



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y Control de Calidad Químicos.

Variación de la concentración de contaminantes emergentes en aguas residuales urbanas depuradas en fotobiorreactores con microalgas

Autor: Miguel Ángel de la Serna Calleja

Tutor/es: Rebeca López Serna, Juan José Jiménez Sevilla

Tabla de contenido

1	RESUMEN	5
2	ABSTRACT	6
3	INTRODUCCIÓN.....	7
3.1	Problemática medioambiental en aguas residuales:.....	7
3.2	La EDAR convencional (depuración de agua residual):	8
3.3	La EDAR del siglo XXI	12
3.4	Algas en el proceso de depuración	14
3.5	Contaminantes emergentes: PPCPs	17
3.6	Microalgas en la depuración de PPCPs en agua residual.....	18
3.7	Posibilidades de análisis de PPCPs en agua residual y residuos semisólidos (purín y algas)	22
4	Objetivos del trabajo	27
5	Parte experimental.....	27
5.1	Material y reactivos	27
5.2	Muestreo de las matrices analizadas.....	29
5.2.1	Reactor dopado	29
5.2.2	Reactor no dopado	30
5.3	Preparación de patrones de calibración	30
5.4	Preparación de muestra.....	32
5.4.1	Muestras acuosas	32
5.4.2	Muestras de biomasa algal	33
5.5	Determinación cromatográfica	35
5.5.1	Separación cromatográfica	35
5.5.2	Detección cromatográfica	36
5.5.3	Parámetros de análisis por compuesto	37

6	RESULTADOS Y DISCURSIÓN	41
6.1	Líneas de calibrado	41
6.2	Límites de cuantificación.....	45
6.3	Análisis y tratamiento de datos	47
6.3.1	Estudio de cromatogramas y obtención de datos.....	47
6.3.2	Cálculo de eliminaciones y retención en biomasa	52
6.4	Concentraciones encontradas. Resultados de eliminaciones y retenciones en biomasa algal	54
7	CONCLUSIONES	58
8	BIBLIOGRAFÍA.....	60
	ANEXO I	64
	ANEXO II	69
9	ÍNDICE DE FIGURAS	71
10	ÍNDICE DE TABLAS	72

1 RESUMEN

El uso de fotobiorreactores con microalgas está siendo considerado hoy en día para la depuración de aguas residuales, siendo necesario conocer no sólo el grado de eliminación de la materia orgánica e inorgánica en su conjunto sino también la eliminación de determinados microcontaminantes. En este trabajo se evalúa la capacidad de estos reactores para la eliminación de contaminantes emergentes, para ello alícuotas de agua residual urbana y efluente depurado han sido muestreados desde un reactor a intervalos regulares de tiempo y analizados en dos campañas: verano e invierno. De manera similar alícuotas de agua residual han sido dopadas con ciertos microcontaminantes para estudiar su comportamiento. Muestras de biomasa algal han sido recogidas y analizadas también. Los resultados indican que estos fotobiorreactores son capaces de eliminar total o parcialmente la mayoría de los compuestos encontrados en las aguas residuales. La biomasa crecida en los reactores acumula pequeñas cantidades de estos microcontaminantes.

2 ABSTRACT

The use of microalgae photobioreactors is being considered nowadays for wastewater treatment, being necessary to know not only the degree of removal of organic and inorganic matter as a whole but also the removal of certain micropollutants. In this work we evaluate the capacity of these reactors for the removal of emerging pollutants. For this purpose, aliquots of urban wastewater and treated effluent have been sampled from a reactor at regular time intervals and analyzed in two campaigns: summer and winter. Similarly, aliquots of wastewater have been doped with certain micropollutants to study their behavior. Samples of algal biomass have also been collected and analyzed. The results indicate that these photobioreactors are capable of totally or partially removing most of the compounds found in the wastewater. The biomass grown in the reactors accumulates small amounts of these micropollutants.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Problemática medioambiental en aguas residuales:

Se considera agua residual a agua usada de cualquier tipo (urbana, domestica, de riego...) o aguas que se han mezclado en algún momento con las anteriores. Este tipo de aguas en países desarrollados y, sobre todo en zonas urbanas, se conduce por alcantarillado hasta una depuradora, aunque hay casos que se usan fosas sépticas que son altamente perjudiciales para el medio ambiente porque esta agua puede filtrarse de esa fosa a acuíferos y aguas subterráneas contaminando lo que eran aguas limpias.

Son un gran contaminante medioambiental debido a que, en general, no son tratadas hasta que llegan a una estación depuradora. Esta falta de tratamiento provoca que, a lo largo del recorrido, desde donde se libera el agua residual hasta que llega a la depuradora pueda entrar en contacto y por ello contaminar vegetación, animales o la propia atmósfera debido a los gases que libera el metabolismo de las bacterias y otros microorganismos que se encuentran en este tipo de aguas, y debido a la presencia de compuestos no naturales o compuestos naturales en concentraciones anormalmente elevadas.

a) Componentes del agua residual:

No son iguales las aguas residuales generadas en un medio industrial o ganadero que en medio doméstico o incluso en medio doméstico cada uso genera aguas residuales muy diferentes en composición.

Es debido a esta variedad y la posterior mezcla de todas ellas en el alcantarillado, que el agua residual se considera una mezcla heterogénea de muchos compuestos (depende donde se tome la muestra de agua residual tendrá unos u otros en mayor o menor medida) y que generalmente tiene una fase suspendida y una fase soluble.

En cuanto a componentes químicos de estos tipos de aguas se encuentran desde compuestos inorgánicos (cloruros, carbonatos, nitrógeno, fósforo...) a compuestos orgánicos generalmente provenientes de excreciones o de restos de comida (urea, aminoácidos, proteínas, jabón...).

En cuanto a componentes biológicos hay una gran cantidad de microorganismos debido en primera instancia a que por excreciones aparecen mucha cantidad de bacterias (del aparato digestivo o de restos de los alimentos) y a que a lo largo del recorrido del agua residual pueden ir apareciendo. Estas bacterias descomponen parte de los componentes del agua residual que utilizan como metabolitos (en caso de nuestro estudio estas bacterias metabolizan gran cantidad de los fármacos que vamos a tratar de cuantificar).

3.2 La EDAR convencional (depuración de agua residual):

La depuración del agua residual es un proceso de grandísima importancia para el medio ambiente y la vida humana (tanto por uso humano directo como el agua usada industrialmente). Debido a que las aguas residuales no pueden ser usadas ni para consumo, ni para higiene, ni para industria se debe de realizar un riguroso proceso de limpieza del agua para que el agua saliente tenga los parámetros de calidad adecuados para poder ser usada en cualquiera de esos ámbitos.

A la depuradora de agua la denominamos como EDAR (Estación Depuradora de Aguas Residuales). Esta planta tiene edificios especiales para evitar la liberación de ruido y olor de la propia planta y así no suponer tampoco un contaminante de este tipo al medio. Se ve una depuradora genérica en la Figura 1.



