: 70 °C, 3 g de LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O₃ en forma de espuma, pH 5,5, caudal = 1 mL/min y 15 mg/L de CZP)

8. Bibliografía

- Acero, J. L., Benitez, F. J., Teva, F., Leal, A. I. (2010). Retention of emerging micropollutants from UP water and a municipal secondary effluent by ultrafiltration and nanofiltration. *Chemical Engineering Journal*, 163 (3), 264–272. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2010.07.060>
- Ahmed, M. B., Zhou, J. L., Ngo, H. H., Guo, W., Thomaidis, N. S., Xu, J. (2017). Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 274–298. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.04.045>
- Ahmed, M. J., y Hameed, B. H. (2018). Removal of emerging pharmaceutical contaminants by adsorption in a fixed-bed column: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 257–266. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2017.12.012>
- Al-Khateeb, L. A., Almotiry, S., Salam, M. A. (2014). Adsorption of pharmaceutical pollutants onto graphene nanoplatelets. *Chemical Engineering Journal*, 248, 191–199. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2014.03.023>
- Al Aukidy, M., Verlicchi, P., Jelic, A., Petrovic, M., Barcelò, D. (2012). Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Science of The Total Environment*, 438, 15–25. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2012.08.061>
- Almomani, F. A., Shawaqfah, M., Bhosale, R. R., Kumar, A. (2016). Removal of

- emerging pharmaceuticals from wastewater by ozone-based advanced oxidation processes. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35(4), 982–995. <https://doi.org/10.1002/ep.12306>
- Ali, M. y Sreekrishnan, T. (2001). Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Advances in Environmental Research*, 5(2), 175–196. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(00\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(00)00055-1)
- Anasonye, F., Winqvist, E., Räsänen, M., Kontro, J., Björklöf, K., Vasilyeva, G., Tuomela, M. (2015). Bioremediation of TNT contaminated soil with fungi under laboratory and pilot scale conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 105, 7–12. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2015.08.003>
- APHA: American Public Health Association. E (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Editado por Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., Eaton, A. D. 20th Edition*. ISBN: 0875532357.
- Araya-Cloutier, C., den Besten, H. M. W., Aisyah, S., Gruppen, H., Vincken, J.P. (2017). The position of prenylation of isoflavonoids and stilbenoids from legumes (Fabaceae) modulates the antimicrobial activity against Gram positive pathogens. *Food Chemistry*, 226, 193–201. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.01.026>
- Archibald, F., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M. y Reid, I. (1997). Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 53(2–3), 215–236. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)01675-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01675-1)
- Arfanis, M. K., Adamou, P., Moustakas, N. G., Triantis, T. M., Kontos, A. G., Falaras, P. (2017). Photocatalytic degradation of salicylic acid and caffeine emerging contaminants using titania nanotubes. *Chemical Engineering Journal*, 310, 525–536. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2016.06.0988>
- Asamblea General de la cumbre de las Naciones Unidas. (2015). *Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible*. <https://doi.org/A/RES/70/1>
- Babuponnusami, A., Muthukumar, K. (2012). Removal of phenol by heterogenous photo electro Fenton-like process using nano-zero valent iron. *Separation and Purification Technology*, 98, 130–135. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2012.04.034>
- Badia-Fabregat, M., Lucas, D., Tuomivirta, T., Fritze, H., Pennanen, T., Rodríguez-Mozaz, S., Vicent, T. (2017). Study of the effect of the bacterial and fungal communities present in real wastewater effluents on the performance of fungal treatments. *Science of The Total Environment*, 579, 366–377. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.088>
- Badia-Fabregat, M., Lucas, D., Pereira, M. A., Alves, M., Pennanen, T., Fritze, H.,

- Caminal, G. (2016). Continuous fungal treatment of non-sterile veterinary hospital effluent: pharmaceuticals removal and microbial community assessment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2401–2415. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7105-0>
- Badia-Fabregat, M., Lucas, D., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Caminal, G., Vicent, T. (2015). Identification of some factors affecting pharmaceutical active compounds (PhACs) removal in real wastewater. Case study of fungal treatment of reverse osmosis concentrate. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 663–671. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.007>
- Bai, X., Lutz, A., Carroll, R., Keteles, K., Dahlin, K., Murphy, M., Nguyen, D. (2018). Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. *Chemosphere*, 200, 133–142. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.02.106>
- Bautista, P., Mohedano, A. F., Gilarranz, M. A., Casas, J. A., Rodriguez, J. J. (2007). Application of Fenton oxidation to cosmetic wastewaters treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 143(1–2), 128–134. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2006.09.004>
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1), 78–91. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00245-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00245-4)
- Bayramoğlu, G., Bektaş, S., Arica, M. Y. (2003). Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 101(3), 285–300. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(03\)00178-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00178-X)
- Beier, S., Cramer, C., Koster, S., Mauer, C., Palmowski, L., Schroder, H. F., & Pinnekamp, J. (2011). Full scale membrane bioreactor treatment of hospital wastewater as forerunner for hot-spot wastewater treatment solutions in high density urban areas. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 63(1), 66–71. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.010>
- Bello, M. M., Abdul Raman, A. A., Asghar, A. (2019). A review on approaches for addressing the limitations of Fenton oxidation for recalcitrant wastewater treatment. *Process Safety and Environmental Protection*, 126, 119–140. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2019.03.028>
- Bello, M. M., Abdul Raman, A. A., Purushothaman, M. (2017). Applications of fluidized bed reactors in wastewater treatment – A review of the major design and operational parameters. *Journal of Cleaner Production*, 141, 1492–1514. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2016.09.148>
- Bending, G. D., Friloux, M., Walker, A. (2002). Degradation of contrasting pesticides

- by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*, 212(1), 59–63. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00710-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00710-3)
- Benotti, M. J. y Brownawell, B. J. (2009). Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. *Environmental Pollution*, 157 (3), 994–1002. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2008.10.009>
- Berto, J., Rothenbach, G. C., Barreiros, M. A. B., Corrêa, A. X. R., Peluso-Silva, S., Radetski, C. M. (2009). Physico-chemical, microbiological and ecotoxicological evaluation of a septic tank/Fenton reaction combination for the treatment of hospital wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(4), 1076–1081. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2008.12.002>
- Blanch, A. R., Caplin, J. L., Iversen, A., Kühn, I., Manero, A., Taylor, H. D., Vilanova, X. (2003). Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *Journal of Applied Microbiology*, 94 (6), 994–1002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01919>
- Blánquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T. (2004). Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research*, 38(8), 2166–2172. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.019>
- Blánquez, P., Sarrà, M., & Vicent, T. (2006). *Study of the cellular retention time and the partial biomass renovation in a fungal decolourisation continuous process*. *Water research* (Vol. 40). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.02.010>
- Boddy. (2000). Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 185–194. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00683.x>
- Bokare, A. D., Choi, W. (2014). Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 275, 121–135. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.054>
- Bollmann, A. F., Seitz, W., Prasse, C., Lucke, T., Schulz, W., Ternes, T. (2016). Occurrence and fate of amisulpride, sulphiride, and lamotrigine in municipal wastewater treatment plants with biological treatment and ozonation. *Journal of Hazardous Materials*, 320, 204–215. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.08.022>
- Borràs, E., Blánquez, P., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T. (2008). *Trametes versicolor* pellets production: Low-cost medium and scale-up. *Biochemical Engineering Journal*, 42(1), 61–66. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2008.05.014>
- Borràs, E., Caminal, G., Sarrà, M., Novotný, Č. (2010). Effect of soil bacteria on the

- ability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by *Trametes versicolor* and *Irpex lacteus* from contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2087–2093. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2010.08.003>
- Bourin, M., Birgit, B., Boehler, M., Borowska, E., Fleiner, J., Salhi, E., Teichler, R., Von Gunten, U., Siegrist, H., McArdell, C.S. (2018). Evaluation of a full-scale wastewater treatment plant upgraded with ozonation and biological post-treatments: Abatement of micropollutants, formation of transformation products and oxidation by-products. *Water Research*, 129, 486-498 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.036>
- Bradha, M., Vijayaraghavan, T., Suriyaraj, S. P., Selvakumar, R., Ashok, A. M. (2015). Synthesis of photocatalytic $\text{La}_{(1-x)}\text{A}_x\text{TiO}_{3.5-6}$ (A=Ba, Sr, Ca) nano perovskites and their application for photocatalytic oxidation of congo red dye in aqueous solution. *Journal of Rare Earths*, 33(2), 160–167. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(14\)60397-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(14)60397-5)
- Brillas, E., Garcia-Segura, S. (2020). Benchmarking recent advances and innovative technology approaches of Fenton, photo-Fenton, electro-Fenton, and related processes: A review on the relevance of phenol as model molecule. *Separation and Purification Technology*, 237, 116337. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2019.116337>
- Brusseau, M y Artiola, J.F. (2019). Chemical contaminants. Environmental and Pollution Science. *Environmental and Pollution Science*, 175–190. doi:10.1016/b978-0-12-814719-1.00012-4
- Buerge, I. J., Buser, H.R., Poiger, T., Muller, M. D. (2006). Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surface waters. *Environmental Science & Technology*, 40 (23), 7242–7250
- Camargo, M. C., Garcia, A., Riquelme, A., Otero, W., Camargo, C. A., Hernandez-Garcia, T., Rabkin, C. S. (2014). The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America. *The American Journal of Gastroenterology*, 109 (4), 485–495. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.24>
- Campo, J. (2015). Emerging Contaminants. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 68, 515–578. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63340-8.00010-8>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Carrasco-Díaz, M. R., Castillejos-López, E., Cerpa-Naranjo, A., Rojas-Cervantes, M. L. (2016). Efficient removal of paracetamol using $\text{LaCu}_{1-x}\text{M}_x\text{O}_3$ (M = Mn, Ti)

- perovskites as heterogeneous Fenton-like catalysts. *Chemical Engineering Journal*, 304, 408–418. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.06.054>
- Carriazo, J., Bossa-Benavides, L., Castillo, E. (2011). Catalytic activity of transition metals in the hydrogen peroxide decomposition. *Química Nova*, 35, 1101–1106. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000600006>
- Chemidlin Prevost-Boure, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougél, C., Lelievre, M., Jolivet, C., Ranjard, L. (2011). Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS One*, 6(9), e24166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024166>
- Cheng, M., Lai, C., Liu, Y., Zeng, G., Huang, D., Zhang, C., Xiong, W. (2018). Metal-organic frameworks for highly efficient heterogeneous Fenton-like catalysis. *Coordination Chemistry Reviews*, 368, 80–92. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2018.04.012>
- Christofides, S. R., Hiscox, J., Savoury, M., Boddy, L., Weightman, A. J. (2019). Fungal control of early-stage bacterial community development in decomposing wood. *Fungal Ecology*, 42, 100868. <https://doi.org/10.1016/J.FUNECO.2019.100868>
- Clausen, C. A. (1996). Bacterial associations with decaying wood: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 37 (1–2), 101–107. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(95\)00109-3](https://doi.org/10.1016/0964-8305(95)00109-3)
- Coetsier, C. M., Spinelli, S., Lin, L., Roig, B., Touraud, E. (2009). Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs? *Environment International*, 35 (5), 787–792. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2009.01.008>
- Collado, N., Rodríguez-Mozaz, S., Gros, M., Rubirola, A., Barceló, D., Comas, J., Buttiglieri, G. (2014). Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system. *Environmental Pollution*, 185, 202–212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.040>
- Contreras López, A. y Molero Meneses, M. (2006). Ciencia y Tecnología del Medioambiente. *Librería UNED (Universidad Nacional de Educación a Distancia)*. ISBN: 978-84-362-5296-5
- Córdoba Bolaños, R. y Cultid Chamorro, G. R. (2015). Estudio comparativo de la actividad enzimática de Lacasa, ligina peroxidasa y manganeso peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* cultivado en residuos lignocelulosicos de raquis de palma de aceite, bagazo de fique y pulpa de café. Universidad de Nariño.
- Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T., Sarrà, M. (2013). Degradation of pharmaceuticals in non-sterile

- urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water Research*, 47(14), 5200–5210. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.007>
- Cruz-Morató, C., Lucas, D., Llorca, M., Rodríguez-Mozaz, S., Gorga, M., Petrovic, M., Marco-Urrea, E. (2014). Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds. *Science of The Total Environment*, 493, 365–376. <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.117>
- D'Agostini, É. C., Mantovani, T. R. D., Valle, J. S. do, Paccola-Meirelles, L. D., Colauto, N. B., Linde, G. A. (2011). Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. *Scientia Agricola*, 68(3), 295–300. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000300004>
- Dai, C., Tian, X., Nie, Y., Lin, H.-M., Yang, C., Han, B., Wang, Y. (2018). Surface Facet of CuFeO₂ Nanocatalyst: A Key Parameter for H₂O₂ Activation in Fenton-Like Reaction and Organic Pollutant Degradation. *Environmental Science & Technology*, 52(11), 6518–6525. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01448>
- Dao, A. T. N., Vonck, J., Janssens, T. K. S., Dang, H. T. C., Brouwer, A., de Boer, T. E. (2019). Screening white-rot fungi for bioremediation potential of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Industrial Crops and Products*, 128, 153–161. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.10.059>
- Daouk, S., Chevre, N., Vernaz, N., Widmer, C., Daali, Y., Fleury-Souverain, S. (2016). Dynamics of active pharmaceutical ingredients loads in a Swiss university hospital wastewaters and prediction of the related environmental risk for the aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment*, 547, 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.117>
- Daughton, C. G. y Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, 107 Suppl(Suppl 6), 907–938. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s6907>
- Davididou, K., Monteagudo, J. M., Chatzisyneon, E., Durán, A., Expósito, A. J. (2017). Degradation and mineralization of antipyrine by UV-A LED photo-Fenton reaction intensified by ferrioxalate with addition of persulfate. *Separation and Purification Technology*, 172, 227–235. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2016.08.021>
- Deblonde, T. y Cossu-Leguille, C. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214 (6), 442–448. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2011.08.002>
- De Lima Perini, J. A., Perez-Moya, M., Nogueira, R. F. P. (2013). Photo-Fenton degradation kinetics of low ciprofloxacin concentration using different iron

- sources and pH. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 259, 53–58. <https://doi.org/10.1016/J.PHOTOCHEM.2013.03.002>
- Dodds, C. y Lawson, D.H. (1938). Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* 125 (839), 222–232. <https://doi.org/10.1098/rspb.1938.0023>
- Di Luca, C., Massa, P., Grau, J. M., Marchetti, S. G., Fenoglio, R., Haure, P. (2018). Highly dispersed Fe³⁺-Al₂O₃ for the Fenton-like oxidation of phenol in a continuous up-flow fixed bed reactor. Enhancing catalyst stability through operating conditions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 237, 1110–1123. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2018.05.032>
- Ding, Y., Tang, H., Zhang, S., Wang, S., Tang, H. (2016). Efficient degradation of carbamazepine by easily recyclable microscaled CuFeO₂ mediated heterogeneous activation of peroxymonosulfate. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.06.004>
- Du, J., Guo, W., Li, X., Li, Q., Wang, B., Huang, Y., Ren, N. (2017). Degradation of sulfamethoxazole by a heterogeneous Fenton-like system with microscale zero-valent iron: Kinetics, effect factors, and pathways. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 81, 232–238. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2017.10.017>
- Ehlers, G. A., Rose, P. D. (2005). Immobilized white-rot fungal biodegradation of phenol and chlorinated phenol in trickling packed-bed reactors by employing sequencing batch operation. *Bioresource Technology*, 96(11), 1264–1275. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2004.10.015>
- Ekpeghere, K. I., Sim, W. J., Lee, H. J., Oh, J. E. (2018). Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and the aquatic environment. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.218>
- El-Enshasy, H. A. (2007). Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, 225–261. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50010-4>
- El-Ogri, F., Ouazzani, N., Boraâm, F., Mandi, L. (2016). A survey of wastewaters generated by a hospital in Marrakech city and their characterization. *Desalination and Water Treatment*, 57 (36), 17061–17074. <https://doi.org/10.1080/19443994.2016.1138328>
- Elgueta, S., Santos, C., Lima, N., Diez, M. C. (2016). Immobilization of the white-rot

- fungus *Anthracoxyllum discolor* to degrade the herbicide atrazine. *AMB Express*, 6(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0275-z>
- Emídio, E. S., Hammer, P., Nogueira, R. F. P. (2020). Simultaneous degradation of the anticancer drugs 5-fluorouracil and cyclophosphamide using a heterogeneous photo-Fenton process based on copper-containing magnetites ($\text{Fe}^{3-x}\text{Cu}^x\text{O}_4$). *Chemosphere*, 241, 124990. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.124990>
- Ergueta Acebey, F. (2016). El agua: tratamiento de aguas residuales hospitalarias. (*INDESAR*) 62, 91–97.
- Escher, B. I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., McArdell, C. S. (2011). Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Research*, 45 (1), 75–92. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.08.019>
- Escher, B. I., Bramaz, N., Richter, M., Lienert, J. (2006). Comparative Ecotoxicological Hazard Assessment of Beta-Blockers and Their Human Metabolites Using a Mode-of-Action-Based Test Battery and a QSAR Approach. *Environmental Science & Technology*, 40 (23), 7402–7408. <https://doi.org/10.1021/es052572>
- Espinosa-Ortiz, E. J., Rene, E. R., Pakshirajan, K., van Hullebusch, E. D., Lens, P. N. L. (2016). Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives. *Chemical Engineering Journal*, 283, 553–571. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.068>
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (2006). Guideline on the Environment Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use.
- Expósito, A. J., Monteagudo, J. M., Duran, A., San Martín, I., Gonzalez, L. (2018). Study of the intensification of solar photo-Fenton degradation of carbamazepine with ferrioxalate complexes and ultrasound. *Journal of Hazardous Materials*, 342, 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.069>
- Fatta-Kassinos, D., Meric, S., Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(1), 251–275. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4300-9>
- Ferrando-Climent, L., Cruz-Morató, C., Marco-Urrea, E., Vicent, T., Sarrà, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D. (2015). Non conventional biological treatment based on *Trametes versicolor* for the elimination of recalcitrant anticancer drugs in hospital wastewater. *Chemosphere*, 136, 9–19. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.051>
- Ferrando-Climent, L., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D. (2014). Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: From hospital effluents through urban

- wastewater to natural environment. *Environmental Pollution*, 193, 216–223. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2014.07.002>
- Ferreira da Silva, B., Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A. A., Petrovic, M., Barceló, D. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere*, 85 (8), 1331–1339. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2011.07.051>
- Fey, T., Betke, U., Rannabauer, S., Scheffler, M. (2017). Reticulated Replica Ceramic Foams: Processing, Functionalization, and Characterization. *Advanced Engineering Materials*. <https://doi.org/10.1002/adem.201700369>
- Focazio, M. J., Kolpin, D. W., Barnes, K. K., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Thurman, M. E. (2008). A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States) untreated drinking water sources. *The Science of the Total Environment*, 402 (2–3), 201–216. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.021>
- FOEN. (2017). Qualité de l'eau : révision de l'ordonnance sur la protection des eaux. Consultado en Agosto 2019: <https://www.bafu.admin.ch/bafu/fr/home/themes/formation/communiqués.msg-id-59323.html>
- Ganiyu, S. O., van Hullebusch, E. D., Cretin, M., Esposito, G., Oturan, M. A. (2015). Coupling of membrane filtration and advanced oxidation processes for removal of pharmaceutical residues: A critical review. *Separation and Purification*
- García-Espinoza, J. D., Mijaylova-Nacheva, P., Avilés-Flores, M. (2018). Electrochemical carbamazepine degradation: Effect of the generated active chlorine, transformation pathways and toxicity. *Chemosphere*, 192, 142–151. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.10.147>
- García-Galán, M. J., González Blanco, S., López Roldán, R., Díaz-Cruz, S., Barceló, D. (2012). Ecotoxicity evaluation and removal of sulfonamides and their acetylated metabolites during conventional wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 437, 403–412. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2012.08.038>
- García-Rodríguez, A., Matamoros, V., Fontàs, C., Salvadó, V. (2014). The ability of biologically based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 21 (20), 11708–11728. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2448-5>
- Garrido-Ramírez, E. G., Theng, B. K. ., Mora, M. L. (2010). Clays and oxide minerals as catalysts and nanocatalysts in Fenton-like reactions — A review. *Applied Clay Science*, 47(3–4), 182–192. <https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2009.11.044>
- Geisseler, D., Horwath, W. R., Joergensen, R. G., Ludwig, B. (2010). Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms — A review. *Soil Biology and*

- Biochemistry*, 42(12), 2058–2067.
<https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2010.08.021>
- Gerrity, D., Gamage, S., Holady, J. C., Mawhinney, D. B., Quiñones, O., Trenholm, R. A., Snyder, S. A. (2011). Pilot-scale evaluation of ozone and biological activated carbon for trace organic contaminant mitigation and disinfection. *Water Research*, 45 (5), 2155–2165. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.12.031>
- Guélou, E., Barrault, J., Fournier, J., Tatibouët, J.M. (2003). Active iron species in the catalytic wet peroxide oxidation of phenol over pillared clays containing iron. *Applied Catalysis B: Environmental*, 44(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(03\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(03)00003-1)
- Glaze, W. H., Kang, J.W. y Chapin, D. H. (1987). The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation. *Ozone: Science & Engineering*, 9 (4), 335–352. <https://doi.org/10.1080/01919518708552148>
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V., Chaminda G.G, T., Kyoungjin An, A., Kumar, M. (2018). Occurrence and Fate of Emerging Contaminants in Water Environment: A Review. *Groundwater for Sustainable Development* 6, 169-180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>
- Gómez-Canela, C., Pueyo, V., Barata, C., Lacorte, S., Marcé, R. M. (2019). Development of predicted environmental concentrations to prioritize the occurrence of pharmaceuticals in rivers from Catalonia. *Science of The Total Environment*, 666, 57–67. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.02.078>
- Gómez-Toribio , V., García-Martín, A.B., Martínez, M.J., Martínez, Á. T., Guillén, F. (2009). Enhancing the Production of Hydroxyl Radicals by *Pleurotus eryngii* via Quinone Redox Cycling for Pollutant Removal. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (12), 3954–3962. <https://doi.org/10.1128/AEM.02138-08>
- Gordalla, C., Ewers, B., Frimmel, F. (2013). Hydraulic fracturing: A toxicological threat for groundwater and drinking-water? *Environmental Earth Sciences* 70 (8), 3875-3893. <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2672-9>
- Grandclément, C., Seyssiecq, I., Piram, A., Wong-Wah-Chung, P., Vanot, G., Tiliacos, N., Doumenq, P. (2017). From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. *Water Research*, 111, 297–317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.005>
- Guillén, F., Martínez, M. J., Muñoz, C., Martínez, A. T. (1997). Quinone Redox Cycling in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii* Leading to Extracellular Production of Superoxide Anion Radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339 (1), 190–199. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1996.9834>

- Hai, F. I., Modin, O., Yamamoto, K., Fukushi, K., Nakajima, F., Nghiem, L. D. (2012). Pesticide removal by a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(3), 459–462. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2011.11.002>
- Han, L.J., Kong, Y.J., Yan, T.J., Fan, L.T., Zhang, Q., Zhao, H.J., Zheng, H.G. (2016). A new five-coordinated copper compound for efficient degradation of methyl orange and Congo red in the absence of UV–visible radiation. *Dalton Trans.*, 45(46), 18566–18571. <https://doi.org/10.1039/C6DT03273G>
- Han, J.L., Ng, I.S., Wang, Y., Zheng, X., Chen, W.-M., Hsueh, C.C., Chen, B.Y. (2012). Exploring new strains of dye-decolorizing bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(4), 508–514. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2011.11.014>
- Han-Tran, N. H., Gin, K. Y.H. (2017). Occurrence and removal of pharmaceuticals, hormones, personal care products, and endocrine disrupters in a full-scale water reclamation plant. *Science of The Total Environment*, 599–600, 1503–1516. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.05.097>
- Hao Chen, H., Gao, B., Li, H. (2014). Functionalization, pH, and ionic strength influenced sorption of sulfamethoxazole on graphene. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 310–315. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2013.12.021>
- Harms, H., Schlosser, D., Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 177. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrmicro2519>
- Hatakka, A., Hammel, K. E. (2011). Fungal biodegradation of lignocelluloses. *The Mycota - Industrial Applications*, 10, 319–340.
- Haugen, H., Will, J., Köhler, A., Hopfner, U., Aigner, J., Wintermantel, E. (2004). Ceramic TiO₂-foams: characterisation of a potential scaffold. *Journal of the European Ceramic Society*, 24(4), 661–668. [https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(03\)00255-3](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(03)00255-3)
- Heeger, F., Wurzbacher, C., Bourne, E. C., Mazzoni, C. J., Monaghan, M. T. (2019). Combining the 5.8S and ITS2 to improve classification of fungi. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(10), 1702–1711. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13266>
- Heo, J., Flora, J. R. V., Her, N., Park, Y.G., Cho, J., Son, A., Yoon, Y. (2012). Removal of bisphenol A and 17 β -estradiol in single walled carbon nanotubes–ultrafiltration (SWNTs–UF) membrane systems. *Separation and Purification Technology*, 90, 39–52. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2012.02.007>
- Hodge, A., Robinson, D., Fitter, A. (2000). Are microorganisms more effective than

- plants at competing for nitrogen? *Trends in Plant Science*, 5(7), 304–308. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01656-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01656-3)
- Huang, L., Wang, M., Shi, C., Huang, J., Zhang, B. (2014). Adsorption of tetracycline and ciprofloxacin on activated carbon prepared from lignin with H₃PO₄ activation. *Desalination and Water Treatment*, 52 (13–15), 2678–2687. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.833873>
- Huggett, D. B., Brooks, B. W., Peterson, B., Foran, C. M., Schlenk, D. (2002). Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43 (2), 229–235. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1182-7>
- Hussain, S., Aneggi, E., Briguglio, S., Mattiussi, M., Gelao, V., Cabras, I., Goi, D. (2020). Enhanced ibuprofen removal by heterogeneous-Fenton process over Cu/ZrO₂ and Fe/ZrO₂ catalysts. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 103586. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2019.103586>
- INE. (2018). *España en cifras 2018*.
- Jauris, I. M., Matos, C. F., Saucier, C., Lima, E. C., Zarbin, A. J. G., Fagan, S. B., Zanella, I. (2016). Adsorption of sodium diclofenac on graphene: a combined experimental and theoretical study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18 (3), 1526–1536. <https://doi.org/10.1039/C5CP05940B>
- Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Cespedes-Sánchez, R., Ventura, F., Petrovic, M., Barcelo, D. (2011). Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research*, 45 (3), 1165–1176. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.11.010>
- Jelic, A., Cruz-Morató, C., Marco-Urrea, E., Sarrà, M., Perez, S., Vicent, T., Barcelo, D. (2012). Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *Water Research*, 46(4), 955–964. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.063>
- Jess Krarup. (2015). Project partners: Herlev Hospital – New standard for hospital wastewater treatment. *Filtration + Separation*, 52(3), 44–45. [https://doi.org/10.1016/S0015-1882\(15\)30141-5](https://doi.org/10.1016/S0015-1882(15)30141-5)
- Jin, P., Jin, X., Wang, X., Feng, Y., Wang, X. C. (2013). Biological activated carbon treatment process for advanced water and wastewater treatment. In *Biomass Now-Cultivation and Utilization*.
- Jjemba, P. K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63 (1), 113–130. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2004.11.011>
- Josset, S., Hajiesmaili, S., Begin, D., Edouard, D., Pham-Huu, C., Lett, M. C., Keller, V.

- (2010). UV-A photocatalytic treatment of *Legionella pneumophila* bacteria contaminated airflows through three-dimensional solid foam structured photocatalytic reactors. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1–3), 372–381. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.10.013>
- Jung, R., Fish, D., Obritsch, M., MacLaren, R. (2004). Surveillance of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an urban tertiary-care teaching hospital. *Journal of Hospital Infection*, 57 (2), 105–111. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2004.03.001>
- Kanakaraju, D., Glass, B. D., Oelgemöller, M. (2018). Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review. *Journal of Environmental Management*, 219, 189–207. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2018.04.103>
- Kang, J., Zhang, H., Duan, X., Sun, H., Tan, X., Liu, S., Wang, S. (2019). Magnetic Ni-Co alloy encapsulated N-doped carbon nanotubes for catalytic membrane degradation of emerging contaminants. *Chemical Engineering Journal*, 362, 251–261. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2019.01.035>
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J. (2008). The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*, 42 (13), 3498–3518. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2008.04.026>
- Kay, P., Hughes, S. R., Ault, J. R., Ashcroft, A. E., Brown, L. E. (2017). Widespread, routine occurrence of pharmaceuticals in sewage effluent, combined sewer overflows and receiving waters. *Environmental Pollution*, 220, 1447–1455. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2016.10.087>
- Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., Flick, R. W. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (21), 8897 LP-8901. <https://doi.org/10.1073/pnas.06095681044>
- Kielak, A. M., Scheublin, T. R., Mendes, L. W., van Veen, J. A., Kuramae, E. E. (2016). Bacterial Community Succession in Pine-Wood Decomposition. *Frontiers in Microbiology*, 7, 231. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00231>
- Kim, J.W., Jang, H.-S., Kim, J.G., Ishibashi, H., Hirano, M., Nasu, K., Arizono, K. (2009). Occurrence of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) in Surface Water from Mankyung River, South Korea. *Journal of Health Science*, 55 (2), 249–258. <https://doi.org/10.1248/jhs.55.249>
- Kim, S., Eichhorn, P., Jensen, J. N., Weber, A. S., Aga, D. S. (2005). Removal of Antibiotics in Wastewater: Effect of Hydraulic and Solid Retention Times on the Fate of Tetracycline in the Activated Sludge Process. *Environmental Science &*

- Technology*, 39(15), 5816–5823. <https://doi.org/10.1021/es050006u>
- Kocakuşakoğlu, A., Dağlar, M., Konyar, M., Yatmaz, H. C., Öztürk, K. (2015). Photocatalytic activity of reticulated ZnO porous ceramics in degradation of azo dye molecules. *Journal of the European Ceramic Society*, 35(10), 2845–2853. <https://doi.org/10.1016/J.JEURCERAMSOC.2015.03.042>
- Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W. J., Lorenz, L. F., Zeikus, J. G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 117(3), 277–285. <https://doi.org/10.1007/bf00738547>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glockner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36 (6), 1202–1211. <https://doi.org/10.1021/es011055j>
- Krueger, M. C., Bergmann, M. y Schlosser, D. (2016). Widespread ability of fungi to drive quinone redox cycling for biodegradation. *FEMS Microbiology Letters*, 363 (11). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw105>
- Ksepko, E. (2018). Perovskite $\text{Sr}(\text{Fe}_{1-x}\text{Cu}_x)\text{O}_{3-\delta}$ materials for chemical looping combustion applications. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(20), 9622–9634. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2018.04.046>
- Krumina, L., Lyngsie, G., Tunlid, A., Persson, P. (2017). Oxidation of a Dimethoxyhydroquinone by Ferrihydrite and Goethite Nanoparticles: Iron Reduction versus Surface Catalysis. *Environmental Science & Technology*, 51(16), 9053–9061. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02292>
- Kumar, A., Rana, A., Sharma, G., Naushad, M., Dhiman, P., Kumari, A., Stadler, F. J. (2019). Recent advances in nano-Fenton catalytic degradation of emerging pharmaceutical contaminants. *Journal of Molecular Liquids*, 290, 111177. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2019.111177>
- Kümmerer, K. (2001). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*, 45 (6–7), 957–969. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00144-8)
- Kümmerer, K. (2010). Pharmaceuticals in the Environment. *Annual Review of Environment and Resources*, 35 (1), 57–75. <https://doi.org/10.1146/annurev->

environ-052809-161223

- Li, H., Helm, P. A., Metcalfe, C. D. (2010). Sampling in the Great Lakes for pharmaceuticals, personal care products, and endocrine-disrupting substances using the passive polar organic chemical integrative sampler. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (4), 751–762. <https://doi.org/10.1002/etc.104>
- Li, W., Nanaboina, V., Zhou, Q. y Korshin, G. V. (2012). Effects of Fenton treatment on the properties of effluent organic matter and their relationships with the degradation of pharmaceuticals and personal care products. *Water Research*, 46(2), 403–412. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.11.002>
- Li, W. C. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution*, 187, 193–201. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2014.01.015>
- Li, X., Xu, J., de Toledo, R. A., Shim, H. (2015). Enhanced removal of naproxen and carbamazepine from wastewater using a novel countercurrent seepage bioreactor immobilized with *Phanerochaete chrysosporium* under non-sterile conditions. *Bioresource Technology*, 197, 465–474. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.08.118>
- Li, X., Xu, J., de Toledo, R. A., Shim, H. (2016). Enhanced carbamazepine removal by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a novel rotating suspension cartridge reactor under non-sterile condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 115, 102–109. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2016.08.003>
- Lilly, W. W., Wallweber, G. J., Higgins, S. M. (1991). Proteolysis and amino acid recycling during nitrogen deprivation in *Schizophyllum commune*. *Current Microbiology*, 23(1), 27–32. <https://doi.org/10.1007/BF02092305>
- Ling, Y., Long, M., Hu, P., Chen, Y., Huang, J. (2014). Magnetically separable core–shell structural $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Cu/Al-MCM-41}$ nanocomposite and its performance in heterogeneous Fenton catalysis. *Journal of Hazardous Materials*, 264, 195–202. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2013.11.008>
- Liu, P., Liu, W.J., Jiang, H., Chen, J.J., Li, W.W., Yu, H.Q. (2012). Modification of bio-char derived from fast pyrolysis of biomass and its application in removal of tetracycline from aqueous solution. *Bioresource Technology*, 121, 235–240. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.06.085>
- Liu, S. (2007). Food and agricultural wastewater utilization and treatment. *Blackwell Publishing*. ISBN: 9780813814230. DOI: 10.1002/9780470277683
- Loos, G., Scheers, T., Van Eyck, K., Van Schepdael, A., Adams, E., Van der Bruggen, B., Dewil, R. (2018). Electrochemical oxidation of key pharmaceuticals using a boron doped diamond electrode. *Separation and Purification Technology*, 195, 184–191. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2017.12.009>

- López-Ramón, M. V., Álvarez, M. A., Moreno-Castilla, C., Fontecha-Cámara, M. A., Yebra-Rodríguez, Á., Bailón-García, E. (2018). Effect of calcination temperature of a copper ferrite synthesized by a sol-gel method on its structural characteristics and performance as Fenton catalyst to remove gallic acid from water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 511, 193–202. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2017.09.117>
- Lú-Chau, T. A., Ruiz-Dueñas, F. J., Camarero, S., Feijoo, G., Martínez, M. J., Lema, J. M., Martínez, A. T. (2004). Effect of pH on the stability of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase during heterologous production in *Emericella nidulans*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(5), 287–293. <https://doi.org/10.1007/s00449-004-0365-1>
- Lu, Y., Yan, L., Wang, Y., Zhou, S., Fu, J., Zhang, J. (2009). Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1–3), 1091–1097. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2008.10.091>
- Lu, H., Zhu, Z., Zhang, H., Zhu, J., Qiu, Y., Zhu, L., Küppers, S. (2016). Fenton-Like Catalysis and Oxidation/Adsorption Performances of Acetaminophen and Arsenic Pollutants in Water on a Multimetal Cu–Zn–Fe-LDH. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(38), 25343–25352. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b08933>
- Lucas, D., Barceló, D. y Rodríguez-Mozaz, S. (2016). Removal of pharmaceuticals from wastewater by fungal treatment and reduction of hazard quotients. *Science of The Total Environment*, 571, 909–915. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.07.074>
- Lucas, D., Castellet-Rovira, F., Villagrasa, M., Badia-Fabregat, M., Barceló, D., Vicent, T., Rodríguez-Mozaz, S. (2018). The role of sorption processes in the removal of pharmaceuticals by fungal treatment of wastewater. *Science of The Total Environment*, 610, 1147–1153. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.118>
- Lyu, L., Zhang, L., Hu, C. (2015). Enhanced Fenton-like degradation of pharmaceuticals over framework copper species in copper-doped mesoporous silica microspheres. *Chemical Engineering Journal*, 274, 298–306. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2015.03.137>
- Manzoni, M., Rollini, M. (2001). Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Daedalea quercina*. *Biotechnology Letters*, 23(18), 1491–1497. <https://doi.org/10.1023/A:1011637407030>
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G., Vicent, T. (2010 a). Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials*,

- 176(1), 836–842.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.112>
- Marco-Urrea, E., Radjenović, J., Caminal, G., Petrović, M., Vicent, T., Barceló, D. (2010 b). Oxidation of atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibric acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Water Research*, 44(2), 521–532.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.049>
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 74 (6), 765–772.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.040>
- Markakis, E. A., Kavroulakis, N., Ntougias, S., Koubouris, G. C., Sergeantani, C. K., Ligoigakis, E. K. (2017). Characterization of Fungi Associated With Wood Decay of Tree Species and Grapevine in Greece. *Plant Disease*, 101(11), 1929–1940.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1761-RE>
- Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of Hazardous Materials*, 239–240, 40–47. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2012.04.068>
- Martín García, I., Betancort-Rodríguez, J. R., Salas-Rodríguez, J. J., Peñate Suárez, B., Pidre Bocardo, J.R. (2006). Guía sobre tratamientos de aguas residuales urbanas para pequeños núcleos de población. Mejora de la calidad de los efluentes. *Instituto Tecnológico de Canarias y Centro de las nuevas Tecnologías del Agua*.
- Martínez, Á. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Del Río, J. C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8, 195–204.
- Martínez, F., Molina, R., Rodríguez, I., Pariente, M. I., Segura, Y., Melero, J. A. (2018). Techno-economical assessment of coupling Fenton/biological processes for the treatment of a pharmaceutical wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.12.008>
- Martínez, F., Pariente, M. I., Melero, J. A., Botas, J. A., Gómez, E. (2007 a). Catalytic wet peroxidation of phenol in a fixed bed reactor. *Water Science and Technology*, 55(12), 75–81. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.389>
- Martínez, F., Melero, J. A., Botas, J. Á., Pariente, M. I., Molina, R. (2007 b). Treatment of Phenolic Effluents by Catalytic Wet Hydrogen Peroxide Oxidation over Fe₂O₃/SBA-15 Extruded Catalyst in a Fixed-Bed Reactor. *Industrial &*

- Engineering Chemistry Research*, 46(13), 4396–4405.
<https://doi.org/10.1021/ie070165h>
- Marzluf, G. A. (1996). Regulation of Nitrogen Metabolism in Mycelial Fungi BT - Biochemistry and Molecular Biology. In R. Brambl & G. A. Marzluf (Eds.) (pp. 357–368). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-10367-8_16
- Masella, A. P., Bartram, A. K., Truszkowski, J. M., Brown, D. G., Neufeld, J. D. (2012). PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-31>
- Massieu, J. B. (2010). Memoria 2010-Hospital Universitario Virgen de las Nieves.
- Matamoros, V., Gutiérrez, R., Ferrer, I., García, J., Bayona, J. M. (2015). Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials*, 288, 34–42.
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2015.02.002>
- Mawabo, I. K., Noumedem, J. A. K., Kuate, J. R., Kuete, V. (2015). Tetracycline improved the efficiency of other antimicrobials against Gram-negative multidrug-resistant bacteria. *Journal of Infection and Public Health*, 8(3), 226–233. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2014.09.001>
- Melero, J. A., Calleja, G., Martínez, F., Molina, R. (2006). Nanocomposite of crystalline Fe₂O₃ and CuO particles and mesostructured SBA-15 silica as an active catalyst for wet peroxide oxidation processes. *Catalysis Communications*, 7(7), 478–483.
<https://doi.org/10.1016/J.CATCOM.2006.01.008>
- Melo-Guimaraes, A., Torner-Morales, F. J., Duran-Alvarez, J. C., Jimenez-Cisneros, B. E. (2013). Removal and fate of emerging contaminants combining biological, flocculation and membrane treatments. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 67 (4), 877–885. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.640>
- Mendoza, A., Aceña, J., Pérez, S., López de Alda, M., Barceló, D., Gil, A., Valcárcel, Y. (2015). Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard. *Environmental Research*, 140, 225–241.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.04.003>
- Metcalf & Eddy, Revisado por: Tchobanoglous G., Burton F.L. (1998). Ingeniería de aguas residuales: Tratamiento, vertido y reutilización. Volumen I, Tercera Edición. McGraw-Hill Inc. ISBN: 0-07-041690-7.
- Metcalf, C. D., Koenig, B. G., Bennie, D. T., Servos, M., Ternes, T. A., Hirsch, R. (2003). Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (12), 2872–2880.

- <https://doi.org/10.1897/02-469>
- Michael, I., Hapeshi, E., Michael, C., Varela, A. R., Kyriakou, S., Manaia, C. M., Fatta-Kassinos, D. (2012). Solar photo-Fenton process on the abatement of antibiotics at a pilot scale: Degradation kinetics, ecotoxicity and phytotoxicity assessment and removal of antibiotic resistant enterococci. *Water Research*, 46 (17), 5621–5634. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2012.07.049>
- Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Pérez, J. A. S., Malato, S. (2014). Removal of pharmaceuticals from MWTP effluent by nanofiltration and solar photo-Fenton using two different iron complexes at neutral pH. *Water Research*, 64, 23–31. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2014.06.032>
- Mir-Tutusaus, J. A., Bacchar, R., Caminal, G., Sarrà, M. (2018 a). Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. *Water Research*, 138, 137–151. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2018.02.056>
- Mir-Tutusaus, J. A., Caminal, G., & Sarrà, M. (2018 b). Influence of process variables in a continuous treatment of non-sterile hospital wastewater by *Trametes versicolor* and novel method for inoculum production. *Journal of Environmental Management*, 212, 415–423. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2018.02.018>
- Mir-Tutusaus, J. A., Parladé, E., Llorca, M., Villagrasa, M., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., Sarrà, M. (2017). Pharmaceuticals removal and microbial community assessment in a continuous fungal treatment of non-sterile real hospital wastewater after a coagulation-flocculation pretreatment. *Water Research*, 116, 65–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.005>
- Mir-Tutusaus, J. A., Sarrà, M., Caminal, G. (2016). Continuous treatment of non-sterile hospital wastewater by *Trametes versicolor*: How to increase fungal viability by means of operational strategies and pretreatments. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 561–570. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.07.036>
- Mizerska-Dudka, M., Jaszek, M., Blachowicz, A., Rejczak, T. P., Matuszewska, A., Osinska-Jaroszuk, M., Kandefor-Szerszen, M. (2015). Fungus *Cerrena unicolor* as an effective source of new antiviral, immunomodulatory, and anticancer compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 459–468. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.015>
- Mohammadi, A., Kazemipour, M., Ranjbar, H., Walker, R. B., Ansari, M. (2015). Amoxicillin Removal from Aqueous Media Using Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 23 (2), 165–169. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2013.866944>
- Moldovan, Z. (2006). Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere*, 64 (11), 1808–1817.