Figura 1: Foto aérea de una Depuradora de agua residual

Una depuradora tiene las siguientes etapas/elementos:

1. Entrada a la depuradora: El agua llega por un sistema de alcantarillado nuevo (recubierto en su interior por materiales que esterilizan parcialmente el agua) y entra a los pozos de entrada, tras pasar por unas rejillas con huecos pequeños que se encargan de retirar los residuos sólidos de mayor tamaño y entran a las cámaras de bombeo que son las encargadas de impulsar el agua dentro de la depuradora (puede bombear hasta 4300 litros por segundo de caudal).

2. Pretratamiento: Se realiza con el sistema de pretratamiento que está compuesto por:

➤ Canales de desbaste fino de 6 mm de paso: Evita la entrada de sólidos de gran tamaño que puedan provocar obstrucciones y problemas en la planta depuradora. Se realiza mediante rejillas paralelas con poca separación que deben ser limpiadas discontinuamente y de manera frecuente debido a que puede obstruir la entrada de agua y reducir el caudal (se debe mantener el caudal en unos valores óptimos).

➤ Canales de desarenado y desengrasado del agua residual: Evita la entrada de grava, arena y partículas minerales pequeñas. Se protege así también la planta ya que estos materiales pueden sedimentar y obstruir bombas u otros aparatos provocando sobrecargas en tratamientos. El desengrasador evita la entrada de grasas o líquidos inmiscibles en la planta que disminuye la capacidad de depuración. Se muestra en la Figura 2.



Figura 2: Zona de pretratamiento EDAR

3. Decantación primaria: Con este sistema se realiza la separación inicial de los sólidos decantables del agua residual (se elimina hasta el 60% de materia sólida en el agua residual) mediante decantadores del orden de 34 metros de diámetro y 3240 metros cúbicos de volumen capaces de tratar toda el agua que entra con el caudal bombeado (los 4300 l/s). Esta zona se ve en la Figura 3.

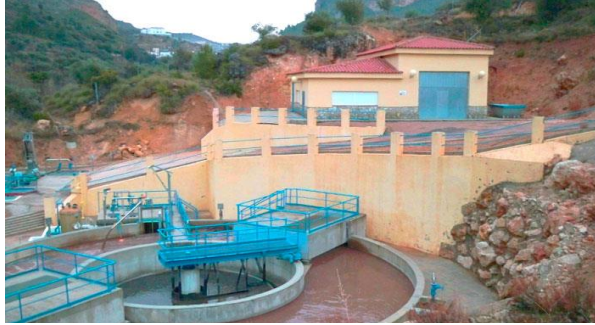


Figura 3: Zona de decantación primaria EDAR

4. Reactor biológico: Tras decantarse se dirige el flujo a cada una de las líneas independientes disponibles en el reactor biológico que elimina nutrientes. Este reactor es un depurador biológico avanzado que permite la eliminación de compuestos con fósforo y nitrógeno (nutrientes) sin tener que añadir compuestos al agua residual usando el método UCT modificado. Es un método desarrollado en Ciudad del Cabo (Sudáfrica) que divide al reactor biológico en tres zonas:

- Zona anaerobia: Sin presencia de oxígeno. Se realiza una fermentación anaerobia con un fango que genera un biogás que genera energía para la propia planta
- Zona anóxica: Presencia limitada de oxígeno.
- Zona aerobia: Presencia muy elevada de oxígeno. Es esta la que hay que tener más controlada ya que la demanda de oxígeno es elevadísima y por ello hay que aportar un volumen de oxígeno muy elevado y de forma uniforme.

5. Decantación secundaria: A través de la arqueta de reparto se distribuye el flujo de agua (llamado licor mezcla debido a la presencia de microorganismos provenientes del reactor biológico previo) a decantadores secundarios de succión donde por la gran densidad del fango que venía del reactor, este se va al fondo activo decantándose y extrayéndose, pudiendo realimentar de nuevo el reactor biológico. El agua que queda en la superficie se considera limpia y se toma por encima para llevarse al siguiente proceso de la planta. Esta zona se ve en la Figura 4.



Figura 4: Zona de decantación secundaria EDAR

6. Tratamiento del agua con rayos ultravioleta: Sirve para realizar la desinfección del agua extraída de la superficie del decantador secundario y, así, poder liberar esta agua al cauce urbano.

7. Edificio de control: Como cualquier planta industrial de gran tamaño, la EDAR cuenta con un edificio de control que monitoriza el proceso y la calidad del agua en cada etapa del proceso gracias a la mecanización del proceso y los caudales.

8. Línea de fangos: Por esta vía discurren los residuos generados en el proceso de depuración para tratarlos y obtener un fango lo más deshidratado (mediante centrifugación y separado de la fase líquida y un posterior secado térmico) posible para reutilizarse en el proceso o en caso de excedente o que no reúna las condiciones para volver a usarse en el reactor, se puede usar como fertilizantes o abonos naturales. Se regeneran cerca de 20 toneladas de fango diarias en una planta de este tipo.

- Fangos primarios: Proviene directamente de la decantación primaria, se espesan en una línea de espesado que aumenta la concentración del fango o que cultiven el propio fango en medio ácido (hay de ambos tipos).
- Fangos secundarios: Son los obtenidos en la decantación secundaria son espesados por flotación y tras ello se mezclan con los fangos primarios ya concentrados también y se introducen en el reactor juntos.

3.3 La EDAR del siglo XXI

Hay una gran tendencia en la actualidad a estudiar cómo mejorar el proceso de depurado del agua residual urbana. Esta importancia recae en la actualidad debido a la búsqueda de optimizar los procesos para que tengan un mínimo consumo energético, mínimos residuos y sobre todo que el proceso, recursos y residuos sean todos amigables con el medio ambiente.

La nueva estructura de EDAR tiene que lograr un efluente de mayor calidad, menor generación de fangos (uno de los problemas de la actual), menor impacto medioambiental y lograr, a diferencia de la actual, recuperar nutrientes y energía en forma de biomasa y, por último, lograr eliminar contaminantes que no se logran eliminar por completo en las actuales como son los PPCPs. Este nuevo tipo de depuradora es una WRRF (water resource recovery facility) debido a esa importancia en la recuperación de energía y nutrientes.

Con esta nueva estructura se logra recuperar nutrientes con fosforo, nitrógeno y carbono para utilizarlos como abono a partir de la propia agua residual, lo que hace más rentable el proceso de tratamiento del agua. Además, tras varios ciclos de uso, las microalgas, fangos y otros organismos utilizados pueden, en vez de tratarse o desecharse, utilizarse como biomasa para la obtención de energía.

La idea principal es lograr que la depuradora pueda ser más autosuficiente en cuanto a energía por esa recuperación de energía como biomasa y la rentabilidad económica de producir abonos de gran calidad.

Una de las opciones más prometedoras consiste en combinar la decantación primaria, reactores anaerobios con membrana, fangos activados, reactores aerobios con membrana y finalmente cultivos de microalgas.

El sistema de membranas que se está desarrollando trata de suplir el bajo tiempo de retención hidráulico (TRH), debido a los grandes flujos que tiene el agua en los reactores, con la total retención de la biomasa en las membranas para alcanzar altos tiempos de retención celular (TRC) que mejoran mucho la eliminación anaerobia sobre todo de materia orgánica en temperaturas bajas. El sistema de filtración mediante membranas

de ultrafiltración es el adecuado para sustituir las membranas aerobias actuales para reducir la necesidad de limpieza química que requiere estas últimas.

Este nuevo tipo de depuradoras que utilizan tanta cantidad de microorganismos para el tratamiento del agua tiene como principal inconveniente la gran cantidad de metano que se produce por la digestión de los contaminantes por parte de esos microorganismos, que sale disuelto en el efluente al medio ambiente, siendo el metano un gas de efecto invernadero muy potente pero que podría utilizarse como biogás.

En cuanto los nutrientes recuperados de la depuración podrían utilizarse directamente, tras la eliminación del metano y ácido sulfhídrico disueltos, ya que se obtienen en forma de amonio y fosfatos (en forma de estruvita $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) mejor que fertilizantes estándar utilizados. Si se utilizan microalgas para este proceso de digestión de contaminantes a compuestos sin impacto medioambiental el principal problema es la total eliminación de la biomasa algal del agua, que incluso si se logra en muchos casos deja coloreada el agua de un tono verde. Dicha biomasa puede utilizarse como ya se ha comentado para extraer energía de esta o tratarse para destinarse de nuevo al proceso de depuración o para otros fines. Este proceso de recuperación de nutrientes, depurado y obtención de biomasa se muestra en la figura 5 según la fotosíntesis de las microalgas con procesos de metabolismo del carbono, nitrógeno y fósforo ya estudiados.

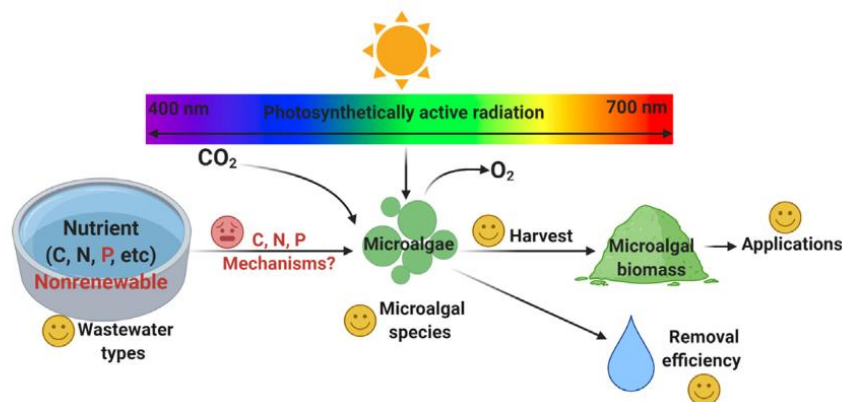


Figura 5: Proceso de tratado de aguas residuales con microalgas y sus productos

Como proyectos concretos la Universitat de València planteó el LIFE MEMORY que busca reducir en un 70% el consumo energético, las emisiones netas de gases de efecto invernadero en un 80% por la planta y la reducción de residuos a la mitad; además de una mejora en la calidad de efluente.

3.4 Algas en el proceso de depuración

La utilización de microalgas en el proceso de depuración como se ha comentado en el apartado 3.2, es uno de los retos planteados en la mejora de la EDAR actual. El principal reto o problemática al que se enfrenta esta etapa de depuración es el escalado del nivel de tanques al nivel industrial con tanques y flujos mucho mayores que hay en las depuradoras reales.

La depuración con microalgas se basa en el proceso de digestión por las microalgas de los componentes del agua residual mediante un proceso de fotosíntesis ayudado por luces que incitan esa fotosíntesis en la zona del UV-visible y en la cual toman CO_2 que puede provenir de la respiración bacteriana en la propia agua residual y liberan oxígeno el cuál suple la mayor parte de la demanda de oxígeno que tiene el agua residual por estas bacterias que se encuentran en ella.

Las microalgas tienen la gran capacidad de digerir y, por tanto, eliminar una gran cantidad de contaminantes del agua residual. Son capaces de metabolizar o ingerir desde contaminantes emergentes como fármacos, nutrientes e incluso metales pesados.

En cuanto a nutrientes, según se muestra en la imagen 6, en su metabolismo son capaces de digerir nitratos y fosfatos y por ello reducir la concentración de nitrógeno y fósforo del agua residual mejorando así la calidad de esta, tomando además dióxido de carbono y liberando oxígeno y, finalmente biomasa algal que puede utilizarse para obtener energía (Rasoul-Amini, 2014).

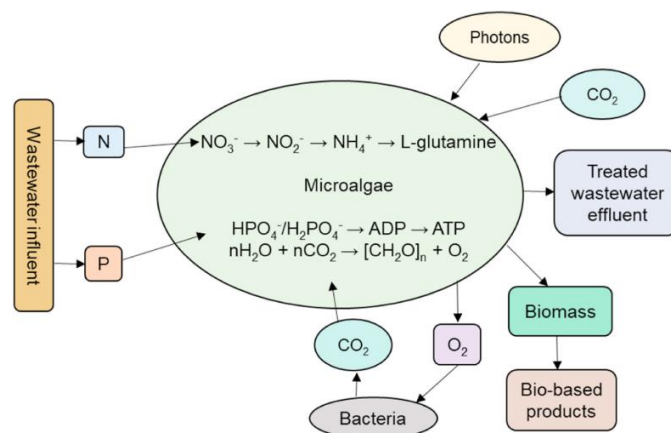


Figura 6: Metabolización de nutrientes de nitrógeno y fósforo provenientes de agua residual por las microalgas

Ese oxígeno que liberan al realizar la fotosíntesis da lugar a que aumente la cantidad de oxígeno disuelto en el agua residual, que este oxígeno sea tomado por los microbios y sea usado en la degradación de muchos más contaminantes orgánicos por parte sobre todo de bacterias produciendo dióxido de carbono. Al haber más oxígeno disuelto gracias a las microalgas, el valor de COD y BOD (demanda de oxígeno química y biológica respectivamente) disminuya. Esta cooperación cíclica entre el metabolismo fototrópico de las microalgas y el heterótrofo de los microorganismos presentes en el agua residual es muy beneficiosa para ambas y para el proceso de depuración. Como se muestra en la Figura 7 ambos microorganismos degradan contaminantes y cada uno libera lo que el otro necesita para su metabolismo (las algas liberan oxígeno y las bacterias dióxido de carbono).