- <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.02.003>
- Monsalvo, V. M., McDonald, J. A., Khan, S. J., Le-Clech, P. (2014). Removal of trace organics by anaerobic membrane bioreactors. *Water Research*, 49, 103–112. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2013.11.026>
- Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Huerta, B., Barceló, D., León, V. M. (2016). Do pharmaceuticals bioaccumulate in marine molluscs and fish from a coastal lagoon? *Environmental Research*, 146, 282–298. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.001>
- Muñoz, M., Conde, J., de Pedro, Z. M., Casas, J. A. (2018). Antibiotics abatement in synthetic and real aqueous matrices by H₂O₂/natural magnetite. *Catalysis Today*, 313, 142–147. <https://doi.org/10.1016/J.CATTOD.2017.10.032>
- Muñoz, M., Mora, F. J., de Pedro, Z. M., Alvarez-Torrellas, S., Casas, J. A., Rodriguez, J. J. (2017). Application of CWPO to the treatment of pharmaceutical emerging pollutants in different water matrices with a ferromagnetic catalyst. *Journal of Hazardous Materials*, 331, 45–54. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2017.02.017>
- Muñoz, M., Garcia-Muñoz, P., Pliego, G., Pedro, Z. M. de, Zazo, J. A., Casas, J. A., Rodriguez, J. J. (2016). Application of intensified Fenton oxidation to the treatment of hospital wastewater: Kinetics, ecotoxicity and disinfection. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(4, Part A), 4107–4112. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2016.09.019>
- Muñoz, M., de Pedro, Z. M., Casas, J. A., Rodriguez, J. J. (2015). Preparation of magnetite-based catalysts and their application in heterogeneous Fenton oxidation – A review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 176–177, 249–265. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2015.04.003>
- Muñoz, M., de Pedro, Z. M., Menendez, N., Casas, J. A., Rodriguez, J. J. (2013). A ferromagnetic γ -alumina-supported iron catalyst for CWPO. Application to chlorophenols. *Applied Catalysis B: Environmental*, 136–137, 218–224. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2013.02.002>
- Nadais, H., Li, X., Alves, N., Couras, C., Andersen, H. R., Angelidaki, I., Zhang, Y. (2018). Bio-electro-Fenton process for the degradation of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 338, 401–410. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2018.01.014>
- National Association of Clean Water Agencies. (2012). Pharmaceuticals in the water environment, 38.
- Nazaret, S. y Aminov, R. (2014). Role and prevalence of antibiosis and the related resistance genes in the environment. *Frontiers in Microbiology*, 5, 520. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00520>

- Nguyen, L. N., Hai, F. I., Yang, S., Kang, J., Leusch, F. D. L., Roddick, F., Nghiem, L. D. (2013). Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 148, 234–241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.142>
- Nie, Y., Zhang, L., Li, Y.Y., Hu, C. (2015). Enhanced Fenton-like degradation of refractory organic compounds by surface complex formation of LaFeO₃ and H₂O₂. *Journal of Hazardous Materials*, 294, 195–200. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2015.03.065>
- Obst, U., Schwartz, T., Jansen, B., Kohnen, W. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 43 (3), 325–335. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073>
- Ohlsen, K., Ternes, T., Werner, G., Wallner, U., Löffler, D., Ziebuhr, W., Hacker, J. (2003). Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage. *Environmental Microbiology*, 5 (8), 711–716. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00459>
- Olicón-Hernández, D. R., González-López, J., Aranda, E. (2017). Overview on the Biochemical Potential of Filamentous Fungi to Degrade Pharmaceutical Compounds . *Frontiers in Microbiology* . Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01792>
- Olsen, G. W., Chang, S. C., Noker, P. E., Gorman, G. S., Ehresman, D. J., Lieder, P. H., Butenhoff, J. L. (2009). A comparison of the pharmacokinetics of perfluorobutanesulfonate (PFBS) in rats, monkeys, and humans. *Toxicology*, 256(1–2), 65–74. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2008.11.008>
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., & Colpaert, J. V. (2014). Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLOS ONE*, 9(6), e97629. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629>
- Oral, O., Kantar, C. (2019). Diclofenac removal by pyrite-Fenton process: Performance in batch and fixed-bed continuous flow systems. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.084>
- Organización Mundial de la Salud y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). (2017). Progresos en materia de agua potable, saneamiento e higiene: informe de actualización de 2017 y línea de base de los ODS. [https://doi.org/ISBN 978-92-4-351289-1](https://doi.org/ISBN%20978-92-4-351289-1)
- Ort, C., Lawrence, M. G., Reungoat, J., Eaglesham, G., Carter, S., Keller, J. (2010). Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. *Water Research*, 44(2), 605–615.

- <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2009.08.002>
- Ovejero, G., Sotelo, J. L., Martínez, F., Gordo, L. (2001). Novel heterogeneous catalysts in the wet peroxide oxidation of phenol. *Water Science and Technology*, 44(5), 153–160. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0275>
- Pal, A., He, Y., Jekel, M., Reinhard, M., Gin, K. Y.H. (2014). Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environment International*, 71, 46–62. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2014.05.025>
- Palli, L., Castellet-Rovira, F., Pérez-Trujillo, M., Caniani, D., Sarrà-Adroguer, M., Gori, R. (2017). Preliminary evaluation of *Pleurotus ostreatus* for the removal of selected pharmaceuticals from hospital wastewater. *Biotechnology Progress*, 33 (6), 1529–1537. <https://doi.org/10.1002/btpr.2520>
- Palli, L., Gullotto, A., Tilli, S., Caniani, D., Gori, R., Scozzafava, A. (2016). Biodegradation of 2-naphthalensulfonic acid polymers by white-rot fungi: Scale-up into non-sterile packed bed bioreactors. *Chemosphere*, 164, 120–127. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.071>
- Pariente, M. I., Molina, R., Melero, J. A., Botas, J. Á., Martínez, F. (2015). Intensified-Fenton process for the treatment of phenol aqueous solutions. *Water Science and Technology*, 71(3). <https://doi.org/10.2166/wst.2014.515>
- Pariente, M. I., Siles, J. A., Molina, R., Botas, J. A., Melero, J. A., Martínez, F. (2013). Treatment of an agrochemical wastewater by integration of heterogeneous catalytic wet hydrogen peroxide oxidation and rotating biological contactors. *Chemical Engineering Journal*, 226, 409–415. <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.081>
- Parlamento y Consejo Europeo. (1991). Directiva 91/271/CEE del Consejo sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas.
- Parlamento Europeo y del Consejo. (1993). Directiva 93/67/CEE de la Comisión por la que se fijan los principios de evaluación de riesgo para el ser humano y el medio ambiente de las sustancias notificadas en la Directiva 67/548/CEE (1993).
- Parlamento y Consejo Europeo. (1998). Directiva 98/15/CE de la Comisión por la que se modifica la Directiva 91/271/CEE.
- Parlamento Europeo y del Consejo. (2000). Directiva 2000/60/CE por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- Parlamento y Consejo Europeo. (2008). Directiva 2008/105/CE relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE,

- 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo.
- Parlamento y Consejo Europeo. (2013). Directiva 2013/39/UE por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.
- Parlamento y Consejo Europeo. (2015) Decisión de ejecución (UE) 2015/495 de la Comisión por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas.
- Parlamento y Consejo Europeo. (2018). Decisión de ejecución (UE) 2018/840 de la Comisión por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas
- Paustian, K., Schnürer, J. (1987). Fungal growth response to carbon and nitrogen limitation: A theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(5), 613–620. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90107-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90107-6)
- Pauwels, B. y Verstraete, W. (2006). The treatment of hospital wastewater: an appraisal. *Journal of Water and Health*, 4 (4), 405–416. <https://doi.org/10.2166/wh.2006.0024>
- Pazarlıoğlu, N. K., Sarişik, M., Telefoncu, A. (2005). Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochemistry*, 40(5), 1673–1678. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2004.06.052>
- Peng, H., Pan, B., Wu, M., Liu, Y., Zhang, D., Xing, B. (2012). Adsorption of ofloxacin and norfloxacin on carbon nanotubes: hydrophobicity- and structure-controlled process. *Journal of Hazardous Materials*, 233–234, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.06.058>
- Phan, H. V, Hai, F. I., Kang, J., Dam, H. K., Zhang, R., Price, W. E., Nghiem, L. D. (2014). Simultaneous nitrification/denitrification and trace organic contaminant (TrOC) removal by an anoxic-aerobic membrane bioreactor (MBR). *Bioresource Technology*, 165, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.094>
- Pignatello, J. J., Oliveros, E., MacKay, A. (2006). Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36(1), 1–84. <https://doi.org/10.1080/10643380500326564>
- Plesch, G., Vargová, M., Vogt, U. F., Gorbár, M., Jesenák, K. (2012). Zr doped anatase supported reticulated ceramic foams for photocatalytic water purification. *Materials Research Bulletin*, 47(7), 1680–1686. <https://doi.org/10.1016/J.MATERRESBULL.2012.03.057>
- Pliego, G., Zazo, J. A., Blasco, S., Casas, J. A., Rodriguez, J. J. (2012). Treatment of Highly Polluted Hazardous Industrial Wastewaters by Combined Coagulation–

- Adsorption and High-Temperature Fenton Oxidation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(7), 2888–2896. <https://doi.org/10.1021/ie202587b>
- Pouretedal, H. R. y Sadegh, N. (2014). Effective removal of Amoxicillin, Cephalexin, Tetracycline and Penicillin G from aqueous solutions using activated carbon nanoparticles prepared from vine wood. *Journal of Water Process Engineering*, 1, 64–73. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2014.03.006>
- Rau, U. (1997). Biosynthesis, Production and properties of extracellular fungal glucans. Shaker, Aachen.
- Rau, U., Kuenz, A., Wray, V., Nimtz, M., Wrenger, J., Cicek, H. (2009). Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by *Trametes* (*Coriolus*) *versicolor* ATCC 200801. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(5), 827–837. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1700-2>
- Ravindran, A., Adav, S. S., Sze, S. K. (2012). Characterization of extracellular lignocellulolytic enzymes of *Coniochaeta* sp. during corn stover bioconversion. *Process Biochemistry*, 47(12), 2440–2448. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2012.10.003>
- Rekik, H., Zraï Jaouadi, N., Bouacem, K., Zenati, B., Kourdali, S., Badis, A., Jaouadi, B. (2019). Physical and enzymatic properties of a new manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes pubescens* strain i8 for lignin biodegradation and textile-dyes biodecolorization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 514–525. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.12.053>
- Riaño, B., Coca, M., García-González, M. C. (2014). Evaluation of Fenton method and ozone-based processes for colour and organic matter removal from biologically pre-treated swine manure. *Chemosphere*, 117, 193–199. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.06.047>
- Richardson, S.D y Ternes, T.A. (2017). Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*, 90 (1), 398–428. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04577>
- Rizzo, L., Malato, S., Antakyali, D., Beretsou, V. G., Đolić, M. B., Gernjak, W., Fattakassinou, D. (2019). Consolidated vs new advanced treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater. *Science of The Total Environment*, 655, 986–1008. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.11.265>
- Robles-Hernández, L., González-Franco, A., Crawford, D., Chun, W. C. (2018). Review of environmental organopollutants degradation by white- rot basidiomycete mushrooms. *Tecnociencia Chihuahua*, 2(2 SE-Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable). Retrieved from

- <https://vocero.uach.mx/index.php/tecnociencia/article/view/64>
- Rodarte-Morales, A. I., Feijoo, G., Moreira, M. T., Lema, J. M. (2012). Operation of stirred tank reactors (STRs) and fixed-bed reactors (FBRs) with free and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* for the continuous removal of pharmaceutical compounds. *Biochemical Engineering Journal*, 66, 38–45. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2012.04.011>
- Rodil, R., Quintana, J. B., Concha-Graña, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D. (2012). Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). *Chemosphere*, 86 (10), 1040–1049. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2011.11.053>
- Rodrigues, C. S. D., Madeira, L. M., Boaventura, R. A. R. (2009). Treatment of textile effluent by chemical (Fenton's Reagent) and biological (sequencing batch reactor) oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 172(2–3), 1551–1559. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.08.027>
- Rodriguez-Couto, S. (2017). Industrial and environmental applications of white-rot fungi. *Mycosphere* 8 (3), 456-466. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/3/7>
- Rodriguez-Garcia, G., Molinos-Senante, M., Hospido, A., Hernández-Sancho, F., Moreira, M. T., Feijoo, G. (2011). Environmental and economic profile of six typologies of wastewater treatment plants. *Water Research*, 45(18), 5997–6010. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.08.053>
- Rodríguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Balcázar, J. L. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234–242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- Rodríguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323, 361–380. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2017.04.106>
- Rodríguez-Rodríguez, C. E., Marco-Urrea, E., Caminal, G. (2010). Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresource Technology*, 101(7), 2259–2266. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.11.089>
- Rodríguez González, J. C., Rodeiro Guerra, I. (2014). El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Revista Cubana de Farmacia*, 48(3), 495–507. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152014000300015&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Romero, V., Acevedo, S., Marco, P., Giménez, J., Esplugas, S. (2016). Enhancement of

- Fenton and photo-Fenton processes at initial circumneutral pH for the degradation of the β -blocker metoprolol. *Water Research*, 88, 449–457. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2015.10.035>
- Romillac, N. (2019). Ammonification. *Encyclopedia of Ecology*, 256–263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10889-9>
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J. A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M. J., Rodríguez Fernández-Alba, A. R. (2010 a). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, 44 (2), 578–588. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2009.07.004>
- Rosal, R., Rodea-Palomares, I., Boltes, K., Fernandez-Pinas, F., Leganes, F., Gonzalo, S., Petre, A. (2010 b). Ecotoxicity assessment of lipid regulators in water and biologically treated wastewater using three aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research International*, 17 (1), 135–144. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0137-1>
- Rousk, J., y Bååth, E. (2007). Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(3), 258–267. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00398.x>
- Ruiz, B., Cabrita, I., Mestre, A. S., Parra, J. B., Pires, J., Carvalho, A. P., Ania, C. O. (2010). Surface heterogeneity effects of activated carbons on the kinetics of paracetamol removal from aqueous solution. *Applied Surface Science*, 256 (17), 5171–5175. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2009.12.086>
- Ruiz, L., Domínguez, M. A., Ruiz, N., Viñas, M. (2004). Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. *Archives of Medical Research*, 35 (3), 251–257. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2004.02.005>
- Rusevova, K., Köferstein, R., Rosell, M., Richnow, H. H., Kopinke, F.-D., Georgi, A. (2014). LaFeO₃ and BiFeO₃ perovskites as nanocatalysts for contaminant degradation in heterogeneous Fenton-like reactions. *Chemical Engineering Journal*, 239, 322–331. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.11.025>
- Ryzhakov, A. V, Kukkonen, N. A., Lozovik, P. A. (2010). Determination of the rate of ammonification and nitrification in natural water by kinetic method. *Water Resources*, 37(1), 70–74. <https://doi.org/10.1134/S0097807810010069>
- Sanglimsuwan, S., Yoshida, N., Morinaga, T., Murooka, Y. (1993). Resistance to and uptake of heavy metals in mushrooms. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(2), 112–114. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(93\)90220-3](https://doi.org/10.1016/0922-338X(93)90220-3)

-
- Santos, L. H. M. L. M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., Montenegro, M. C. B. S. M. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of The Total Environment*, 461–462, 302–316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077>
- Sainz Sastre, J. A. (2005). Tecnologías para la sostenibilidad. Procesos y operaciones unitarias de depuración de aguas residuales. Fundación EOI Editorial. ISBN: 978-84-88723-58-1
- Semerjian, L., Shanableh, M., Semreen, M.H., Samarai, M. (2018). Human health risk assessment of pharmaceuticals in treated wastewater reused for non-potable applications in Sharjah, United Arab Emirates. *Environment International*, 121, 325-331. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412018310110>
- Serrano, E., Muñoz, M., de Pedro, Z. M., Casas, J. A. (2019). Efficient removal of the pharmaceutical pollutants included in the EU Watch List (Decision 2015/495) by modified magnetite/H₂O₂. *Chemical Engineering Journal*, 376, 120265. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2018.10.202>
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2004.03.014>
- Shao, Y., Chen, H. (2018). Heterogeneous Fenton oxidation of phenol in fixed-bed reactor using Fe nanoparticles embedded within ordered mesoporous carbons. *Chemical Engineering Research and Design*, 132, 57–68. <https://doi.org/10.1016/J.CHERD.2017.12.039>
- Shin, M., Nguyen, T., Ramsay, J. (2002). Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(1), 218–223. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1088-3>
- Shreve, M. J. y Brennan, R. A. (2019). Trace organic contaminant removal in six full-scale integrated fixed-film activated sludge (IFAS) systems treating municipal wastewater. *Water Research*, 151, 318–331. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2018.12.042>
- Shreve, M. J., Brockman, A., Hartleb, M., Prebihalo, S., Dorman, F. L., Brennan, R. A. (2016). The white-rot fungus *Trametes versicolor* reduces the estrogenic activity of a mixture of emerging contaminants in wastewater treatment plant effluent. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 109, 132–140. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2016.01.018>
-

- Sinha, J., Bae, J., Park, J., Kim, K., Song, C., Yun, J. (2001). Changes in morphology of *Paecilomyces japonica* and their effect on broth rheology during production of exo-biopolymers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1), 88–92. <https://doi.org/10.1007/s002530100606>
- Sophia A., C. y Lima, E. C. (2018). Removal of emerging contaminants from the environment by adsorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150, 1–17. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2017.12.026>
- Sotelo, J. L., Rodríguez, A., Álvarez, S., García, J. (2012). Removal of caffeine and diclofenac on activated carbon in fixed bed column. *Chemical Engineering Research and Design*, 90 (7), 967–974. <https://doi.org/10.1016/J.CHERD.2011.10.012>
- Sotelo, J. ., Ovejero, G., Martínez, F., Melero, J. ., Milieni, A. (2004). Catalytic wet peroxide oxidation of phenolic solutions over a LaTi_{1-x}Cu_xO₃ perovskite catalyst. *Applied Catalysis B: Environmental*, 47(4), 281–294. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2003.09.007>
- Souza, B. M., Dezotti, M. W. C., Boaventura, R. A. R., Vilar, V. J. P. (2014). Intensification of a solar photo-Fenton reaction at near neutral pH with ferrioxalate complexes: A case study on diclofenac removal from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, 256, 448–457. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2014.06.111>
- Sperling, M. (2007). Biological Wastewater Treatment Serie: wastewater characteristics, treatment and disposal. IWA Publishing. ISBN: 1 84339161 9
- Spina, F., Varese, G. C., Vincenzi, M., Aragno, M., Arcangeli, G., Mucci, N., Gori, R. (2019). Occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater treatment plants of Tuscany: An effect-based approach to evaluate the potential environmental impact. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 222(4), 717–725. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2019.05.006>
- Stackelberg, P. E., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Henderson, A. K., Reissman, D. B. (2004). Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of The Total Environment*, 329 (1–3), 99–113. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2004.03.015>
- Steger-Hartmann, T., Länge, R., Schweinfurth, H., Tschampel, M., Rehm, I. (2002). Investigations into the environmental fate and effects of iopromide (ultravist), a widely used iodinated X-ray contrast medium. *Water Research*, 36(1), 266–274. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00241-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00241-X)
- Su, Z., Li, J., Zhang, D., Ye, P., Li, H., Yan, Y. (2019). Novel flexible Fenton-like catalyst: Unique CuO nanowires arrays on copper mesh with high efficiency across a wide

- pH range. *Science of The Total Environment*, 647, 587–596.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.08.022>
- Suarez, S., Lema, J. M., Omil, F. (2010). Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Research*, 44 (10), 3214–3224. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.02.040>
- Sun, Y., Tian, P., Ding, D., Yang, Z., Wang, W., Xin, H., Han, Y.F. (2019). Revealing the active species of Cu-based catalysts for heterogeneous Fenton reaction. *Applied Catalysis B: Environmental*, 258, 117985.
<https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2019.117985>
- Sun, S.P., Zeng, X., Li, C., Lemley, A. T. (2014). Enhanced heterogeneous and homogeneous Fenton-like degradation of carbamazepine by nano-Fe₃O₄/H₂O₂ with nitilotriacetic acid. *Chemical Engineering Journal*, 244, 44–49.
<https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2014.01.039>
- Sun, S.P., Zeng, X., Lemley, A. T. (2013 a). Kinetics and mechanism of carbamazepine degradation by a modified Fenton-like reaction with ferric-nitilotriacetate complexes. *Journal of Hazardous Materials*, 252–253, 155–165.
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2013.02.045>
- Sun, S.P., Zeng, X., Lemley, A. T. (2013 b). Nano-magnetite catalyzed heterogeneous Fenton-like degradation of emerging contaminants carbamazepine and ibuprofen in aqueous suspensions and montmorillonite clay slurries at neutral pH. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 371, 94–103.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCATA.2013.01.027>
- Tadkaew, N., Hai, F. I., McDonald, J. A., Khan, S. J., Nghiem, L. D. (2011). Removal of trace organics by MBR treatment: The role of molecular properties. *Water Research*, 45(8), 2439–2451. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.01.023>
- Taheran, M., Naghdi, M., Brar, S. K., Verma, M., Surampalli, R. Y. (2018). Emerging contaminants: Here today, there tomorrow! *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 10, 122–126.
<https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2018.05.010>
- Tan, X., Acquah, I., Liu, H., Li, W., Tan, S. (2019). A critical review on saline wastewater treatment by membrane bioreactor (MBR) from a microbial perspective. *Chemosphere*, 220, 1150–1162.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.01.027>
- Tang, J. y Wang, J. (2020). Iron-copper bimetallic metal-organic frameworks for efficient Fenton-like degradation of sulfamethoxazole under mild conditions. *Chemosphere*, 241, 125002.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.125002>
- Taran, O. P., Ayusheev, A. B., Ogorodnikova, O. L., Prosvirin, I. P., Isupova, L. A.,

- Parmon, V. N. (2016). Perovskite-like catalysts LaBO₃ (B = Cu, Fe, Mn, Co, Ni) for wet peroxide oxidation of phenol. *Applied Catalysis B: Environmental*, 180, 86–93. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.apcatb.2015.05.055>
- Tavares, A. P. A., Agapito, M. S. M., Coelho, M. A. M., da Silva, J. A., Barros-Timmons, A., Coutinho, J. A. J., Xavier, A. M. R. B. (2005). Selection and Optimization of Culture Medium for Exopolysaccharide Production by *Coriolus* (*Trametes*) *Versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8), 1499–1507. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-7370-7>
- Tchobanoglus, G., Burton, F., y Stensel, H. D. (2003). Wastewater engineering: Treatment and reuse. *McGraw-Hill Series in Civil and Environmental Engineering*. ISBN: 0070418780
- Thiebault, T., Boussafir, M., Le Milbeau, C. (2017). Occurrence and removal efficiency of pharmaceuticals in an urban wastewater treatment plant: Mass balance, fate and consumption assessment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(3), 2894–2902. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2017.05.039>
- Tisa, F., Abdul Raman, A. A., Wan Daud, W. M. A. (2014). Applicability of fluidized bed reactor in recalcitrant compound degradation through advanced oxidation processes: A review. *Journal of Environmental Management*, 146, 260–275. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2014.07.032>
- Tondera, K., Blecken, G.-T., Tournebize, J., Viklander, M., Österlund, H., Andersson Wikström, A., Tanner, C. C. (2018). Emerging Contaminants: Occurrence, Treatment Efficiency and Accumulation Under Varying Flows BT - Ecotechnologies for the Treatment of Variable Stormwater and Wastewater Flows. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70013-7_6
- Torán, J., Blánquez, P., Caminal, G. (2017). Comparison between several reactors with *Trametes versicolor* immobilized on lignocellulosic support for the continuous treatments of hospital wastewater. *Bioresource Technology*, 243, 966–974. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.07.055>
- Torres-Pérez, J., Gérente, C., Andrés, Y. (2012). Sustainable Activated Carbons from Agricultural Residues Dedicated to Antibiotic Removal by Adsorption. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 20 (3), 524–529. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(11\)60214-0](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60214-0)
- Trinh, T., Van den Akker, B., Stuetz, R. M., Coleman, H. M., Le-Clech, P., Khan, S. J. (2012). Removal of trace organic chemical contaminants by a membrane bioreactor. *Water Science and Technology*, 66(9), 1856–1863. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.374>
- Trovó, A. G., Pupo Nogueira, R. F., Agüera, A., Fernandez-Alba, A. R., Malato, S. (2011).

- Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process – Chemical and toxicological assessment. *Water Research*, 45(3), 1394–1402. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.10.029>
- Tyler, G. (1982). Metal accumulation by wood-decaying fungi. *Chemosphere*, 11(11), 1141–1146. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(82\)90124-2](https://doi.org/10.1016/0045-6535(82)90124-2)
- Valkaj, K. M., Katović, A., Zrnčević, S. (2011). Catalytic Properties of Cu/13X Zeolite Based Catalyst in Catalytic Wet Peroxide Oxidation of Phenol. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(8), 4390–4397. <https://doi.org/10.1021/ie102223g>
- Van Aken, B., Agathos, S. N. (2001). Biodegradation of nitro-substituted explosives by white-rot fungi: A mechanistic approach. *Advances in Applied Microbiology*, 48, 1–77. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(01\)48000-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(01)48000-2)
- Van Stempvoort, D. R., Roy, J. W., Grabuski, J., Brown, S. J., Bickerton, G., Sverko, E. (2013). An artificial sweetener and pharmaceutical compounds as co-tracers of urban wastewater in groundwater. *Science of The Total Environment*, 461–462, 348–359. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.05.001>
- Vasiliadou, I. A., Molina, R., Pariente, M. I., Christoforidis, K. C., Martinez, F., Melero, J. A. (2018). Understanding the role of mediators in the efficiency of advanced oxidation processes using white-rot fungi. *Chemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2018.11.035>
- Vasiliadou, I. A., Sánchez-Vázquez, R., Molina, R., Martínez, F., Melero, J. A., Bautista, L. F., Morales, G. (2016). Biological removal of pharmaceutical compounds using white-rot fungi with concomitant FAME production of the residual biomass. *Journal of Environmental Management*, 180, 228–237. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.035>
- Vasiliadou, I. A., Molina, R., Martínez, F., Melero, J. A. (2014). Experimental and modeling study on removal of pharmaceutically active compounds in rotating biological contactors. *Journal of Hazardous Materials*, 274, 473–482. <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.034>
- Vasiliadou, I. A., Molina, R., Martínez, F., Melero, J. A. (2013). Biological removal of pharmaceutical and personal care products by a mixed microbial culture: Sorption, desorption and biodegradation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 108–119. <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.010>
- Verlicchi, P., Barceló D., Kostianoy, A.G. (2018). Hospital Wastewaters: Characteristics, Management, Treatment and Environmental Risks. Volumen 60, Springer International Publishing, ISBN: 978-3-319-62177-7
- Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D., Al Aukidy, M., Zambello, E. (2013 a). Removal of selected pharmaceuticals from domestic wastewater in an

- activated sludge system followed by a horizontal subsurface flow bed — Analysis of their respective contributions. *Science of The Total Environment*, 454, 411–425. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.044>
- Verlicchi, P., Galletti, A. y Al Aukidy, M. (2013 b). Hospital Wastewaters: Qualitative Characterization and for Strategies for Their Treatment and Disposal and Wastewater Reuse and Management. Springer Netherlands, 225–251. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4942-9_8
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D. (2012). Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of The Total Environment*, 430, 109–118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.055>
- Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D. (2010 a). Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*, 389 (3), 416–428. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jhydrol.2010.06.005>
- Verlicchi, P., Galletti, A., Masotti, L. (2010 b). Management of hospital wastewaters: the case of the effluent of a large hospital situated in a small town. *Water Science and Technology*, 61 (10), 2507–2519. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.138>
- Vieno, N., Tuhkanen, T. y Kronberg, L. (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research*, 41 (5), 1001–1012. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2006.12.017>
- Vulliet, E. y Cren-Olivé, C. (2011). Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution*, 159 (10), 2929–2934. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2011.04.033>
- Wang, H., Zhang, L., Hu, C., Wang, X., Lyu, L., Sheng, G. (2018). Enhanced degradation of organic pollutants over Cu-doped LaAlO₃ perovskite through heterogeneous Fenton-like reactions. *Chemical Engineering Journal*, 332, 572–581. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2017.09.058>
- Wang, J., Liu, C., Li, J., Luo, R., Hu, X., Sun, X., Wang, L. (2017). In-situ incorporation of iron-copper bimetallic particles in electrospun carbon nanofibers as an efficient Fenton catalyst. *Applied Catalysis B: Environmental*, 207, 316–325. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2017.02.032>
- Wang, J. y Wang, S. (2016). Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review. *Journal of Environmental Management*, 182, 620–640. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2016.07.049>
- Wang, N., Zheng, T., Zhang, G., Wang, P. (2016). A review on Fenton-like processes

- for organic wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(1), 762–787. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2015.12.016>
- Wang, Y., Zhao, H., Zhao, G. (2015). Iron-copper bimetallic nanoparticles embedded within ordered mesoporous carbon as effective and stable heterogeneous Fenton catalyst for the degradation of organic contaminants. *Applied Catalysis B: Environmental*, 164, 396–406. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2014.09.047>
- Wang, Y., Zhao, H., Li, M., Fan, J., Zhao, G. (2014). Magnetic ordered mesoporous copper ferrite as a heterogeneous Fenton catalyst for the degradation of imidacloprid. *Applied Catalysis B: Environmental*, 147, 534–545. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2013.09.017>
- Wang, J. y Jin Xu, L. E. (2012). Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: Formation of Hydroxyl Radical and Application. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42 (3), 251-325 . <https://doi.org/10.1080/10643389.2010.507698>
- Wang, Y., Zhang, H., Zhang, J., Lu, C., Huang, Q., Wu, J., Liu, F. (2011). Degradation of tetracycline in aqueous media by ozonation in an internal loop-lift reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 192(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2011.04.086>
- Watkinson, S., Bebbler, D., Darrah, P., Fricker, M., Tlalka, M., Boddy, L. (2006). The role of wood decay fungi in the carbon and nitrogen dynamics of the forest floor. *Fungi in Biogeochemical Cycles*, 151–181. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511550522.008>
- Webb, S., Ternes, T., Gibert, M. y Olejniczak, K. (2003). Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. *Toxicology Letters*, 142 (3), 157–167. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00071-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00071-7)
- Wei, H. J., Cao, Y., Ji, W. J., Au, C. T. (2008). Lattice oxygen of La_{1-x}Sr_xMO₃ (M = Mn, Ni) and LaMnO₃-αFe perovskite oxides for the partial oxidation of methane to synthesis gas. *Catalysis Communications*, 9(15), 2509–2514. <https://doi.org/10.1016/J.CATCOM.2008.06.019>
- Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., Hühnerfuss, H. (2004). Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56 (6), 583–592. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2004.04.015>
- Weissbrodt, D., Kovalova, L., Ort, C., Pazhepurackel, V., Moser, R., Hollender, J., McArdell, C. S. (2009). Mass Flows of X-ray Contrast Media and Cytostatics in Hospital Wastewater. *Environmental Science & Technology*, 43(13), 4810–4817.

- <https://doi.org/10.1021/es80367255>
- Wilkinson, J., Hooda, P., Barker, J., Barton, S., Swinden, J. (2017). Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environmental pollution* 231 (1), 954-970. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.032>
- Witte, W. (1998). Medical Consequences of Antibiotic Use in Agriculture. *Science*, 279 (5353), 996-997. <https://doi.org/10.1126/science.279.5353.996>
- Woo-Sik J., Seong-Yong, C., Young-Bok, Y., Soon-Ja, S., Hee-Young, J. (2010). Culture Conditions for Mycelial Growth of *Coriolus versicolor*. *Mycobiology*, 38(3), 195–202. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2010.38.3.195>
- Wu, J., Xiao, Y.Z., Yu, H.Q. (2005). Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresource Technology*, 96(12), 1357–1363. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2004.11.019>
- Xiong, J. Q., Kurade, M. B., & Jeon, B.H. (2018). Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water? *Trends in Biotechnology*, 36 (1), 30–44. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2017.09.003>
- Xu, J., Li, Y., Yuan, B., Shen, C., Fu, M., Cui, H., Sun, W. (2016). Large scale preparation of Cu-doped α -FeOOH nanoflowers and their photo-Fenton-like catalytic degradation of diclofenac sodium. *Chemical Engineering Journal*, 291, 174–183. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2016.01.059>
- Xu, J., Wang, L. y Zhu, Y. (2012). Decontamination of Bisphenol A from Aqueous Solution by Graphene Adsorption. *Langmuir*, 28 (22), 8418–8425. <https://doi.org/10.1021/la301476p>
- Yadav, M., Srivastva, N., Shukla, A. K., Singh, R. S., Upadhyay, S. N., Dubey, S. K. (2015). Efficacy of *Aspergillus* sp. for Degradation of Chlorpyrifos in Batch and Continuous Aerated Packed Bed Bioreactors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), 16–24. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1244-0>
- Yang, L. y Ray, M. B. (2008). Degradation of paracetamol in aqueous solutions by TiO₂ photocatalysis. *Water Research*, 42 (13), 3480–3488. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2008.04.023>
- Yang, S., Hai, F. I., Nghiem, L. D., Nguyen, L. N., Roddick, F., Price, W. E. (2013 a). Removal of bisphenol A and diclofenac by a novel fungal membrane bioreactor operated under non-sterile conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 483–490. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.012>
- Yang, S., Hai, F. I., Nghiem, L. D., Price, W. E., Roddick, F., Moreira, M. T., Magram, S. F. (2013 b). Understanding the factors controlling the removal of trace organic

- contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: A critical review. *Bioresource Technology*, 141, 97–108. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.173>
- Yangali-Quintanilla, V., Sadmani, A., McConville, M., Kennedy, M., Amy, G. (2010). A QSAR model for predicting rejection of emerging contaminants (pharmaceuticals, endocrine disruptors) by nanofiltration membranes. *Water Research*, 44 (2), 373–384. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2009.06.054>
- Yao, T., Qi, Y., Mei, Y., Yang, Y., Aleisa, R., Tong, X., Wu, J. (2019). One-step preparation of reduced graphene oxide aerogel loaded with mesoporous copper ferrite nanocubes: A highly efficient catalyst in microwave-assisted Fenton reaction. *Journal of Hazardous Materials*, 378, 120712. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2019.05.105>
- Yao, Y., Gao, B., Chen, H., Jiang, L., Inyang, M., Zimmerman, A. R., Li, H. (2012). Adsorption of sulfamethoxazole on biochar and its impact on reclaimed water irrigation. *Journal of Hazardous Materials*, 209–210, 408–413. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2012.01.046>
- Yao, Y., Ochiai, T., Ishiguro, H., Nakano, R., Kubota, Y. (2011). Antibacterial performance of a novel photocatalytic-coated cordierite foam for use in air cleaners. *Applied Catalysis B: Environmental*, 106(3–4), 592–599. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2011.06.020>
- Yuan, J., Zheng, X., Cheng, F., Zhu, X., Hou, L., Li, J., Zhang, S. (2017). Fungal community structure of fallen pine and oak wood at different stages of decomposition in the Qinling Mountains, China. *Scientific Reports*, 7(1), 13866. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14425-6>
- Zhang, M., Dong, H., Zhao, L., Wang, D., Meng, D. (2019). A review on Fenton process for organic wastewater treatment based on optimization perspective. *Science of The Total Environment*, 670, 110–121. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.03.180>
- Zhang, Y. y Geißen, S.U. (2012). Elimination of carbamazepine in a non-sterile fungal bioreactor. *Bioresource Technology*, 112, 221–227. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.02.073>
- Zhang, Y., Geißen, S. U., Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>
- Zheng, H., Wang, Z., Zhao, J., Herbert, S., Xing, B. (2013). Sorption of antibiotic sulfamethoxazole varies with biochars produced at different temperatures. *Environmental Pollution*, 181, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.0>

- Zhao, Y., Kuang, J., Zhang, S., Li, X., Wang, B., Huang, J., Yu, G. (2017). Ozonation of indomethacin: Kinetics, mechanisms and toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 460–470. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.05.023>
- Zhao, H., Cao, J., Lv, H., Wang, Y., Zhao, G. (2013). 3D nano-scale perovskite-based composite as Fenton-like system for efficient oxidative degradation of ketoprofen. *Catalysis Communications*, 41, 87–90. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.catcom.2013.07.017>
- Zhu, J.N., Zhu, X.Q., Cheng, F.F., Li, P., Wang, F., Xiao, Y.W., Xiong, W.W. (2019 a). Preparing copper doped carbon nitride from melamine templated crystalline copper chloride for Fenton-like catalysis. *Applied Catalysis B: Environmental*, 256, 117830. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2019.117830>
- Zhu, Y., Zhu, R., Xi, Y., Zhu, J., Zhu, G., He, H. (2019 b). Strategies for enhancing the heterogeneous Fenton catalytic reactivity: A review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 255, 117739. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2019.05.041>
- Zorita, S., Mårtensson, L., Mathiasson, L. (2009). Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of The Total Environment*, 407(8), 2760–2770. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2008.12.030>

Summary



DOCTORAL THESIS

Advanced oxidation processes based on fungal rotating biological contactors and heterogeneous Fenton catalytic fixed bed reactors for the removal of pharmaceutical micropollutants in wastewater streams

Author:

Ana Belén Cruz del Álamo

Supervisors:

Fernando Martínez Castillejo

Raúl Molina Gil

Doctoral Program in Industrial Technology: Chemical, Environmental,
Energy, Electronics, Mechanics, and Materials

International Doctoral School

2020

INDEX

1. INTRODUCTION.....	7
1.1. Advanced bio-oxidation process based on white-rot fungi.....	10
1.2. Advanced oxidation process based on heterogeneous Fenton catalysts	14
2. SCOPE.....	15
3. EXPERIMENTAL PROCEDURE.....	17
3.1. Fungus culture preparation.....	17
3.2. Urban wastewater treatment by advanced bio-oxidation process on rotating biological contactors.....	18
3.3. Hospital wastewater treatment by advanced bio-oxidation process on modified-wooden rotating biological contactors.....	23
3.4. Hospital wastewater treatment by advanced Fenton-like process.....	26
3.5. Analytical methods for characterization of wastewater samples.....	29
3.6. Evaluation of fungal sludge.....	31
4. RESULTS AND DISCUSSION.....	33
4.1. Evaluation of advanced bio-oxidation process for the treatment of a simulated and real urban wastewater spiked with pharmaceutical compounds.....	34
4.2. Advanced bio-oxidation process as alternative fungal treatment of different real cases of urban wastewater for the removal of pharmaceutical compounds.....	42
4.3. Advanced bio-oxidation process on modified-wooden rotating biological contactors for the on-site treatment of hospital wastewater effluents for the removal of pharmaceutical compounds.....	56
4.4. Fenton catalyst based on a reticulated porous perovskite material for the on-site removal of pharmaceutical compounds in hospital wastewater streams.....	75
5. CONCLUSIONS.....	90
6. REFERENCES.....	91

This PhD Thesis has been developed in the Chemical and Environmental Technology Department at Rey Juan Carlos University and within the research line of Advanced Oxidation Technologies for the removal of non-biodegradable contaminants in urban and industrial wastewater streams. The research has been funded by the Regional Government of Comunidad de Madrid through the projects S2013/MAE-2716 (Red Madrileña de Tratamientos Avanzados de Aguas Residuales) and S2018/EMT-4341 (Red Madrileña de Tratamientos para la Reutilización de Aguas Residuales y Valorización de Fangos).

1. INTRODUCTION

Water is an essential natural resource for the life and the environmental sustainability, which have suffered an important deterioration in its quality during the last decades. Fast-social development and inappropriate disposal of used water produce an increase in wastewater generation. Therefore, the protection and improvement of the aquatic environment would be a social, economic, political and scientific concern.

In addition, new analytical techniques allow the detection of new micropollutants of emerging concern which may be responsible for negative ecotoxicological and bio-accumulative effects on the aquatic life (Taheran et al., 2018; Mendoza et al, 2015). Among them, pharmaceutical compounds are considered

particularly relevant due to their continuous presence in natural water basins, their potential toxicity and risk to the aquatic environment, and low biodegradability in the conventional wastewater treatment plants. Actually, urban sewage effluents are one of the main sources of pharmaceuticals in water pollution due to the limited efficiency of wastewater treatment plants (WWTPs) to remove them (Han-Tran et al., 2017; Thiebaut et al., 2017; Bolmann et al., 2016; Verlicchi et al., 2013; Martín et al., 2012; Deblonde et al., 2011). Consequently, some of these compounds are commonly found at low concentration in different aqueous medium (underground, surface and tap water) ranged from $\mu\text{g/L}$ to ng/L (Table 1: Gogoi et al., 2018).