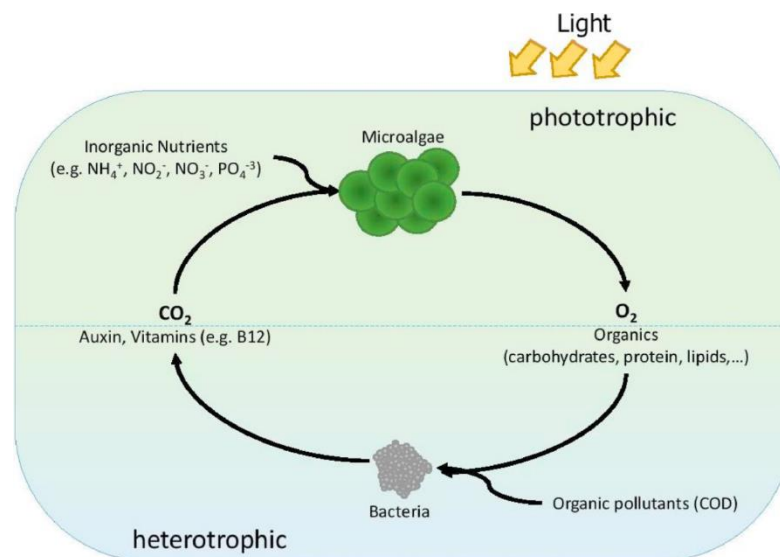


Figura 7: Reducción de la demanda de oxígeno biológico y químico en el agua residual gracias a la liberación de oxígeno por las microalgas

Las microalgas tienen también la capacidad de eliminar metales pesados que se encuentren disueltos en agua mediante absorción de estos por biosorción en la membrana celular y tras ello paso al citoplasma donde pueden almacenarse como polifosfatos o formando otro tipo de complejos con el metal como se muestra esquemáticamente en la figura 8 (Salam, 2019).

Se ha determinado que dependiendo de cuál es la microalga tiene más afinidad por biosorber unos metales u otros. La mayoría es capaz de eliminar el cobre disuelto en un 80% más o menos y otras 7 microalgas estudiadas en otro artículo son capaces de captar otros metales como el cadmio. (Hashim, 2004)

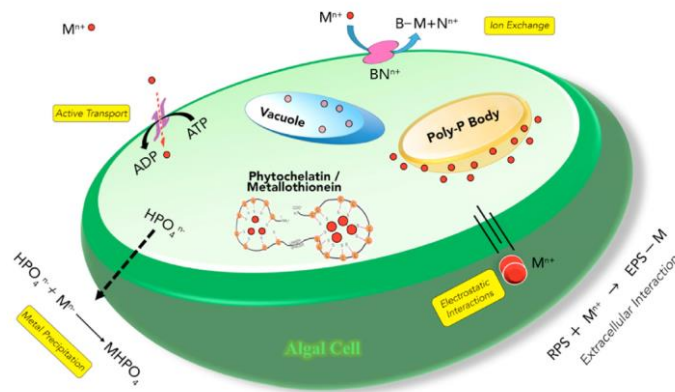


Figura 8: Sitios de unión a metales de una célula de microalga

Otra gran ventaja de las microalgas es la competencia que suponen frente microorganismos patógenos en el agua residual. Debido a que son también organismos vivos, se produce una competencia entre las microalgas y muchas bacterias patógenas por la absorción de nutrientes y otros componentes necesarios en el medio en el que se encuentran. Esta competencia causa la muerte y por ello disminución de una gran cantidad de los microorganismos patógenos del agua residual.

Pueden también afectar a los patógenos debido al aumento del pH que provocan al tomar tanto CO₂ disuelto causando que el medio tenga un pH mayor y estas variaciones de pH, el medio básico e, incluso la generación de mucho oxígeno provoca la muerte de muchas bacterias. (Ansa, 2011)

En resumen, las microalgas son claramente candidatas para entrar en el proceso de depuración en la EDAR por su gran capacidad de reducir la cantidad de metales, nutrientes e incluso, como se verá en el presente trabajo de contaminantes emergentes, sobre todo PPCPs. Se muestra en la figura 9 la gran cantidad de mecanismos por los que elimina contaminantes una célula de microalga (Markou, 2018).

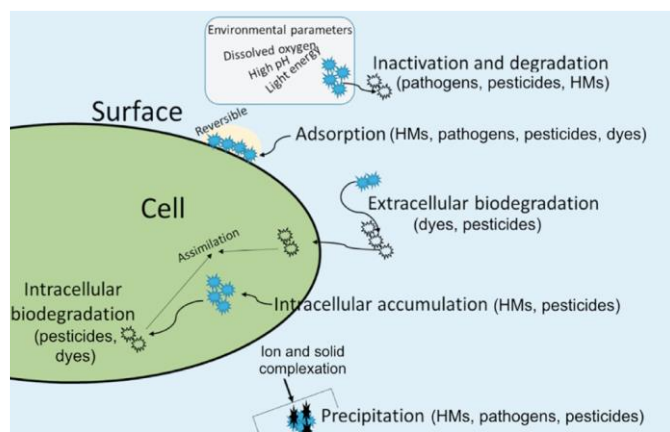


Figura 9: Mecanismos de eliminación de patógenos, metales pesados y otros contaminantes

El problema que tienen es la problemática de reescalar los fotobiorreactores de un tamaño medio al tamaño industrial debido al gran precio de los aparatos necesarios (Acién, 2012) y la complicación que tienen las aguas residuales turbias o con muchos sólidos en la fotosíntesis de las algas (Amenorfenyo, 2019).

Una de las formas de reescalar los montajes de laboratorios a la depuradora es con la inmovilización de las microalgas. La inmovilización suele llevarse a cabo con polímeros, quitosano o vidrio poroso y permite la fácil separación y manipulación de las microalgas, facilitando así por ejemplo la separación de estas tras terminar la depuración, hecho muy importante a la hora de liberar el agua depurada al medio ambiente y de nuevo al consumo (Delahaye, 2005).

Además, se ha demostrado que puede aumentar la captación de ciertos elementos como el fósforo por parte de una cianobacteria (*Anabaena variabilis*) al inmovilizarse sobre espuma de poliuretano (Gaffney, 2001).

3.5 Contaminantes emergentes: PPCPs

Un fármaco es una sustancia que sirve para prevenir, tratar o curar una enfermedad, dolor físico o infección determinada. Estos fármacos se pueden ingerir de múltiples formas y, cada uno tiene una forma de aplicación óptima (se pueden preparar para otras formas optimizándolas en algunos casos), ya que su actuación química, absorción del medicamento y dónde actúa está también determinada por su método de ingestión.