Table 1. Therapeutic families' concentrations in diverse aqueous medium (Gogoi et al., 2018)

Therapeutic family	WWTPs effluent	Surface water	Underground water	Tap water
Analgesics	60 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	-	0.12 $\mu\text{g/L}$
Antibiotics	6 $\mu\text{g/L}$	1.9 $\mu\text{g/L}$	0.2 $\mu\text{g/L}$	-
Antiepileptic	22 $\mu\text{g/L}$	1.8 $\mu\text{g/L}$	1.1 $\mu\text{g/L}$	0.05 $\mu\text{g/L}$
β -blockers	9 $\mu\text{g/L}$	2 $\mu\text{g/L}$	-	0.27 $\mu\text{g/L}$
Hormones	0.1-650 ng/L	0.1-17 ng/L	13-80 ng/L	0.2-2.1 ng/L
Cholesterol regulators	5 $\mu\text{g/L}$	0.2 $\mu\text{g/L}$	7.5 $\mu\text{g/L}$	0.17 $\mu\text{g/L}$

There are many different points where urban wastewater could be generated (urban centres, services areas or domestic zones). However, among the various streams to be consider incomes of WWTPs, hospital wastewater effluents appear as an important input of these emerging concern micropollutants owing to the high concentration of pharmaceuticals detected in their complex matrix (Verlicchi et al., 2018; El-Ogri et al., 2016; Kümmerer et al., 2001). As it can be seen from Table 2, hospital effluents are between 3 and 150 times more concentrated of these micropollutants than urban wastewater. The concentrations of analgesic and antibiotic are between 5 and 15 times higher in hospital effluents than urban ones, being between 50 and 150 for X-ray contrast agents.

Table 2. Average concentration for different therapeutic families in hospital and urban wastewater (Verlicchi et al., 2010 a)

Therapeutic family	Average detected concentration ($\mu\text{g/L}$)		Ratio $\frac{[\text{Hospital}]_{\text{average}}}{[\text{Urban}]_{\text{average}}}$
	Hospital	Urban	
Analgesics	100	12	3 - 15
Antibiotics	11	1	1 - 10
β -blockers	6	3	1 - 20
Hormones	0,2	0,1	1 - 3
X-ray contrast agents	1.000	7	50-150

In this context, hospital wastewater effluents usually represent from 40 to 70 % of the pharmaceutical concentration incoming to WWTPs (Santos et al., 2013; Verlicchi et al., 2010 a and b), because discharge their wastewater effluents into municipal sewage system without any preliminary treatment.

Nowadays, the continuous discharge of pharmaceuticals into the environment imply an actual problem because their legal concentration limits are not yet regulated in most of the countries. Only some of these micropollutants are identified in the current list of priority substances in water for Union-wide monitoring approved by the European Parliament in 2018 (Decision 2018/840 /EU): macrolide antibiotics – erythromycin, clarithromycin, azithromycin-, amoxicillin and ciprofloxacin. (European Parliament, 2018).

Water is a fundamental component for the development of hospital centres. Thus, although different management plans have been established for this resource, its critical composition will always be more perilous than domestic one. In this situation, several works have proposed end-of pipe dedicated wastewater treatments for hospital wastewater as a potential alternative to decrease the load of pharmaceuticals (Escher et al., 2011). This has been tested in different studies over Europe, in which different on-site treatments have been developed for specific treatment of hospital wastewater, instead of the direct discharge into the municipal sewer system (Rodríguez- Narvaez et al., 2017; Verlicchi et al., 2012; Verlicchi et al., 2010 a; Pauwels and Verstraete, 2006). Among the different proposed technologies, advanced oxidation processes, membrane technologies and biological treatments are well-known as powerful treatments for the degradation of chemical pollutants (Rizzo et al., 2019; Rodríguez-Narvaez et al., 2017). Biological treatments based on membrane bioreactors (MBRs) have shown promising results for the treatment of hospital wastewater with removals of pharmaceutical micropollutants ranging from 19 to 94 %. These biological processes have been effective for some compounds like clarithromycin, but others, such as carbamazepine or diclofenac, were hardly removed (Beier et al., 2011). However, nowadays these alternative processes are still far away to be a realistic perspective to the future (Taheran et al., 2018). Most of them achieve high removal efficiencies but they usually consider strict conditions, which make difficult to scale up the processes to an industrial scale. Thus, to find an alternative treatment able to remove the micropollutants from wastewater has emerged as a critical duty in the environmental research field.

This work will be focused on two different objectives. Firstly, the assessment of an alternative process able to remove pharmaceutical micropollutants for the centralized treatment of real urban wastewater, which could be replace the conventional ones. In this framework, an advanced bio-oxidation process base on

white-rot fungi in a rotating biological contactor was proposed as alternative biological urban wastewater treatment. Secondly, the separated treatment of the hospital wastewater will be studied with the aim to explore on-site pre-treatments for the removal of the pharmaceutical micropollutants from the hospital wastewater before its discharge to the municipal sewage system (Rodríguez-Narvaez et al., 2017; Verlicchi et al., 2012). In this case, two different options were evaluated: the advanced bio-oxidation process by white-rot fungi and an advanced oxidation Fenton-like process.

1.1. Advanced bio-oxidation process based on *white-rot fungi*

White rot fungi (WRF) are basidiomycetes that can degrade the lignin component of complex lignocellulose substrates (Mir-Tutusaus et al., 2018; Palli et al., 2017; Marco-Urrea et al., 2009). WRF are robust organisms with high tolerance to toxic environments and they withstand high temperatures in a wide range of pH (Woo-Sik et al., 2010). The ability of the lignin-degrading WRF is related to their unspecific oxidative enzymatic system with lignin-modifiers extra-cellular enzymes, especially laccase and peroxidases, and intra-cellular enzymatic complexes, such as cytochrome P450 (Olicón-Hernández et al., 2017).

In addition, the production of hydrogen peroxide in ligninolytic fungal cultures has been proven by different mechanisms based on peroxide-generating enzymes such as glucose or glyoxal oxidases (Zhao and Janse, 1996; Daniel et al., 1994). The ubiquitous formation of hydrogen peroxide upon WRF system enables the generation of hydroxyl radicals through Fenton-like reactions by quelated iron complexes of the medium (Krueger et al., 2016). This process has been suggested to be site-specific in nature, with production of hydroxyl radicals occurring in the fungi cell wall close to lignin and cellulose (Backa et al., 1993). Several works have also demonstrated that the production of hydroxyl radicals can be enhanced by addition of quinone-like mediators. These compounds favor quinone redox cycles driven by intracellular quinone reductase and extracellular lignin-modifying enzymes to produce hydrogen peroxide (Marco-Urrea et al., 2010 a; Gómez-Toribio et al., 2009). The non-specificity and high potential oxidation of hydroxyl radicals makes them very effective for the degradation of non-biodegradable pollutants. Thus, WRF are considered a potential alternative for the removal of micropollutants of emerging concern such as pharmaceutical compounds (Mir-Tutusaus et al., 2018; Olicón-Hernández et al., 2017; Palli et al., 2017; Marco-Urrea et al., 2009). Thus, WRF provide a promising route to degrade complex organic substrates (Figure 1), making them a

good alternative of biological treatment for the removal of micropollutants of emerging concern such as pharmaceutical compounds.

Nowadays, previous works of WRF-based systems have been focused on the removal of pharmaceutical compounds in malt-extract synthetic mediums (optimum for fungal growth) in order to explore their degradation pathways and by-products (Nguyen et al., 2013; Yang et al., 2013 a). Others have been focused on the treatment of real effluents coming from urban (Badia-Fabregat et al., 2017; Cruz-Morató et al., 2013), hospital (Mir-Tutusaus et al., 2017; Cruz-Morató et al., 2014) and veterinary (Badia-Fabregat et al., 2016) depuration facilities. However, in case of real wastewater streams, the treatments performed with fungal processes established operating conditions that present several drawbacks associated to their application at industrial scale (Mir-Tutusaus et al., 2018), such as the requirement of adding supplementary biodegradable carbon and nitrogen nutrients, the design of bioreactors, bacterial contaminations or high hydraulic retention times. Recently, a critical review of the limiting drawbacks of WRF to be considered a real wastewater treatment alternative for the removal of organics micropollutants has been reported (Mir-Tutusaus et al., 2018).

The addition of supplementary carbon and nitrogen readily biodegradable sources during operation is one of the limitations of WRF (Badia-Fabregat et al., 2015; Cruz-Morató et al., 2013). Glucose and ammonium tartrate have been the preferred compounds as supplementary source of nutrients in most of the studies (Badia-Fabregat et al., 2015; Jelic et al., 2012; Zhang and Geißen, 2012). This is a serious limitation to up-scaling the process, due to the cost of these substrates when large a volume of wastewater is treated in the wastewater treatment plants.

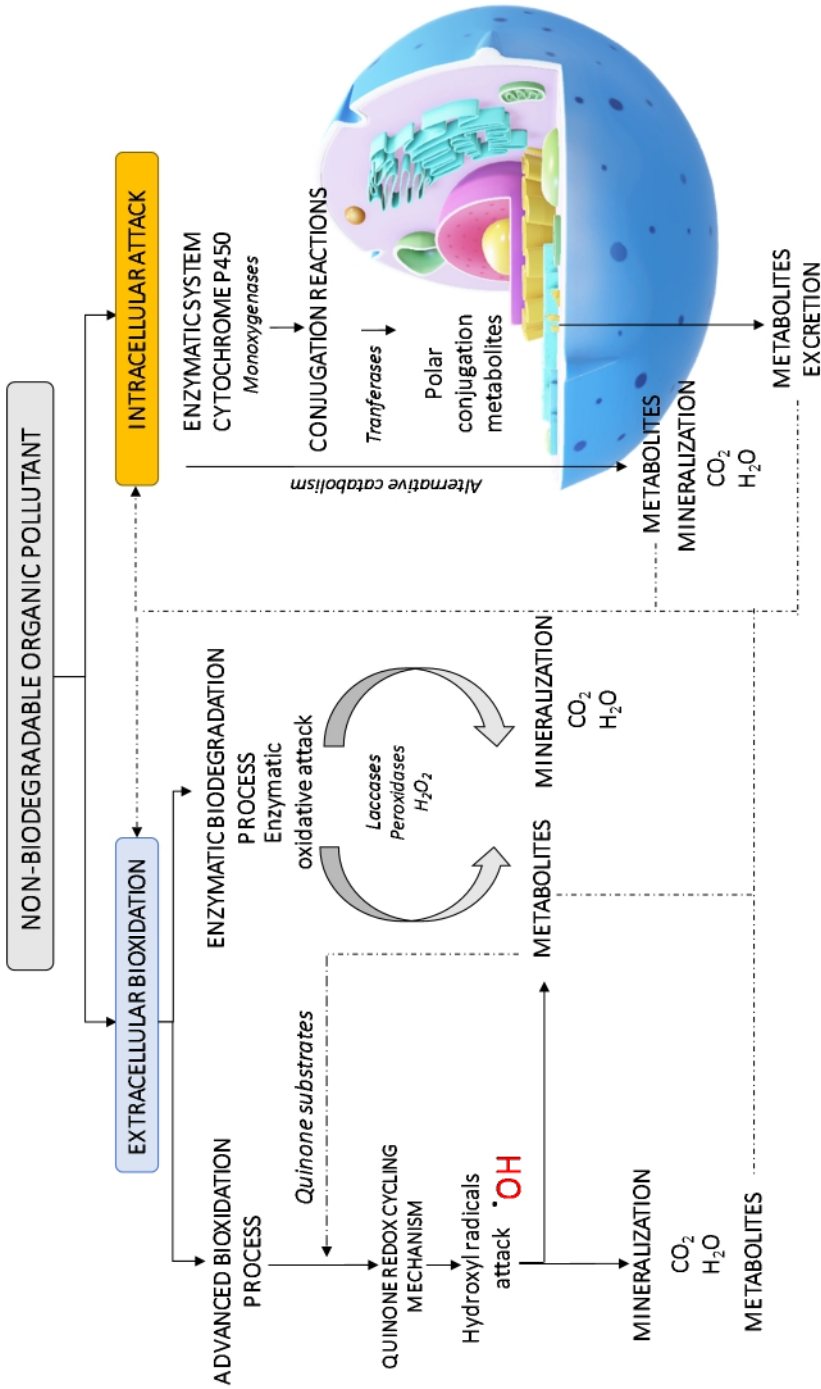


Figure 1. Enzymatic routes for the bio elimination of non-biodegradable organic pollutants by WRF

Other important limitation is the bacterial contamination of the biomass fixed in the reactor under non-sterile conditions. The proliferation of autogenous microorganism's own wastewater causes the competition for substrates leading to the loss and destabilization of fungal biomass, and consequently, reducing the removal of micropollutants. Several strategies have been proposed to promote the white-rot fungi growth and maintain their activity over bacteria. They include immobilization of the fungal biomass, pH adjustment, periodical biomass renewal or optimization of the carbon-to-nitrogen ratio (C: N ratio). However, none of them are completely satisfactory for the application at full-scale.

Previous works have studied the treatment of simulated wastewater with model micropollutants in optimal C: N conditions under sterile conditions at lab-scale (Cruz-Morató et al., 2014 and 2013; Jelic et al., 2012). However, the C: N ratio is depending on the wastewater nature and the addition of supplementary sources to achieve the optimal composition is not feasible from an economical point of view. The option of partial biomass renovation requires an external system for cultivation and growth of fresh fungi that should be periodically inoculated in the reactor. It usually implies that a significant proportion of fungal biomass should be retired from the reactor and replaced by fresh white-rot fungi (Badia-Fabregat et al., 2016; Blázquez et al., 2006). Finally, the immobilization of the fungal biomass into carriers/supports allows the decoupling of hydraulic retention time (HRT) and the sludge retention time (SRT), producing the wash-out of the suspended bacteria microorganisms. This is a good strategy, but a minimum HRT of 2 days is necessary for an effective removal of micropollutants (Hai et al., 2009; Blázquez et al., 2008 a and b). The immobilization of fungal biomass also reduces the problems of WRF growth in dispersed mycelium on the reactor surfaces (wall, stirrers) or forming foams. Different solutions have been applied in literature, such as the growth of fungus in form of pellets (Espinosa-Ortiz et al., 2016; Blázquez et al., 2006) or the immobilization on inert (polyurethane) or non-inert (wooden chips and wooden residues) carriers (Torán et al., 2017; Li et al., 2016; Liang et al., 2012). Fixed bed reactors, fluidized bed reactors and membrane biological reactors (MBR) are the technologies usually found in literature in these cases (Torán et al., 2017; Zhang et al., 2017, Hai et al., 2013; Nguyen et al., 2013; Jelic et al., 2012; Rodarte-Morales et al., 2012). Interestingly, the immobilization of fungi into carriers can enhance the efficiency of the fungal treatment, especially in non-sterile conditions (Li et al., 2015).

Summarizing, WRF treatment could be a feasible alternative to treat large volume of effluents which contain emerging organic micropollutants. However, it is necessary to overcome its current limitations to finally propose an improved treatment which could be replace the conventional ones. So, although WRF can be a

real option for the removal of organic micropollutants from actual wastewater, further studies are necessary at pilot plant to the full adaptation of the process to the real application for the centralized treatment of urban wastewater.

1.2. Advanced oxidation process based on heterogeneous Fenton catalysts

Otherwise, the effectiveness of advanced oxidation processes (AOPs) for the elimination of complex dissolved emerging pollutants which generally are toxic or non-biodegradable have been demonstrated (Deegan et al., 2011). Moreover, AOPs have been tested as pre-treatment for the removal of emerging concern micropollutants present in hospital wastewater. Among AOPs, Fenton oxidation has emerged as a feasible technology for the removal micropollutants such as amoxicillin, paracetamol, ofloxacin, diclofenac, etc. in different water matrixes (Mirzaei et al., 2017; Wilde et al., 2017). Fenton oxidation has been also proposed for hospital wastewater effluents, but mainly focused on the reduction of the soluble organic matter or the increase of its biodegradability instead of an efficient removal for emerging pharmaceutical micropollutants (Muñoz et al., 2016; Kajitvichyanukul et al., 2006). The main drawbacks of Fenton oxidation are the narrow range of operating pH (2.5-3.5) that is required for the efficiency of typical soluble catalytic iron species. The use of heterogeneous Fenton-like catalysts can overcome this limitation as well as the amounts of metallic iron sludge generated after neutralization and precipitation of the dissolved metallic salts (Kumar et al., 2019; Oral et al., 2019; Mirzaei et al., 2017).

In this sense, most of heterogeneous Fenton catalysts are based on iron-containing materials based on the immobilization of iron species in different supports such as zeolites (Ovejero et al., 2001), pillared clays (Guélou et al., 2003), alumina (Muñoz et al., 2013), amorphous mesoporous silica (Pariante et al., 2013; Melero et al., 2006) and activated carbons (Qian et al., 2018). But the use of other low-valency transition-metal ions such as Cu, Mn, Ru, V and Ti may be also extend the scope of the Fenton reaction (Bokare et al., 2014). In the last decades, perovskites type oxides have been extensively investigated as catalysts for several applications (Peña et al., 2001), including heterogeneous Fenton-like catalyst (Nie et al., 2015; Rusevova et al., 2014; Sotelo et al., 2004). Perovskite materials are characterized by a crystal structure as CaTiO_3 and their chemical formula is represented as ABO_3 , where A-site is a lanthanide metal (La, Ba, Ca, and Sr) with a 12-coordinated cation and B-site is a transition metal (Ni, Ti, Co, Fe, Mn or Cu) with a 6-coordinated cation as active site (Soongpravit et al., 2012). Their catalytic properties are closely related to the nature of the A and/or B cations and can be modified by the partial substitution of A and B,

leading to the formation of a variety of mixed oxides. This fact could affect to the chemical state of the cations, the generation of oxygen vacancies, the mobility of oxygen lattice and the formation of structural defects (Wei et al., 2008). These features make perovskites promising heterogeneous Fenton-like catalysts.

A preliminary work of $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ has been reported as an active and stable heterogeneous Fenton-like catalyst for the removal of paracetamol as model pollutant in ultrapure water (Carrasco et al., 2016). However, the feasibility for real and complex wastewater matrixes, like hospital wastewater, has not been studied. Moreover, a critical point for the full-scale implementation of powdered heterogeneous Fenton-type catalysts in fixed-bed reactors and/or stirred tank reactors with stationary catalytic baskets is that they need to be pelletized or immobilized in opened macrostructures (Bello et al., 2019; Tisa et al., 2014). In this sense, some examples of continuous fixed-bed reactors filled with heterogeneous catalysts have been proposed to Fenton-like oxidation processes based on packing metallic-based catalyst pellets (Kantar et al., 2019; Martínez et al., 2018; Pariente et al., 2015). In recent years, reticulated porous ceramics (RPCs) have been also investigated using the polymeric sponge replication method, which is a simple and effective procedure to make reticulated ceramic foams, also known as open-cell cellular ceramics. In this method, a porous polymeric sponge used as scaffold is impregnated with a slurry of ceramic precursors to form a macroporous structure with a high mechanical strength after burning out the organic polymer and sintering of the ceramic precursors at high temperature (Fey et al., 2017). The application of heterogeneous catalyst conformed as RPCs for AOPs has been hardly reported in literature. Some examples can be found in photocatalytic systems for water or air purification using RPCs of different materials (alumina or polysiloxane-polyurethane foams) as support of the active TiO_2 photo catalyst (Plesch et al., 2012; Yao et al., 2011; Josset et al., 2010). Kocakuşakoğlu et al. (2015) demonstrated a remarkable performance an open three-dimensional network structure of a reticulated porous ZnO ceramic material with a high interconnected porosity in the photocatalytic degradation of the azo dye Reactive Red 180.

2. SCOPE

The main scope of this research is the development of advanced biological and oxidation processes capable of an efficient removal of pharmaceutical micropollutants in urban and hospital wastewater streams.

On one hand, the first objective is to assess the viability of an advanced bio-oxidation process based on *Trametes versicolor* as white-rot fungi for the removal of

pharmaceutical micropollutants from urban and hospital wastewater. Taking into account all the previously limitations of WRF for an actual wastewater treatment, this work proposes a fungal bioreactor based on rotating biological rotating contactors (RBCs). For this purpose, *Trametes versicolor* was immobilized in RBCs for the continuous treatment of different wastewater under non-sterile conditions, non-addition of supplementary biodegradable sources and non-renovation of fungal microorganisms. The performance of the fungal biological process for a centralized biological treatment of urban real wastewater and the treatment of hospital streams were evaluated and validated in terms of the removal of carbon, nitrogen, phosphorus sources of the wastewater. Finally, the stability of the fungal microorganisms as well as the contribution of bacterial communities to the overall efficiency of the system have been assessed under non-sterile conditions of treatment of real wastewater.

On the other hand, a second objective is to evaluate the feasibility of heterogeneous Fenton-like catalytic system based on a reticulated porous perovskite (RPP) material of $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ for the removal of emerging pharmaceutical micropollutants in continuous fixed bed reactors. The activity and stability of this type of catalyst will be assessed at different initial pH values, temperatures and hydrogen peroxide dosages. Finally, the efficiency of the RPP material will be tested for the removal of the pharmaceutical micropollutants contained in a hospital wastewater in the real range of concentrations ($\mu\text{g/L}$) as on-site pre-treatment prior to discharge into the sewer network.

According to these general objectives, the specific ones can be summarized as follows:

- Performance of the advanced bio-oxidation process with *Trametes versicolor* immobilized on rotating biological contactors for the continuous treatment of a simulated and real urban wastewater effluents from the primary treatment of a demo wastewater treatment plant fortified with pharmaceutical micropollutants.
- Evaluation and validation of the advanced bio-oxidation process as alternative centralized biological treatment of real urban wastewater or as a decentralized on-site pre-treatment of hospital wastewater effluents before discharging in the sewer network.
- Influence of urban wastewater effluents composition (initial carbon and nutrients' loadings) and hydraulic retention time on the performance of the advanced bio-oxidation process with *Trametes versicolor* immobilized in rotating biological contactors.

- Effect of modified rotating biological contactors with wooden-discs on the stabilization of the immobilized fungal biomass in order to avoid the addition of supplementary biodegradable sources and/or renovation of fungal microorganisms.
- Evaluation of the fungal and bacterial contribution on the performance of fungal rotating biological contactors for the treatment of non-sterile urban wastewater. As well as, the evolution of both microorganisms during the continuous treatment of hospital wastewater streams in rotating biological contactors.
- Preparation of reticulated porous perovskite materials based on sponge replication methods for their application in catalytic fixed bed reactors.
- Influence of initial pH, temperature and hydrogen peroxide dosage on the activity and stability of reticulated porous perovskite materials for the removal of pharmaceutical micropollutants in real wastewater streams.
- Evaluation of reticulated porous perovskite materials in catalytic fixed bed reactors for the removal of pharmaceutical micropollutants as on-site pre-treatment of hospital wastewater.

3. EXPERIMENTAL PROCEDURE

3.1. Fungus culture preparation

The strain *Trametes versicolor* (CECT 20817) was collected from the “Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) and maintained by sub-culturing on 2 % malt extract agar slants (pH 4.5) at 25 °C. Subcultures were routinely prepared every 15 days. Mycelial mass was produced according to a procedure previously described by Vasiliadou et al. (2016). Briefly, the mycelial suspension was obtained by inoculation of four pieces of 1 cm² area of *Trametes versicolor* agar plugs to 500 mL Erlenmeyer flasks containing 150 mL of malt extract medium (MEM, 20 g/L malt extract) adjusted to a pH value of 4.5. The Erlenmeyer flasks were incubated on an orbital shaker at 80 rpm and room temperature. After 7-9 days, the MEM was removed by filtration, and the dense mycelial mass was blended with a homogenizer. The blended mycelial suspensions were used as fungal inoculum to the rotating biological contactors.

3.2. Urban wastewater treatment by advanced bio-oxidation process on rotating biological contactors

3.2.1. Immobilization of fungal inoculum on rotating biological contactors

The RBCs were provided by ACAI Depuración S.L. (Huesca, Spain). The bioreactor was made of AISI 304 stainless steel and it was equipped with five rotating discs (30 cm - diameter) made of polypropylene, which provide a total surface area of 0.71 m² (Figure 2).

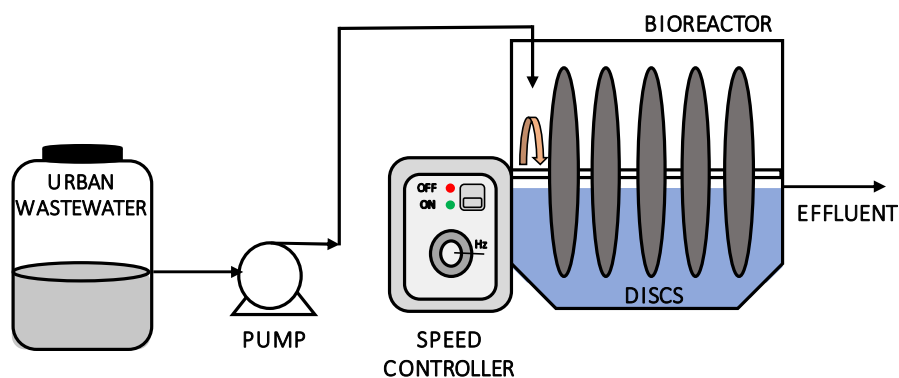


Figure 2. Schematic set-up of rotating biological contactors

The bioreactor inoculated with blended mycelial inoculum was initially operated in fed-batch mode for 30 days (start-up period: immobilization and growth stage) until obtaining a homogeneous biofilm immobilized over the discs. The batch working volume was set to 15 L being 60 % of the discs submerged throughout operation and a rotational speed of 7.5 rpm. During this stage, the reactor was operated in draw-fill cycles using 15 L of a 6.5 g/L malt extract solution at pH of 4.5 (equivalent to 3 g/L of total organic carbon) as specific fungal growth medium. Once 50 % of the initial malt extract concentration was consumed, 1 L of the reactor's medium was replaced with fresh malt extract in order to restore again the initial concentration and starting a new draw-fill cycle. After 30 days, the malt extract was substituted by a synthetic urban wastewater prepared following the procedure described elsewhere (Marco-Urrea et al., 2009), but maintaining the same total carbon concentration and pH. The bioreactor was operated under these conditions (start-up period: acclimation and growth stage) for 20 days. The excess of organic content and pH (4.5) for both stages, using either the malt extract or the synthetic wastewater, maximizes the production of extracellular polysaccharides (EPS) that enhance the adhesion of *Trametes versicolor* to the discs surface (Tavares et al.,

2005). Finally, the bioreactor was continuously operated for the treatment of urban wastewater coming from different wastewater treatment plants.

3.2.2. Wastewater samples and operation conditions of RBCs for the treatment of urban wastewater effluents

After the start-up stage, the treatment under continuous operation of different urban wastewater was carried out. Firstly, a simulated urban wastewater (SUWW) spiked with eight 50 µg/L of pharmaceutical compounds from different therapeutic groups was treated (Table 3): 4-AAA, antipirine; ACF, clofibrac acid; CFN, caffeine; CZP, carbamazepine; DCF, diclofenac; GFZ, gemfibrozil; HCT, hydrochlorothiazide and SMX, sulfamethoxazole. These compounds were chosen due to their occurrence and potential eco-toxicity in the effluent of WWTPs (Kay et al. 2017; Al Aukidy et al. 2012). The SUWW contained 0.6 g/L saccharide, 37 mg/L of ammonium tartrate and 10 and 100 mL/L of micro- and macro-nutrient solutions, respectively. The macro-nutrient solution contained 0.2 g/L KH_2PO_4 , 0.05 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 10 mg/L CaCl_2 in distilled water, while the micro-nutrient solution was consisted of minerals and vitamins (Marco-Urrea et al., 2009).

Then, different urban wastewater streams were treated. They were collected from: i) demo pilot plant located in Rey Juan Carlos University, Móstoles Campus, Madrid (Spain) designed to 1,800 equivalent inhabitants providing a capacity of 360 m³/d (**DPP-URJC**); and ii) wastewater treatment plant at Toledo (Spain) of 65,000 equivalent inhabitants currently working with 8,800 m³/d (**WWTP-Toledo**). Several samples of both DPP-URJC and WWTP-Toledo facilities were used for the study at different operation conditions (Table 4). During these treatments, the working volume was set to 10 L and 40 % of the discs were submerged. To ensure an appropriate aeration in the reactor, the set of the discs was mechanically rotated at 12 rpm. Table 4 summarizes the characterization data of the wastewater samples and the operating conditions of RBCs for the treatment of the different real urban wastewater effluents. All the wastewater samples, except **DPP-URJC-1-spiked** maintained its raw concentration of pharmaceutical compounds. In this case, five pharmaceutical compounds more than SUWW from different therapeutic groups were spiked (β -blockers: ATN, atenolol; analgesic: IBP, ibuprofen; hormones: PGT, progesterone; antihistaminic: RNT, ranitidine and psychiatric: SPD, sulpiride) (Table 3).

Table 3. Therapeutic families' classification of pharmaceutical compounds spiked during urban wastewater treatment

Therapeutic family	Pharmaceutical	Abbreviation
Anti-inflammatories and analgesics	Antipirine	4-AAA
	Diclofenac	DCF
	Ibuprofen	IBP
Antibiotics	Sulfamethoxazole	SMX
Antihistaminic	Ranitidine	RNT
B-blockers	Atenolol	ATN
Cholesterol regulators	Clofibric acid	ACF
	Gemfibrozil	GFZ
	Hydrochlorothiazide	HCT
Hormones	Progesterone	PGT
Psychiatric	Carbamazepine	CZP
	Caffeine	CFN
	Sulpiride	SPD

Moreover, except **DPP-URJC-2-*Trametes versicolor***, all the stages were treated under the advanced bio-oxidation process (ABOP), that comprises the addition of a lignin derived quinone-type mediator (gallic acid, 85 mg/L) and complexed metal sources (Fe^{3+} -oxalate, 145 mg/L; and Mn^{2+} -nitrate, 20 mg/L). Gallic acid increases the activities of fungal ligninolytic enzymes, whereas metallic species act as Fenton-like catalytic precursors to promote the production of highly oxidizing hydroxyl radicals to degrade recalcitrant pollutants of wastewater. The concentrations of these chemicals were taken from previous works (Christoforidis et al., 2018; Gómez-Toribio et al., 2009). The inlet streams were adjusted to a pH of 4.5 in order to inhibit the bacteria cellular transport and leading to the predominance of fungi activity in the bioreactor (Mir-Tutusaus et al., 2018). The hydraulic retention time (HRT) was fixed at 1 day for all the wastewater samples (minimum value reported in literature for continuous reactors based on white-rot fungi (Mir-Tutusaus et al., 2018), except for **DPP-URJC-4-HRT** sample that was decreased at 0.5 day.

Table 4. Characterization of urban wastewater and operating conditions of RBCs system

Stage	Wastewater				Operating conditions RBCs			
	Feed composition	pH	Pharmaceuticals	Advanced bio-oxidation promoters	Operation mode	HRT	Submerged (%)	Speed (rpm)
Immobilization and growth	Malt extract	4-5	-	-	Discontinuous	-	60 ± 10	7.5
Acclimation	SUWW	4,5	-	-	Discontinuous	-	60 ± 10	7.5
URBAN WASTEWATER TREATMENTS								
Simulated urban wastewater	SUWW TOC: 300 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 5 mg/L	4,5	4-AAA, DCF, ACF, GEZ, HCT, CZP, CFN, SMX 50 µg/L	Gallic acid Fe ³⁺ -oxalate Mn ²⁺ -nitrate	85 mg/L 145 mg/L 20 mg/L	Continuous	1 day	40 ± 10 12
DPP-URIC wastewater <i>1-spiked</i>	Raw wastewater TOC: 415 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 50 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 2 mg/L	4,5	4-AAA, DCF, ACF, GEZ, HCT, CZP, CFN, SMX, IBP, SPD, RNT, PGT, ATN 50 µg/L	Gallic acid Fe ³⁺ -oxalate Mn ²⁺ -nitrate	85 mg/L 145 mg/L 20 mg/L	Continuous	1 day	40 ± 10 12

Table 4 (Continuation). Characterization of urban wastewater and operating conditions of RBCs system

Stage	Wastewater			Operating conditions RBCs				
	Feed composition	pH	Pharmaceuticals	Advanced bio-oxidation promoters	Operation mode	HRT	Submerged (%)	Speed (rpm)
URBAN WASTEWATER TREATMENTS								
DPP-URIC wastewater <i>2- T. versicolor</i>	Raw wastewater TOC: 145 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 120 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 12 mg/L	4.5	Raw concentration	-	Continuous	1 day	40 ± 10	12
DPP-URIC wastewater <i>3- biological T. versicolor + Bio-oxidation</i>	Raw wastewater TOC: 115 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 175 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 14 mg/L	4.5	Raw concentration	Gallic acid Fe ³⁺ -oxalate Mn ²⁺ -nitrate	Continuous	1 day	40 ± 10	12
DPP-URIC wastewater <i>4-HRT</i>	Raw wastewater TOC: 140 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 30 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 10 mg/L	4.5	Raw concentration	Gallic acid Fe ³⁺ -oxalate Mn ²⁺ -nitrate	Continuous	12 h	40 ± 10	12
WWTP-Toledo 1	Raw wastewater TOC: 76 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 29 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 13 mg/L	4.5	Raw concentration	Gallic acid Fe ³⁺ -oxalate Mn ²⁺ -nitrate	Continuous	1 day	40 ± 10	12
WWTP-Toledo 2	Raw wastewater TOC: 116 mg/L N-NH ₄ ⁺ : 41 mg/L P-PO ₄ ³⁻ : 2,3 mg/L	4.5	Raw concentration	Gallic acid Fe ³⁺ -oxalate Mn ²⁺ -nitrate	Continuous	1 day	40 ± 10	12

3.3. Hospital wastewater treatment by advanced bio-oxidation process on modified wooden rotating biological contactors

3.3.1. Immobilization of fungal inoculum on modified wooden rotating biological contactors

The previous described rotating biological contactors was modified by the fixation of pine wooden planks over the discs made of polypropylene (0.5 cm of thickness) in two different RBCs-unit before to the immobilization of *Trametes versicolor* (Figure 3). These wooden planks provide the same total area available for the attachment of fungal biomass (0.71 m^2). Additionally, the system also includes an impeller integrated with the shaft of the discs in order to improve the turbulence and homogenization of vessel's content as well as the oxygen mass transfer from atmospheric air to the liquid. Two identical bioreactors were operated simultaneously, in order to obtain a clear view of the reproducibility of the process.

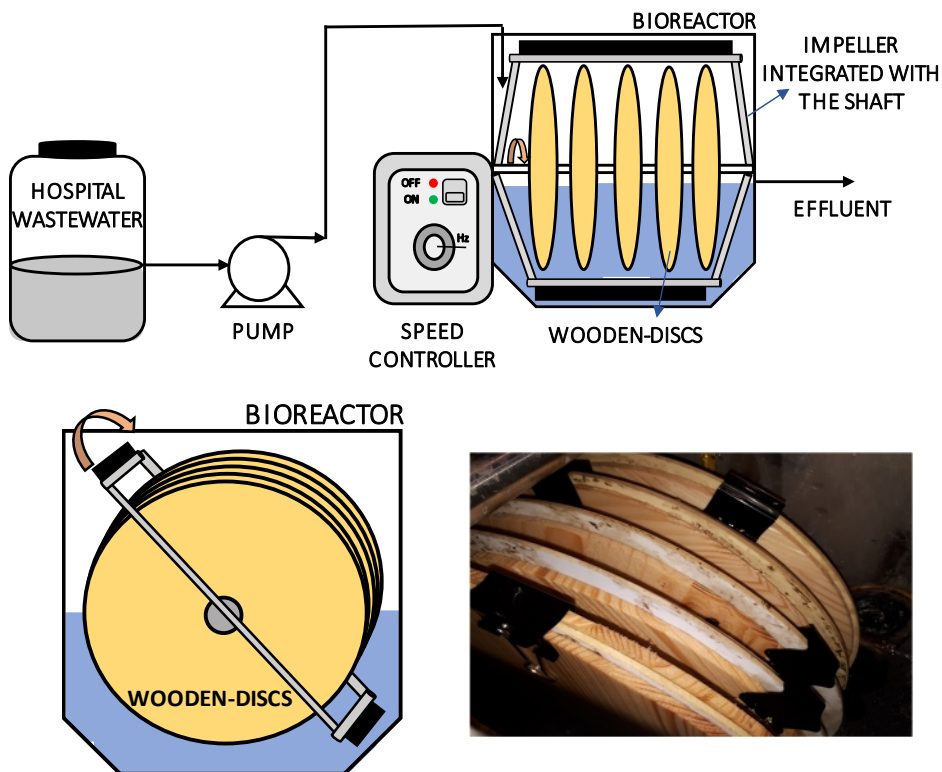


Figure 3. Schematic set-up of modified wooden rotating biological contactors

The start-up procedure developed for both wooden-RBCs system was modified according to the new configuration of the units. In this case, the start-up of the two RBCs was started parallel and was divided in three steps: pre-treatment to conditioning wooden discs, immobilization and growth of *Trametes versicolor* over the wooden-disc and acclimation stage. Firstly, the reactor was filled up to 60 % volume with tap water (15 L) and the discs were mechanically rotated at 7.5 rpm during 24 h in order to soak completely the wooden covers and clean them from superficial impurities. After that, the reactor was emptied and inoculated with blended mycelial *Trametes versicolor* (100 mL/ 15 L water), maintaining the reactor during 30 days under the same rotating speed in order to promote the colonization of the wooden disc surfaces by the fungal culture. The pine wood acted a selective carbon source for *Trametes versicolor* during this period (Torán et al., 2017), favoring the formation of the biofilm.

In a subsequent step (immobilization and growth stage), the bioreactors were operated in draw-fill using a (Vasiliadou et al., 2016) using a malt extract solution (3 g/L in TOC, pH of 4.5) as specific fungal growth medium for 40 days until obtaining a homogeneous biofilm over the wooden discs. In each cycle, and after consumption of 50 % of the initial TOC, 1 L of the reactor's medium was replaced with fresh malt extract (10 % volume exchange) in order to restore again a TOC concentration of 3 g/L and starting a new draw-fill cycle.

Once attained the attachment and growth of the biofilm over the wooden surfaces, the next step was the acclimation of the fungal microorganism to the hospital wastewater matrix. First, the draw-fill experiments were maintained for 4 days, but decreasing the carbon organic concentration in the synthetic wastewater from 3 g/L to 1 g/L. In the next 4 days, the operation was maintained, but substituting the malt extract by hospital wastewater enriched with saccharide and ammonium tartrate in the same proportion fixed previously for the simulated wastewater (SUWW). The concentration of those chemicals was slowly decreasing from an initial TOC concentration of 250 mg/L to 50 mg/L in 4 days. In that moment, the reactors were switched to continuous operation at HRT of 1 d and a submergence of the discs of 40 %. After 10 days, only the hospital wastewater was fed to the reactors, starting the normal operation of the systems.

3.3.2. Wastewater samples and operation conditions of modified wooden-RBCs for the treatment of hospital wastewater

Wastewater samples were taken from a hospital located in the south of Madrid (Spain) which contains 400 beds. The hospital generates three effluents

coming from different therapeutic units (general areas, digestive, X-rays, laboratories, intensive cares, anatomic, sterilization and pharmacological area). In order to collect representative samples of the hospital daily discharge, three automatic water sampler systems were used to take 330 mL (110 mL each) of wastewater every 10 min through 7 days and mixed together, collecting up to 1000 L. The samples were accumulated and did not suffer any prior pre-treatment before storage at 4 °C. The characteristics of the wastewater and operating conditions of both modified wooden-RBCs systems are summarized in Table 5.

The hospital wastewater was continuously treated during 75 days by the advanced bio-oxidation process (ABOP) in the modified wooden-RBCs systems. In both bioreactors, the working volume was 10 L and around 40 % of each disc was submerged into that working volume during the operation. The set of discs was mechanically rotated at 12 rpm, to ensure homogeneous conditions and appropriate aeration of the reactor. Metallic species in form of Fe³⁺-oxalate (145 mg/L) and Mn²⁺-nitrate (20 mg/L), and gallic acid (85 mg/L) as quinone-like compound were added as ABOP mediators (Christoforidis et al., 2018; Gómez-Toribio et al., 2009). The inlet streams were adjusted to a pH of 4.5 in order to inhibit the bacteria cellular transport and stimulate the fungi activity into the bioreactor. A HRT of 1 day was fixed in order to work at the minimum value established in literature for continuous reactors based on white rot fungi (Mir-Tutusaus et al., 2018).

Table 5. Characterization of hospital wastewater and operating conditions of both wooden modified wooden-RBCs system

Hospital wastewater				
Feed composition	pH	Pharmaceuticals	Advanced Bio-oxidation promoters	
Raw wastewater	4.5	Raw concentration	Gallic acid	85 mg/L
TOC: 75 mg/L			Fe ³⁺ -oxalate	145 mg/L
N-NH ₄ ⁺ : 40 mg/L			Mn ²⁺ -nitrate	20 mg/L
P-PO ₄ ³⁻ : 3 mg/L				
Operating conditions of both modified RBCs				
Operation mode	HRT	Submerged (%)	Speed (rpm)	
Continuous	1 day	40 ± 10	12	

3.4. Hospital wastewater treatment by advanced oxidation Fenton-like process

The hospital wastewater described previously was also treated by an advanced oxidation Fenton-like process. The wastewater samples followed the same collection procedure than the one described above. In this section, the synthesis and preparation of catalyst, the experimental installation and the conditions of the process are described.

3.4.1. Synthesis of powdered $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ and preparation of a reticulated porous perovskite materials

The synthesis of the powder $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite was performed using the method described by Carrasco-Diaz et al. (2016). Typically, metal sources as $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ were completely dissolved in 100 mL of ultrapure water. Then, citric acid was added until obtaining a pH between 2.5 ± 0.3 and the resulting solution was stirred for 3 h. Thereafter, the solution was dried at 70 °C for 12 hours to form the sol-gel, and then at 110 °C for 16 hours to form an amorphous precursor. After that, it was crushed and sieved until a particle size between 236 and 254 nm, and finally calcined at 700 °C for 5 h in air atmosphere to obtain the powdered $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite material.