Un medicamento es la forma en la que se comercializa el fármaco, es decir, su estado (por ejemplo, ion del fármaco con sulfato), su mezcla (si es racemato, enantiopuro o que exceso enantiomérico tiene), su acondicionamiento (polvos, encapsulado...) y sus excipientes que son las sustancias que acompañan a la molécula activa (jarabe, emulsión, capsula...).

En la actualidad, los medicamentos son mucho más accesibles por la sociedad (sea cual sea su poder adquisitivo), al menos los medicamentos más comunes (antibióticos o analgésicos) y esto provoca que muchísima gente los consuma y debido a esto puedan aparecer fármacos al analizar matrices medioambientales.

En las aguas residuales se pueden detectar fármacos que pueden ser debido a que sean liberados directamente al agua residual o a sus metabolitos (moléculas a las que los transforma el cuerpo cuando son metabolizados) al excretarlos.

En los purines se pueden detectar fármacos también, sobre todo las denominadas drogas veterinarias que son compuestos administrados a animales de granja para mejorar la salud animal, y así algún parámetro del producto que se obtiene de estos. En el caso del purín porcino aparecerán drogas veterinarias usadas para que el cerdo aumente de peso en aquellos países en los que aún se autoriza este uso, o simplemente fármacos que se le dieron para curar o tratar alguna enfermedad.

En ambos casos la cantidad de fármacos liberada a esas matrices medioambientales es muy elevada y, al igual que los purines, es un contaminante que en sí siempre ha habido pero que, actualmente está aumentando exponencialmente su incidencia y ya se ha convertido en un gran problema. Es por esto, que se considera a los fármacos un tipo de CECs (Concerned Emergent Contaminants) y son los que vamos a estudiar en este trabajo.

Para entender el por qué son un contaminante peligroso hay que entender que estos fármacos que pasan a las aguas residuales no se consiguen eliminar/limpiar con las depuradoras (al menos las usadas actualmente) y por tanto vuelven al agua de uso humano y se ingieren (aunque sea en pequeñas cantidades). El ingerir fármacos de forma frecuente (como ocurriría si los fármacos no se logran eliminar del agua de uso humano) puede provocar adicciones a medicamentos y, sobre todo, puede generar resistencia bacteriana a ellos. Además, hay algunos fármacos que pueden reaccionar entre sí y formar sustancias de gran tamaño y varios grupos químicos de las que no se conoce su toxicidad o efectos en el organismo tanto humano como animal.

3.6 Microalgas en la depuración de PPCPs en agua residual

En los últimos años se han publicado muchos estudios que tratan la capacidad de eliminación de PPCPs en agua por parte de las microalgas convirtiéndose estas en un prometededor añadido a las plantas de tratamiento de agua residual convencionales para eliminar este tipo de contaminantes.

En el proceso de eliminación de los PPCPs están envueltos muchos procesos o mecanismos que llevan a cabo estos microorganismos entre los que están la biosorción, biodegradación, la fotodegradación en el medio acuoso... Los mecanismos más importantes y representativos de este tipo de eliminación ya se han comentado en el apartado 3.3. En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos en los que se ve como el mecanismo de eliminación generalmente es común para el PPCP eliminado, aunque se utilicen diferentes bacterias. Se estudian bacterias debido a que se utiliza la cooperación bacteria-microalga como ya se ha comentado debido al metabolismo cíclico que las une.

Tabla 1: Mecanismo de eliminación del PPCP según la bacteria

Bacterial strain	PPCPs	Mechanisms involved
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> subsp. <i>denitrificans</i> TR1	Triclosan	Metabolic degradation
<i>Pseudomonas putida</i> TriRY	Triclosan	Metabolic degradation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TJ1	17 β -estradiol	Metabolic degradation
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	Acetaminophen	Metabolic degradation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Acetaminophen	Metabolic degradation
<i>Stenotrophomonas</i> sp. f1	Acetaminophen	Metabolic degradation
<i>Pseudomonas</i> sp. f2 and fg-2	Acetaminophen	Metabolic degradation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> HJ1012	Acetaminophen	Metabolic degradation
<i>Pseudomonas</i> sp. CBZ-4	Carbamazepine	Metabolic degradation
Ammonia-oxidizing bacteria	Atenolol	Co-metabolic degradation
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KB2	Naproxen	Metabolic degradation
<i>Pseudomonas</i> sp. I-24	Iopromide	Co-metabolic degradation
<i>Pseudomonas psychrophila</i> HA-4	Sulfamethoxazole	Metabolic degradation
Variovorax Ibu-1	Ibuprofen	Metabolic degradation
<i>Bacillus thuringiensis</i> B1	Ibuprofen	Co-metabolic degradation

Como es de esperar la mayoría de las eliminaciones llevadas a cabo por la cooperación con la bacteria, esta se encarga de metabolizar el PPCP degradándolo a compuestos menos contaminantes.

A continuación, se muestra en la tabla 2 una grandísima cantidad y variedad de microalgas utilizadas en la eliminación de diferentes contaminantes (todos PPCPs). En esta tabla se muestra el PPCP, la microalga, la especificación, el mecanismo que sigue para eliminarlo y el porcentaje de eliminación obtenidos de diferentes estudios recogidos en una revisión (Hena, 2020).