The conformation of reticulated porous perovskite materials over organic polyurethane foams was carried out following the sponge replica method commonly used for manufacturing TiO_2 and other ceramic foams (Fey et al., 2017; Haugen et al., 2004). In this case, the powdered perovskite and additional inorganic binder (bentonite) were dispersed in ethanol (1 perovskite: 0.25 bentonite: 0.6 ethanol in wt.). Thereafter, a deflocculating agent Dolapix CE 64 (65 % wt. respect to the perovskite mass) was added to avoid the agglomeration of the powder particles. After a good dispersion, Optapix RA 4G (polyvinyl alcohol, 4 % wt. respect to the perovskite mass) as organic binder and drops of non-ionic anti-foaming agent (Contraspum KWE) were added to the slurry suspension. The mixture was maintained under vigorous stirring for 10 minutes. After that, a polyurethane foam of 40 ppi (pores per linear inch) with a dimension of 15 mm-width, 40 mm-long and 40 mm-height was immersed in the perovskite-containing slurry suspension. After 30 min, the soaked foam was taken out and dried for 24 hours at ambient temperature. This procedure was performed twice. Finally, the organic polymer used as scaffold of the reticulated porous perovskite material was removed by calcination at 700 °C for 2 hours using a

ramp of 2 - 5 °C/min and sintered at 1000 and 1200 °C for 2 hours with a heating rate of 5 °C/min.

3.4.2. Characterization of powder and reticulated porous perovskite materials

X-ray diffraction (XRD) patterns of powder samples were carried out in an XPert Pro Diffractometer (Philips PW0340/00) using the CuK α radiation. Data were recorded at the 2 θ angle ranging from 10° to 90° with steps of 0.04° and two seconds of accumulation each step. The molecular formula of the perovskite material was determined by ICP-AES using a Vista AX Pro-720ES equipment. The samples were previously digested under strong acid medium (HNO₃/HCl). As different oxidation states of the β -site cations produced oxygen non-stoichiometry (δ), this value was estimated by the actual metal content. The δ values lower than zero imply defect of oxygen, so oxygen vacancies are created. However, δ values greater than zero indicate the presence of over-stoichiometric interstitial oxygen.

Mechanical strength under compression until failure of reticulated porous perovskite materials was determined using a dynamometer according ASTM D 4179/2011. In this test, probes of 1 cm³ are subjected to controlled compression until failure. A standardized mechanical test bench (Chatillon Force Measurement LTCM Series) has been used to perform this test. Porosity of the reticulated samples (ϵ) were determined by the known volume of dislodged water after its immersion in water.

3.4.3. Preliminary catalytic tests of the powdered perovskite material

Preliminary Fenton experiments were performed batch-wise in a cylindrical glass stirred tank reactor of 1 L. In a typical experiment, 600 mL of a hospital wastewater was spiked with 15 mg/L of carbamazepine (CZP) and placed in the reactor under stirring (700 rpm). The pH was adjusted if necessary, by addition of H₂SO₄ 2N. Once the desired temperature was achieved, 0.6 g/L of powder catalyst and 700 mg/L of H₂O₂ (stoichiometric value for the total TOC consumption) were added into the reactor taking this instant as zero-reaction time. The time of experiment was extended until the hydrogen peroxide was completely consumed. The temperature (30, 50 and 70 °C) and the pH (3, 5.5 and natural -7.5-) were studied in batch experiments for the powdered perovskite catalyst.

3.4.4. Catalytic runs of reticulated porous perovskite material

These experiments were evaluated in a continuous up-flow fixed bed reactor (FBR) at atmospheric pressure (Figure 4). The FBR consists of a jacketed cylindrical

tube of 1.5 cm of inner diameter and 25 cm of length. The catalytic bed was formed by 3 g of the reticulated porous perovskite catalyst. Spherical inert glass particles bed was located upper and lower to the catalyst bed in order to maintain it stable on place. The hospital wastewater was pumped by means of a ProMinent GUGAL S.A. pump, model DULCO®flex at 1 mL/min, giving a residence time of 3 minutes, according to equation 1 (Martínez et al., 2007), where ε and V_{bed} accounts for porosity and volume of the reticulated porous foams used as catalytic bed in the FBR. The temperature of the catalytic run was controlled using was an external heating device of silicon oil that is recirculated through the jacket of the glass reactor. The time zero of the continuous catalytic run was taken once the outlet effluent reached the top of the fixed bed reactor.

$$t_R = \frac{\varepsilon \cdot V_{bed}}{Q} \quad \text{Eq. 1}$$

Initially, the hospital wastewater was spiked with 15 mg/L of carbamazepine (CZP) and the activity and stability of the reticulated porous perovskite material in continuous operation was evaluated at different temperatures (50, 70 and 90 °C) and hydrogen peroxide dosages (700 mg/L and 350 mg/L). Finally, the performance of the catalyst was assessed for the removal of the emerging pharmaceutical micropollutants of the hospital wastewater at their real concentration. The CZP removals, H_2O_2 consumption, metal leached-off the catalysts and pH of filtered aliquot samples were monitored along the time for the different (batch or continuous) catalytic runs.

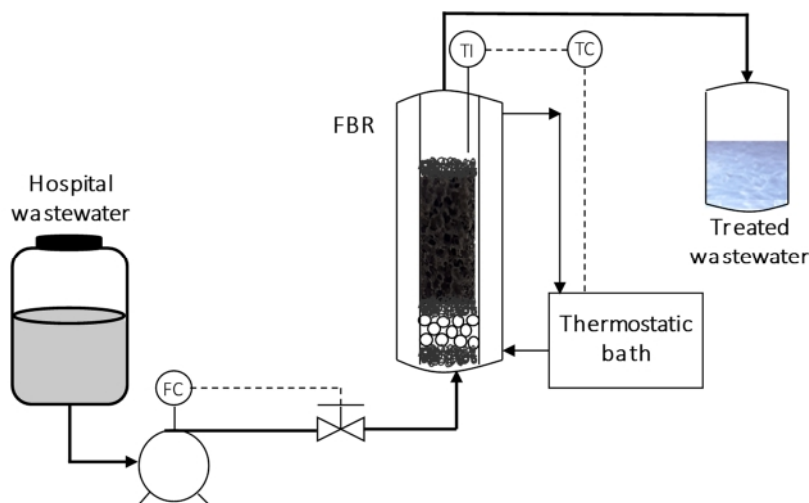


Figure 4. Schematic set-up of fix bed reactor

3.5. Analytical methods for characterization of wastewater samples

3.5.1. Characterization of wastewater samples for advanced bio-oxidation process

Samples were withdrawn from inlet and outlet streams of the RBCs units in order to monitor the performance of the biological treatment under the different conditions. Total organic carbon (TOC) was estimated using a combustion/non-dispersive infrared gas analyser model TOC-V Shimadzu. Other typical macroscopic parameters such as chemical oxygen demand (COD), N concentration as ammonium (N-NH_4^+), Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) or P concentration as phosphate (P-PO_4^{3-}) were determined following the standardized APHA methods (5220D, 4500-NH₃, 4500-N_{ORG}, 4500-P of APHA, 2005). The pH and dissolved oxygen (DO) in the RBCs were also monitored by using a pH/ion-meter (Crison Compact Titrator) and a DurOx₃₂₅ probe.

The analysis of pharmaceutical micropollutants was performed after solid phase extraction (SPE) by ultra-high-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS) using vortex electrospray ionization interface (Bruker UHPLC/MSMS EVOQ™ QUBE). The method includes 22 pharmaceutical compounds of 7 different therapeutic groups (Table 6). The samples were filtered through a dura-pore hydrophilic filter (PVDF, 0.65 μm) and extracted using a polymeric cartridge (TELOS C18 (EC) 200mg/6 mL) from Kinesis following the protocol described by Alfonso-Olivares et al. (2017). Chromatographic separation was achieved with a Bruker Intensity Solo 2 C18 column (100 x 2.1 mm and 2 μm). The mobile phase (flow rate 400 $\mu\text{L}/\text{min}$) consisted of a gradient program of water with 0.04 % acetic acid and acetonitrile at 40 °C.

The remnant gallic acid was monitored in the outlet effluent of the RBCs using a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) in a Varian Pro-star equipped with a Phenomenex C18 column (3 x 150 mm) and a UV-Vis detector at 254 nm. A mixture of methanol (49.5%), ultrapure water (49.5%) and glacial acetic acid (1%) at pH of 2-2.5 was impulse as mobile phase at 0.15 mL/min. The concentration of dissolved metals (Fe and Mn salts) in the treated wastewater was measured directly in the water matrix by ICP-AES (Varian, Vista AX Pro-720ES).

Table 6. Operating conditions to the detection of pharmaceutical compounds

Compound	t_R (min)	Q_1		Q_3'		Q_3''		Q_3'''		
		P_M (g/mol)	Polarity	P_M (g/mol)	E_C' (V)	P_M (g/mol)	E_C'' (V)	P_M (g/mol)	E_C''' (V)	
Antipirine	AAA	3.42	246	Positive	104	38	228	74	83	51
Clofibrac acid	ACF	5.89	213	Negative	126	14	84.8	12		
Atenolol	ATN	2.75	267	Positive	144.9	25	189.9	17	116	17
Amoxicillin	AMX	3.46	366	Positive	160	12	114	30		
Azithromycin	AZM	3.96	375	Positive	83.2	12	158.1	17		
Caffeine	CFN	3.38	195	Positive	138	16	110	20		
Cyclophosphamide	CPD	4.62	261	Positive	140	18	106	14		
Carbamazepine	CZP	5.54	237	Positive	194	14	152	34		
DEET	DEET	5.8	192	Positive	118.9	13	72	15.5		
Diclofenac	DCF	6.41	294	Negative	249.9	8	213.9	17		
Estrone	EST	6.09	269	Negative	145	37	183	30		
Gemfibrozil	GFZ	6.98	249	Negative	121	11	127	7		
Hydrochlorothiazide	HCT	3.36	296	Negative	268.6	25	77.9	25		
Ibuprofen	IBP	6.59	205	Negative	161	4	117	12	115	18
Iohexol	IHX	2.46	822	Positive	803.6	14	374.8	39		
Iopamidol	IPM	1.96	778	Positive	558.8	20	386.8	18		
Metoprolol	MTP	3.81	268	Positive	74.2	18	116	15		
Metronidazole	MDZ	3	172	Positive	128	10	82.2	20		
Progesterone	PGT	7.18	315	Positive	109	20	97.1	17	297	14
Ranitidine	RNT	2.83	315	Positive	176	18	130	18		
Sulfamethoxazole	SMX	4.5	254	Positive	155.9	14	92	26		
Sulpiride	SPD	2.93	342	Positive	112	24	214	30		

3.5.2. Characterization of wastewater samples for advanced oxidation Fenton-like process

Carbamazepine concentration in the range of 0.15-15 mg/L was determined by a HPLC (Varian ProStar) equipped by a Phenomenex C18 column coupled to a pre-column (Phenomenex HPLC Guard Cartridge System) working with a UV detector at 254 nm. A solution composed by HPLC quality methanol (49.5 %), ultrapure water (49.5 %) and glacial acetic acid (1 %) with a pH value of 2-2.5 was used as mobile phase with a flowrate of 0.30 mL/min. Hydrogen peroxide was determined by a colorimetric method (DEV (H15)) based on the measurement of the chromophore formed at 410

nm after the addition of a standard commercial solution of titanium oxysulfate (TiOSO_4 1.9-2.1 %). The concentration of dissolved metals in the outlet effluent of treated wastewater was measured directly in the water matrix by ICP-AES (Varian, Vista AX Pro-720ES). Total Organic Carbon (TOC) and pharmaceutical micropollutants was performed as it is previously described for the advanced bio-oxidation process.

3.6. Evaluation of fungal sludge

Two methods were used to analysis the stability of fungi biomass on RCBs and its evolution along the treatment of the different wastewater by the advanced bio-oxidation process.

3.6.1. Bioassays for evaluation of fungal and bacteria activity

Several bioassays were performed in order to estimate the presence and activity of fungi and bacteria communities in the biofilm of the RCBs as consequence of the continuous treatment of wastewater under non-sterile conditions. The activity tests were performed batch-wise in a 200 mL bottles using 100 mL of synthetic wastewater adjusted to pH values of 4.5 or 7 with diluted solutions of NaOH or H_2SO_4 . The synthetic wastewater was prepared as described previously (Marco-Urrea et al., 2009), but substituting the organic carbon sources by sodium acetate as readily biodegradable substrate. The bottles were inoculated with 200 mg dry-based v_{SS} /L of biomass collected from the biofilm formed over the RCBs at the end of each wastewater treatment (DPP-URJC and WWTP-Toledo). Additionally, Gram-negative and Gram-positive bactericides (ampicillin, 4 mg/L, and tetracycline, 128 mg/L) or fungicide (nystatin, 200 mg/L) were added and maintained 24 hours under continuous stirring at 25 °C to inhibit the bacterial or fungal activity. The minimal inhibitory concentration for each chemical were optimized from previous studies (Araya-Cloutier et al., 2017; Mawabo et al., 2015; Han et al., 2012). Finally, 250 mg/L of TOC as sodium acetate was added to the medium to start the bioassays. The bottles were incubated during 4 days at 300 rpm and controlled temperature of 25 °C. Further bioassays in absence of bactericides and fungicide or a mixture of the three inhibitors were also carried out with the purpose of comparison. The bottles were incubated under controlled temperature (25 °C) during 4 days at 300 rpm in absence of advanced bio-oxidation mediators.

3.6.2. DNA extraction, qPCR and metagenomics analysis

DNA extraction, quantitative polymerase chain reaction and metagenomics analysis were only carried out to the biomass obtained after the advanced bio-oxidation treatment with the hospital wastewater. The huge complexity of this matrix required an exhaustive characterization of the microbiological population by complex molecular biological techniques.

Four biomass samples were taken of both modified wooden-RBCs units at different times of the hospital wastewater treatment (0, 21, 46 and 75 days). Firstly, total DNA was extracted using Microbial DNA isolation kit (Soil DNA Isolation Kit, CANVAX, Córdoba, Spain). DNA yield range was between 104 and 676 ng/ μ L.

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed in order to obtain the absolute quantification of *Trametes versicolor*, total fungi and total bacteria in different samples from the two bioreactors. This technique is based on the amplification of DNA fragments using a complementary primer. Primers used were designed to detect *T. versicolor* (ITS1 and ITS2, Badia-Fabregat et al., 2017), total fungi (FR1 and FF390, Chemidlin Prévost-Bouré et al., 2011) and total bacteria (16S V3-V4, Klindworth et al., 2013). A final volume of 10 μ L was used for qPCR reactions: 4 μ L of sample diluted 1/400 and 6 μ L of master-mix and primers (1 μ L of primer mix, 5 μ M of each primer and 5 μ L Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, CN 4367659) which includes AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, dNTPs and the rest of reagents needed to perform the qPCR.

q-PCR reactions were performed in a CFX384 Real Time System C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) in hard-Shell[®] 384-Well PCR Plates White Well Clear shell (Bio-Rad CN HSP-3805). Reactions were performed under the following conditions: 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 1 min. The qPCR products were purified with the Real clean spin kit (Real, Ref: RBMCS02) following manufacturer's instructions. In order to estimate the individual efficiency of each primer pair and to validate a quantitative range for each assay we performed a qPCR over a six-point ¼ dilution curve made from a pool of the samples. PCR efficiency is calculated from curve's slope. The curve had an optimal correlation coefficient between 0.992 and 0.998.

PCR products were also sequenced by Illumina Mi-Seq Instrument under a 2x300 protocol to determinate all the bacterial and fungal microorganisms present in DNA samples. Metagenomics analysis is based on determining the nucleotides order in DNA fragment to identify biological species. Sequencing runs were performed using the following specific sequencing primers: total fungi CS1-ITS4 (GACTACHVGGGTATCTAATCC) and ITS86F-CS2 (GTGAATCATCGAATCTTTGAA) (Op De

Beeck y col., 2014); total bacteria 16S V3-V4 direct (CCTACGGGNGGCWGCAG) and invers (GACTACHVGGGTATCTAATCC). After sequencing, quality analyses were performed over reads using Fast-QC software. The already trimmed paired reads were joined into one single sequence using PANDA-seq Assembler, correcting sequencing errors in the overlap region, and discarding those pairs that do not align between them or that have low quality (less than 10 % of the joined reads). The assembled reads were the input for the core analysis. Green-Genes and UNITE databases were used for mapping 16S and ITS2 sequencing reads, respectively, through Qiime2 software (Caporaso et al., 2010).

4. RESULTS AND DISCUSSION

The results of advanced fungal bio-oxidation treatment based on the immobilization of *Trametes versicolor* fungi over rotating biological contactors for the removal on pharmaceutical micropollutants has been divided in three main chapters according to the concentration of micropollutants in the water matrixes and the origin of the wastewater streams:

- Evaluation of advanced bio-oxidation process for the treatment of a simulated and real urban wastewater spiked with pharmaceutical compounds.
- Advanced bio-oxidation process as alternative fungal treatment of different real urban wastewater streams for the removal of pharmaceutical compounds.
- Advanced bio-oxidation process on modified wooden rotating biological contactors for the on-site treatment of hospital wastewater effluents and the removal of pharmaceutical compounds.

Otherwise, the preparation and evaluation of $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ reticulated porous perovskite materials as active and stable heterogeneous Fenton-like catalyst for the continuous on-site treatment to remove the pharmaceutical compounds present in a hospital wastewater matrix was explained in another chapter:

- Fenton-like catalyst based on a reticulated porous perovskite material for the on-site removal of pharmaceutical compounds in hospital wastewater streams.

4.1. Evaluation of advanced bio-oxidation process for the treatment of a simulated and real urban wastewater spiked with pharmaceutical compounds

The advanced bio-oxidation process (ABOP) with *Trametes versicolor* was evaluated for the continuous treatment of a simulated urban wastewater and a real wastewater collected from the Dissolved Air Flotation Tank (DAF) of the wastewater demo-pilot plant located at Rey Juan Carlos University. Both, simulated and real wastewater, were spiked with a 50 µg/L of different pharmaceutical compounds of diverse therapeutics' families (Table 3). As it was mentioned previously, *Trametes versicolor* was immobilized over the discs of a rotating biological contactors (RBCs) system which operated with an HRT of 1-day. Moreover, oxidizing mediators (gallic acid and iron/manganese salts) were added in order to induce the hydroxyl radicals production via quinone redox cycling by the intra- and extra cellular enzymatic system of fungi.

In order to evaluate the efficiency of this process, this section is divided in three sections:

- A. Immobilization of *Trametes versicolor* on the rotating biological contactors.
- B. Performance of advanced bio-oxidation process for the treatment of spiked simulated and real urban wastewater for carbon and nutrients removal.
- C. Performance of advanced bio-oxidation process for the treatment of spiked simulated and real urban wastewater for pharmaceutical compounds removal.

A) Immobilization of *Trametes versicolor* on rotating biological contactors

The main aim of this step was to achieve a stable fungi's biofilm over the discs. For this purpose, the procedure described in the experimental section 3.2 was followed. The excess of organic content and pH (4.5) for both stages, using either the malt extract or the synthetic wastewater, maximizes the production of extracellular polysaccharides (EPS) that enhance the adhesion of *Trametes versicolor* to the discs surface (Tavares et al., 2005). Figure 5 shows the evolution of the biomass during the start-up period. As can be seen, the immobilization of *Trametes versicolor* over the disc was accomplished after 50 days, obtaining a homogeneous fungi biofilm.

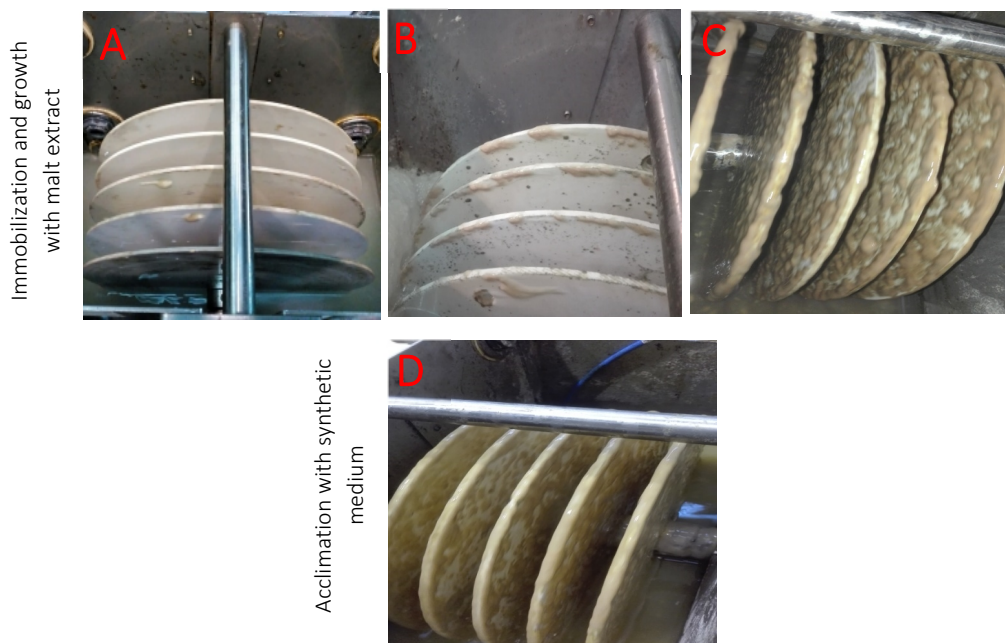


Figure 5. Evolution of biomass during the start-up of RBCs system: (A) Initial time, (B) 12 days, (C) 30 days and (E) 50 days

B) Performance of advanced bio-oxidation process for the treatment of spiked simulated and real urban wastewater for carbon and nutrients removal

Once RCBs-system was started-up, a simulated urban wastewater spiked with eight pharmaceutical compounds was treated by the advanced bio-oxidation process. The formulation of simulated wastewater (**SUWW**) was described previously by Marco-Urrea et al. (2010 a and b; 2009) which includes carbon and nitrogen biodegradable sources and advanced bio-oxidation mediators (gallic acid and iron and manganese salts). After that treatment, RBCs system was continuously fed with the real urban wastewater spiked with thirteen pharmaceutical compounds from the demo-pilot depuration plant from Rey Juan Carlos University (**DPP-URJC**). The characteristics of the wastewater and operating conditions were described in Table 4.

The performance of the biological treatment was evaluated for the removal of the carbon and nitrogen sources of wastewater. The simulated (**SUWW**) and real urban wastewater (**DPP-URJC-1-spiked**) showed TOC: N-NH₄⁺ ratios of 70:1 and 69:8, respectively. Figure 6 depict the results of TOC and N-NH₄⁺ of the inlet and outlet streams for the continuous operation of RBCs using an HRT of 1 day with SUWW from day 1 to day 120 and DPP-URJC-1 from day 121 to day 155. The P-PO₄³⁻ was not

continuously monitored along the operation time as TOC or N-NH_4^+ , and only data of days 149, 151, 153 and 154 of the treatment for DPP-URJC-1 were analysed.

The results of TOC and N-NH_4^+ removals evidenced a good performance of the fungal biomass, obtaining removal rates of $68 \pm 25 \%$ for TOC and $73 \pm 22 \%$ for N-NH_4^+ once the steady-state was reached (from 45 to 120 days) during the treatment of simulated wastewater. Discussing about to the urban wastewater from DPP-URJC, the outlet profiles of TOC and N-NH_4^+ loadings were constant during the whole treatment regardless the fluctuating initial concentration of the real wastewater. It could be concluded that the biomass of RBCs system was stable, active and showed a good adaptation to a real wastewater matrix. Furthermore, the modification to a real matrix had not affect to the good performance of the advanced bio-oxidation process obtaining removal rates of $82 \pm 12 \%$ for TOC, $61 \pm 21 \%$ for N-NH_4^+ and $70 \pm 5 \%$ for P-PO_4^{3-} once the steady-state has been reached (from 121 to 155 days).

The TOC removal increased from $68 \pm 25 \%$ of simulated wastewater to $82 \pm 12 \%$ of the real urban wastewater. This improvement could be related to the growth of indigenous bacterial microbial in the RBCs could contribute partially to the carbon and nitrogen consumption.

The comparison of the performance of white-rot fungi as advanced bio-oxidation process in continuous RBC with conventional biological treatments in WWTPs evidenced that the TOC removals were in the range of the values of conventional activated sludge in WWTPs (Tchobanoglous et al., 2002). However, the range of removals for N-NH_4^+ and P-PO_4^{3-} were higher than those of conventional activated sludge according to the results reported by six WWTPs (Rodriguez-Garcia et al., 2011). Therefore, the use of white-rot fungi as advanced bio-oxidation process seems to be a good alternative for the continuous treatment in RBCs of non-sterile urban wastewater acidified at 4.5 without additional substrates for fungi growth and 1 day of HRT, achieving remarkable removals of the TOC and of N-NH_4^+ and P-PO_4^{3-} nutrients.

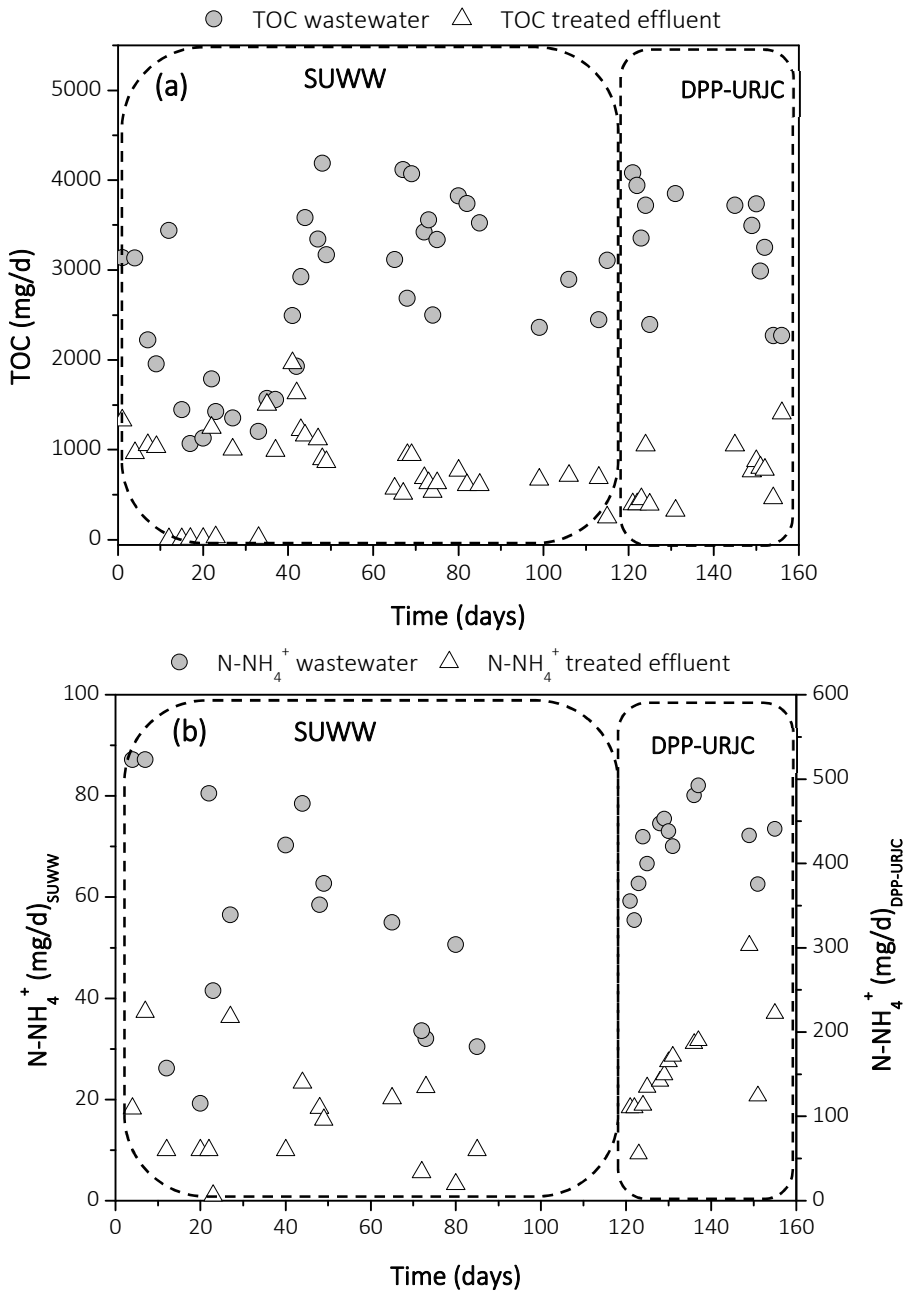


Figure 6. Evolution (a) TOC loadings and (b) $N-NH_4^+$ during spiked simulated and real urban wastewater treatment

C) Performance of advanced bio-oxidation process for the treatment of spiked simulated and real urban wastewater for pharmaceutical compounds removal

The efficiency of advanced bio-oxidation process with *Trametes versicolor* was also evaluated for the removal of eight spiked pharmaceutical compounds at 50 µg/L each in the simulated wastewater (4-AAA, ACF, CFN, CZP, DCF, GFZ, HCT and SMX). Figure 7 shows the removal efficiencies of pharmaceuticals for the continuous treatment for 120 days. The results correspond to the minimum, maximum and average removal percentage of seven samples taken during the steady-state of the treatment in the RBCs (days 49, 57, 72, 74, 81, 108 and 114).

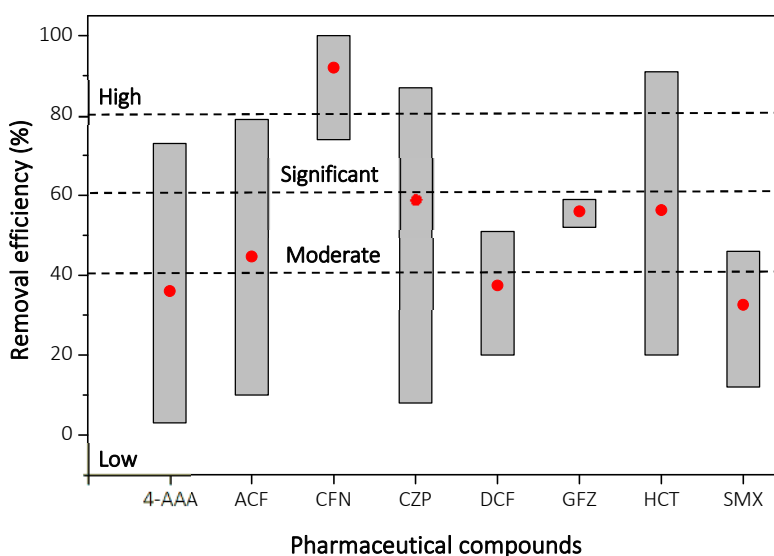


Figure 7. Removal intervals of spiked pharmaceutical compounds during simulated wastewater treatment (red dot: average value)

Taking into account the average removals of these samples, efficiencies ranging from 30 % (SMX) to 60 % (CZP y GFZ) were obtained for all the studied compounds, except for CFN between 70 and 90 % was achieved. However, it is noteworthy a considerable dispersion of the results during the treatment on operation of RBCs, especially for 4-AAA, ACF, CZP and HCT. Nevertheless, these results of the ABOP with *T. Versicolor* are similar or slightly better than others already published with this type of WRF. Thus, Vasiliadou et al. (2016) reported removal values lower than 30 % for ACF and lower than 20 % for HCT, DCF, 4-AAA and CZP in discontinuous bioassays for 7 days of incubation under sterilized conditions using a synthetic defined medium. Jelic et al. (2012) also reported a removal efficiency of 54 % for CZP in an air pulsed fluidized bioreactor operated in continuous mode with an

HRT of 3 days but only for the degradation of this compound as model pollutant. On the other hand, CZP was not removed in experiments performed with sterilized and non-sterilized urban wastewater in the work reported by Cruz-Mòrato et al. (2013).

A more exhaustive evaluation of removal of pharmaceutical compounds were performed with the DPP-URJC-1-spiked expanding the pharmaceutical compounds to thirteen target compounds spiked at 50 µg/L each in the wastewater (4-AAA, ACF, ATN, CFN, CZP, DCF, GFZ, HCT, IBP, PGT, RNT, SMX and SPD). Figure 8 shows the removal efficiencies of pharmaceuticals for the continuous treatment for 35 days. The results correspond to the minimum, maximum and average removal percentage of five samples taken during the steady-state of the treatment in the RBCs (days 125, 129, 136, 139, 153 and 155).

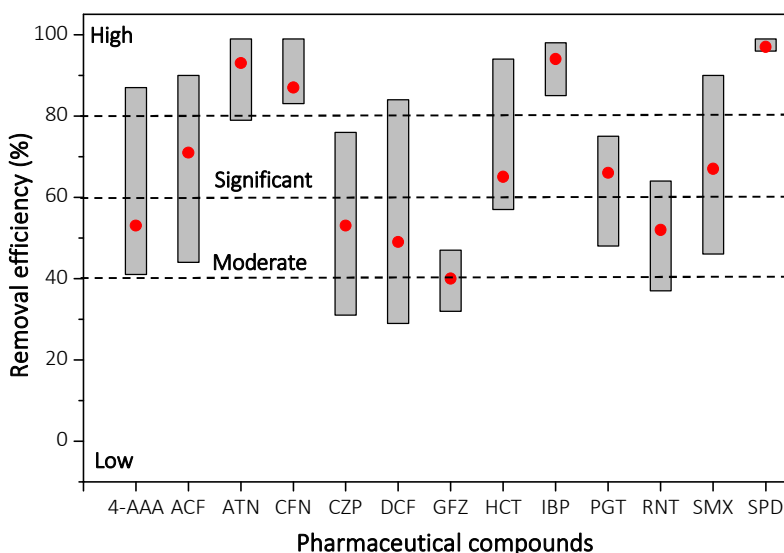


Figure 8. Removal intervals of spiked pharmaceutical compounds during urban wastewater treatment from DPP-URJC (red dot: average value)

Likewise, the removal efficiency was classified into three different groups depending on their average removal values: low removal (0-40 %), moderate removal (40-60 %), significant removal (60-80 %) and high removal (80-100 %). According to the average results displayed in Figure 8, all spiked pharmaceuticals achieved removal efficiencies higher than 40 %, being relevant that eight of them accomplished more than 60 %. Interestingly, the removal efficiencies of pharmaceuticals for the treatment of real urban wastewater from DPP-URJC were slightly higher than those obtained in the simulated wastewater (SUWW) for the studied compounds. This increase is probably due to the additional microbial activity of the indigenous

microorganisms of the real wastewater, which could grow with fungi during the continuous treatment in the RBC at non-sterilized conditions (Badia-Fabregat et al., 2017 and 2015).

The efficiency of the advanced bio-oxidation process (ABOP) in the RBC was compared to the results of conventional biological treatments of WWTPs. Usually, the removal efficiency significantly varies from one to other WWTPs, mainly due to the different characteristics of the inlet wastewater and operating conditions (HRT, SRT and type of biological process). In any case, IBP, CFN and ATN showed remarkable removals for the biological treatments of WWTPs (Thiebault et al., 2017; Han-Tran et al., 2017; Verlicchi et al., 2013; Deblonde et al., 2011, Rosal y col., 2010;). IBP and CFN with ranges from 80 to 100 % and ATN slightly lower between 15 and 60 % (Han-Tran et al., 2017; Martin et al., 2012; Jelic et al., 2011; Rosal y col., 2010; Vieno et al., 2007). The values of ABOP system were also around these ranges (95, 87 and 93 %, respectively).

In the case of SPD, the ABOP achieved a higher removal (95 %, average removal value) whereas removals from 0 to 84 % for the best conditions were achieved for the biological treatments of WWTPs (Han-Tran et al., 2017; Bollmann et al., 2012). The ABOP also promoted a higher SMX and PGT removal than the conventional biological treatments of WWTPs, with 70 % for ABOP and much lower values of 17–52 % or 30–60 % in the case of activated sludge with nitrification/denitrification processes (Verlicchi et al., 2013). On the contrary, ABOP system achieved removal rates for 4-AAA, GFZ, ACF and HCT (53, 40, 71 and 65 %, respectively) like the ranges achieved in WWTPs, being 9–65 % for 4-AAA (Rosal et al., 2010), -7 – 83 % GFZ and around 40–80 % for ACF (Verlicchi et al., 2013, Rosal et al., 2010) and HCT (Rosal et al., 2010). Finally, pharmaceuticals that are usually removed in low extension in WWTPs such as RNT (18 – 30 %), DCF (-15 – 40 %), or CZP (-21 – 20 %) accomplished high removals for ABOP with average values between 50 and 60 %, respectively (Verlicchi et al., 2013; Rosal et al., 2010).

Generally, the efficiencies removal of pharmaceuticals by white-rot fungi varied widely between compounds (Vasiliadou et al., 2016; Yang et al., 2013 b). In this work, the main removal mechanism is the attack of hydroxyl radicals formed by the induced advanced bio-oxidation process. However, this process is developed close to the fungal biomass surface (Backa et al., 1993) so it could be influenced by the physio-chemicals properties of each compound. The molecular structure, molecular weight, hydrophobic or hydrophilic behaviour or the chemical form are the dominant characteristics which could strongly affect to the pharmaceutical removal (Yang et al., 2013 a and b).

Regarding the molecular structure, the functional groups of the chemical structure can strongly affect their removal (Yang et al., 2013 b). In general, pharmaceuticals containing electron donating functional groups such as amine ($-\text{NH}_2$), hydroxyl ($-\text{OH}$), alkoxy ($-\text{OR}$), alkyl ($-\text{R}$) and carbonyls ($-\text{COR}$) groups are more susceptible to suffer an electrophilic attack because they present free available electrons and consequently could be degraded by the oxidative catabolism of fungi. On the contrary, electron acceptor functional groups, such as amide ($-\text{CONR}_2$), carboxylic ($-\text{COOH}$), halogen ($-\text{X}$), and nitro ($-\text{NO}_2$) groups are less susceptible to this elimination way being degraded, because provoke a lack of electrons in the structure making pharmaceutical more resistant to a bio-oxidative action by the fungal metabolism.

The bio-refractory behaviour of CZP for white-rot fungi has been attributed to the presence of electron-acceptor functional groups (amide, azepine) in its molecular formula. However, the pharmaceutical compounds usually have both type of functional groups and then its behaviour is not easy to predict. Thus, IBP or SMX with a sulphonamide (electron-acceptor) and an amine (electron-donor) groups, achieved high removal degrees (95 and 67 %) during this treatment. In the same way, DCF with an electron-donor (amine) and various electron-acceptor groups (carboxylic and chlorine) only achieved 50 %. Therefore, there are other factors that are synergistically affecting the removal efficiency of pharmaceuticals in white-rot fungi processes.

Hydrophobicity also plays a critical role in bio-sorption of micropollutants in the white-rot fungi, enhancing its removal from the aqueous phase (Grandclément et al., 2017). Thus, hydrophobic micropollutants ($\log K_{ow} > 3$) such as GFZ obtained a moderate removal (56 %) despite of present a low pKa (4.5). Only three of the studied pharmaceuticals possess $\log K_{ow} > 3$, IBP, GFZ and PGT, which achieved removals of 95, 40 and 66 %, respectively. In these cases, the removal by bio-adsorption could be feasible or at least an important contribution. On the other hand, hydrophilic compounds with $\text{pKa} > \text{pH}$ medium could be also adsorbed on the fungal biomass as higher affinity is developed by non-ionic molecules. These could be the cases of CFN, ATN and SPD. Hydrophilic compounds with $\text{pKa} < \text{pH}$ medium are expected to be as ionic forms promoting its dissolution in the aqueous phase, such as DCF, 4-AAA, RNT and CFA (Yang et al., 2013 b; Grandclément et al., 2017). Hydrophilic PCs with $\text{pKa} > \text{pH}$ medium reached significant (60-80 %) or high (80-100 %) removal yields, which can be associated to partial removal by sorption processes of the fungal biomass.

However, there have been published several works that discard significant contributions of sorption processes on the removal of pharmaceutical compounds. Thus, Vasiliadou et al. (2016) reported a negligible contribution in the removal of GFZ,

IBP and other pharmaceuticals such as DCF, SMX and SPD when using *T. Versicolor*. A more exhaustive and recent work focused on the role of sorption processes with different fungi, including *T. versicolor*, has also reported values accounting for ca. 7 % as mean value for 4 pharmaceutical compounds that includes carbamazepine, diclofenac, iopromide and venlafaxine (Lucas et al., 2018).

*The advanced bio-oxidation process based on the immobilization of *T. versicolor* as WRF over RBC-unit was assessed in the continuous treatment of a synthetic urban (SUWW) and real urban wastewater (DPP-URJC) for 155 days. The biological performance of bio-oxidation in terms of the TOC and pharmaceuticals removal increased for the treatment of real urban wastewater. The high efficiencies obtained in terms of carbon, nitrogen and phosphorus demonstrated the good adaptation of biomass to the modification of wastewater matrix.*

Moreover, the advanced bio-oxidation process operated in the RBCs for the treatment of the real DPP-URJC with 1 day of HRT, non-supplementary loads of extra substrates and no partial fungal replacement, showed higher removal efficiencies of pharmaceutical compounds than other fungal bioreactors reported in literature and conventional biological processes of WWTPs. Thus, 12 of the studied 13 pharmaceutical compounds were eliminated with removal efficiencies ranging from 50 to 95 %. Among them, compounds such as diclofenac, carbamazepine or ranitidine, commonly characterized as refractory compounds for biological treatments, were removed with efficiencies of 50, 55 and 52 %, respectively.