Tabla 2: Porcentaje de eliminación de PPCPs con microalgas

PPCPs	Microalgae	Specific conditions	Removal (%)
Enrofloxacin	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Cultures were developed in sterilized Bold's Basal Medium for 11 days under 40–50 $\mu\text{mol photon/m}^2 \text{ s}$ light intensity, at 27 °C temperature, shaking with 150 rpm and light/dark cycle of 16:8 h. The initial concentration of enrofloxacin was 1 mg/L. The consortium was prepared with an equal amount of all microalgae with final OD_{680} of -1.0	23
	<i>Chlamydomonas mexicana</i>		25
	<i>Chlorella vulgaris</i>		26
	<i>Ourococcus multisporus</i>		18
	Consortium		20
Naproxen	<i>Cymbella sp.</i>	The freshwater algae <i>Cymbella sp.</i> and <i>Scenedesmus quadricauda</i> were cultured in sterile D1 and BG11 medium and spiked with 1mg/L naproxen. The inoculum size was maintained with 1×10^5 cells mL. The culture was maintained for 30-day incubation.	26
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>		97.1
Salicylic acid	<i>Chlorella vulgaris</i>	Microalgal strains were cultured in Mann and Meyers medium with an initial inoculum size of about 3×10^9 cells mL, for 24 h under 175 $\mu\text{mol photon/m}^2 \text{ s}$ light intensity, at 25 °C temperature, with 7% CO_2 and 250 rpm with 12:12 photoperiods. The initial concentration of each targeted compound was 25 mg/L.	> 25
	<i>Tetradesmus obliquus</i>		> 93
Paracetamol	<i>Chlorella vulgaris</i>	of each targeted compound was 25 mg/L.	> 21
	<i>Tetradesmus obliquus</i>		> 40
7-amino cephalosporanic acid	<i>Chlorella sp.</i>	<i>Chlorella sp.</i> , <i>Chlamydomonas sp.</i> , and <i>Mychonastes sp.</i> , were developed in a synthetic medium; BM, BBM and BG-11 respectively for 24 h under 200 $\mu\text{mol photon/m}^2 \text{ s}$ light intensity, at 26 °C temperature, with 2.5% CO_2 aeration. The initial OD_{680} of inoculum was 0.1, and the initial concentration of 7-amino cephalosporanic acid was 100 mg/L.	76.2
	<i>Chlamydomonas sp.</i>		69.3
	<i>Mychonastes sp.</i>		64.9
Carbamazepine	<i>Chlamydomonas mexicana</i>	The microalgae were cultured in Bold Basal Media in two different flasks at 27 °C and 150 rpm, under 45–50 $\mu\text{mol photon/m}^2 \text{ s}$ for 10 days. The initial OD_{680} of inoculum was 1, and the initial concentration of carbamazepine was 1 mg/L.	37
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		30
Diclofenac	<i>Chlorella sorokiniana</i>	The cultures were cultivated in synthetic media at 25 °C, under 175 $\mu\text{mol photon/m}^2 \text{ s}$, shaking with 250 rpm and light/dark cycle of 12:12h. The inoculum was maintained as 3×10^9 cells/mL, and the initial concentration of diclofenac was 25 mg/L.	70.01
	<i>Chlorella vulgaris</i>		78.42
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		20.9
Nonylphenol	<i>Chlorella vulgaris</i>	The cultures were cultivated in Bristol medium at 25 °C, under 40 $\mu\text{mol photon/m}^2 \text{ s}$, shaking with 160 rpm and light/dark cycle of 16:8 h for 7 days. The inoculum size corresponded to 1 mg/L chlorophyll a and the initial concentration of nonylphenol was 1 mg/L.	99
	<i>Chlorella sp. (Iuoi)</i>		92
	<i>Chlorella sp. (2f5aia)</i>		94
Progesterone	<i>Chlorella miniata</i>	The microalgae were cultivated in BG-11 medium at 25 °C, under 3000 lux, shaking with 150 rpm and light/dark cycle of 12:12 h for 5 days. The inoculum was maintained as 10^9 cells/mL, and the initial concentration of target compounds was 1.6 μM .	93
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		> 95
Norgestrel	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	The microalgae were cultivated in BG-11 medium at 25 °C, under 3000 lux, shaking with 150 rpm and light/dark cycle of 12:12 h for 5 days. The inoculum was maintained as 10^9 cells/mL, and the initial concentration of target compounds was 1.6 μM .	> 95
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		–100
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		–60
Acetaminophen (340 $\mu\text{g/L}$)	<i>Chlorella sorokiniana</i>	<i>Chlorella sorokiniana</i> was inoculated with 1.66×10^9 cells/mL for the treatment of anaerobically treated wastewater at 35 °C for 10 days under 60 $\mu\text{mol photon/m}^2 \text{ s}$ with continuous illumination.	99
Carbamazepine (117 $\mu\text{g/L}$)			33
Diclofenac (150 $\mu\text{g/L}$)			45
Ibuprofen (320 $\mu\text{g/L}$)			100
Metoprolol (180 $\mu\text{g/L}$)			38
Trimethoprim (200 $\mu\text{g/L}$)			55
Carbamazepine (0.130 $\mu\text{g/L}$)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Filtered raw wastewater cultured with microalgae separately with inoculum size corresponding to 0.05 mg/L chlorophyll a, with 150 rpm, at 25 °C under 60 $\mu\text{mol photon/m}^2 \text{ s}$ light intensity for 12:12h light/dark cycle till 7 days.	12.3
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		5.38
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		3.84
Ciprofloxacin (0.029 $\mu\text{g/L}$)	<i>Chlorella vulgaris</i>		10
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		79.3
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		79.3
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		75.86
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		89.06
Progesterone (0.011 $\mu\text{g/L}$)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		93.54
	<i>Chlorella vulgaris</i>		93.06
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		81.81
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		81.81
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		83.63
Roxithromycin (0.049 $\mu\text{g/L}$)	<i>Chlorella vulgaris</i>		86.36
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		93.87
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		86.94
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		92.04
	<i>Chlorella vulgaris</i>		89.80
Salicylic acid (62.510 $\mu\text{g/L}$)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		97.76
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		98.28
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		98.96
	<i>Chlorella vulgaris</i>		97.50
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		73.92
Sulfadiazine (0.028 $\mu\text{g/L}$)	<i>Scenedesmus obliquus</i>		53.57
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		57.14
	<i>Chlorella vulgaris</i>		66.07
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		50
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		75
Sulfadimethoxine (0.006 $\mu\text{g/L}$)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		60
	<i>Chlorella vulgaris</i>		68.33
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		81.48
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		87.03
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		81.11
Sulfamethazine (0.056 $\mu\text{g/L}$)	<i>Chlorella vulgaris</i>		81.85
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		48.21
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		17.85
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		23.21
	<i>Chlorella vulgaris</i>		33.92
Triclocarban (0.057 $\mu\text{g/L}$)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		82.63
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		98.59
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		82.63
	<i>Chlorella vulgaris</i>		80.70
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		57.56
Triclosan (0.041 $\mu\text{g/L}$)	<i>Scenedesmus obliquus</i>		30.24
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		41.46
	<i>Chlorella vulgaris</i>		52.19
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		37.03
	<i>Scenedesmus obliquus</i>		18.51
Trimethoprim (0.027 $\mu\text{g/L}$)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		29.62
	<i>Chlorella vulgaris</i>		0.0
	<i>Chlorella vulgaris</i>		0.0

Como puede verse en la tabla 2, la lista de contaminantes que son eliminables por microalgas en aguas residuales es muy variada y amplia, pudiendo con una misma microalga eliminar más de un contaminante. Cabe destacar que muchas de estas microalgas pueden juntarse en el reactor de la planta de depuración para mejorar la eliminación de un compuesto o aumentar el número de PPCPs que se pueden eliminar.

Se cuantifica también en esta revisión la concentración a partir de la cuál cada PPCP es tóxico para varias microalgas estudiadas. Es importante tener esta concentración en cuenta porque causaría que ciertas microalgas dejaran de ser efectivas y disminuir el porcentaje de eliminación.