4.2. Advanced bio-oxidation process as alternative fungal treatment of different urban wastewater streams for the removal of pharmaceutical compounds.

In this second chapter, the advanced bio-oxidation process with *Trametes versicolor* has been evaluated and validated as an alternative biological treatment of real urban wastewater from different WWTPs without spiking any additional pharmaceutical compounds. Both continuous treatments with real wastewater were performed with non-addition of extra supplementary biodegradable sources and non-renovation of fungal biomass at reduced HRTs.

Firstly, the treatment of the urban wastewater from the demo pilot plant located at Rey Juan Carlos University (DPP-URJC) was carried out at the RBC-system. During this treatment, the influence of the advanced bio-oxidation mediators on the

fungal activity and the effect of the HRT were evaluated. Secondly, the RBCs-system was fed with the urban wastewater from the WWTP located at Toledo (**WWTP-Toledo**). In this case, the influence of the wastewater composition on the performance of the treatment was also assessed. Finally, the contribution of bacterial and fungi communities to the overall efficiency of the biological treatment was also investigated. This section is divided in three sections:

- A. Evaluation of advanced bio-oxidation process for the treatment of the real urban wastewater from the DPP-URJC: *influence of advanced bio-oxidation mediators and the HRT on the performance of the system.*
- B. Influence of the wastewater composition on the biological performance of fungal RBCs.
- C. Assessment of the prevalence of fungal or bacterial communities in the biofilm of RBCs after treatment of DPP-URJC and WWTP-Toledo wastewater.

A) Evaluation of advanced bio-oxidation process for the treatment of the real urban wastewater from the DPP-URJC

RBCs system was continuously fed with the real urban wastewater from the demo-pilot depuration plant from Rey Juan Carlos University for 115 days. The treatment was divided in three different stages where the RBCs unit operated under different conditions (Table 4). During the first 65 days, the DPP-URJC wastewater was treated without the addition of advanced bio-oxidation mediators and an HRT of 1 day (**DPP-URJC-2-*Trametes versicolor***). In this case, real wastewater was kept their natural concentration of pharmaceutical compounds. In the same way, the working volume was 10 L and around 40 % of each disc was submerged. The set of discs was mechanically rotated at 12 rpm, to ensure homogeneous conditions and appropriate aeration of the reactor. After this period, for 30 days more, the metallic species in form of Fe³⁺-oxalate (145 mg/L) and Mn²⁺-nitrate (20 mg/L), and gallic acid (85 mg/L) as quinone-like compound were added as advanced bio-oxidation mediators (Marco-Urrea et al., 2010 b) (**DPP-URJC-3-*Trametes versicolor* + bio-oxidation**). The immersed area and rotation speed of RBCs as well as the HRT were kept constant. These stages were compared in order to study the effect of adding advanced bio-oxidation mediators. Finally, in the last stage, the HRT was reduced to 12 hours (**DPP-URJC-4-*HRT***), keeping the advanced bio-oxidation mediators, the immersed area and rotation speed. Fungal based biological treatments have been traditionally evaluated as alternative systems for removal of pharmaceutical pollutants refractory to conventional biological treatments. Figure 9 depicts the results of TOC, N-NH₄⁺ and P-PO₄³⁻ of the inlet and outlet streams for the continuous operation of RBCs for 115 days.

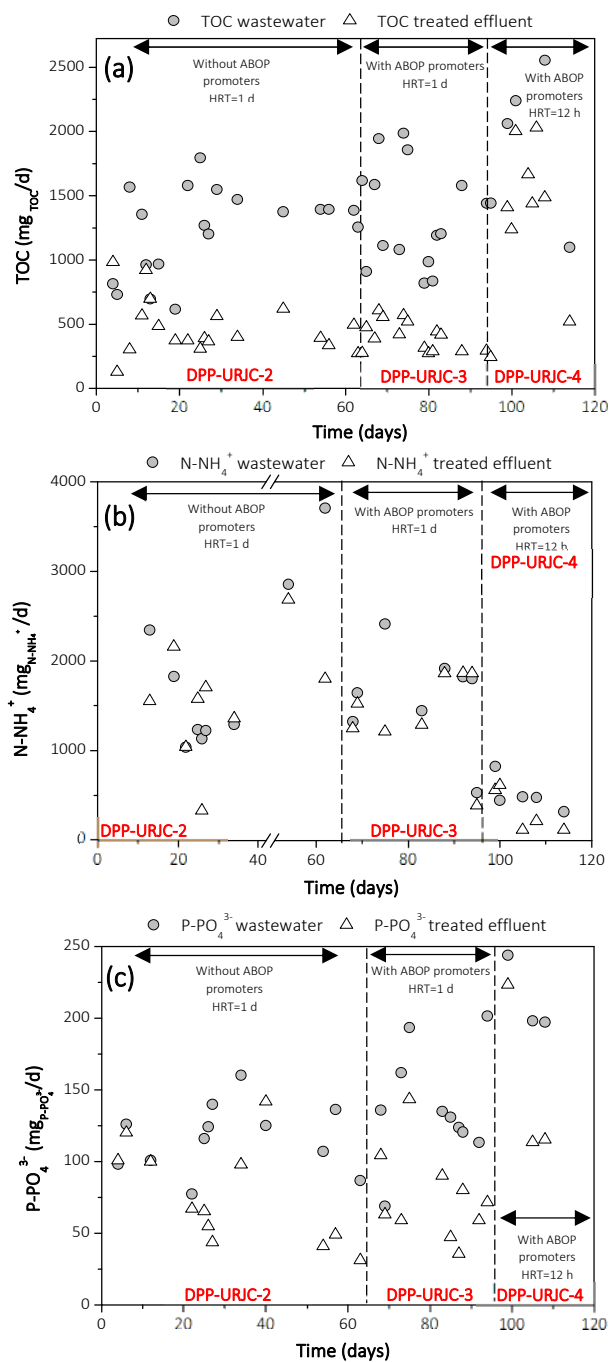


Figure 9. Evolution (a) TOC, (b) N-NH_4^+ and (c) P-PO_4^{3-} loadings during urban wastewater treatment from DPP-URJC

Influence of advanced bio-oxidation mediators on the fungal activity of *T. versicolor*

Initially, the effect of adding advanced bio-oxidation mediators for enhancing the production of non-selective and highly oxidizing hydroxyl radicals was studied for the wastewater collected at the demo pilot plant at Rey Juan Carlos University. The RBCs operated in absence of oxidizing mediators for 65 days (**DPP-URJC-2-*Trametes versicolor***), and then the advanced bio-oxidation mediators were added to the inlet wastewater for further 30 days on operation (**DPP-URJC-3-*Trametes versicolor* + bio-oxidation**). The hydraulic retention time as well as the immersed fraction and rotation speed of RBCs were kept constant.

Figure 10 (a) and (b) shows the performance of the RBCs in terms of TOC, N-NH₄⁺ and P-PO₄³⁻ removals and the elimination of pharmaceutical compounds for both stages. The fungal treatment (**DPP-URJC-2-*Trametes versicolor***) showed remarkable removals of TOC (70 ± 8 %) and phosphates (37 ± 29 %). In contrast, the ammonium removal was practically negligible. The addition of advanced bio-oxidation mediators showed similar TOC reductions (71 ± 6 %) and the increase of N-NH₄⁺ and P-PO₄³⁻ removals (7 ± 7 and 54 ± 15 %), but these variations are not statistically significant. These results prove an active and stable performance of the biomass immobilized on RBCs for the treatment of a real wastewater with a low C:N ratio (between 1.2 and 0.6, too far from the theoretical optimum range for white-rot fungi of 7-10) operating without additional loadings of biodegradable carbon and nitrogen extra sources as usually employed in other works (Torán et al., 2017; Mir-Tutusaus et al., 2016).

The low ammonium removal seems to be related to the limited nitrogen uptake of the WRF (Mir-Tutusaus et al., 2018; Cruz-Morató et al., 2013). Moreover, NH₄⁺ can be released by ammonification of urea, with partial assimilation of nitrogen and release of the ammonium in excess to the medium (Romillac 2019; Geisseler et al., 2010). The balance between the uptake and release of ammonium is influenced by the nutritional status of the fungal community (starvation or nitrogen excess), the C:N ratio of the population and the quantity and chemical composition of dissolved organic matter. Typically, fungi release nitrogen as ammonium for a C:N ratio lower than 30:1 (Hodge et al., 2000). Thus, it is expected that the ammonification process happened considering the low C:N ratios of the urban wastewater used in this work, DPP-URJC wastewater (C:N between 1.2 and 0.6).

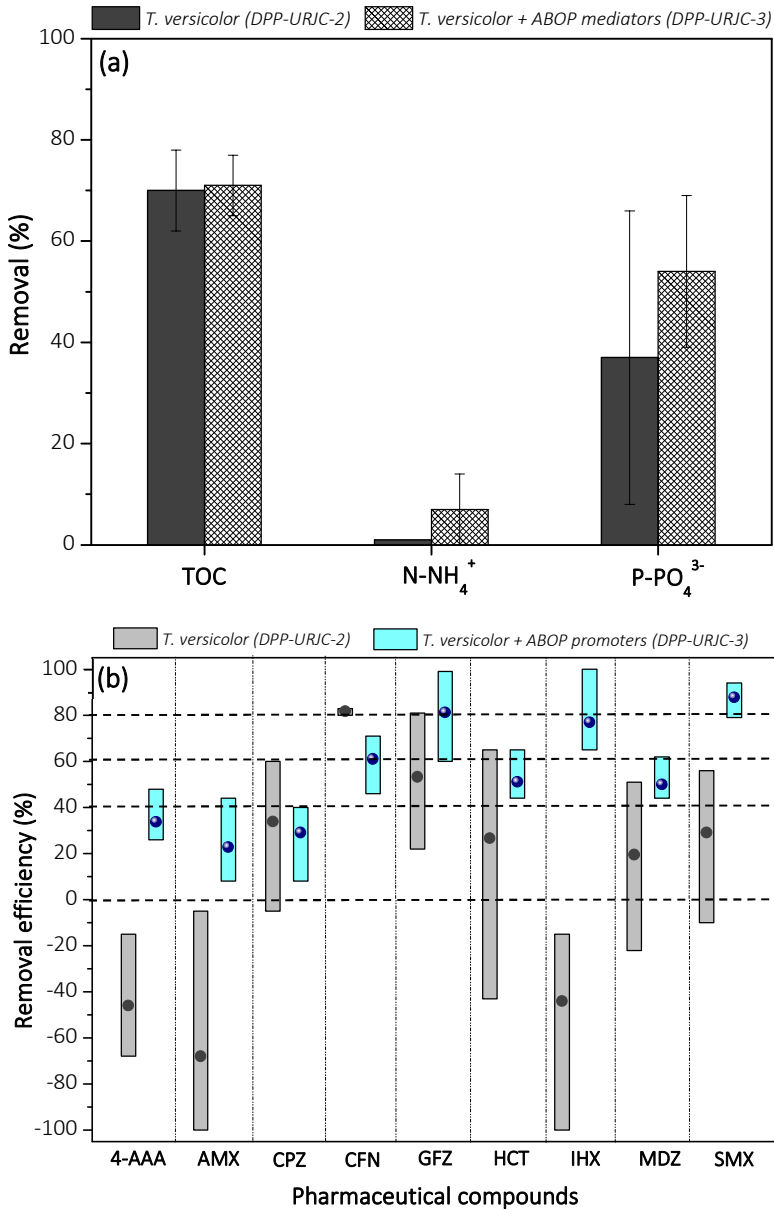


Figure 10. Removal of (a) TOC, N-NH₄⁺ and P-PO₄³⁻ and (b) pharmaceutical compounds for fungal and advanced bio-oxidation treatments of wastewater from DPP-URJC.

In terms of the pharmaceutical removal, only 9 out of the 22 pharmaceutical analyzed in this work (Table 6) were detected in samples of DPP-URJC (Figure 10 b): 3

antibiotics (Amoxicillin, AMX, metronidazole, MDZ and sulfamethoxazole, SMX), 2 psychiatric drugs (carbamazepine, CPZ and caffeine, CFN), 1 analgesic (4-acetamidoantipyrine, 4-AAA), 1 lipid regulator (gemfibrozil, GFZ), 1 chemical diuretic (hydrochlorothiazide, HCT) and 1 contrast agent (iohexol, IHX). CFN and AMX, that the last one was recently included in the watch list of priority substances modified by the Commission Implementing Decision (EU) 2018/840 (European Parliament, 2018), were the pharmaceutical detected in the highest concentration in DPP-URJC samples.

The fungal treatment (**DPP-URJC-2-*Trametes versicolor***) showed moderate removals with values below 40 % for 7 pharmaceuticals. Only caffeine achieved an elimination higher than 80 %, while others compounds like 4-AAA, AMX and IHX showed no reduction. The recalcitrant behaviour of these compounds in biological treatment has been observed previously in other studies (Spina et al., 2019; Zorita et al., 2009) which report the conversion of conjugated metabolites to their parent compound through enzymatic processes and the sudden release of pharmaceuticals from sludge. The negative removals of IHX, AMX and 4-AAA agree with previous observations due to concentrations in the effluent higher than in the influent. This fact has been reported very often for recalcitrant compounds to biological oxidation like CPZ, DCF or AMX (Spina et al., 2019), attributing these results to different factors: i) the conversion of conjugated metabolites to their parent compound through enzymatic processes; ii) sudden release of pharmaceuticals from sludge; iii) sampling variations due to long hydraulic retention times and iv) the limited analytical capabilities for low concentrations.

As it previously mentioned, the functional groups of the chemical structure as well as the hydrophilic/hydrophobic behaviour of the pharmaceuticals strongly affect their removal (Yang et al., 2013 b). In general, pharmaceuticals containing electron donating functional groups such as amine ($-NH_2$), hydroxyl ($-OH$) or alkoxy ($-OR$) groups are more susceptible to be biologically degraded by the oxidative catabolism of fungi. On the contrary, pharmaceuticals containing strong electron-acceptor functional groups, such as CZP containing azepine, an amide ($-CONR_2$) group are majorly degraded by extracellular lignin modifying enzymes, but with lower removal degrees (Rodríguez-Rodríguez et al., 2010; Marco-Urrea et al., 2009).

On the other hand, hydrophobicity plays a critical role in bio-sorption of micropollutants in the white-rot fungi, enhancing its removal from the aqueous phase. Hydrophobic micropollutants ($\log K_{ow} > 3$), such as GFZ are easily removed by white-rot fungi (Grandclément et al., 2017). However, elimination of hydrophilic compounds ($\log Kow < 3$) is highly dependent on the presence of electron-donor and/or acceptor groups (Grandclément et al., 2017; Yang et al., 2013 b). The presence of the strong electron acceptor groups of amide and iodine in the IHX, prevails over

its electron donating hydroxyl groups, hindering their biological oxidation. Moreover, the pH of the aqueous medium is also an important factor. Hydrophilic compounds with $pK_a < pH_{\text{medium}}$ are expected to be as ionic forms, promoting its solubility in the aqueous phase and making more difficult their elimination. It seems the case of 4-AAA, AMX, MDZ, SMX and HCT. For example, HCT possess electron withdrawing groups (sulphonamide and chlorine) and amine donating group, being the biodegradability comparable to that obtained for SMX, which accounts for the same opposing groups (sulphonamide and amide).

The promotion of highly oxidizing hydroxyl radicals by advanced bio-oxidation mediators increased the elimination of 4-AAA, AMX and IHX up to 34, 23 and 77 %, respectively. Significant increases were also accomplished for HCT and MDZ (both around 50 %) and GFZ and SMX (82 and 89 %, respectively). Finally, it should be concluded that the addition of gallic acid and iron/manganese, which promote the hydroxyl radical's production, improved the efficiency of the process in terms of the pharmaceutical compound's removal but not significantly in carbon, nitrogen and phosphorus removal. This fact confirms that pharmaceuticals, which are non-biodegradable pollutants, were mainly removed by the hydroxyl radicals attack. Likewise, it must be noted that these results were obtained under continuous operation of RBCs with a HRT of only 1 day and non-supplementary addition of extra biodegradable carbon and nitrogen sources, which have been very influencing factors in the performance of alternative bioreactors using *T. versicolor*, such as fixed bed columns or fluidized bed reactors, for the treatment of wastewater (Palli et al., 2017; Torán et al., 2017; Hai et al., 2009; Blánquez et al., 2008 a and b).

Influence of HRT on the performance of advanced bio-oxidation treatment on RBCs

The immobilization of *T. versicolor* on the surface of the RBC's discs makes possible decoupling the hydraulic retention time and cellular retention time. HRTs ranging from 1-3 days have been reported for fungal treatments (Mir-Tutusaus et al., 2018 and 2017; Palli et al. 2017; Badia Fabregat et al., 2016) as lower HRTs usually limit the performance of the treatment, decreasing the removal of micropollutants. In order to consider the potential capacity of *Trametes versicolor* immobilized over RBCs as alternative to biological technologies implemented in a conventional WWTPs, an HRT of 12 h was studied for the treatment of **DPP-URJC-4-HRT**. Figure 11 a and b shows the performance of advanced bio-oxidation process with *Trametes versicolor* on RBCs operating with a HRT of 1 day (DPP-URJC-3) and 12 hours (DPP-URJC-4).

As expected, the TOC removal decreased when reducing the HRT from 24 to 12 hours. A less significant reduction was observed for the phosphate removal. In the

case of ammonium, the removal was improved from 10 to 20 %. This fact is attributed to limited ammonification of the organic nitrogen compounds, leading to less ammonium concentration by the nitrogen uptake of the microorganisms of the biological treatment.

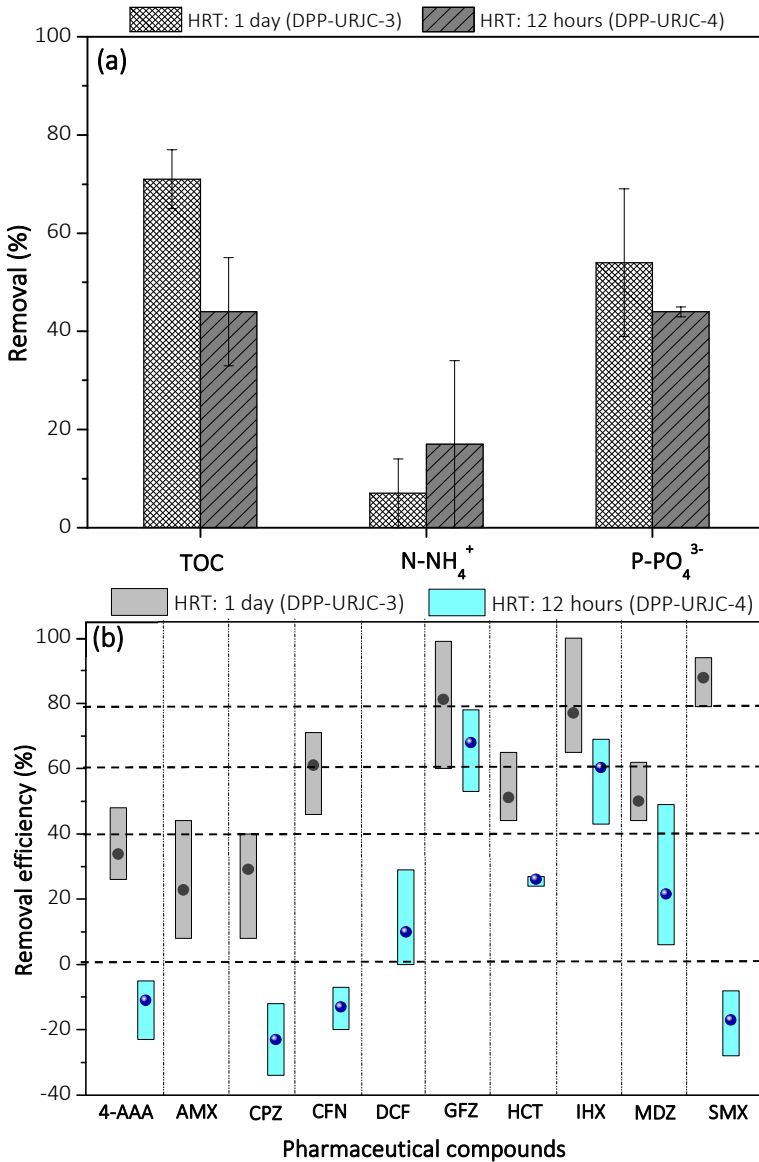


Figure 11. Removal of (a) TOC, N-NH₄⁺ and P-PO₄³⁻ and (b) pharmaceutical compounds for advanced bio-oxidation treatments of wastewater from DPP-URJC with 1-day and 12 hours of HRT

Nevertheless, the most important influence of decreasing the HRT to 12 hours was obtained in the pharmaceutical's removal efficiency (Figure 11 b). An extremely decrease in the efficiency of the system was observed in terms of pharmaceutical elimination working at HRT of 12 hours. GFZ and IHX removal efficiency went down from 82 and 77 % to 70 and 60 %, respectively. HCT and MDZ fell from 50 to 25 and 20 %, respectively. Finally, 4-AAA, CFN, CZP and SMX were not eliminated, in comparison with the results at HRT of 1 day (removals ranging from 30 to 90 %).

Thus, it can be concluded that the decrease of the HRT from 1 day to 12 hours dramatically reduced the efficiency of pharmaceuticals removal at the rotating biological contactors. However, it is worthy to note that 1-day HRT was enough to obtain remarkable carbon, nitrogen, phosphorus and pharmaceutical removal being until now the lowest proposed HRT in literature for fungal treatments.

B) Influence of the wastewater composition on the biological performance of fungal RBCs

After the treatment of DPP-URJC, RBCs-system was continuously fed with the real urban wastewater from the wastewater treatment plant located at Toledo for 22 days. The characteristics of the wastewater and operating conditions were described in Table 4. During this treatment, real wastewater was also kept their natural concentration of pharmaceutical compounds. In the same way, the working volume was 10 L and around 40 % of each disc was submerged. The set of discs was mechanically rotated at 12 rpm, to ensure homogeneous conditions and appropriate aeration of the reactor. Similarly, to the DPP-URJC treatment where the advanced bio-oxidation mediators were added, and 1-day was fixed as HRT.

The performance of the biological treatment at bench scale was evaluated for the removal of the carbon, nitrogen, phosphorus and pharmaceutical compounds present in the real wastewater. As it can be seen from Table 7, the treatment has been also divided into two different stages in which the initial composition of the water fed to the RBCs-system was different: period between day 4 to 15 (**WWTP-Toledo - 1**) and from 15 to 22 of operation (**WWTP-Toledo - 2**).

A first stage where average loadings reached were 760, 290 and 130 mg/d for the TOC, N-NH₄⁺ and P-PO₄³⁻ respectively; and in a second stage the loadings increased for TOC and N-NH₄⁺ at 1,160 and 410 mg/d, while P-PO₄³⁻ decreased to 23 mg/d. These oscillations are common in the WWTPs' inlets which suffer considerable variations depends on the periods of treatment. In this case, thanks to the composition varied depending on the time in which the sampling of the wastewater from the WWTP was

carried out, the influence of the wastewater composition on the process performance was evaluated.

Table 7. Characterization of urban wastewater from DPP-URJC and WWTP- Toledo

	DPP-URJC-3 (bio-oxidation)	WWTP- Toledo-1 (days from 4 to 15)	WWTP- Toledo-2 (days from 15 to 22)
TOC (mg/L)	115 ± 29	76 ± 18	116 ± 3
COD _{TOTAL} (mg/L)	480 ± 44	359 ± 201	416 ± 81
COD _{SOLUBLE} (mg/L)	401 ± 41	210 ± 47	169 ± 18
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	175 ± 21	29 ± 5	41 ± 7
P-PO ₄ ³⁻ (mg/L)	14 ± 3	13 ± 4	2,3 ± 0,2
TOC: N-NH ₄ ⁺	1: 1.5	3: 1	3: 1
TOC: P-PO ₄ ³⁻	8:1	6:1	50:1

The validation of the advanced bio-oxidation process with *Trametes versicolor* on RBCs for a plausible implementation in a conventional wastewater treatment plant requires its evaluation for several types of wastewater. In this context, two wastewater samples (**WWTP-Toledo-1** and **WWTP-Toledo-2**) taken at different periods of time from a WWTP in the north of Toledo (Spain) and a wastewater stream from the demo wastewater pilot plant at Rey Juan Carlos University (**DPP-URJC-3**) were compared. All the wastewater were collected from the outlet streams of primary treatment in the depuration facilities. As it can be seen from Table 7, the WWTP-Toledo-1 and WWTP-Toledo-2 wastewater samples showed similar C:N ratios and they have higher C:N ratio than DPP-URJC-3 wastewater samples (ca. 3:1 vs 1:1.5, respectively). However, the C:P ratios of WWTP-Toledo-1 and WWTP-Toledo-2 streams are different (6:1 and 50:1, respectively), whereas the C:P ratio of DPP-URJC-3 (ca. 8:1) is quite like that of the WWTP-Toledo-1 (Table 8).

The variation of C:P composition of WWTP-Toledo-1 to WWTP-Toledo-2 wastewater did not modify the efficiency of the biological treatment during operation (Figures 12 and 13, respectively for macronutrients and pharmaceutical compounds removals). Thus, a low of phosphate content of the wastewater does not limit the performance of the advanced bio-oxidation fungal treatment.

Otherwise, the higher C:N ratio of WWTP-Toledo respect to DPP-URJC-3 wastewater samples promoted a slight improvement of the TOC, N-NH₄⁺, P-PO₄³⁻ removals (Figure 12). This fact is probably due to the best performance of biological fungal systems with higher C:N ratios. A high C:N ratio mimics the optimal conditions of white rot fungi for degradation of lignin in natural lignocellulosic substrates, which increases the production of lignin-modifying enzymes (Elgueta et al., 2016; Rousk, 2007). Typically, it is reported in literature an optimum C:N ratio ranging from 7 to 10

(Woo-Sik et al., 2010). Moreover, a high C:N ratio ensures the fungal growth and maintenance under non-sterile conditions over bacterial populations. Regarding the effect of C:P content, there is not information reported about its influence on fungal biological systems.

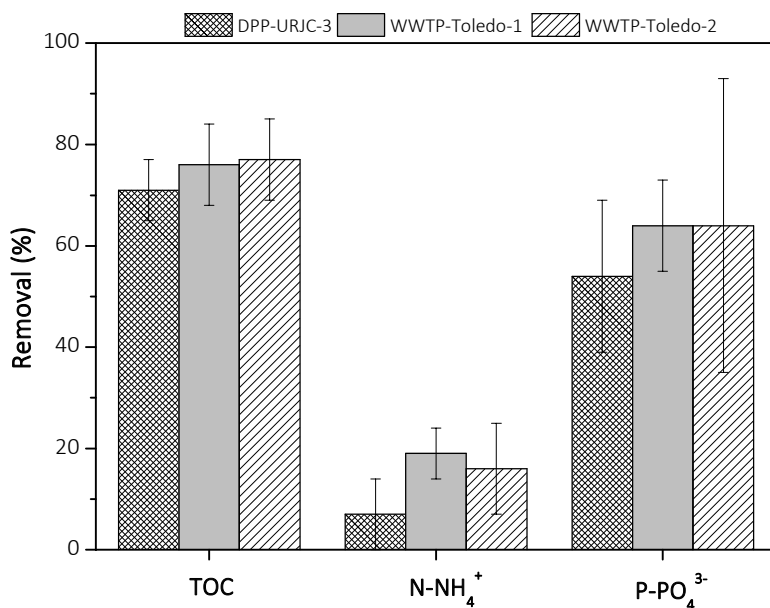


Figure 12. Comparative of removal rates to TOC, N-NH₄⁺ and P-PO₄³⁻ during urban wastewater treatment from DPP-URJC and WWTP-Toledo

Concerning the pharmaceutical micropollutants, AMX was not detected in WWTP-Toledo 1 and 2, IHX was not detected in WWTP-Toledo-2 and DCF and N,N-Diethyl-meta-toluamide (an insect repellent, DEET) were found only in the WWTP-Toledo-2 sample (Figure 13). The elimination of pharmaceutical compounds showed similar removals for 4-AAA, CFN, CPZ and GFZ in both wastewater samples (WWTP-Toledo-2 and DPP-URJC-3). In turn, the removal of antibiotics (MDZ and SMX) slightly decreased for the WWTP-Toledo-2 wastewater. Thus, it seems that the slight improvement of biological performance in terms of the TOC, N-NH₄⁺ and P-PO₄³⁻ removals is not related to a higher efficiency of the removal of pharmaceuticals. However, it was seen that the total content of pharmaceuticals in the WWTP-Toledo-2 wastewater (ca. 59 µg/L) is considerable higher than in the DPP-URJC-3 wastewater (ca. 32 µg/L). Taking into account these data, the efficiency of the treatment for the removal of pharmaceuticals could be affected by its loading rate, as it can be deduced from the overall efficiency of all the pharmaceuticals detected (59 % for DPP-URJC-3

versus 46 % for WWTP-Toledo-2). Likewise, it must be pointed out the remarkable tolerance of the fungal treatment for the range of the pharmaceutical loadings of these two wastewaters, from 317 $\mu\text{g}/\text{d}$ (DPP-URJC-3) to 590 $\mu\text{g}/\text{d}$ (WWTP-Toledo-2).

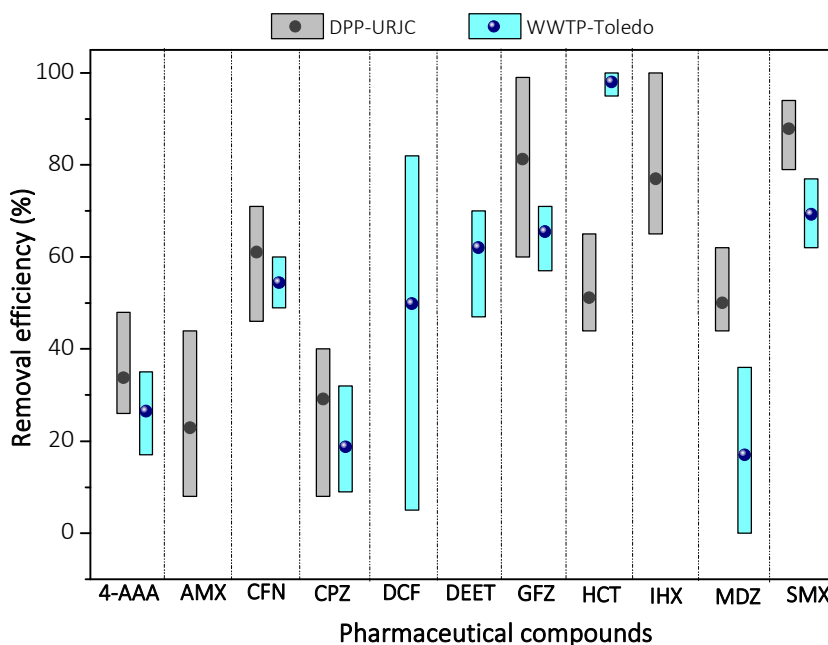


Figure 13. Removal intervals of detected pharmaceutical compounds during urban wastewater treatment from DPP-URJC and WWTP-Toledo (dots: average value)

C) Assessment of the prevalence of fungal or bacterial communities in the biofilm of RBCs after treatment of DPP-URJC and WWTP-Toledo wastewater

As it has been mentioned, the treatment of non-sterile wastewater under continuous operation can promote the proliferation of bacterial colonies, which compete for the available substrates of the wastewater. This fact can produce the prevalence of dominant bacterial colonies, which would reduce the efficiency of the fungal advanced bio-oxidation process for the removal of pharmaceutical micropollutants. In order to evaluate the prevalence of fungal or bacterial communities in the RBCs, several bioassays with bactericides and fungicide were performed using as inoculums the sludge of the biofilm created over the RBCs-discs after the treatment of **DPP-URJC-3** and **WWTP-Toledo-2** wastewater.

The consumption of sodium acetate in terms of the TOC content was used as indirect measurement of the prevalence of fungal or bacterial communities in the

RBCs. Figure 14 (a) and (b) shows the results of the activity tests at pH 4.5 and 7, respectively, after the addition of inhibitors (bactericides to see the fungal activity, fungicide to see the bacterial activity). These pH values were chosen according to the pH of the inlet and outlet streams of the RBCs during treatment. In addition, bio-tests were also performed with total biomass inhibition (control: bactericides and fungicide were added) and bio-tests without biomass inhibition that allowed the evaluation of the activity of the entire microbial population (none: total activity).

In presence of the fungicide (bacterial activity), the WWTP-Toledo-2 inoculum achieved a TOC removal of ca. 25 % at pH 4.5 (Figure 14 a). In turn, a negligible TOC removal was observed by the DPP-URJC-3 inoculum at the same conditions. The bioassays using bactericides (fungal activity) showed similar TOC removals that obtained by the inoculums alone, even with a slight increase for the DPP-URJC-3 inoculum. These results clearly point to a prevalence of fungi in the DPP-URJC-3 and WWTP-Toledo-2 inoculums. At pH 7 (Figure 14 b), the DPP-URJC-3 inoculum was less active in absence of fungicide and bactericides in comparison to the results at pH 4.5. This is a consequence of a more favourable pH for bacterial communities and the decelerated metabolism of fungal communities. Likewise, the activity of bacteria when using the fungicide increased up to ca. 37 % and 12 % for the WWTP-Toledo-2 and DPP-URJC-3 inoculums, respectively. Nevertheless, the activity of fungi in bioassays performed with bactericides was much higher than those obtained by bacteria in those with the fungicide.

This confirms the prevalence of fungal communities on the biofilm of RBCs. However, the development of bacterial communities during the treatment of both wastewaters is also evident, being more important for the inoculum of the WWTP-Toledo-2 treatment. Moreover, it is observed that both inoculums displayed a slight decrease of activity for none additives (inoculum alone) as compared to those performed with bactericides bioassays. These results indicate that the higher proportion of bacteria microorganisms reduces the activity of both fungal communities, probably due to the competitive substrate consumption.

On the other hand, the increase of the bacterial proportion in the inoculum of the WWTP-Toledo-2 could be related to the higher C:N ratio of this wastewater, three times higher than the DPP-URJC-3 effluent. Summarizing and looking at the results obtained at pH 7, real pH of operation of the RBCs, the bacterial communities will be contributing to the biological performance of the RBCs. Moreover, the increasing competition of bacteria for the substrate could lead to loss of fungal biomass and the destabilization of fungal enzymes (Hai et al., 2013). Additionally, the decrease in the fungi proportion would produce a reduction of the efficiency of pharmaceuticals removal (Badia-Fabregat et al., 2017). Thus, as the RBCs are less

colonized by bacterial communities during the treatment of DPP-URJC-3, a higher efficiency for pharmaceutical compounds removal was achieved. The higher proportion of fungal biomass will increase the production of non-selective oxidizing hydroxyl radicals through the advanced bio-oxidation process enhancing the removal of more bio-refractory micropollutants (Christoforidis et al., 2018).

*The efficiency of *T.versicolor* as white-rot fungi immobilized on rotating biological contactors (RBCs) for the treatment of urban wastewater of different depuration facilities has been validated. The presence of advanced bio-oxidation promoters, a lignin-derived mediator and metal complexes with redox activity, enhanced the performance of fungal biological treatment for the removal of pharmaceutical micropollutants, increasing significantly the elimination of 4-AAA, AMX, IHX and SMX among others. Remarkable removals of the organic content (ca. 70-75 % of TOC) were achieved with C:N and C:P ratios ranging from 0.6 to 2.8 and 6 to 50, respectively. These results were accomplished operating with non-addition of supplementary biodegradable glucose source, non-fungal biomass refreshment, non-external aeration and 1 day of HRT, which are the main limitations of fungal biological treatments for plausible implementation in WWTPs. It was observed the proliferation of bacteria in the biofilm of RBCs as consequence of the continuous treatment of real wastewater under non sterile conditions. However, the fungal communities dominate the performance of the removal of the organic loading. The fungal treatment based on the immobilization of *T.versicolor* on RBCs (10 L/d in a reactor of 10 L capacity) is considered an effective technology for depuration of real urban wastewaters including the removal of pharmaceutical micropollutants, although further steps must be done in order to achieve a better stabilization of the fungal biomass and higher removals of nitrogen as nutrient.*

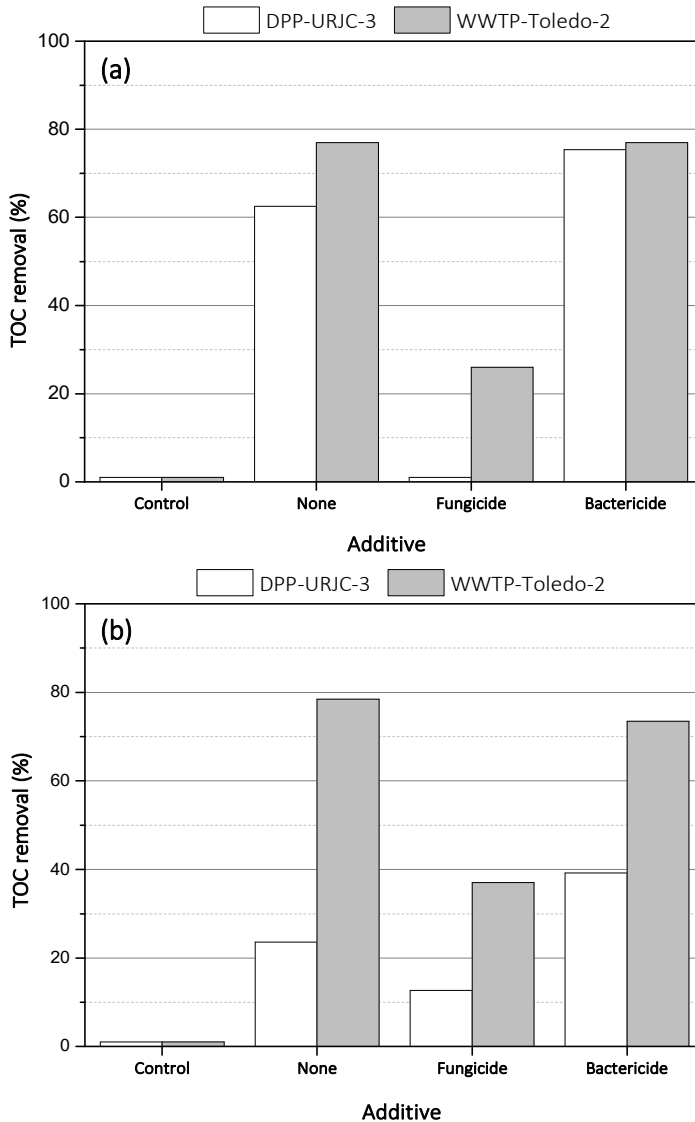


Figure 14. Fungal and bacterial activity of inoculums after DPP-URJC-3 and WWTP-Toledo-2 wastewater treatment after 4 days of incubation at: a) pH 4.5 and b) pH 7.

4.3. Advanced bio-oxidation process on modified wooden rotating biological contactors for the on-site treatment of hospital wastewater effluents and the removal of pharmaceutical compounds.

The continuous treatment of the hospital wastewater was carried out by the advanced bio-oxidation process with *Trametes versicolor* in two modified rotating biological contactors at bench-scale. The improved and modified systems are based on RBCs-unit presented previously for the urban wastewater treatment, but in this case the propylene discs were completely covered by pine wooden planks of the same diameter and 0.5 cm thickness (Figure 2 and 3). The incorporation of a lignocellulosic substrate promotes the growth of the fungal culture and its attachment to the discs (Shin et al., 2002). In addition, lignocellulosic substrate acts as a selective source of carbon and nutrients and reduces the proliferation and massive growth of bacteria (Torán et al., 2017). The treatment of hospital wastewater was carried out in parallel in two units in order to study the reproducibility of the advanced bio-oxidation process and to validate it as an alternative biological treatment to substitute the conventional one present in the WWTPs.

In order to evaluate the efficiency of this process, this chapter is divided in three sections:

- A. Immobilization of *Trametes versicolor* on the modified rotating biological contactors.
- B. Overall performance and validation of advanced bio-oxidation process at modified wooden-RBCs system for the hospital wastewater treatment.
- C. Evaluation and evolution of fungal or bacterial communities in the biofilm of RBCs after treatment of hospital wastewater.

A) Immobilization of *Trametes versicolor* on modified rotating biological contactors

The main aim to this previous step is to get a stable fungi's biofilm over the discs. For this purpose, the procedure described in the experimental section 3.3 was followed. After 80 days of start-up, as it can be seen from Figure 15, the immobilization of *Trametes versicolor* over the disc was accomplished, obtaining a homogeneous fungi's biofilm. It should be noted that the immobilization of biomass on wooden discs generated a biofilm of greater thickness and stability than that obtained for the RBCs-unit with polypropylene discs (Figure 5). This fact is due to working with an excess of organic content for the presence of wood which allowed to maintain a high concentration of carbon in the system. Thus, a higher biosynthesis of extracellular exopolysaccharides (EPS), which are responsible for the adhesion of the fungus, was accomplished in the system by *T. versicolor* (Tavares et al., 2005; Fang and Zhong, 2002; Sinha et al., 2001 a and b). In addition, using this lignocellulosic material as a surface of immobilization, which has a roughness and porosity greater than polypropylene, also improved its adhesion to the discs avoiding the detachment.



Figure 15. Evolution of biomass during the start-up of modified wooden-RBCs system: (A) Pre-treatment, (B) 31 days, (C) 57 days, (D) 71 days and (E) 80 days

B) Overall performance and validation of advanced bio-oxidation process at modified wooden-RBCs system for the hospital wastewater treatment

Hospital wastewater was continuously treated during 75 days in the both RBCs-systems. The characteristics of the wastewater and operating conditions were described in Table 5. Fungal based biological treatments have been traditionally evaluated as alternative systems for removal of pharmaceutical pollutants refractory to conventional biological treatments. However, depuration of hospital wastewater, in terms of TOC, nitrogen, phosphorous removal is not usually assessed.