Destaca también que según sea el montaje del reactor habría ventajas o desventajas. Se comparan concretamente los montajes de tener las microalgas inmovilizadas o en suspensión, destacando ventajas e inconvenientes de ambos. Las diferencias más destacadas se muestran en la tabla 3 (Hena, 2020):

Tabla 3: Ventajas e inconvenientes de la suspensión e inmovilización de microalgas en el fotobiorreactor

Suspensión		Inmovilización	
Ventaja	Inconveniente	Ventaja	Inconveniente
Alta eliminación por volatilización	La luz solo incide en las microalgas superficiales	Instalación barata y eficaz en cuanto a luminosidad	Difícil de optimizar
Más fácil de optimizar	Difícil limpieza	Agente inmovilizador duradero	Agente inmovilizador caro y requiere mantenimiento
Requiere poco espacio	Instalación cara	No requiere gran volumen	Difícil de controlar
Bueno para agua residual	Requiere gran volumen para suspensión eficaz	Fácil limpieza y separación	Se inhiben algunos mecanismos de eliminación
Alta producción de biomasa si se usa membrana	Bloqueo de membrana si se utiliza	Alta producción de biomasa	Alta contaminación puede inutilizar el inmovilizador

3.7 Posibilidades de análisis de PPCPs en agua residual y residuos semisólidos (purín y algas)

La metodología utilizada para detectar y cuantificar los PPCPs debe ser una metodología muy sensible y, a la vez, que sea capaz de analizar a una gran cantidad de compuestos que son de estructuras variadas entre sí como son los PPCPs.

Para ser capaz de detectar concentraciones pequeñas (del rango de los ng/L que es el orden en el que se encuentran la mayoría de contaminantes emergentes analizados en aguas) es necesario un paso de concentración de los mismos previo al análisis por cromatografía y detección con espectrómetro de masas (el detector ideal para ser selectivo a tantos compuestos diferentes en un mismo análisis cromatográfico).

Para determinar la mejor forma de analizar los PPCPs es necesario conocer cuáles son sus principales características físico-químicas:

- **Polaridad y temperatura de ebullición:** Son compuestos moderadamente polares y no volátiles. Esto provoca que se utilice generalmente la cromatografía de líquidos para el análisis, ya que para la cromatografía de gases sería necesario derivatización previa.
- **Constante de acidez y solubilidad:** Los compuestos varían entre algunos ácidos y otros básicos (Gonçalves, 2013). La mayoría (moderadamente polares) son muy solubles en agua y se mantienen en forma disuelta pudiendo ser absorbidos fácilmente por algas, lodos y otros cuerpos presentes en agua (Gracia-lor, 2012).

Método de preconcentración (pretratamiento de muestra)

Es el paso que más variaciones tiene ya que pueden utilizarse diferentes métodos de extracción de analitos (López-Serna, 2019):

- Extracción en fase sólida (SPE): Es el método más utilizado. Destaca la utilización de los OASIS HLB (hydrophilic-lipophilic balance) ya que sirven para analitos de diferentes polaridades y acidez como es el caso de los PPCPs (Shao, 2009). También se utilizan los OASIS MCX (mixed-mode resilient) que son intercambiadores iónicos (Shraim, 2017).

- Extracción líquida con presión (PLE): Se basa en el uso de presión y temperatura para lograr la extracción de los analitos deseados, siendo más eficaz para algún antibiótico como las sulfonamidas o el Trimethoprim (Gobel, 2005) en cuanto a recuperaciones, poco tiempo de extracción, reduce el uso de disolventes orgánicos (utilizados en SPE). Como inconveniente tienen el mayor uso de energía (para la presión y temperatura requeridas) y es menos selectivo que la SPE provocando dilución con algunos interferentes (Dabrowski, 2002).
- Extracción asistida por ultrasonidos (UAE): Es una metodología barata y efectiva comparada con otros métodos de extracción. Se puede aplicar con diferentes disolventes y depende su efectividad de la polaridad de este, la naturaleza de la muestra, frecuencia de ultrasonidos... (Albero, 2015) Hasta un 75% de la energía puede disiparse en forma de calor. Puede utilizarse previa a la SPE en casos de lodos y otras matrices semisólidas.
- Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME): Mezcla la matriz a analizar con un disolvente inmiscible en agua (disolventes clorados como diclorometano, cloroformo o tetracloruro de carbono) al que pasan los analitos por reparto. Se obtiene una mezcla turbia que tras centrifugación tiene dos fases bien separadas que se separan logrando que los analitos solo se encuentren en la fase orgánica. Se logran coeficientes de reparto muy elevados logrando gran recuperación, poco disolvente y poco tiempo y energía necesitada. Esta técnica aporta buenos resultados con los parabenos y bisfenoles (Mudiam, 2014).
- Extracción asistida por microondas (MAE) y extracción en disolvente asistida por microondas (MASE): Son extracciones similares en las que se aprovecha la energía de microondas para poder extraer los analitos de interés o bien en una disolución acuosa en la que se extraiga de una muestra semisólida o bien en un disolvente con el que se mezcle la muestra. Es importante destacar que el disolvente utilizado debe absorber bien la energía microondas por lo que no sirve cualquiera. Son técnicas rápidas y sencillas comparadas con otras como la extracción líquido-líquido o la SPE (Delgado, 2012). Incluso puede acoplarse a la extracción Soxhlet (FMASE) como energía auxiliar para acelerar el proceso. Todas ellas logran disminuir los tiempos de extracción, volumen de disolvente y permite la extracción continuada para mejorar las recuperaciones (Chen, 2008).

- Extracción con fluidos supercríticos (SFE): Se utilizan fluidos supercríticos para realizar la extracción de los analitos, requiriendo elevadas presiones y moderadas temperaturas para lograr este meta-estado de la materia. Generalmente se utiliza dióxido de carbono como superfluido con metanol como modificador orgánico para extraer los compuestos polares (P= 150-450 bar y T=40-150°C). La recolección de lo extraído se realiza sobre un pequeño volumen de disolvente o en una trampa de fase sólida que se eluye posteriormente con un disolvente orgánico. Es una extracción rápida, con volumen mínimo de disolvente y no requiere limpieza ni filtración. Es difícil de optimizar debido a la gran cantidad de parámetros a optimizar (temperatura, presión, modificador...) (Bowadt, 1995) (Herrero, 2010).
- Extracción Soxhlet (SE): Para la extracción Soxhlet se prepara el montaje requerido y se extrae de una matriz sólida o semisólida con un disolvente que se calienta y va evaporándose y volviendo a condensar sobre la propia muestra extrayendo los analitos en múltiples ciclos. Utiliza volúmenes de entre 100-500 ml típicamente, 1-30 gramos de muestra y entre 3-48 horas de extracción, teniendo como ventaja que no se requiere filtrar y da buenos resultados en compuestos orgánicos (De Castro, 2010) pero tiene tiempos de extracción muy grandes y mucho volumen de disolvente y requiere limpieza posterior. Gasta agua de refrigeración y energía de calentado durante mucho tiempo. Se ha utilizado para compuestos como el Triclosan (Bester, 2003) aunque no se ha aplicado para ninguno más prácticamente aún.