Figure 16 shows the overall performance of the systems, in terms of TOC, N-NH_4^+ , P-PO_4^{3-} and TKN loadings in the inlet and outlet streams during operation of bioreactor 1 and 2. Results show a stable operation, with results quite similar for both reactors. This fact demonstrates the good performance and reproducibility of the system for the treatment of the hospital wastewater with *Trametes versicolor* by the advanced bio-oxidation process. Moreover, it indicates the good adaptation and the high stability of the biofilm to the treatment of a real hospital wastewater which present in its matrix a high concentration of toxic micropollutants and pathogen microorganism.

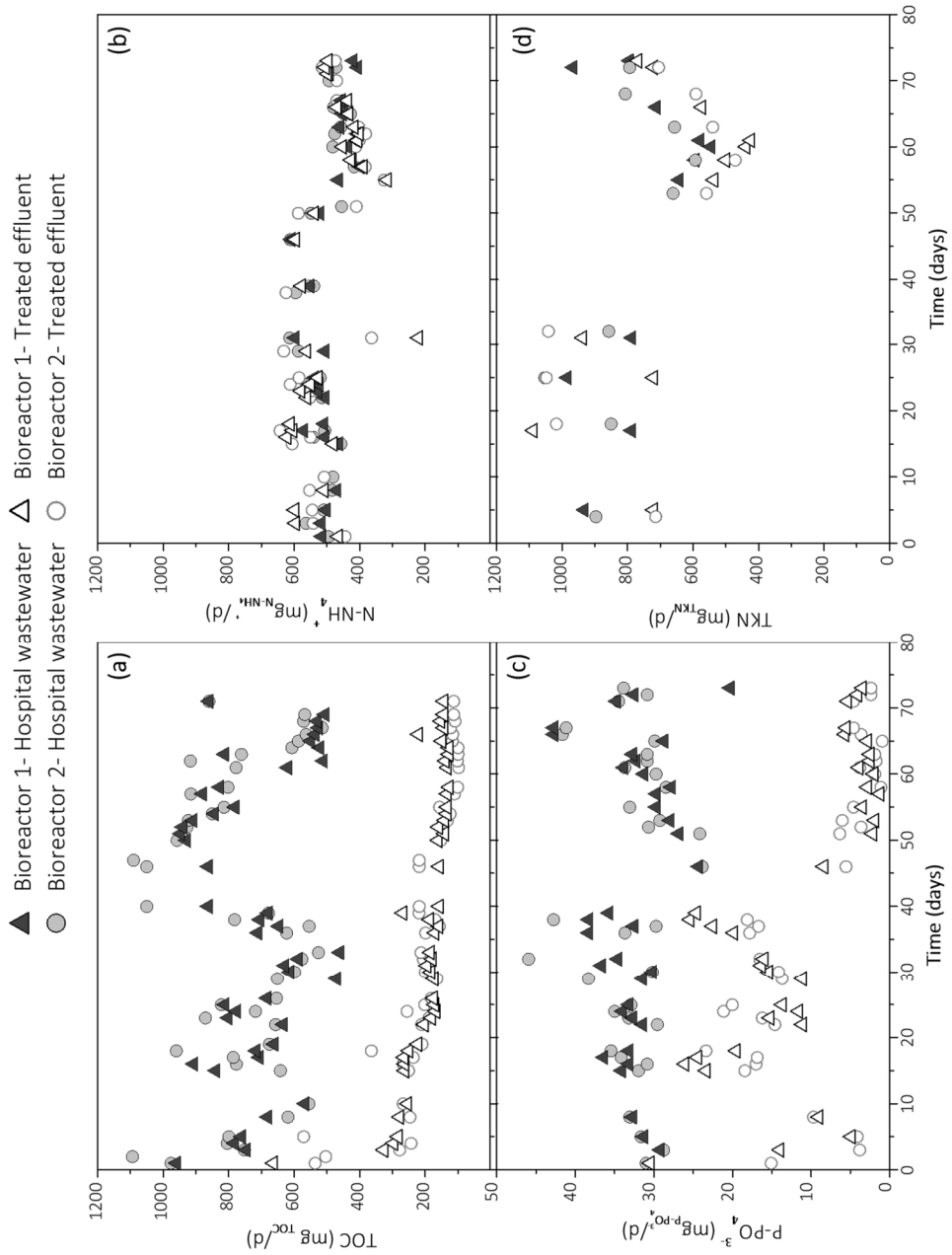


Figure 16. Evolution of (a) TOC, (b) N-NH_4^+ , (c) P-PO_4^{3-} and (d) TKN loadings during hospital wastewater treatment on both modified wooden-RBCs systems

As it can be seen from Table 8, averages TOC removals of 78 % and 82 % were obtained in bioreactors 1 and 2, respectively, during the steady-state period (from 25 to 75 days). Total COD concentrations of 68 ± 41 and 88 ± 56 mg/L in the outlet stream were also obtained, even below the discharge limit (125 mg/L) established for this parameter by current Directive 91/271/EEC (European Parliament, 1991). Phosphorous was also efficiently removed, reaching concentrations of 0.8 ± 0.8 and 0.9 ± 0.7 mg/L in the effluents from 1 and 2, respectively. Regarding to nitrogen, TKN and N-NH_4^+ were hardly affected during the treatment, with removal percentages of ca. 10 %, and TOC/TKN consumption ratios of 5 and 10. Wood decay fungi are physiological adapted to use wood as natural nutrient source, which is rich in carbon but poor in nitrogen, with ratios C/N up to 1250/1 (Watkinson et al., 2006). Those fungi specialized to utilize wood show several nitrogen-conserving strategies, such as selective depletion of cells for nitrogen recycling and re-assimilation from old to new mycelium (Paustian and Schnürer, 1987) or the ability to utilize and select between many different nitrogen compounds (Marzluf, 1996; Lilly et al., 1991). Thus, some studies demonstrate that, even in nitrogen limitation conditions, this nutrient is not completely assimilated, due to these recycling strategies (Watkinson et al., 2006). Besides that, presence of ammonia as readily used nitrogen source represses enzymes involved in the use of other nitrogen sources, such as those responsible for transport of urea or glutamate, and histidine usage (Lee et al., 2006). All these factors are limiting the efficiency for nitrogen removal in the reactors.

Table 8. Characterization of hospital wastewater, treated effluent and removals rate during the treatment of hospital wastewater

Bioreactor 1				
	Hospital wastewater	Effluent	Consumption	Removal (%)
TOC (mg/L)	71 ± 17	16 ± 3	55 ± 18	78 ± 4
COD _{TOTAL} (mg/L)	181 ± 40	68 ± 41	113 ± 52	65 ± 21
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	47 ± 6	45 ± 9	2 ± 2	10 ± 10
TKN (mg/L)	74 ± 16	63 ± 17	14 ± 8	26 ± 15
P-PO ₄ ³⁻ (mg/L)	3.2 ± 0.5	0.8 ± 0.8	2.4 ± 0.8	73 ± 25
Bioreactor 2				
	Hospital wastewater	Effluent	Consumption	Removal (%)
TOC (mg/L)	77 ± 18	15 ± 5	60 ± 22	82 ± 6
COD _{TOTAL} (mg/L)	195 ± 49	88 ± 56	105 ± 47	61 ± 22
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	49 ± 8	47 ± 9	2 ± 7	10 ± 10
TKN (mg/L)	77 ± 16	71 ± 24	7 ± 7	15 ± 15
P-PO ₄ ³⁻ (mg/L)	3.4 ± 0.7	0.9 ± 0.7	2.6 ± 0.8	75 ± 22

Although the performance of the reactors was stable, a slight increase in the TOC loading fed to bioreactors maintaining the same loading in the effluents were obtained after day 30 of operation (Figure 16). In addition, the P-PO_4^{3-} removal also increased at this time due to the loading in the effluents decreased significantly. As can be seen in Figures 17, operational conditions suffered a continuous change during the reactor operation. The reactors were under continuous operation from end February (start-up, growth and acclimation period) to late June, where a considerable change in ambient temperature occurs in Madrid. As the RBCs are open reactors, and they are operated under non-controlled temperature, this parameter suffered a continuous increase from ca. 11 °C in the first days to ca. 18-22 °C especially in the last 30 days of operation (Figure 17 a). An increase in temperature can accelerated the biochemical reactions inside the RBCs, justifying the slight increase in the TOC and phosphate removal in that last period. Both factors (increasing temperature and activity) are reflected in a continuous reduction of dissolved oxygen from ca. 8 to ca. 6.5 mg/L (Figure 17 b). The increase in the pH of the effluent up to values of ca. 7-7.5 (Figure 17 c) in the first 15 days of operation could be consequence of ammonium released during the fungal endogenous metabolism.

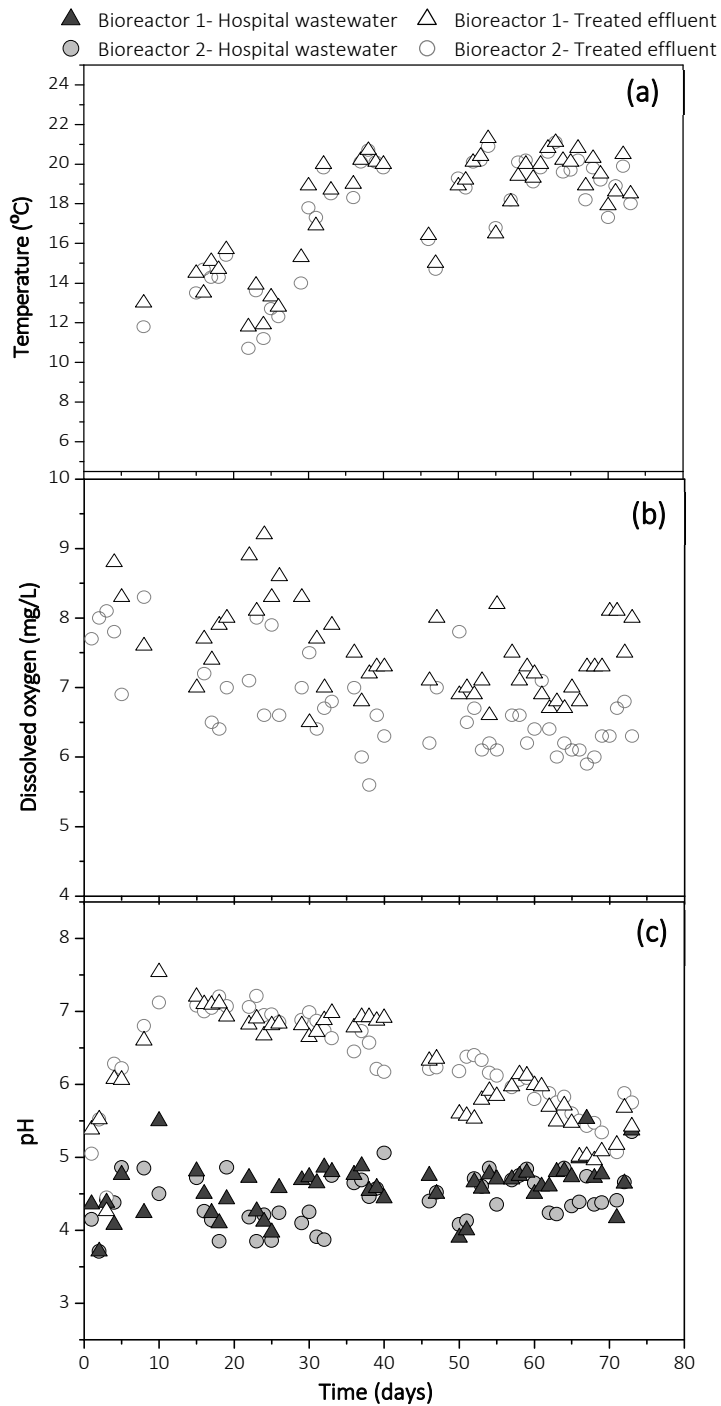


Figure 17. Evolution of (a) temperature, (b) dissolved oxygen and (c) pH during hospital wastewater treatment on both modified wooden-RBCs system

Regarding the fate of the advanced bio-oxidation promoters, Figure 18 shows the behavior of gallic acid in the influent and effluent of the RBCs. This quinone-like compound was fed continuously to the RBCs at ca. 850 mg/d, being reduced to ca. 20 mg/d in the effluent during the treatment. This out rate corresponds to a concentration of gallic acid lower than 2 mg/L in the effluent and a reduction of 97.6 % in the RBCs.

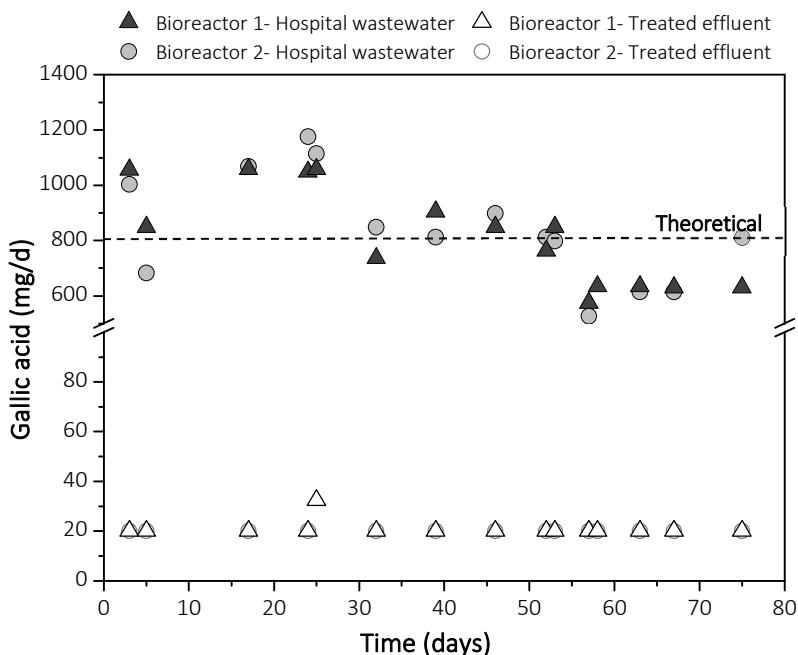


Figure 18. Evolution of Gallic acid loadings during hospital wastewater treatment on both modified wooden-RBCs-systems

On the other hand, the iron-oxalate was fed at 145 mg/L which correspond to an iron concentration of 16.7 mg_{Fe}/L (loading of 0.16 g/d) in the influent to the RBCs. The manganese nitrate was fed at 20 mg/L which is a Mn concentration of 5.5 mg/L (loading of 0.05 of g/d) in the influent to the RBCs. The concentration of manganese in the effluent was similar than in the influent, whereas the concentration of iron was < 1 mg/L during all the operation of the RBCs, demonstrating a continuous adsorption of iron in the biomass. Analysis of Fe in the solid phase showed a concentration of ca. 12 mg_{Fe}/g_{biomass}. These results agree with previous studies demonstrating the ability of white rot fungi and other wood-decaying fungi to adsorb heavy metals by different mechanisms, without generating any toxic effect on the microorganism (Bayramoğlu et al., 2003). Fungi are especially capable of

accumulation of Cd, Zn, Cu and Fe, being excluded Mn and Pb (Tyler, 1982). Similar results with metal accumulation/exclusion were also found with litter-decomposing and ectomycorrhizal soil fungi (Baldrian, 2003). Other studies reported that the presence of certain metallic species, such as Fe and Mn, stimulates the growth and activity of white-rot fungi because these species are involved in the cellulose and hemicellulose decomposition mechanism. For instance, manganese participates in the reaction cycle of manganese peroxidase (MnP) which is responsible for oxidizing reduced organic compounds and starting the advanced bio-oxidation process. This fact makes the interaction between heavy metals and extracellular ligninolytic enzymes of white-rot fungi particularly important for bio-technological processes (advanced biodegradation and bio-oxidation), commonly used in the removal of emerging micro-contaminants. It should be mentioned that iron and manganese concentration in the influent (ca. 16 and 5.5 mg/L, respectively) are below toxic limits reported for heavy metals in fungi, with values of several tens, depending on the fungi cultures and the metal ion (Baldrian, 2003). Thus, potential negative effects due to the presence of both metals (Fungal growth inhibition, potential morphological and physiological changes, or affections in the reproduction of Basidiomycetes, among others) has been discarded.

The efficiency of advanced bio-oxidation process with *Trametes versicolor* was also evaluated for the removal of detected pharmaceutical compounds. Up to 18 out of the 22 pharmaceutical compounds analysed in this work (Table 6) were detected in samples taken from the inlet streams to bioreactor 1 and 2: 4 antibiotics (Amoxicillin, AMX, azithromycin, AZM, metronidazole, MDZ and sulfamethoxazole, SMX), 2 β -blockers (atenolol, ATN and metoprolol, MTP), 3 psychiatric drugs (carbamazepine, CPZ, caffeine, CFN and sulpiride, SPD), 1 analgesic (4-Acetamidoantipyrine, 4-AAA), 1 drug used as chemotherapy and to suppress the immune system (cyclophosphamide, CPD), 2 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (diclofenac, DCF and ibuprofen, IBP), 1 lipid regulator (gemfibrozil, GFZ), 1 chemical diuretic (hydrochlorothiazide, HCT) and 1 contrast agent (iohexol, IHX), 1 steroid hormone (progesterone, PGT) and 1 H₂ histamine receptor antagonist (ranitidine, RNT). Two antibiotics, AMX and AZM, are currently included in the watch list of priority substances modified by the Commission Implementing Decision (EU) 2018/840 (European Parliament, 2018). DCF was included in the previous Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 (European Parliament, 2015).

As can be seen in Table 9 and 10, ATN (5,038 and 5,193 $\mu\text{g/L}$) and CPD (10,539 and 10,582 $\mu\text{g/L}$) were the compounds detected with the highest concentration in the raw hospital wastewater. These compounds are commonly used in hospitals for cardiovascular or hypertension problems and chemotherapy, respectively. Antibiotic

compounds or contrast agents such as AZM (405 and 339 $\mu\text{g/L}$), SPD (338 and 397 $\mu\text{g/L}$) and IHX (159 and 221 $\mu\text{g/L}$) were detected in a lesser extent. Previously, these groups have been already reported as the predominant therapeutic groups present in these aqueous effluents in addition to analgesics (Santos et al., 2013).

Table 9. Pharmaceutical compounds concentration detected in the raw hospital wastewater and treated effluent in bioreactor 1

Bioreactor 1			
Pharmaceutical compound	Acronym	Raw wastewater ($\mu\text{g/L}$)	Treated effluent ($\mu\text{g/L}$)
Antipirine	4-AAA	20 \pm 5	24 \pm 13
Atenolol	ATN	5,038 \pm 1,237	568 \pm 725
Amoxicillin	AMX	18 \pm 4	8.2 \pm 8.2
Azithromycin	AZM	405 \pm 163	0.002 \pm 0.002
Caffeine	CFN	54 \pm 23	0.83 \pm 1
Carbamazepine	CZP	0.14 \pm 0.01	0.092 \pm 0.092
Cyclophosphamide	CPD	10,539 \pm 2,990	0.0023 \pm 0.0017
Diclofenac	DCF	0.14 \pm 0.003	0.084 \pm 0.084
Gemfibrozil	GFZ	1.8 \pm 0.9	0.41 \pm 0.27
Hydrochlorothiazide	HCT	0.6 \pm 0.3	0.59 \pm 0.48
Ibuprofen	IBP	6.8 \pm 2.9	0.009 \pm 0.008
Iohexol	IHX	159 \pm 29	137 \pm 67
Metrodinazol	MDZ	0.032 \pm 0.002	0.007 \pm 0.005
Metropolol	MTP	0.57 \pm 0.45	0.11 \pm 0.11
Progesterone	PGT	0.3 \pm 0.16	0.18 \pm 0.13
Ranitidine	RNT	1.8 \pm 0.4	0.74 \pm 0.60
Sulfamethoxazole	SMX	1.4 \pm 0.5	0.23 \pm 0.17
Sulpiride	SPD	338 \pm 103	0.15 \pm 0.15

Table 10. Pharmaceutical compounds concentration detected in the raw hospital wastewater and treated effluent in bioreactor 2

Bioreactor 2			
Pharmaceutical compound	Acronym	Raw wastewater (µg/L)	Treated effluent (µg/L)
Antipirine	4-AAA	22 ± 2.9	22 ± 4
Atenolol	ATN	5,193 ± 304	145 ± 209
Amoxicillin	AMX	19 ± 5	6.8 ± 5.0
Azithromycin	AZM	339 ± 217	3.9 ± 3.9
Caffeine	CFN	43 ± 18	1.0 ± 0.7
Carbamazepine	CZP	0.16 ± 0.006	0.059 ± 0.024
Cyclophosphamide	CPD	10,582 ± 645	0.0035 ± 0.0015
Diclofenac	DCF	0.14 ± 0.004	0.0067 ± 0.0018
Gemfibrozil	GFZ	1.50 ± 0.31	0.32 ± 0.16
Hydrochlorothiazide	HCT	0.4 ± 0.3	0.69 ± 0.069
Ibuprofen	IBP	5.9 ± 2.2	0.011 ± 0.001
Iohexol	IHX	121 ± 24	115 ± 139
Metrodinazol	MDZ	0.09 ± 0.09	0.001 ± 0
Metropolol	MTP	0.23 ± 0.2	0.015 ± 0.015
Progesterone	PGT	1.03 ± 2.07	0.43 ± 0.08
Ranitidine	RNT	2.9 ± 1.6	1.1 ± 0.6
Sulfamethoxazole	SMX	1.4 ± 0.8	0.44 ± 0.23
Sulpiride	SPD	397 ± 163	6 ± 6

Figure 19 shows the removal efficiencies of pharmaceuticals for both continuous treatments. The results correspond to the minimum, maximum and average removal percentage of seven samples taken during the steady-state (58, 61, 63, 66, 68, 72 and 74 days). Results shown in Figure 19, demonstrate a removal of CPD higher than 99.9 % in both reactors, with values higher than 98 % for AZM and SPD and ranging 88-97 % (reactors 1 and 2, respectively) for ATN. On the other hand, 4-AAA, HCT and IHX were the most refractory pharmaceuticals to the treatment in the RBCs-systems by the advanced bio-oxidation process.

Low removal degrees for 4-AAA and HCT have been already reported in previous results for the treatment of the real wastewater from DPP-URJC and WWTP-Toledo. Their hydrophilic behaviour ($\log K_{ow}$ -0.13 and -0.07, respectively) and pKa values lower than the pH of the hospital wastewater (1.5 and 7) make these compounds highly refractory to the fungal system. Moreover, compounds at low concentration in the hospital wastewater, such as HCT (0.6-0.4 µg/L) are more susceptible to sampling and analytical errors (Collado et al., 2014). In case of the IHX, the presence of the strong electron acceptor groups of amide and iodine (more

susceptible to be biologically degraded by the oxidative catabolism of fungi) prevails over its electron donating hydroxyl groups (majorly degraded by extracellular lignin modifying enzymes, but with lower removal degrees), hindering their biological oxidation.

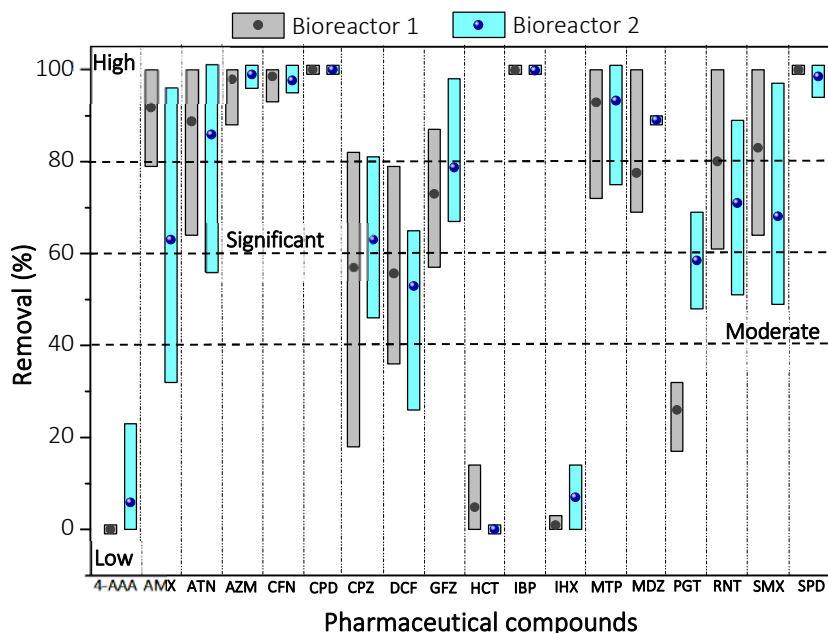


Figure 19. Removal intervals of detected pharmaceutical compounds during hospital wastewater in both modified wooden-RBCs system (red dot: average value)

AZM, CPD and MTP, which were not detected previously during the different urban wastewater treatment (DPP-URJC and WWTP-Toledo), achieved remarkable removal rate with a 98, 99 and 93 % value. AZM is a hydrophobic compound ($\text{Log } K_{OW} = 4.02$) which is expected to be partial as its non-ionic form in the water medium ($\text{p}K_a = 8.7 > \text{pH}_{\text{medium}}$). Moreover, its molecular structure is formed by donating electron groups such as amines and alkoxy. These factors make that it has a high affinity with biomass and consequently get an almost complete removal (98 %). CPD and MTP are hydrophilic compounds ($\text{Log } K_{OW} = 0.63$ and 1.8) but they are expected to be in its non-ionic form in the water medium ($\text{p}K_{a_{CPD}} = 12.78$ and $\text{p}K_{a_{MTP}} = 9.6$). So, a good affinity with the biomass produces high removal efficiencies (99 and 93 %, respectively).

Although chemical composition is different, the pharmaceutical compounds removal grades achieving by the advanced bio-oxidation process in both bioreactors 1 and 2 were similar or higher removal rates for pharmaceuticals than other results reported in literature for the treatment of real hospital wastewater under non sterile conditions and using a *T. versicolor* based reactor (Mir-Tutusaus et al., 2017; Badia-Fabregat et al., 2016; Cruz-Morató et al., 2014). The results for the CPD, an anticancer drug that showed highly refractory behaviour in previous studies using a *T. versicolor* base fluidized reactor (Ferrando-Climent et al., 2015). The removal rates achieved a significant improvement in comparison to other studies previously carried out with *Trametes versicolor* for the treatment of non-sterile hospital wastewater. Mir-Tutusaus et al. (2017) reported lower removal rates for ATN, AZM, IBP and SMX, and similar percentages for CZP and IBP. However, it was operated in a fluidized bioreactor with a higher HRT (3 days) where additional sources of easily biodegradable substrates (C:N of 7.5) were also added and 1/3 of the biomass was replaced every 7 days (Mir-Tutusaus et al., 2017).

Finally, it should be noted that the removal rates achieved in both bioreactors were analogous for the 18 compounds studied. Only, amoxicillin and progesterone showed different results with eliminations of 92 and 26 % in bioreactor 1, compared to 63 and 58 % in bioreactor 2. This fact confirms the good reproducibility of the advanced bio-oxidation process, which it previously observed for the carbon, nitrogen and phosphorus reduction. In addition, it should be pointed that 8 of the compounds studied (ATN, AZM, CFN, CPD, IBP, MTP, MDZ and SPD) obtained removal rates equal to or greater than 80 % in both bioreactors. While only four of them (4-AAA, HCT, IHX and PGT) were removed below 40 %. All these results allow to conclude that the proposed technology is valid as an alternative biological treatment for the elimination of pharmaceutical compounds present in real wastewater.

C) Evaluation of fungal or bacterial communities in the biofilm of RBCs after treatment of hospital wastewater

Concentration of total fungal and bacterial communities, as well as *T. versicolor*, were determined by qPCR of different samples taken from the discs' surface over the operation time: i) after acclimation of the biomass to the wooden-RBCs system correspond to the beginning of the continuous treatment of hospital wastewater (time 0), ii) after 21 and 46 of operation and iii) at the end of the experiment, after 75 days of continuous treatment. The results obtained are shown in Figure 21.

After the acclimation period (time 0), the biomass is majorly colonized by bacteria and fungi species different than *T. versicolor* (Figure 20). Bacteria are probably the most common wood-inhabiting microorganisms before fungal decomposers take their place in the overall succession of microorganisms (Clausen, 1996). In this cases, bacterial communities displace *T. versicolor* during the acclimation period, being predominant in the biomass during operation of 1 and 2. This behaviour contrast with that reported previously in fungal reactors based on *T. versicolor* treating non-sterilized real wastewater, where predominance of fungi over bacteria (Badia-Fabregat et al., 2017) and particularly *T. versicolor* (Mir-Tutusaus et al., 2017) was reported. Nevertheless, substantial differences in the operational variables justified the predominance of *T. versicolor* and other fungal species in those reactors: the addition of supplementary carbon and nitrogen sources easily biodegradable and in ratio optimized for fungi predominance and the replacement of 1/3 of biomass every 5-7 days with fresh *T. versicolor* biomass (partial biomass renovation) to maintain constant the biomass distribution and the activity.

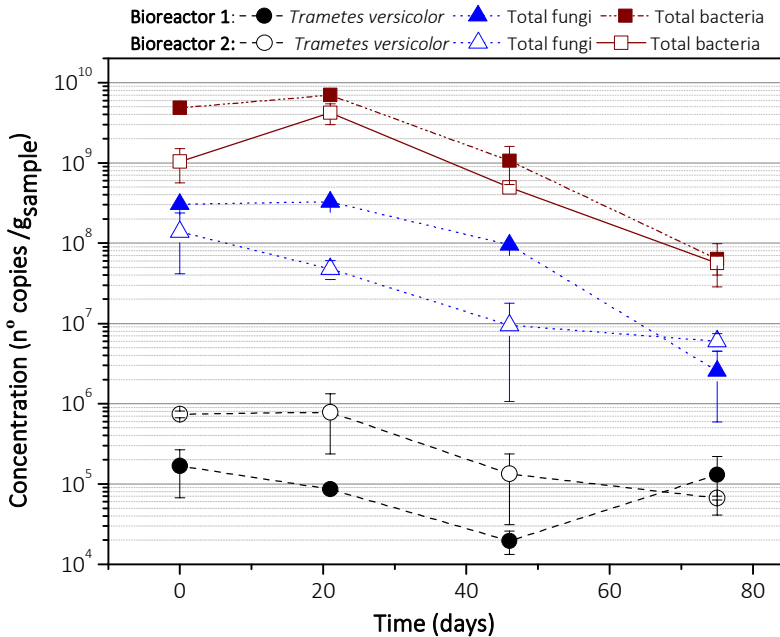


Figure 20. Concentration of total bacteria, fungi and *T. versicolor* and along the time in both bioreactor 1 and 2

On the other hand, wood-decay fungi are well-known for being highly competitive with other fungi species may have a strong and deterministic impact on the community composition (Kielak et al., 2016; Boddy, 2000). In this sense, other fungal species have displaced *T. versicolor* in the growth and acclimation stage performed before starting the continuous operation of the bioreactors.

During operation with hospital wastewater, total fungal and bacteria suffer a continuous decay in the biomass taken from the bioreactors, probably due to development of a biofilm over the discs which is adapted to the continuous treatment of this hospital matrix. Although initial concentrations are different in bioreactor 1 and 2, total fungi and bacteria, and *T. versicolor* evolve similarly, achieving a close final situation after 75 days of operation. Moreover, *Trametes versicolor* has been able to survive during the 75 days of hospital wastewater treatment in both bioreactors.

Analysis of bacterial communities

The taxonomic affiliations of the bacterial reads are given in Figures 21 and 22. *Proteobacteria*, particularly *Alpha proteobacteria* (*Sphingomonadales*, 64.5 %) is the dominant *phylum* in bioreactor 1 at the beginning of the operation. During operation, the bacterial population evolves, decreasing the predominance of *Sphingomonadales* (20 % after 75 days) and gaining relevance *Beta-proteobacteria* (bacteria of the *Burkholderiales*, 15 %), *Firmicutes* (*Clostridiales*, 20 %), *Acidobacteria* (7.5 %) and *Actinobacteria* (5 %).

The evolution of both bioreactors was close similar, even though the bacterial population distribution is different when starting the operation. The dominance of those *phyla* (*Acidobacteria*, *Alpha-*, *Beta-*, *proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*) in decaying wood, especially pine, has been reported before (Kielak et al., 2016). *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* were also reported by Mir-Tutusa et al. (2017) as the most widely represented *phyla* in continuous fungal treatment of non-sterile real hospital wastewater pre-treated by coagulation-flocculation.

Members of the order of *Sphingomonadales* or *Rodhospirillales* have been reported as responsible for the lignin degradation in wood decay (Kielak et al., 2016). Others, like *Burkholderiales* and *Acidobacteria*, such as *Rizhobiales* are known to work associated with fungi (Christofides et al., 2019) for removing toxic wood compounds or fixing nitrogen (Kielak et al., 2016). However, others one, like *Clostridiales*, stimulate the cellular lysis of fungal communities to increase its own cellulose decomposition and nitrogen. So, usually this order usually appears associated to fungal communities as a predator (Christofides et al., 2019).

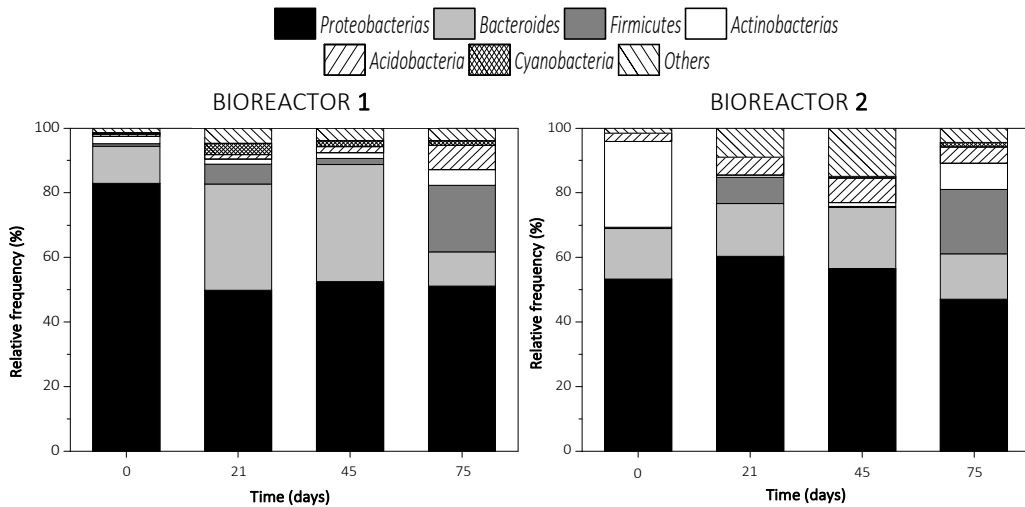


Figure 21. Evolution of bacterial community compositions in bioreactors 1 and 2 presented as relative abundance of taxa at the phylum level

Analysis of fungal communities

Analysis of fungal communities revealed a large proportion of unclassified reads, evolving from a relative frequency of 19.85 ± 3.3 % (t=0 days) to 34 ± 2.8 % (t=75 days) in bioreactor 1 and from 61.5 ± 2.1 % (t=0 days) to 28 ± 1.4 % (t=75 days) in bioreactor 2. These results are not surprising, as it has been demonstrated that the ability of Illumina-based DNA coding to identify fungal taxa in mixed samples differs among studies. It has been reported that the variability of the ITS sequences among closely related taxa makes difficult the whole classification of fungal lineages. Besides, these sequences are often not available in reference databases (Heeger et al., 2019). Consequently, the incomplete state of reference sequence existing in database (UNITE in this case) for many fungal taxa, hindering the ITS classification (Heeger et al., 2019).

The identified taxonomic affiliations of the fungal reads successfully assigned by ITS are given in Figures 23. As with bacterial communities, evolution of bioreactor 2 is close like bioreactor 1 in terms of fungi structure, although the differences observed after 75 days of operation in the relative frequency of fungi genders are more marked than with bacteria.

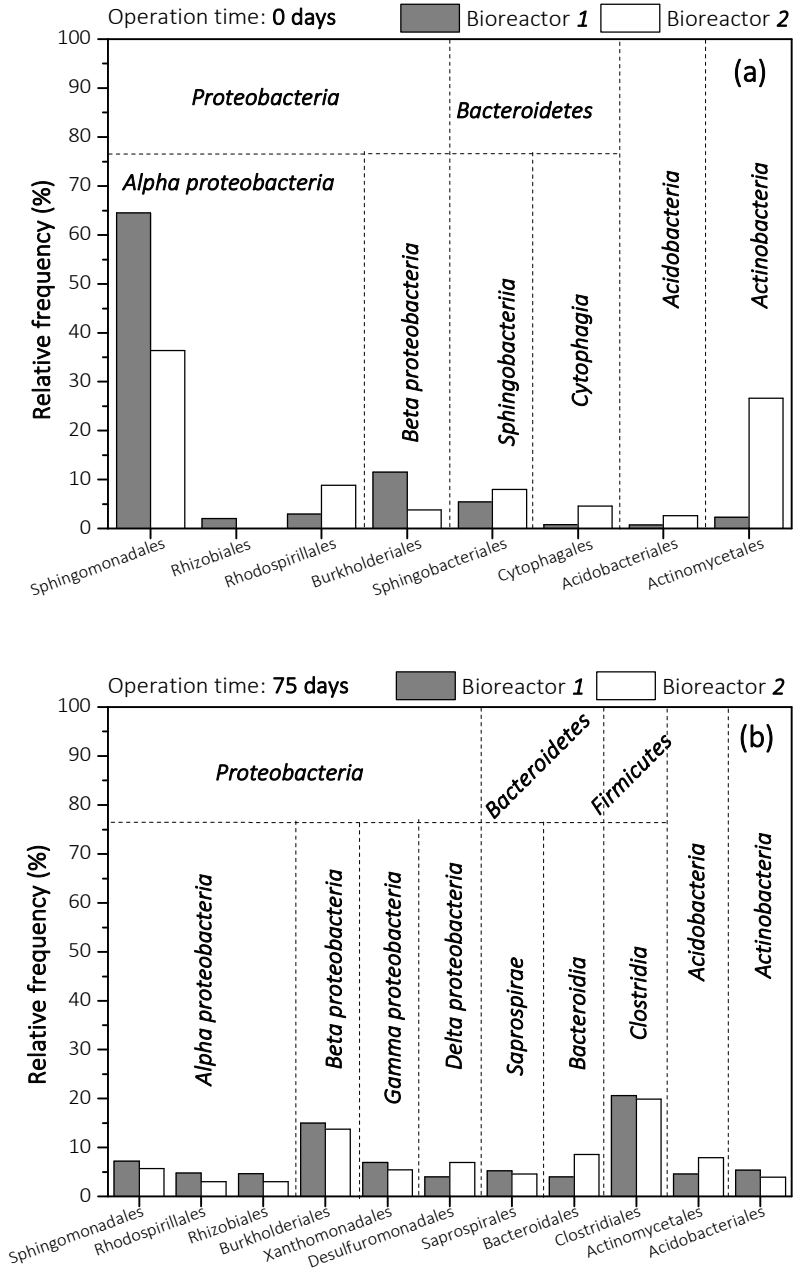


Figure 22. Bacterial orders in bioreactor 1 and 2 at the beginning and the end of operation (operation times 0 and 75 days, respectively)

The competitive interactions between fungi promotes the continuous evolution of the microbial community composition during operation of both bioreactors. Most of the fungal communities consisted of the *phyla* *Ascomycota* (mainly *Sordariomycetes* and *Eurotiomycetes*) and *Basidiomycota*, similarly to main wood-inhibiting fungi found in nature for fallen wood (Yuan et al., 2017). Wood-degrading *Ascomycetes*, such as those from genders *Fusarium* and *Coniochaeta*, can cause pseudo-white-rot (also named soft-rot type II), degrading the lignin during their primary metabolism (Markakis et al., 2017; Hatakka and Hammel, 2011). *Coniochaeta* fungi can utilize aromatic compounds that emerge during wood decomposition and colonize the surface of the wood (Leonhardt et al., 2018; Ravindran et al., 2012).

Although at low relative frequency, consolidation of *T. versicolor* was also established during operation, and the presence of other wood-decaying fungi able to degrade complex organic molecules maintain the activity of the system. In this sense, the production of hydrogen peroxide by ligninolytic fungal cultures has been proven by different mechanisms based on peroxide-generating enzymes such as glucose or glyoxal oxidases (Zhao and Janse, 1996; Daniel et al., 1994). Additionally, the ability to drive the quinone redox-cycle associated to the production of hydroxyl radicals and the removal of organic pollutants has been already reported not only for white-rot fungi, but also other *Basidiomycota* or even *Ascomycota* (Krueger et al., 2016). Thus, the presence of the advanced bio-oxidation process mediators in the hospital wastewater (gallic acid, metallic salts) enhances the activity of the wood-decaying fungi communities which partially colonizing the wooden-RBCs, promoting the removal of pharmaceutical compounds even in conditions of non-predominance of *T. versicolor* in the bioreactor.

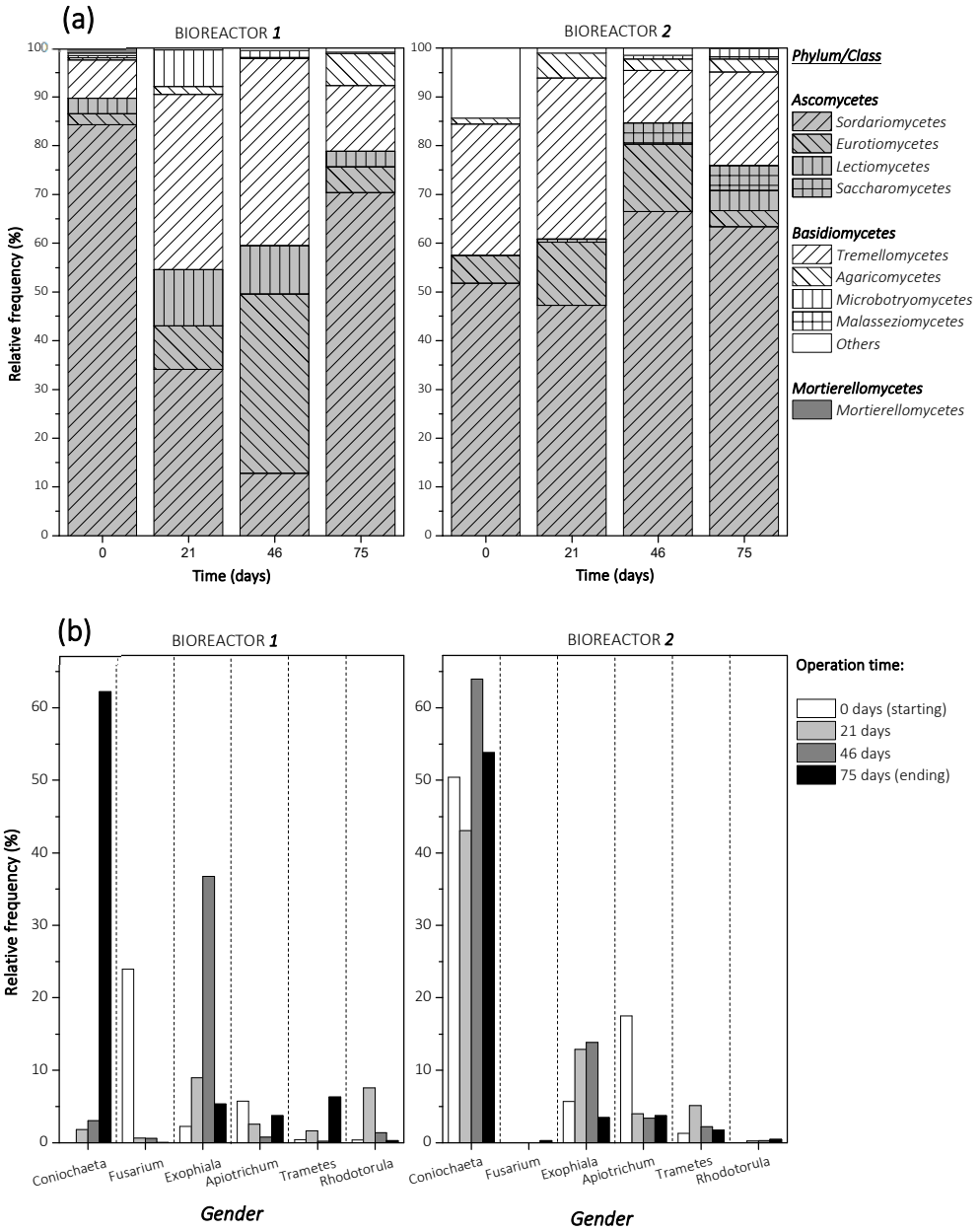


Figure 23. Evolution of bacterial community compositions in bioreactors 1 and 2 presented as relative abundance of (a) taxa at the phylum/class level (b) gender level

The biological system based on RBCs modified with wooden planks as natural support for the biomass showed a remarkable efficiency for the treatment of hospital wastewater effluents, in terms of organic matter and pharmaceutical micropollutants. Similar results obtained in both parallel bioreactor validated this technology as on-site pre-treatment of hospital wastewater effluents before discharging in the sewer network. These results were accomplished operating the reactors in absence of supplementary carbon and nitrogen sources, absence of fungal biomass refreshment, without external aeration and only 1 day of HRT, which are the main limitations of fungal biological treatments for plausible implementation as full-scale wastewater treatment plants.

The results obtained for the qPCR and metagenomics analyses in the biofilm both bioreactors after 75 days of operation demonstrated that the diversity of bacteria and fungi communities evolve to obtain a stable biomass, typically found in the decaying of natural wood. This complex biomass can degrade complex organic molecules, and consequently was highly active for the treatment of hospital wastewater and removal of pharmaceutical compounds.

4.4. Fenton-like based on a reticulated porous perovskite material for the on-site removal of pharmaceutical compounds in hospital wastewater streams.

In this last section of results, the preparation and evaluation of $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ reticulated porous perovskite material (RPP) as active and stable heterogeneous Fenton-like catalyst for the pre-treatment of hospital wastewater to remove pharmaceutical compounds was carried out. The preparation of $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ RPP following the sponge replication method will be optimized. The influence of the temperature, the hydrogen peroxide dosage and the initial pH value on the activity and stability of the catalyst will be evaluated using hospital wastewater as complex wastewater matrix and fortified with carbamazepine as model pharmaceutical compound. Carbamazepine (CZP) is a common antiepileptic drug with important endocrine disrupting effects in water bodies (Ekpeghere et al., 2018) which cannot be effectively removed during the conventional wastewater treatment processes (Zhang et al., 2008). Finally, the efficiency of the $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ reticulated porous foam for the removal of eighteen pharmaceutical compounds detected in the hospital wastewater will be established in a fix bed reactor under continuous operation.

In order to evaluate the efficiency of the catalyst in the Fenton-like process, this chapter is divided in four sections:

- A. Preparation and characterization of the powder and reticulated porous perovskite catalyst.
- B. Preliminary catalytic tests of powder $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite material: influence of temperature and pH.
- C. Catalytic performance of reticulated porous perovskite materials in continuous up-flow fixed bed reactor.
- D. Catalytic performance of reticulated porous perovskite material for the removal of emerging pharmaceutical micropollutants of hospital wastewater

A) Preparation and characterization of the powder and reticulated porous perovskite catalyst

According to the method used for the preparation of the reticulated porous ceramics, several preliminary experiments were needed to determine the optimal composition of the slurry suspension for a successful conformation of the final reticulated porous perovskite material. In these experiments, the dosage of bentonite and Optapix PA 4G as inorganic and organic binders was carefully studied in order to find an optimal viscosity of the slurry suspension for a complete soaking of the macroporous structure of the polyurethane sponge. Experimentally, it was determined that amounts of 65 % wt. (bentonite) and 4 % wt. (Optapix PA 4G) in basis to the mass of powdered perovskite, enables a good penetration of the slurry solution into the sponge structure to form final stable reticulated porous materials after removal of the organic polymer scaffold by calcination.

After optimization of the binders' composition of the slurry suspension that contains the active perovskite material for the dip-coating of a polyurethane sponge, the slow removal of the organic skeleton by calcination with a controlled heating rate is a key variable for obtaining a consistent reticulated porous material. According to the thermogravimetric analysis of the polyurethane sponge, a temperature of 700 °C and a heating rate of 2.5 °C/min was established for achieving a slow and complete decomposition of the organic polyurethane. Likewise, a further thermal treatment for sintering of the reticulated porous material was studied at 1000 and 1200 °C. Table 11 shows the porosity (ϵ) and the mechanical strength of the reticulated porous perovskite (RPP) materials after primary calcination at 700 °C and secondary calcination at 1000 and 1200 °C.

Table 11. Properties of $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ RPPs prepared with different sintering temperatures.

RPP	$T_{\text{final}}^{\text{a}}$ (°C)	ϵ	Resistance (N)
RPP-700	700 °C	Non-stable structure	
RPP-1000	1000 °C	0.60	14 ± 3
RPP-1200	1200 °C	0.30	23 ± 3

At 1000 °C, a stable reticulated porous perovskite material was achieved with a mechanical strength of 14 N and porosity of 0.6. The increasing of temperature up to 1200 °C enhances the mechanical strength until 23 N, but the porosity significantly decreased to 0.3, probably due to the shrinkage and partial collapsing of the perovskite-based structure with the temperature. On the other hand, it was clearly evidenced that 700 °C was insufficient to obtain a reticulated porous material consistent enough. Figure 24 shows images of RPP materials calcined at 700, 1000 and 1200 °C.

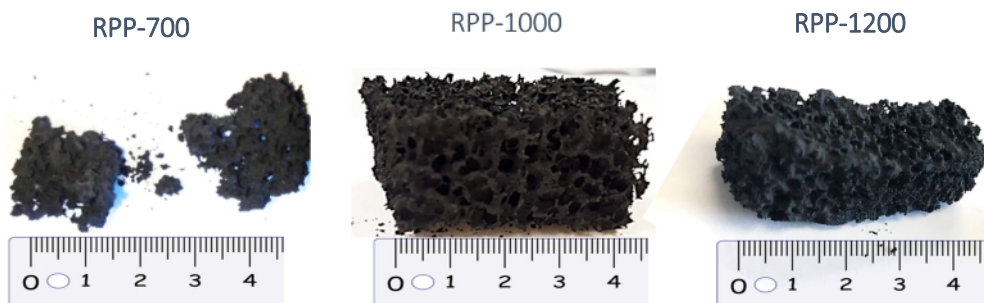


Figure 24. Images of calcined reticulated porous perovskites materials at 700, 1000 and 1200 °C

Additionally, XRD patterns of powder reticulated porous materials after crushing (RPP-700, RPP-1000 and RPP-1200) were assessed as compared to the powder $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite precursor (Figure 25). The RPP-700 material showed characteristic diffraction peaks at 22.6° , 32.2° , 39.8° , 46.2° and 57.4° , corresponding to (101), (121), (220), (202) and (240) lattice planes of the standard ABO_3 structure (JCPDS file: 37–1493). The RPP-1000 material retains the typical ABO_3 perovskite structure, although small diffraction peaks at 30° appeared, being attributed to the presence of bentonite. In the case of RPP-1200 material, the intensity of characteristic signals of ABO_3 perovskite structure decreased and additional diffraction peaks were observed, which can be attributed to segregation of bentonite (montmorillonite, 28° - 30°), copper oxides ($\sim 35^\circ$) and manganese and

lanthanum oxides ($\sim 43^\circ$ - 47°). These results evidenced a partial conversion of the perovskite structure to other crystalline phases at 1200°C .

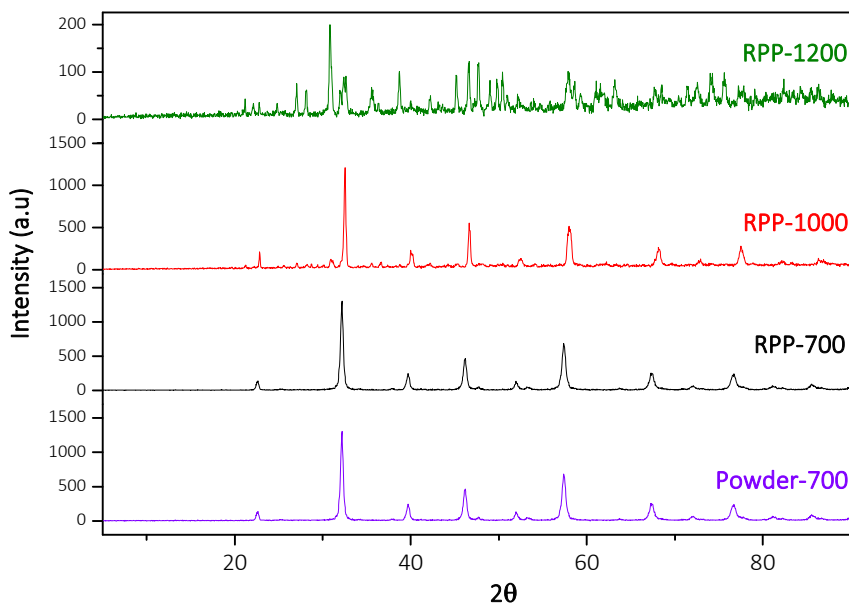


Figure 25. XRD patterns of RPP materials and powder $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite precursor

B) Preliminary catalytic tests of powder $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite material

The influence of the initial pH (3, 5.5, and 7.5) and temperature (30, 50 and 70°C) was initially studied for the treatment of the hospital wastewater spiked with carbamazepine (CZP) as model pollutant for a better evaluation of the catalytic performance of the powder $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite.

Figure 26 shows the H_2O_2 conversion and CZP removal of the catalytic tests carried out at different pH values (natural -7.5-, 5.5 and 3) at three temperatures 30, 50 or 70°C .

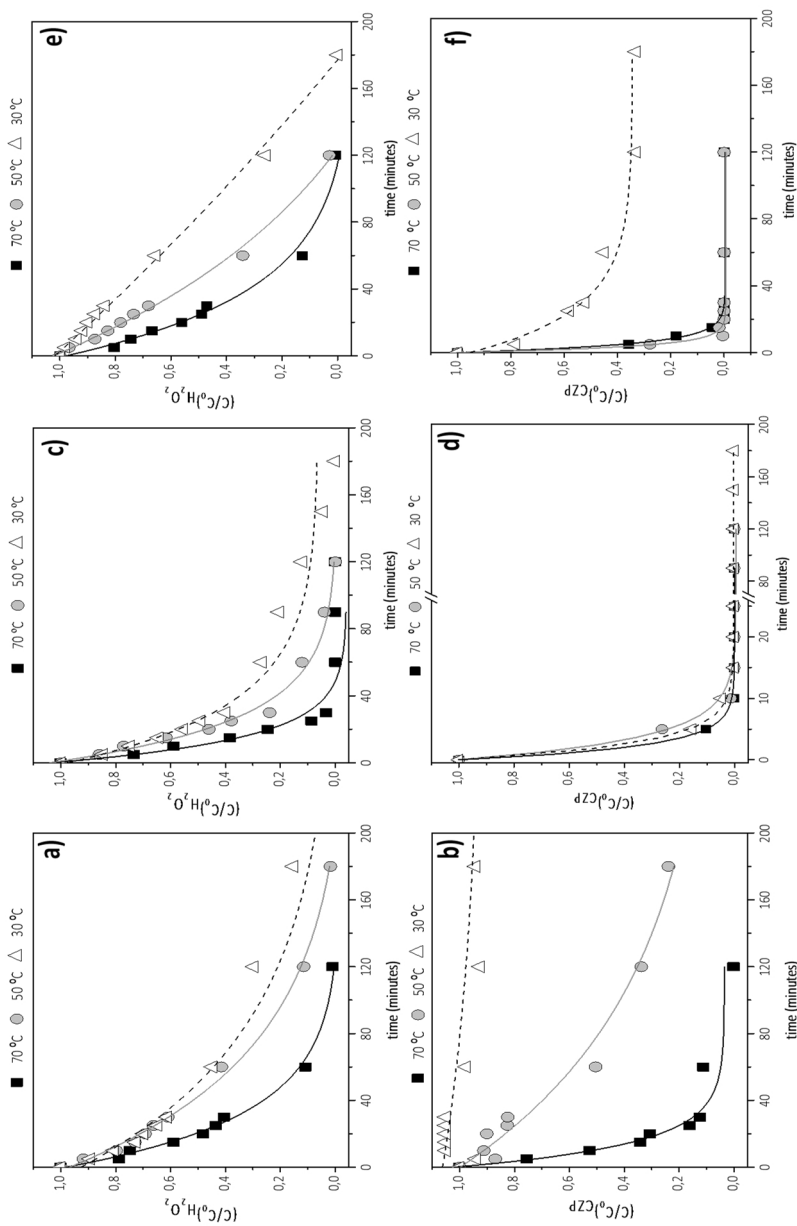


Figure 26. Normalized concentration of hydrogen peroxide and carbamazepine concentrations at initial pH of 7.5 (a) and (b), 3 (c) and (d), 5.5 (e) and (f) for different reaction temperatures (30, 50, and 70 °C) in batch experiments with powder $LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O_3$ perovskite at: $[H_2O_2]_0 = 700$ mg/L, [catalyst] = 0.6 g/L, [CZP]spiked= 15 mg/L in hospital wastewater and stirring =700 rpm

Figure 26 a and 26 b shows the H₂O₂ conversion and CZP removal of the catalytic tests carried out at the initial pH of ca. 7.5 (natural pH of the hospital wastewater) and 30, 50 or 70 °C. The rate of the oxidant conversion increases with the temperature, achieving a complete conversion at 220 min, 180 min and 120 min for 30, 50 and 70 °C, respectively. Likewise, the removal rates of CZP are significantly increased with the reaction temperature, reaching removals of 5 %, 75 % and 100 % at the end of each catalytic run at 30, 50 and 70 °C, respectively. The low efficiency of the catalyst at 30 °C could be attributed to a predominance of the ineffective decomposition of H₂O₂ in H₂O and ½ O₂ promoted by the oxygen vacancies of the perovskite structure (Lee et al., 2001). In fact, the chemical composition of the synthesized powder perovskite (LaCu_{0.5}Mn_{0.49}O_{2.79}) evidence a slight defect of oxygen in comparison to the theoretical one (LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O₃).

Blank experiments performed at 70 °C to determine the oxidative capacity of hydrogen peroxide in absence of catalyst and the adsorption capacity of perovskite in absence of oxidant (Figure 27), also revealed a low removal of CZP (25 %) by the action of H₂O₂ and a negligible adsorption of CZP. Concerning the TOC mineralization, a low TOC reduction was observed for all the studied temperatures in the catalytic experiments at the initial pH of 7.5. The complex composition of the hospital wastewater, accompanied with a relevant amount of urea, can be responsible for this low TOC mineralization (Muñoz et al., 2016). The effect of the complex matrix was confirmed by repeating the catalytic test at 70 °C with CZP in ultrapure water instead of the hospital wastewater matrix (Figure 28). In this case, a remarkable TOC mineralization of ca. 40 % was achieved after 120 min.

The stability of the metallic species of the LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O₃ during the catalytic runs determined by the analysis of the metal ions dissolved in the reaction medium after reaction (Table 12), evidenced a negligible leaching of metallic species, with values of La and Mn concentrations below the detection limit (< 0.2 mg/L) and lower than 0.7 mg/L for Cu (less than 1 % of the Cu content of the solid catalyst).

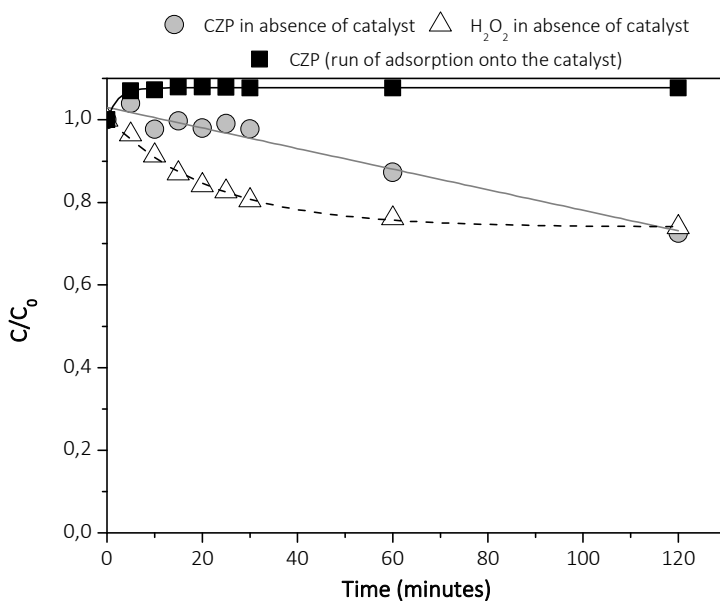


Figure 27. Blank experiments performed in the batch reactor at $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7.5$ and $[\text{CZP}]_{\text{spiked}} = 15\text{ mg/L}$ at hospital wastewater: in absence of catalyst with $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 700\text{ mg/L}$ and to evaluate the adsorption of CZP in absence of hydrogen peroxide and $[\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3]_{\text{powder}} = 0.6\text{ mg/L}$.

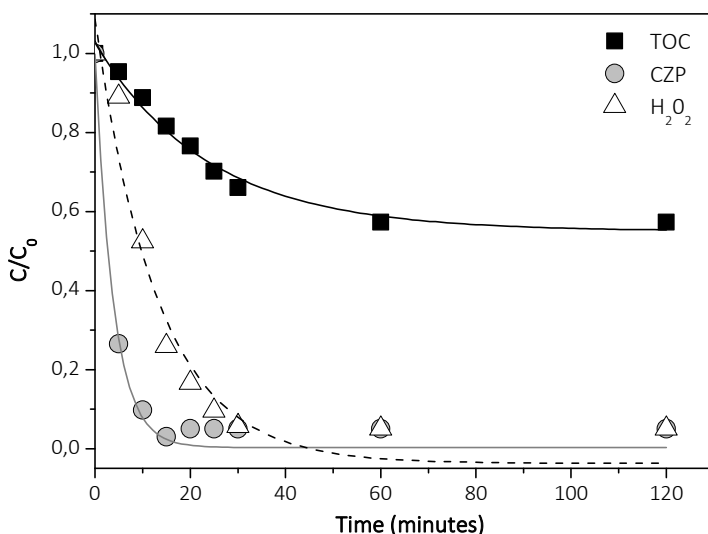


Figure 28. Normalized concentration of TOC, CZP and H_2O_2 for a batch experiment for a batch experiment with powdered $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite at: $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7.5$, $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 700\text{ mg/L}$, $[\text{catalyst}] = 0.6\text{ g/L}$, stirring = 700 rpm and a solution of $[\text{CZP}]_{\text{spiked}} = 15\text{ mg/L}$ in ultrapure water

Table 12. Metal leaching of catalytic tests performed at different temperatures and initial pH values using $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$. Values in brackets correspond to percentage of metal lost from the solid catalyst

pH	T ^a (°C)	Final leaching concentration (mg/L)		
		La	Cu	Mn
7,5	70	< 0.2 (0.06 %)	0.37 ± 0.06 (0.5 %)	< 0.2 (0.3 %)
	50	< 0.2 (0.06 %)	0.48 ± 0.07 (0.6 %)	< 0.2 (0.3 %)
	30	< 0.2 (0.06 %)	0.67 ± 0.06 (0.9 %)	< 0.2 (0.3 %)
5,5	70	0.60 ± 0.02 (0.2 %)	1.24 ± 0.90 (1.6 %)	1.39 ± 0.09 (2.1 %)
	50	1.10 ± 0.03 (0.3 %)	1.57 ± 0.91 (2 %)	3.66 ± 0.07 (5.5 %)
	30	0.97 ± 0.03 (0.3 %)	1.27 ± 0.90 (1.6 %)	1.11 ± 0.095 (1.7 %)
3	70	94 ± 1 (28 %)	19 ± 1 (25 %)	21 ± 1 (31 %)
	50	113 ± 3 (33 %)	22 ± 1 (28 %)	25 ± 1 (37 %)
	30	87 ± 1 (26 %)	18 ± 1 (23 %)	20 ± 1 (30 %)

The acidification of the initial pH of hospital wastewater up to 3 showed a significant increase of the conversion of hydrogen peroxide and the removal of CZP even at 30 °C (Figure 26 c and 26 d). Thus, a complete elimination of CZP was reached in less than 20 minutes at this temperature, being necessary less than 10 minutes at 50 and 70 °C. These results reveal a better efficiency of the oxidant, which is attributed to the higher oxidation potential of hydroxyl radicals at acid pH (2.7 V at pH 3 vs. 1.8 V at pH 7) (Babuponnusami et al., 2014). The TOC removal was also improved at this pH, achieving values of ca. 19, 31 and 36 % for 30, 50 at 70 °C, respectively. However, it must be noteworthy that the metal leaching of the perovskite catalyst dramatically increased with the acid pH, obtaining concentrations of La, Cu and Mn after reaction between 87-113, 18-22 and 20-25 mg/L, respectively (Table 12). Thus, the acidification of pH at 3 significantly affects the stability of the $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite material, limiting its application as Fenton-like catalyst.

Catalytic experiments at pH of 5.5 (Figure 26 e and 26 f) also revealed a good catalytic performance of $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite with remarkable conversions of hydrogen peroxide and removal rates of carbamazepine. CZP removals higher than 95 % were achieved in less than 10 minutes at 50 and 70 °C. At 30 °C, the removal of CZP was significantly higher than that obtained at the pH of 7.5, but still low with only 65 % of removal after 180 min of reaction. Thus, a minimum temperature of 50 °C seems to be recommendable for a fast CZP degradation. Regarding the catalyst stability, the metal concentration of La, Cu and Mn after reaction were in the range of 0.6-1.1, 1.2-1.3 and 1.2-3.7 mg/L, respectively (Table 12). These concentrations correspond to percentages of metal leaching lower than 6 % in all the cases. Moreover, it was observed that the catalyst stability is not significantly depended on

the reaction temperature in the studied interval (30 - 70 °C). These results of the metal leaching demonstrate a higher stability of the Cu on the solid catalyst as compared to that obtained by other copper-containing catalysts operating in analogous reaction conditions, making $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite a promising heterogeneous Fenton-like catalyst (Wen et al., 2014; Melero et al., 2006; Sotelo et al., 2004).

Summarizing, the performance of $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite in terms of the CZP removal progressively increased with the decrease of pH, but in detriment of catalyst stability. The better compromise between activity and stability is obtained at pH values and temperatures equal or higher than 5.5 and 50 °C, respectively. This pH is the minimum value in which the lixiviation of metallic species and consequently the loss of active phase is still negligible. At the same time, 50 °C was the minimum temperature required in order to obtain a desirable catalyst activity in terms of CZP removal, hydrogen peroxide consumption and TOC mineralization. At 50 °C and initial pH of 5.5, it was reached a total CZP removal in hardly 10 minutes and a TOC mineralization of ca. 22 % after 120 min. Moreover, these results are obtained using a catalyst loading (0.6 g/L) and hydrogen peroxide concentration (0.7 g/L), amounts that are much lower than those used in other works reported in literature for the elimination of CZP through homogeneous and heterogeneous Fenton processes. So, Sun et al. (2013 a) hardly achieved a 3 % removal of a 15 mg/L solution of CZP after 180 min of reaction, using 5 mg/L of a homogeneous Fe (III) catalyst at neutral pH, room temperature and 0.6 g/L of H_2O_2 . The use of a heterogeneous catalyst of Fe_3O_4 nanoparticles with a concentration of 1.84 g/L and 20 g/L of H_2O_2 achieved a CZP removal of 86 % at neutral pH and room temperature (Sun et al., 2013 b). However, a decrease of the catalyst loading and the oxidant concentration up to 1 g/L and 3.4 g/L, respectively, dramatically reduced the effectivity of the catalyst, leading to a removal of CZP of only 6 %. CuFeO_2 micro-particles achieved a 31 % removal of CZP in 60 minutes at room temperature and neutral pH but needing a H_2O_2 concentration and a catalyst loading of 7 g/L and 1 g/L respectively (Ding et al., 2016).

C) Catalytic performance of reticulated porous perovskite materials in continuous up-flow fixed bed reactor

The two reticulated porous perovskite materials RPP-1000 and RPP-1200 were tested in a catalytic fixed bed reactor for the treatment of the hospital wastewater spiked with 15 mg/L of CZP. These catalytic runs were performed at 70 °C, initial pH of 5.5, and stoichiometric dosage of hydrogen peroxide (700 mg/L) and residence time of 3 min. The RPP-1200 was less active than RPP-1000 with a H_2O_2 conversion and CZP removal of ca. 20 and 70 %, respectively. On the contrary, the

RPP-1000 achieved a total consumption of the oxidant and CZP removal higher than 90 %. The oxidant conversion and CZP removal of both experiments along the time on operation at steady-state conditions can be found in Figure 29. The lower catalytic performance of RPP-1200 material is attributed to the loss of the perovskite active phase and porosity when the material was calcined at 1200 °C for sintering of the reticulated porous material. On the other hand, it was very remarkable that both materials maintained their physical reticulated porous structure after 5 hours on operation. Moreover, the leaching of the metal containing in the perovskite catalyst was almost negligible.

In order to assess the influence of the temperature in continuous operation of the up-flow fixed bed reactor using the reticulated porous perovskite material RPP-1000, additional catalytic runs were carried out at 50 and 90 °C. These experiments were performed maintaining the acidification of the hospital wastewater up to 5.5, the stoichiometric amount of H₂O₂ (700 mg/L) and the residence time at 3 min. Figure 30 shows the hydrogen peroxide conversion and the CZP removal at steady-state conditions after 5 hours of continuous operation at 50, 70 and 90 °C. At 50 °C, 82 % of CZP was eliminated but not all the hydrogen peroxide was used (74 % of oxidant conversion). The increase of temperature up to 90 °C allows a total oxidant conversion with the increase of the CZP removal until 92 %. It must be noted that the stability of the reticulated porous perovskite material was not significantly affected by the increase of temperature, with concentrations of La, Cu and Mn in the outlet effluent ranging from 0.2-3.8 mg/L, 1.0-2.3 and 3.2-5.9, respectively. The overall metal leaching from the solid catalyst after 5 hours of operation was in all the cases lower than 8 %. These results indicate a high stability of the reticulated porous perovskite catalysts. Additionally, the initial H₂O₂ concentration was decreased from 700 to 350 mg/L at 70 °C in order to evaluate the performance of the RPP-1000 material at a lower oxidant dosage (Figure 30). It must be noted that the hydrogen peroxide is the most significant cost in Fenton operation process. The removal of carbamazepine significantly decreases at steady state (after 5 hours of operation) from 87 % to 40 %. Additional catalytic run in absence of hydrogen peroxide evidenced a negligible CZP removal (Figure 30). These results indicate the important role of the oxidant in the production of hydroxyl radicals and consequently the oxidation of carbamazepine (Bulánke et al., 2019). Thus, the catalytic performance is enhanced by the temperature and the catalyst was very stable even at 90 °C. The intermediate temperature of 70 °C allowed a remarkable CZP removal (ca. 87 %) with an almost total oxidant conversion (93 %). Moreover, the results of a non-catalytic run with only hydrogen peroxide proved the active role of the catalyst. The run performed in absence of catalyst (RPP-1000 replaced by equivalent volume of glassy spheres of 1

mm diameter) achieved only a 30 % of CZP removal by the potential oxidation of hydrogen peroxide (Figure 30).

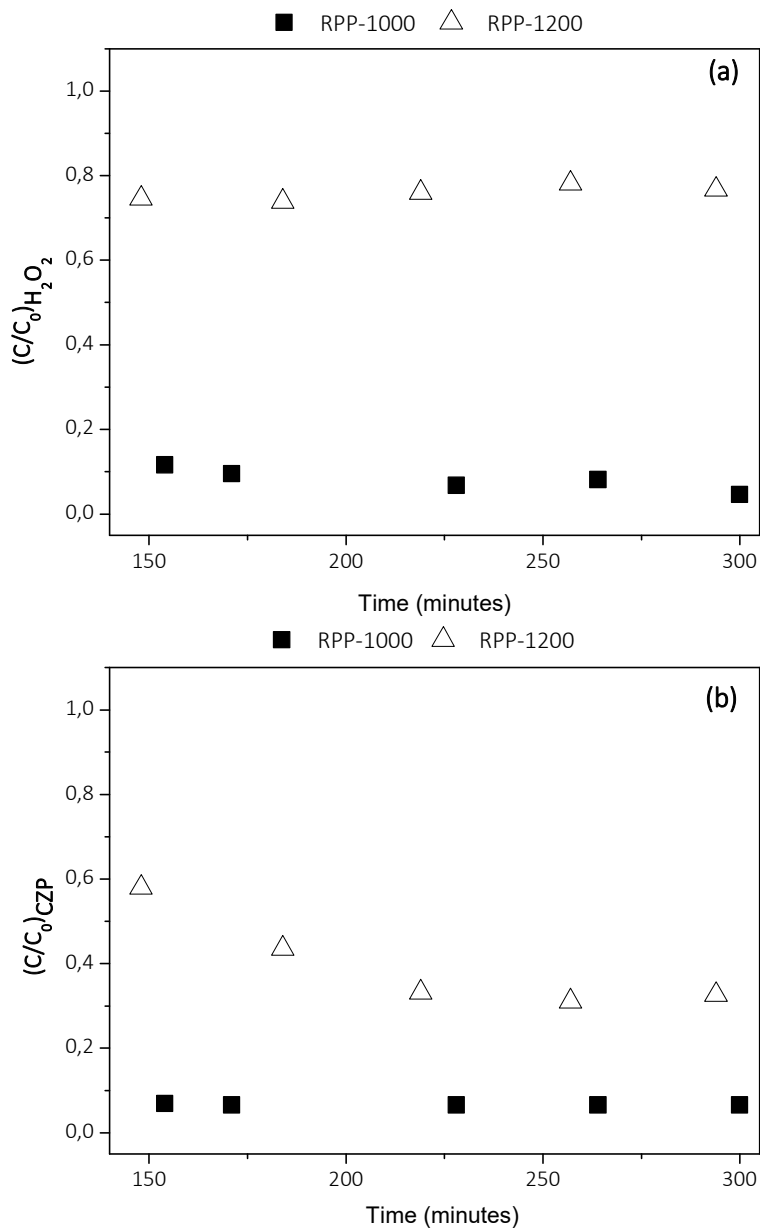


Figure 29. Normalized concentration of (a) H₂O₂ and (b) CZP for catalytic experiments of reticulated porous perovskite materials RPP-1000 and RPP-1200 in a catalytic fixed bed reactor. Operation conditions: T = 70 °C, pH = 5.5, [H₂O₂]₀ = 700 mg/L, [CZP]_{spiked} = 15 mg/L in hospital wastewater, flow rate = 1 mL/min (t_R = 3 min.)

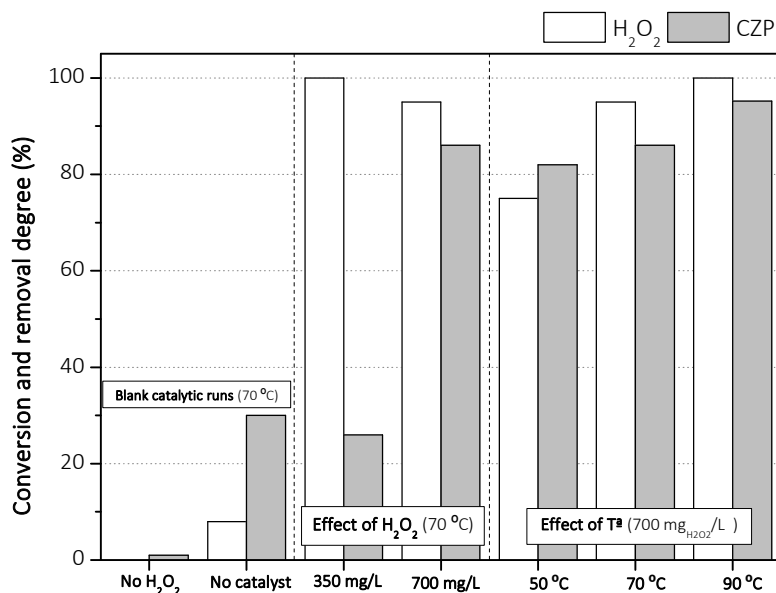


Figure 30. Influence of temperature and hydrogen peroxide dosage on the catalytic performance of reticulated porous perovskite material RPP-1000 in a catalytic fixed bed reactor. Operation conditions: hospital wastewater spiked with CZP (15 mg/L), acidification at pH of 5.5, residence time = 3 min

Few works have approached the study of continuous Fenton processes using heterogeneous catalytic systems for long periods of operation (Shao et al., 2018; Di Luca et al., 2018). Iron nanoparticles embedded within ordered mesoporous carbon catalyst (Fe-OMC) showed a phenol conversion above 90 %, although the efficiency decreased during 39 h of long-term evaluation (Shao et al., 2018). A highly dispersed Fe³⁺-Al₂O₃ catalyst (6 wt. % Fe) retained remarkable mineralization levels of phenol ($X_{\text{TOC}} > 70\%$) with a cumulative iron loss of ca. 20 % of the initial Fe loaded in an up-flow fixed bed reactor (UFBR) after 70 hours on operation (Di Luca et al., 2018). In this work, the catalytic performance of reticulated porous perovskite catalyst was tested for 70 hours at 70 °C, slight acid pH (5.5) and moderate hydrogen peroxide concentration (700 mg/L) in order to assess the feasibility of the catalyst for long-term continuous treatment of the hospital wastewater. Figure 31 shows the results of oxidant conversion and CZP removal along the time on operation. Interestingly, the CZP elimination increases up to complete removal after 10 h on operation accompanied with a total hydrogen peroxide conversion. Moreover, the reticulated porous perovskite material keeps constant a total CZP removal and hydrogen peroxide conversion and maintains its mechanical integrity up to 70 h on operation.

The TOC reduction was of hardly 10 % at steady-state conditions, as consequence of the refractory behaviour of the complex hospital wastewater matrix. Therefore, this catalytic system is proposed as an alternative on-site pre-treatment for the removal of pharmaceutical micropollutants, prior to discharge of the hospital wastewater into the sewer system for final depuration of the water in a conventional WWTPs. These results make this reticulated porous perovskite catalyst a promising catalyst to be applied in continuous Fenton processes based on fixed bed reactors, in this case for the removal of pharmaceutical micropollutants in hospital wastewater.

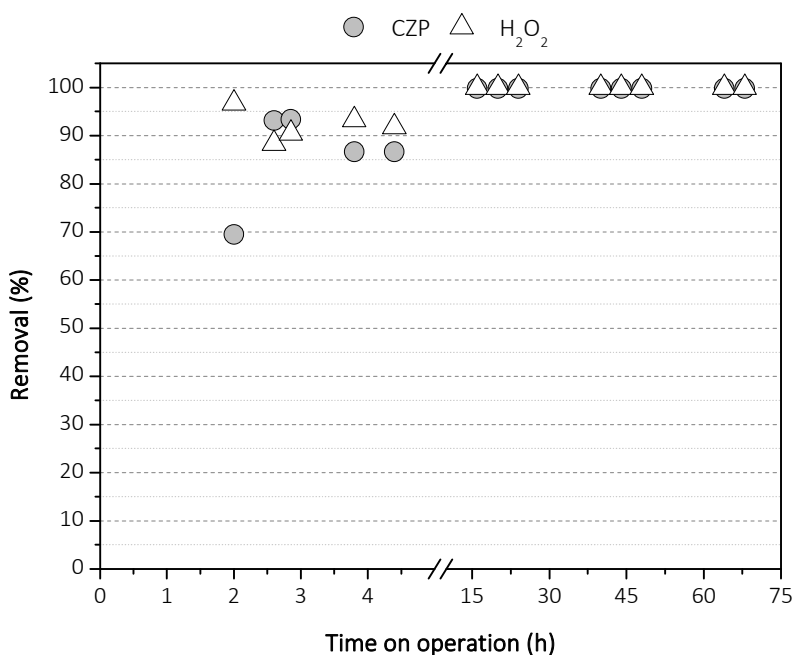


Figure 31. Long term catalytic run of reticulated porous perovskite material RPP-1000 in a catalytic fixed bed reactor. Operation conditions: hospital wastewater spiked with CZP (15 mg/L), acidification at pH of 5.5, 70 °C, [H₂O₂] = 700 mg/L and residence time = 3 min.

D) Catalytic performance of reticulated porous perovskite material for the removal of emerging pharmaceutical micropollutants of hospital wastewater

The removal of the pharmaceutical micropollutants contained in the hospital wastewater at their original concentration was evaluated. In this case, additional carbamazepine was not spiked in the hospital wastewater. Figure 32 shows the concentration of the pharmaceutical micropollutants before and after the treatment and the removal efficiency using the reticulated porous perovskite material RPP-1000 in the fixed bed reactor. Seventeen pharmaceutical micropollutants were detected in

the hospital wastewater. Like the results reported previously (Table 10 and 11), antipyrine (4-AAA), amoxicillin (AMZ), caffeine (CFN), azithromycin (AZM), cyclophosphamide (CPD), iohexol (IHX) and sulpiride (SPD) were the most abundant compounds with concentrations ranging from 10 to 390 µg/L. These drugs are commonly used in hospitals as analgesic/anti-inflammatory, antibiotic, stimulating, antineoplastic, X-ray agent and psychiatric drugs. Gemfibrozil (GFZ), ibuprofen (IBU), ranitidine (RNT) and sulfamethoxazole (SMX) as lipid regulator, anti-inflammatory, antagonist receptor and antibiotic, respectively, were found in concentrations from 1 to 10 µg/L. The rest of compounds including carbamazepine (CZP), diclofenac (DCF), hydrochlorothiazide (HCT), metoprolol (MTP), metronidazole (MDZ) and progesterone (PGT), were detected in much lower concentrations (< 0.5 µg/L). The presence and concentrations of these pharmaceutical micropollutants in the hospital wastewater are in accordance to the typical characterization of these effluents with analgesics, antibiotics and contrast agents as some of the main contributing therapeutic groups (Santos et al., 2013).

The catalyst was extremely efficient for the removal of 9 micropollutants with concentrations after treatment below the detection limits. All the most abundant compounds (CFN, CPD, AZM, IHX, SPD, AMX and AAA) were eliminated with efficiencies above 95 % and 90 % for the case of HCT. Only two compounds detected at very low concentrations such as metoprolol (MTP, 0.42 ± 0.45 µg/L) and carbamazepine (CZP, 0.13 ± 0.01 µg/L) showed lower removal degrees. The low removal efficiency of these two micropollutants can be due to the lower efficiency of hydroxyl radicals for oxidizing more diluted concentration. Moreover, very low concentrations are more susceptible to sampling and analytical error (Collado et al., 2014). Nevertheless, it must be noted that the remaining CZP and MTP concentrations (ca. 0.09 µg/L and 0.13 µg/L, respectively) are quite lower than their predicted non-effect concentration (PNEC) (2.5 µg/L and 7.9 µg/L, for CZP and MTP). It also occurs for the remaining pharmaceutical compounds concentrations in the treated hospital wastewater, demonstrating that the risk for aquatic organisms can be ruled out after this Fenton heterogeneous treatment.

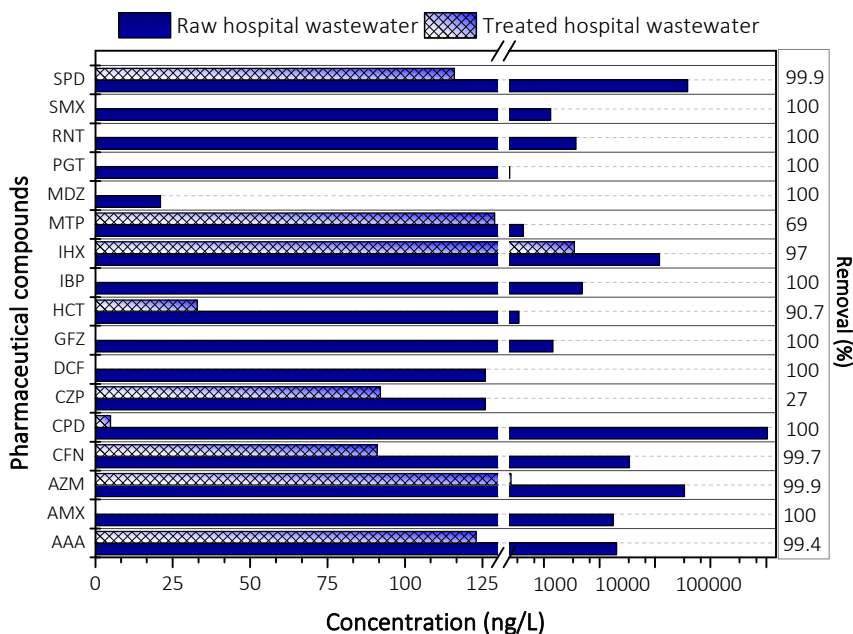


Figure 32. Concentration of pharmaceutical micropollutants in the raw and treated hospital wastewater after the Fenton treatment in the FBR and removal efficiencies achieving for each pharmaceutical compound. Reaction conditions: T = 70 °C, pH = 5.5, [H₂O₂]₀ = 700 mg/L, LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O₃-RPP = 3 g and flow rate = 1 mL/min (t_R = 3 min)

Powdered LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O₃ perovskite was successfully immobilized on a reticulated porous structure by double impregnation and calcination at 1000 °C, achieving a high mechanical resistance and non-alteration of its characteristic ABO₃ lattice.

The activity and stability of LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O₃ perovskite as heterogeneous Fenton-like catalyst was tested for the removal of carbamazepine spiked in a hospital wastewater matrix as model pollutant. The powdered LaCu_{0.5}Mn_{0.5}O₃ perovskite showed a complete CZP removal (120 minutes) and low values of metal leaching (< 1 mg/L) at the natural pH of the wastewater (7.5) and 70 °C. At pH of 3, the stability of the perovskite dramatically decreased. The acidification until pH of 5.5 allows a complete CZP removal in 20 minutes with a remarkable enhancement of the stability.

The reticulated porous perovskite catalyst has achieved a complete removal of CZP at steady-state conditions in an up-flow fixed bed reactor for the continuous treatment of a wastewater fortified with CZP at weak acid pH (5.5), 70 °C and moderate

dosage of hydrogen peroxide (700 mg/L). This catalyst maintained its mechanical integrity and catalytic activity for 70 hours on operation.

Likewise, the most abundant compounds (CFN, CPD, AZM, IHX, SPD, AMX and 4-AAA) of the hospital wastewater at the real concentrations of $\mu\text{g/L}$ were eliminated with high efficiencies between 95 and 100 %. Only some compounds detected at the lowest concentrations ($< 1 \mu\text{g/L}$) showed lower removal degrees. The catalytic activity and the low leaching of the reticulated porous $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite for operation at weak acid pH makes this material a promising catalyst for application in Fenton-like processes using up-flow fixed bed reactors.

5. CONCLUSIONS

The main conclusions of this work are classified according to the different nature of the wastewater (urban or hospital streams) and application (centralized or decentralized pre-treatment) as follows:

1. The continuous treatment of the simulated and real urban wastewater in RBCs-systems showed a good performance in terms of TOC (78 and 85 %, respectively), N-NH_4^+ (71 and 58 %, respectively), P-PO_4^{3-} (73 and 70 %, respectively) and pharmaceutical compounds removal with 1 day of HRT. In terms of pharmaceuticals in the real urban wastewater, 12 of the studied 13 studied compounds were eliminated with removal efficiencies ranging from 50 to 95 %. The biomass was kept stable and active during the whole treatments despite working under non-sterile conditions and without supplementary biodegradable substrates.

2. The addition of advanced bio-oxidation mediators (lignin-derived mediator and metal complexes with redox activity) enhanced the performance of fungal biological treatment for the removal of pharmaceutical micropollutants due to intensify the hydroxyl radical production. The reduction of HRT from 1-day to 12 hours reduced significantly the efficiency of the treatment mainly in terms of pharmaceuticals removal. The COT: N-NH_4^+ of the wastewater are critical parameters for the proposed treatment with *T. versicolor*.

3. The biological system based on modified RBCs with wooden planks as natural support for the biomass showed a remarkable efficiency for the treatment of hospital wastewater effluents, in terms of organic matter and pharmaceutical micropollutants.

The results obtained for the qPCR and metagenomics analyses in the biofilm of modified wooden-RBCs after treatment of hospital wastewater demonstrated that

the diversity of bacteria and fungi communities evolve to obtain a stable biomass typically found in the decaying of natural wood. This complex biomass, mixture of bacterial and fungal communities can degrade complex organic molecules, and consequently is highly active for the treatment of the hospital wastewater and the removal of the pharmaceutical residues that contains.

4. The results validate this technology as alternative biological treatment in WWTPs or on-site pre-treatment of hospital wastewater effluents before discharging in the sewer network. It can be established as a real alternative for the removal of pharmaceutical micropollutants from real urban and hospital wastewater, overcoming the drawbacks associated to fungal wastewater treatments.

5. Finally, powdered $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite was successfully immobilized on a reticulated porous structure by double impregnation and calcination at 1000 °C. The activity and stability of $\text{LaCu}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite as heterogeneous Fenton-like catalyst was demonstrated for the removal of carbamazepine spiked in a complex hospital wastewater matrix as model pollutant. The optimum compromise between activity and stability is obtained at pH values and temperatures equal or higher than 5.5 and 50 °C, respectively. The reticulated porous perovskite catalyst has achieved a complete removal of CZP at steady-state for 70 hours on operation in an up-flow fixed bed reactor for the continuous treatment of the wastewater fortified with CZP at weak acid pH (5.5), 70 °C and moderate dosage of hydrogen peroxide (700 mg/L). Likewise, the removal of the most abundant compounds (CFN, CPD, AZM, IHX, SPD, AMX and 4-AAA) of the hospital wastewater at the real concentrations were eliminated with efficiencies between 95 and 100 %.

6. REFERENCES

- Al Aukidy, M., Verlicchi, P., Jelic, A., Petrovic, M., Barcelò, D. (2012). Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Science of the Total Environment*, 438, 15–25. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2012.08.061>
- Afonso-Olivares, C., Čadková, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., Nováková, L. (2017). Simplified solid-phase extraction procedure combined with liquid chromatography tandem–mass spectrometry for multiresidue assessment of pharmaceutical compounds in environmental liquid samples. *Journal Chromatographical*, 1487,54–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.059>

-
- APHA: American Public Health Association. E. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edited by Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., Eaton, A. D. 20th Edition. ISBN: 0875532357.
- Araya-Cloutier, C., Den Besten, H. M. W., Aisyah, S., Gruppen, H., Vincken, J.P. (2017). The position of prenylation of isoflavonoids and stilbenoids from legumes (*Fabaceae*) modulates the antimicrobial activity against Gram positive pathogens. *Food Chemistry*, 226, 193–201. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.01.026>
- Babuponnusami, A, Muthukumar, K. (2014). A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2 (1), 557–572. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2013.10.011>
- Backa, S., Gierer, J., Reitberger, T., Nilsson, T. (1993). Hydroxyl Radical Activity Associated with the Growth of White-Rot Fungi. *International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*. *Holzforschung* 47(3):181-187. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1993.47.3.181>
- Badia-Fabregat, M., Lucas, D., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Caminal, G., Vicent, T. (2015). Identification of some factors affecting pharmaceutical active compounds (PhACs) removal in real wastewater. Case study of fungal treatment of reverse osmosis concentrate. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.007>
- Badia-Fabregat, M., Lucas, D., Pereira, M. A., Alves, M., Pennanen, T., Fritze, H., Caminal, G. (2016). Continuous fungal treatment of non-sterile veterinary hospital effluent: pharmaceuticals removal and microbial community assessment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (5), 2401–2415. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7105-0>
- Badia-Fabregat, M., Lucas, D., Tuomivirta, T., Fritze, H., Pennanen, T., Rodríguez-Mozaz, S., Vicent, T. (2017). Study of the effect of the bacterial and fungal communities present in real wastewater effluents on the performance of fungal treatments. *Science of The Total Environment*, 579, 366–377. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.088>
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32 (1), 78–91. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00245-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00245-4)
- Bayramoğlu, G., Bektaş, S., Arica, M. Y. (2003). Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous*

-
- Materials, 101 (3), 285–300. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(03\)00178-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00178-X)Beier et al., 2011
- Beier, S., Cramer, C., Köster, S., Mauer, C., Palmowski, L., Schröder, H.F., Pinnekamp, J. (2011). Full scale membrane bioreactor treatment of hospital wastewater as forerunner for hot-spot wastewater treatment solutions in high density urban areas. *Water Science and Technology*, 63, 66–71. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.010>.
- Bello, M. M., Abdul Raman, A. A., Asghar, A. (2019). A review on approaches for addressing the limitations of Fenton oxidation for recalcitrant wastewater treatment. *Process Safety and Environmental Protection*, 126, 119–140. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2019.03.028>
- Blánquez, P., Sarrà, M., Vicent, T. (2006). Study of the cellular retention time and the partial biomass renovation in a fungal decolourisation continuous process. *Water research*, 40(8), 1650-6. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.02.010>
- Blánquez, P., Sarrà, M., Vicent, T., (2008 a). Development of a continuous process to adapt the textile wastewater treatment by fungi to industrial conditions. *Process Biochemistry*. 43, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2007.10.002>Borràs, E.,
- Blánquez, P., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T. (2008 b). *Trametes versicolor* pellets production: Low-cost medium and scale-up. *Biochemical Engineering Journal*, 42(1), 61–66. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2008.05.014>
- Boddy, L., 2000. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, 31, 185–194. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00683>
- Bokare, A. D., Choi, W. (2014). Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 275, 121–135. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.054>
- Bollmann, A. F., Seitz, W., Prasse, C., Lucke, T., Schulz, W., Ternes, T. (2016). Occurrence and fate of amisulpride, sulphiride, and lamotrigine in municipal wastewater treatment plants with biological treatment and ozonation. *Journal of Hazardous Materials*, 320, 204–215. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.08.022>
- Bulánek, R., Hardina, R., Hassan, A.F. (2019) Preparation of polyvinylpyrrolidone modified nanomagnetite for degradation of nicotine by heterogeneous Fenton process, *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 7, (2), 102988. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102988>.
-

- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7 (5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Carrasco-Díaz, M. R., Castillejos-López, E., Cerpa-Naranjo, A., Rojas-Cervantes, M. L. (2016). Efficient removal of paracetamol using $\text{LaCu}_{1-x}\text{M}_x\text{O}_3$ (M = Mn, Ti) perovskites as heterogeneous Fenton-like catalysts. *Chemical Engineering Journal*, 304, 408–418. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.06.054>
- Clausen, C.A. (1996). Bacterial associations with decaying wood: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 37, 101–107.
- Collado, S. Rodríguez-Mozaz, M. Gros, A. Rubirola, D. Barceló, J. Comas, I. Rodríguez-Roda, G. Buttiglieri. (2014). Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system, *Environmental Pollution* 185, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.040>
- Chemidlin Prevost-Boure, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougél, C., Lelievre, M., Jolivet, C., Ranjard, L. (2011). Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PloS One*, 6 (9), 24166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024166>
- Christofides, S.R., Hiscox, J., Savoury, M., Boddy, L., Weightman, A.J. (2019). Fungal control of early-stage bacterial community development in decomposing wood. *Fungal Ecol.* 42, 100868. <https://doi.org/10.1016/J.FUNECO.2019.100868>
- Christoforidis, K.C., Pariente, M.I., Martínez, F., Vasiliadou, I.A., Molina, R., Melero, J.A., (2018). Understanding the role of mediators in the efficiency of advanced oxidation processes using white-rot fungi. *Chemical Engineering Journal*. 359, 1427–1435. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.035>
- Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T., Sarrà, M. (2013). Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water Research*, 47 (14), 5200–5210. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.007>
- Cruz-Morató, C., Lucas, D., Llorca, M., Rodriguez-Mozaz, S., Gorga, M., Petrovic, M., Marco-Urrea, E. (2014). Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds. *Science of The Total Environment*, 493, 365–376.

<https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.117>

- Daniel, G., Volc, J., Kubatova, E. (1994). Pyranose Oxidase, a Major Source of H₂O₂ during Wood Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. *Applied Environmental Microbiology* 60, 2524–2532.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214 (6), 442–448. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2011.08.002>
- Deegan, A. M., Shaik, B., Nolan, K., Urell, K., Oelgemöller, M., Tobin, J., Morrissey, A. (2011). Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 8 (3), 649–666. <https://doi.org/10.1007/BF03326250>
- Di Luca, C., Massa, P., Grau, J. M., Marchetti, S. G., Fenoglio, R., Haure, P. (2018). Highly dispersed Fe³⁺-Al₂O₃ for the Fenton-like oxidation of phenol in a continuous up-flow fixed bed reactor. Enhancing catalyst stability through operating conditions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 237, 1110–1123. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2018.05.032>
- Ding, Y., Tang, H., Zhang, S., Wang, S., Tang, H. (2016). Efficient degradation of carbamazepine by easily recyclable microscaled CuFeO₂ mediated heterogeneous activation of peroxymonosulfate. *Journal of Hazardous Materials*, 317 (5), 686-694. <http://doi:10.1016/j.jhazmat.2016.06.004>.
- Ekpeghere, K.I., Sim, W.J., Lee, H.J. (2018). Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 640-641, 1015-1023. <http://doi:10.1016/j.scitotenv.2018.05.218>
- El-Ogri, F., Ouazzani, N., Boraâm, F., Mandi, L. (2016). A survey of wastewaters generated by a hospital in Marrakech city and their characterization. *Desalination and Water Treatment*, 57 (36), 17061–17074. <https://doi.org/10.1080/19443994.2016.1138328>
- Elgueta, S., Santos, C., Lima, N., Diez, M. C. (2016). Immobilization of the white-rot fungus *Anthracozyllum discolor* to degrade the herbicide atrazine. *AMB Express*, 6 (1), 104. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0275-z>
- Escher, B. I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., McArdell, C. S. (2011). Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Research*, 45 (1), 75–92.

<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.08.019>

- Espinosa-Ortiz, E. J., Rene, E. R., Pakshirajan, K., Van Hullebusch, E. D., Lens, P. N. L. (2016). Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives. *Chemical Engineering Journal*, 283, 553–571. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.068>
- European Parliament. (1991). Directiva 91/271/CEE del Consejo sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas (1991).
- European Parliament. (2015). Decisión de ejecución (UE) 2015/495 de la Comisión por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas (2015).
- European Parliament. (2018). Decisión de ejecución (UE) 2018/840 de la Comisión por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas.
- Fang, Q.H., Zhong, J.J. (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, 10 (1), 61–65. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00158-9)
- Ferrando-Climent, L., Cruz-Morató, C., Marco-Urrea, E., Vicent, T., Sarrà, M., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D. (2015). Non-conventional biological treatment based on *Trametes versicolor* for the elimination of recalcitrant anticancer drugs in hospital wastewater. *Chemosphere*, 136, 9–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.051>
- Fey, T., Betke, U., Rannabauer, S., Scheffler, M. (2017). Reticulated Replica Ceramic Foams: Processing, Functionalization, and Characterization. *Advanced Engineering Materials*, 19, 1700369. <https://doi:10.1002/adem.201700369>.
- Geisseler, D., Horwath, W. R., Joergensen, R. G., Ludwig, B. (2010). Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2058–2067. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2010.08.021>
- Guélou, E., Barrault, J., Fournier, J., Tatibouët, J.M. (2003). Active iron species in the catalytic wet peroxide oxidation of phenol over pillared clays containing iron, *Applied Catalysis B: Environmental*, 44 1–8. [https://doi:10.1016/S0926-3373\(03\)00003-1](https://doi:10.1016/S0926-3373(03)00003-1).
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V., Chaminda G.G, T., Kyoungjin An, A., Kumar, M. (2018). Occurrence and Fate of Emerging Contaminants in Water Environment: A

-
- Review. *Groundwater for Sustainable Development* 6, 169-180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>
- Gómez-Toribio, V., García-Martín, A.B., Martínez, M.J., Martínez, Á. T., Guillén, F. (2009). Enhancing the Production of Hydroxyl Radicals by *Pleurotus eryngii* via Quinone Redox Cycling for Pollutant Removal. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (12), 3954–3962. <https://doi.org/10.1128/AEM.02138-08>
- Grandclément, C., Seyssiecq, I., Piram, A., Wong-Wah-Chung, P., Vanot, G., Tiliacos, N., Doumenq, P. (2017). From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. *Water Research*, 111, 297–317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.005>
- Hai, F.I., Yamamoto, K., Nakajima, F., Fukushi, K. (2009). Factors governing performance of continuous fungal reactor during non-sterile operation – The case of a membrane bioreactor treating textile wastewater. *Chemosphere* 74, 810–817. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2008.10.025>
- Hai, F.I., Yamamoto, K., Nakajima, F., Fukushi, K., Nghiem, L.D., Price, W.E., Jin, B., (2013). Degradation of azo dye acid orange 7 in a membrane bioreactor by pellets and attached growth of *Coriolus versicolour*. *Bioresource Technology* 141, 29–34. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.02.020>
- Han, J. L., Ng, I.S., Wang, Y., Zheng, X., Chen, W.M., Hsueh, C.C., Chen, B.Y. (2012). Exploring new strains of dye-decolorizing bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113 (4), 508–514. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2011.11.014>
- Han-Tran, N. H., Gin, K. Y.H. (2017). Occurrence and removal of pharmaceuticals, hormones, personal care products, and endocrine disrupters in a full-scale water reclamation plant. *Science of The Total Environment*, 599–600, 1503–1516. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.05.097>
- Hatakka, A., Hammel, K.E. (2011). Fungal Biodegradation of Lignocelluloses BT - Industrial Applications. Hofrichter, M. (Ed.) Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 319–340. https://doi.org/10.1007/978-3-642-11458-8_15
- Haugen, H., Will, J., Köhler, A., Hopfner, U., Aigner, J., Wintermantel, E. (2004). Ceramic TiO₂-foams: characterisation of a potential scaffold, *Journal of the European Ceramic Society*, 24 (2004) 661–668. Doi: 10.1016/S0955-2219(03)00255-3.
- Heeger, F., Wurzbacher, C., Bourne, E.C., Mazzoni, C.J., Monaghan, M.T. (2019). Combining the 58S and ITS2 to improve classification of fungi. *Methods in*
-

-
- Ecology and Evolution, 10, 1702–1711. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13266>
- Hodge, A., Robinson, D., Fitter, A. (2000). Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends in Plant Science*, 5 (7), 304–308. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01656-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01656-3)
- Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Cespedes-Sánchez, R., Ventura, F., Petrovic, M., Barcelo, D. (2011). Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research*, 45 (3), 1165–1176. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.11.010>
- Jelic, A., Cruz-Morató, C., Marco-Urrea, E., Sarrà, M., Perez, S., Vicent, T., Barcelo, D. (2012). Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *Water Research*, 46(4),955–964. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.063>
- Josset, S., Hajiesmaili, S., Begin, D., Edouard, D., Pham-Huu, C., Lett, M.C., Keller, N., Keller, V. (2010). UV-A photocatalytic treatment of *Legionella pneumophila* bacteria contaminated airflows through three-dimensional solid foam structured photocatalytic reactors, *Journal Hazardous Materials*, 175, 372–381. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.10.013>.
- Kantar, C., Oral, O., Oz, N.A. (2019). Ligand enhanced pharmaceutical wastewater treatment with Fenton process using pyrite as the catalyst: Column experiments. *Chemosphere*, 237, 124440. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.124440>.
- Kay, P., Hughes, S. R., Ault, J. R., Ashcroft, A. E., Brown, L. E. (2017). Widespread, routine occurrence of pharmaceuticals in sewage effluent, combined sewer overflows and receiving waters. *Environmental Pollution*, 220, 1447–1455. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2016.10.087>
- Kajitvichyanukul, P., Suntronvipart, N. (2006). Evaluation of biodegradability and oxidation degree of hospital wastewater using photo-Fenton process as the pre-treatment method, *Journal Hazardous Materials*, 138, 384–391. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2006.05.064>.
- Kielak, A.M., Scheublin, T.R., Mendes, L.W., van Veen, J.A., Kuramae, E.E. (2016). Bacterial Community Succession in Pine-Wood Decomposition. *Frontiers in Microbiology*, 7, 231. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00231>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical

- and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Reserach*, 41 (1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Kocakuşakoğlu, A., Dağlar, M., Konyar, M., Yatmaz, H.C., Oztürk, K. (2015) Photocatalytic activity of reticulated ZnO porous ceramics in degradation of azo dye molecules, *Journal of the European Ceramic Society*, 35, 2845–2853. <https://doi:10.1016/J.JEURCERAMSOC.2015.03.042>.
- Krueger, M. C., Bergmann, M. & Schlosser, D. (2016). Widespread ability of fungi to drive quinone redox cycling for biodegradation. *FEMS Microbiology Letters*, 363 (11). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw105>
- Kumar, A., Rana, A., Sharma, G., Naushad, M., Dhiman, P., Kumari, A., Stadler, F.J. (2019) Recent advances in nano-Fenton catalytic degradation of emerging pharmaceutical contaminants. *Journal of Molecular Liquids*, 290, 111177. <https://doi:10.1016/J.MOLLIQ.2019.111177>.
- Kümmerer, K. (2001). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*, 45 (6–7), 957–969. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00144-8)
- Lee, Y., Park, C., Lee, B., Han, E.J., Kim, T.H., Lee, J., Kim, S. (2006). Effect of nutrients on the production of extracellular enzymes for decolorization of reactive blue 19 and reactive black 5. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 226–231.
- Li, X., Xu, J., de Toledo, R. A., Shim, H. (2015). Enhanced removal of naproxen and carbamazepine from wastewater using a novel counter current seepage bioreactor immobilized with *Phanerochaete chrysosporium* under non-sterile conditions. *Bioresource Technology*, 197, 465–474. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.08.118>
- Li, X., Xu, J., de Toledo, R. A., & Shim, H. (2016). Enhanced carbamazepine removal by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a novel rotating suspension cartridge reactor under non-sterile condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 115, 102–109. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2016.08.003>
- Liang, H., Gao, D.W., Zeng, Y.G. (2012). Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on different carriers. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35, 1179–1184. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0704-6>
- Leonhardt, S., Büttner, E., Gebauer, A.M., Hofrichter, M., Kellner, H. (2018). Draft Genome Sequence of the *Sordariomycete Lecythophora (Coniochaeta)*

- hoffmannii*. Genome Announcements 6, 01510-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01510-17>
- Lilly, W.W., Wallweber, G.J., Higgins, S.M. (1991). Proteolysis and amino acid recycling during nitrogen deprivation in *Schizophyllum commune*. Current Microbiology, 23, 27–32. <https://doi.org/10.1007/BF02092305>
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. Chemosphere, 74 (6), 765–772. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.040>
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G., Vicent, T. (2010 a). Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. Journal of Hazardous Materials, 176(1), 836–842. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.112>
- Marco-Urrea, E., Radjenović, J., Caminal, G., Petrović, M., Vicent, T., Barceló, D. (2010 b). Oxidation of atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibric acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Water Research, 44 (2), 521–532. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.049>
- Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. Journal of Hazardous Materials, 239–240, 40–47. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2012.04.068>
- Markakis, E.A., Kavroulakis, N., Ntougias, S., Koubouris, G.C., Sergentani, C.K., Ligoixakis, E.K. (2017). Characterization of Fungi Associated with Wood Decay of Tree Species and Grapevine in Greece. Plant Disease, 101, 1929–1940. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1761-RE>
- Martínez, F., Melero, J. A., Botas, J. Á., Pariente, M. I., & Molina, R. (2007). Treatment of Phenolic Effluents by Catalytic Wet Hydrogen Peroxide Oxidation over Fe₂O₃/SBA-15 Extruded Catalyst in a Fixed-Bed Reactor. Industrial & Engineering Chemistry Research, 46 (13), 4396–4405. <https://doi.org/10.1021/ie070165h>
- Martínez, F., Molina, R., Rodríguez, I., Pariente, M.I., Segura, Y., Melero, J.A. (2018). Techno-economical assessment of coupling Fenton/biological processes for the treatment of a pharmaceutical wastewater. Journal of Environmental Chemical Engineering, 6 (1), 485-494. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.12.008>

- Marzluf, G. A. (1996). Regulation of Nitrogen Metabolism in Mycelial Fungi. *Biochemistry and Molecular Biology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 357–368. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10367-8_16
- Mawabo, I. K., Noumedem, J. A. K., Kuate, J. R., Kuete, V. (2015). Tetracycline improved the efficiency of other antimicrobials against Gram-negative multidrug-resistant bacteria. *Journal of Infection and Public Health*, 8 (3), 226–233. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2014.09.001>
- Melero, J. A., Calleja, G., Martínez, F., & Molina, R. (2006). Nanocomposite of crystalline Fe₂O₃ and CuO particles and mesostructured SBA-15 silica as an active catalyst for wet peroxide oxidation processes. *Catalysis Communications*, 7 (7), 478–483. <https://doi.org/10.1016/J.CATCOM.2006.01.008>
- Mendoza, A., Aceña, J., Pérez, S., López de Alda, M., Barceló, D., Gil, A., Valcárcel, Y. (2015). Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard. *Environmental Research*, 140, 225–241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.04.003>
- Mir-Tutusaus, J. A., Sarrà, M., & Caminal, G. (2016). Continuous treatment of non-sterile hospital wastewater by *Trametes versicolor*: How to increase fungal viability by means of operational strategies and pre-treatments. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 561–570. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.07.036>
- Mir-Tutusaus, J. A., Parladé, E., Llorca, M., Villagrasa, M., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., Sarrà, M. (2017). Pharmaceuticals removal and microbial community assessment in a continuous fungal treatment of non-sterile real hospital wastewater after a coagulation-flocculation pretreatment. *Water Research*, 116, 65–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.005>
- Mir-Tutusaus, J. A., Baccar, R., Caminal, G., Sarrà, M. (2018). Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. *Water Research*, 138, 137–151. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2018.02.056>
- Mirzaei, A., Chen, Z., Haghghat, F., Yerushalmi, L. (2017). Removal of pharmaceuticals from water by homo/heterogonous Fenton-type processes – A review, *Chemosphere*, 174, 665–688. <https://doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.02.019>.
- Muñoz, M., De Pedro, Z.M., Menendez, N., Casas, J.A., Rodríguez, J.J. (2013). A ferromagnetic γ -alumina-supported iron catalyst for CWPO. Application to chlorophenols, *Applied Catalysis B: Environmental*, 136–137, 218–224.

<https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2013.02.002>.

- Muñoz, M., García-Muñoz, P., Pliego, G., Pedro, Z. M. de, Zazo, J. A., Casas, J. A., Rodríguez, J. J. (2016). Application of intensified Fenton oxidation to the treatment of hospital wastewater: Kinetics, ecotoxicity and disinfection. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4 (Part A), 4107–4112. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2016.09.019>
- Nie, Y., Zhang, L., Li, Y.Y, Hu, C. (2015). Enhanced Fenton-like degradation of refractory organic compounds by surface complex formation of LaFeO₃ and H₂O₂. *Journal of Hazardous Materials*, 294, 195–200. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.03.065>.
- Nguyen, L. N., Hai, F. I., Yang, S., Kang, J., Leusch, F. D. L., Roddick, F., Nghiem, L. D. (2013). Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 148, 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.142>
- Olicón-Hernández, D. R., González-López, J., Aranda, E. (2017). Overview on the Biochemical Potential of Filamentous Fungi to Degrade Pharmaceutical Compounds. *Frontiers in Microbiology*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01792>
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., Colpaert, J. V. (2014). Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS One* 9, 97629–97629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629>
- Oral, O., Kantar C. (2019). Diclofenac removal by pyrite-Fenton process: Performance in batch and fixed-bed continuous flow systems, *Science of the Total Environment*, 66, 817-823. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.084>.
- Ovejero, G., Sotelo, J.L., Martínez, F., Gordo, L. (2001). Novel heterogeneous catalysts in the wet peroxide oxidation of phenol. *Water Science and Technology*, 44, 153–160. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0275>.
- Palli, L., Castellet-Rovira, F., Pérez-Trujillo, M., Caniani, D., Sarrà-Adroguer, M., Gori, R. (2017). Preliminary evaluation of *Pleurotus ostreatus* for the removal of selected pharmaceuticals from hospital wastewater. *Biotechnology Progress*, 33 (6), 1529–1537. <https://doi.org/10.1002/btpr.2520>
- Pariente, M. I., Siles, J. A., Molina, R., Botas, J. A., Melero, J. A., Martínez, F. (2013). Treatment of an agrochemical wastewater by integration of heterogeneous catalytic wet hydrogen peroxide oxidation and rotating biological contactors.

-
- Chemical Engineering Journal, 226, 409–415.
<http://doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.081>
- Pariante, M.I., Molina, R., Melero, J.A., Botas, J.Á., Martínez, F. (2015). Intensified-Fenton process for the treatment of phenol aqueous solutions. *Water Science and Technology*, 71(3), 359-65. <http://doi:10.2166/wst.2014.515>.
- Paustian, K., Schnürer, J. (1987). Fungal growth response to carbon and nitrogen limitation: A theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 613–620. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90107-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90107-6)
- Pauwels, B., Verstraete, W. (2006). The treatment of hospital wastewater: an appraisal. *Journal of Water and Health*, 4 (4), 405–416. <https://doi.org/10.2166/wh.2006.0024>
- Peña, M.A., Fierro, J.L.G. (2001). Chemical Structures and Performance of Perovskite Oxides, *Chemical Reviews*, 101, 1981–2018. <https://doi:10.1021/cr980129f>
- Plesch, G., Vargová, M., Vogt, U.F., Gorbár, M., Jesenák, K. (2012). Zr doped anatase supported reticulated ceramic foams for photocatalytic water purification. *Materials Research Bulletin* 47, 1680–1686. <https://doi:10.1016/J.MATERRESBULL.2012.03.057>
- Qian, X., Ren, M., Fang, M., Kan, M., Yue, D., Bian, Z., Li, H., Jia, J., Zhao, Y. (2018). Hydrophilic mesoporous carbon as iron (III)/ (II) electron shuttle for visible light enhanced Fenton-like degradation of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, 231, 108–114. <https://doi:10.1016/J.APCATB.2018.03.016>.
- Ravindran, A., Adav, S.S., Sze, S.K. (2012). Characterization of extracellular lignocellulolytic enzymes of *Coniochaeta sp.* during corn Stover bioconversion. *Process Biochemistry*, 47, 2440–2448. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2012.10.003>
- Rodarte-Morales, A.I., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M. (2012). Operation of stirred tank reactors (STRs) and fixed-bed reactors (FBRs) with free and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* for the continuous removal of pharmaceutical compounds. *Biochemical Engineering Journal* 66, 38–45. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2012.04.011>
- Rodriguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323, 361–380. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.106>
- Rodriguez-Garcia, G., Molinos-Senante, M., Hospido, A., Hernández-Sancho, F., Moreira,

- M. T., Feijoo, G. (2011). Environmental and economic profile of six typologies of wastewater treatment plants. *Water Research*, 45 (18), 5997–6010. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.08.053>
- Rodríguez-Rodríguez, C.E., Marco-Urrea, E., Caminal, G., (2010). Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresource Technology*. 101, 2259–2266. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.11.089>
- Romillac, N. (2019). Ammonification. *Encyclopedia of Ecology*, 256–263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10889-9>
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J. A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M. J., Rodríguez Fernández-Alba, A. R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, 44 (2), 578–588. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2009.07.004>
- Rousk, J., Bååth, E. (2007). Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios. *FEMS Microbiology Ecology*, 62 (3), 258–267. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00398.x>
- Rizzo, L., Malato, S., Antakyali, D., Beretsou, V. G., Đolić, M. B., Gernjak, W., Fatta-Kassinos, D. (2019). Consolidated vs new advanced treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater. *Science of The Total Environment*, 655, 986–1008. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.11.265>
- Rusevova, K., Köferstein, R., Rosell, M., Richnow, H. H., Kopinke, F.D., Georgi, A. (2014). LaFeO₃ and BiFeO₃ perovskites as nanocatalysts for contaminant degradation in heterogeneous Fenton-like reactions. *Chemical Engineering Journal*, 239, 322–331. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.11.025>
- Santos, L. H. M. L. M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., Montenegro, M. C. B. S. M. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of The Total Environment*, 461–462, 302–316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077>
- Shao, Y., Chen, H. (2018). Heterogeneous Fenton oxidation of phenol in fixed-bed reactor using Fe nanoparticles embedded within ordered mesoporous carbons. *Chemical Engineering Research and Design*, 132, 57–68. <https://doi.org/10.1016/J.CHERD.2017.12.039>

- Shin, M., Nguyen, T., Ramsay, J. (2002). Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60 (1), 218–223. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1088-3>
- Sinha, J., Bae, J., Park, J., Kim, K., Song, C., Yun, J. (2001 a). Changes in morphology of *Paecilomyces japonica* and their effect on broth rheology during production of exo-biopolymers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1), 88–92. <https://doi.org/10.1007/s002530100606>
- Sinha, J., Tae Bae, J., Pil Park, J., Hyun Song, C., Won Yun, J. (2001 b). Effect of substrate concentration on broth rheology and fungal morphology during exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica* in a batch bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 29 (6–7), 392–399. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00418-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00418-5) Soongprasit et al., 2012
- Soongprasit, K., Aht-Ong, D., Sricharoenchaikul, V., Atong, D. (2012). Synthesis and catalytic activity of sol-gel derived La-Ce-Ni perovskite mixed oxide on steam reforming of toluene. *Current Applied Physics*, 12 (2), S80–88.. <https://doi:10.1016/j.cap.2012.02.025>.
- Sotelo, J., Ovejero, G., Martínez, F., Melero, J., Milieni, A. (2004). Catalytic wet peroxide oxidation of phenolic solutions over a $\text{LaTi}_{1-x}\text{Cu}_x\text{O}_3$ perovskite catalyst. *Applied Catalysis B: Environmental*, 47 (4), 281–294. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2003.09.007>
- Spina, F., Varese, G.C., Vincenzi, M., Aragno, M., Arcangeli, G., Mucci, N., Santianni, D., Caffaz, S., Gori, R. (2019). Occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater treatment plants of Tuscany: An effect-based approach to evaluate the potential environmental impact. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 222, 717–725. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2019.05.006>
- Sun, S.P., Zeng, X., Lemley, A. T. (2013 a). Kinetics and mechanism of carbamazepine degradation by a modified Fenton-like reaction with ferric-nitritotriacetate complexes. *Journal of Hazardous Materials*, 252–253, 155–165. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2013.02.045>
- Sun, S.P., Zeng, X., Lemley, A. T. (2013 b). Nano-magnetite catalysed heterogeneous Fenton-like degradation of emerging contaminants carbamazepine and ibuprofen in aqueous suspensions and montmorillonite clay slurries at neutral pH. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 371, 94–103. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATA.2013.01.027>

- Tavares, A. P. A., Agapito, M. S. M., Coelho, M. A. M., da Silva, J. A., Barros-Timmons, A., Coutinho, J. A. J., Xavier, A. M. R. B. (2005). Selection and Optimization of Culture Medium for Exopolysaccharide Production by *Coriolus (Trametes) Versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (8), 1499–1507. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-7370-7>
- Taheran, M., Naghdi, M., Brar, S. K., Verma, M., Surampalli, R. Y. (2018). Emerging contaminants: Here today, there tomorrow! *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 10, 122–126. <https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2018.05.010>
- Tchobanoglous, G., Burton, F., y Stensel, H. D. (2003). *Wastewater engineering: Treatment and reuse*. McGraw-Hill Series in Civil and Environmental Engineering. ISBN: 0070418780
- Thiebault, T., Boussafir, M., Le Milbeau, C. (2017). Occurrence and removal efficiency of pharmaceuticals in an urban wastewater treatment plant: Mass balance, fate and consumption assessment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(3), 2894–2902. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2017.05.039>
- Tisa, F., Abdul Raman, A.A, Wan Daud, W.M.A. (2014). Applicability of fluidized bed reactor in recalcitrant compound degradation through advanced oxidation processes: A review. *Journal of Environmental Management*, 146, 260–275. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2014.07.032>.
- Torán, J., Blánquez, P., Caminal, G. (2017). Comparison between several reactors with *Trametes versicolor* immobilized on lignocellulosic support for the continuous treatments of hospital wastewater. *Bioresource Technology*, 243, 966–974. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.07.055>
- Tyler, G. (1982). Metal accumulation by wood-decaying fungi. *Chemosphere* 11, 1141–1146. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(82\)90124-2](https://doi.org/10.1016/0045-6535(82)90124-2)
- Vasiliadou, I. A., Sánchez-Vázquez, R., Molina, R., Martínez, F., Melero, J. A., Bautista, L. F., Morales, G. (2016). Biological removal of pharmaceutical compounds using white-rot fungi with concomitant FAME production of the residual biomass. *Journal of Environmental Management*, 180, 228–237. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.035>
- Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D. (2010 a). Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*, 389 (3), 416–428. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jhydrol.2010.06.005>

- Verlicchi, P., Galletti, A., Masotti, L. (2010 b). Management of hospital wastewaters: the case of the effluent of a large hospital situated in a small town. *Water Science and Technology*, 61 (10), 2507–2519. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.138>
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D. (2012). Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of The Total Environment*, 430, 109–118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.055>
- Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D., Al Aukidy, M., Zambello, E. (2013). Removal of selected pharmaceuticals from domestic wastewater in an activated sludge system followed by a horizontal subsurface flow bed — Analysis of their respective contributions. *Science of The Total Environment*, 454, 411–425. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.044>
- Verlicchi, P., Barceló D., Kostianoy, A.G. (2018). *Hospital Wastewaters: Characteristics, Management, Treatment and Environmental Risks*. Volumen 60, Springer International Publishing, ISBN: 978-3-319-62177-7
- Vieno, N., Tuhkanen, T. & Kronberg, L. (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research*, 41 (5), 1001–1012. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2006.12.017>
- Watkinson, S., Bebber, D., Darrah, P., Fricker, M., Tlalka, M., & Boddy, L. (2006). The role of wood decay fungi in the carbon and nitrogen dynamics of the forest floor. *Fungi in Biogeochemical Cycles*, 151–181. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511550522.008>
- Wei, H. J., Cao, Y., Ji, W. J., & Au, C. T. (2008). Lattice oxygen of $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MO}_3$ (M = Mn, Ni) and $\text{LaMnO}_3-\alpha\text{F}\beta$ perovskite oxides for the partial oxidation of methane to synthesis gas. *Catalysis Communications*, 9(15), 2509–2514. <https://doi.org/10.1016/J.CATCOM.2008.06.019>
- Wen, G., Wang, S.J., Ma, J., Huang, T.L., Liu, Z.Q., Zhao, L., Xu, J.L. (2014). Oxidative degradation of organic pollutants in aqueous solution using zero valent copper under aerobic atmosphere condition. *Journal Hazardous Materials*, 275, 193-199. <https://doi:10.1016/j.jhazmat.2014.05.002>.
- Woo-Sik J., Seong-Yong C., Young-Bok Y., Soon-Ja S., Hee-Young Jung, M.J. K. (2010). Culture Conditions for Mycelial Growth of *Coriolus versicolor*. *Mycobiology*, 38(3), 195–202. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2010.38.3.195>
- Wilde, M. L., Schneider, M., Kümmerer, K. (2017). Fenton process on single and mixture components of phenothiazine pharmaceuticals: Assessment of intermediaries,

- fate, and preliminary ecotoxicity. *Science of the Total Environment*, 583, 36–52. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.12.184>.
- Yao, Y., Ochiai, T., Ishiguro, H., Nakano, R., Kubota, Y. (2011). Antibacterial performance of a novel photocatalytic-coated cordierite foam for use in air cleaners, *Applied Catalysis B: Environmental*, 106, 592–599. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2011.06.020>.
- Yang, S., Hai, F. I., Nghiem, L. D., Nguyen, L. N., Roddick, F., Price, W. E. (2013 a). Removal of bisphenol A and diclofenac by a novel fungal membrane bioreactor operated under non-sterile conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 483–490. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.012>
- Yang, S., Hai, F. I., Nghiem, L. D., Price, W. E., Roddick, F., Moreira, M. T., Magram, S. F. (2013 b). Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: A critical review. *Bioresource Technology*, 141, 97–108. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.173>
- Zhang, Y., Geißen, S.U., Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies, *Chemosphere*, 73 (8), 1151–1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>
- Zhang, Y., Geißen, S.U. (2012). Elimination of carbamazepine in a non-sterile fungal bioreactor. *Bioresource Technology*, 112, 221–227. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.02.073>
- Zhang, A., Wang, G., Gong, G., Shen, J. (2017). Immobilization of white rot fungi to carbohydrate-rich corn cob as a basis for tertiary treatment of secondarily treated pulp and paper mill wastewater. *Industrial Crops Products*. 109, 538–541. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.006>
- Zhao, J., Janse, B.J.H. (1996). Comparison of H₂O₂-producing enzymes in selected white rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 139, 215–221. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08205.x>
- Zorita, S., Mårtensson, L., Mathiasson, L. (2009). Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of the Total Environment*, 407, 2760–2770. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2008.12.030>