Posibles separaciones cromatográficas

- Cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS): Son las técnicas más utilizadas debido a su gran nivel de sensibilidad y accesibilidad en cuanto a coste del aparato y los libros de datos de espectrómetros de masas por impacto electrónico. Para este tipo de análisis deben derivatizarse prácticamente todos los analitos debido a su baja volatilidad por lo que el análisis multicomponente de la misma muestra es complejo por la necesidad de derivatizar a cada analito.

No tiene prácticamente efecto matriz. El principal problema de la derivatización es que aparte de la dificultad y control, da problemas a la larga de recuperación y sensibilidad

(Reddersen, 2003) por la manipulación de la muestra y en el caso de estos analitos un suele utilizarse por la dificultad de volatilización.

- Cromatografía de líquidos acoplada a masas (LC-MS): Se ha extendido su utilización en los últimos años gracias al uso de la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la ionización por electroespray (Liang, 2003), además del desarrollo de aparatos de espectrometría de masas más accesibles. Para el análisis de PPCPs es ideal la cromatografía de líquidos porque las matrices son acuosas o fácil de convertir en acuosas y que no requiere derivatizar como la de gases. Se ve más afectada por el efecto matriz que la de gases, pero se suele describir en las validaciones de método para su corrección (Zuloaga, 2012).

- Electroforesis capilar (CE): Es una técnica barata, efectiva y veloz de separación de analitos de interés farmacológico típicamente. Muchos analitos que son difíciles de aislar y separar con cromatografía de líquidos son bien separados en esta técnica debido a ser selectiva según el pH, concentración de tampón, aditivos... Se la pueden acoplar además mecanismos de limpieza previa on-line con el capilar como microextracción en fase sólida (SPME). Ha demostrado servir para identificar compuestos del grupo de los PPCPs en matrices acuosas (Ahrer, 2001) (Amelin, 2012).

- Cromatografía de líquidos de ultra alto rendimiento acoplada a masas (UHPLC-MS): Es un avance de la técnica de cromatografía de líquidos en la que se alcanza una mejor separación y detección de los compuestos al utilizar como medio de separación partículas de menor diámetro que la cromatografía HPLC (Andreozzi, 2003).

Detección

- Espectrómetro de masas (MS): Es el detector utilizado en este tipo de estudios debido a la gran selectividad y sensibilidad requerida para detectar estos compuestos tan variados y en concentraciones tan pequeñas. Puede realizarse un análisis simple o analizarse con espectrometría de masas en tándem (MS/MS) logrando límites de detección bajos y muy alta selectividad (Petrovic, 2006).

En la tabla 4 puede verse la cuantificación de varios PPCPs en diferentes matrices con estos métodos de concentración de analitos y de análisis comentados.

Tabla 4: Análisis y modo de extracción de PPCPs y concentraciones medidas en múltiples estudios (Ohoro, 2019)

Analyte	Sample Matrix	Extraction Mode	Analysis	Concentration
Caffeine	Influent	b	m	25,578 ng/L
	Effluent	b	m	115.1
	River	b	m	34–238
Carbamazepine	Influent	c	P	2.1 µg/L
	Effluent	c	P	0.39 µg/L
	Activated sludge	c	P	0.76 µg/L
	Surface water	c	p	28.3 ng/L mean conc
Sulfamethaxazole	Influent	b	m	356 ng/L
	Effluent	b	m	22 ng/L
	Intermediate	b	m	57 ng/L
	River1	b	m	25–58 ng/L
Triclosan	Influent	c	p	1.8 µg/L
	Effluent	c	p	0.05 µg/L
	Activated sludge	c	p	0.09 µg/L
Naproxen	Biooild	e	o	470 ng/dw
	Influent	c	p	14 µg/L
	Effluent	c	p	0.08 µg/L
	Activated sludge	c	p	1.8 µg/L
Ibuprofen	Influent	b	m	863 ng/L
	Effluent	b	m	170 ng/L
	Intermediate	b	m	224 ng/L
	River1	b	m	18 ng/L
	River2	b	m	96 ng/L
	River3	b	m	60 ng/L
	Influent	c	p	21 µg/L
Diclofenac	Effluent	c	p	0.06 µg/L
	Activated sludge	c	p	2.2 µg/L
	Wastewater	e	s	4.8 mg/L instrumental
	Sediment	j	q	<LOD-309 ± 15.3
Ketoprofen	Influent	c	p	3.2 µg/L
	Effluent	c	p	<LOD
	Activated sludge	c	p	0.15 µg/L
	Influent	b	m	1993 ng/L
	Effluent	b	m	632 ng/L
	Intermediate	b	m	1665 ng/L
	River1	b	m	186–839 ng/L
DEET	Influent	c	p	1.5 µg/L
	Effluent	c	p	<LOD
	Activated sludge	c	p	0.02 µg/L
Acetaminophen	Influent	b	m	124 ng/L
	Intermediate	b	m	121 ng/L
	Effluent	b	m	79 ng/L
	River1	b	m	22–94 ng/L
Ampicillin	Intermediate	b	m	233 ng/L
	Effluent	b	m	115 ng/L
	River1	b	m	93–278 ng/L
Aspirin	Sediment	j	q	50.8 ± 2.66–369 ± 9.0
Nalixidic acid	Sediment	j	q	212 ± 1.6–427 ± 4.47
Clofibriric acid	Sediment	j	q	117 ± 23.1–455 ± 12.2
	Influent	c	p	<LOD
	Effluent	c	p	<LOD
Estradiol	Activated sludge	c	p	<LOD
	Influent	b	m	1165 ng/L
	Intermediate	b	m	862 ng/L
	Effluent	b	m	19.8 ng/L
Parecetamol	River1	b	m	211–228 ng/L
	Influent	p	p	77 µg/L
	Effluent	c	p	0.18 µg/L
	Activated sludge	c	p	0.33 µg/L

a—QuEchERS; b—SPE Oasis HLB; c—SPE; d—online SPE reversed phase; e—PLE; f—MAE-Hf-L/SME; g—PHWE; h—SPE-CE; i—USAEME; j—ultrasonication; l—UPLC MS-MS; m—LC-MSMS; n—LC-DAD-MS; o—LC-UV-ESI-MS; p—GC-MS; q—LC-ESI-MS-MS; r—L.

En esta review puede verse la detección de varios compuestos pertenecientes al grupo de los PPCPs mediante diferentes modos de extracción y técnicas de análisis y cuál es la concentración medida en diferentes matrices acuosas (agua depurada, no depurada y ríos) y semisólidas (sedimentos y lodos activados). Se puede ver como efectivamente hay muchas posibilidades de análisis de estos compuestos y de modos de preconcentración de ellos.

En el caso del análisis de PPCPs en matrices acuosas predomina la utilización de la extracción en fase sólida (SPE) para lograr la preconcentración de los analitos de interés y la cromatografía elegida es la de líquidos, preferiblemente la de ultra alto rendimiento (UHPLC) capaz de lograr la mejor separación posible de dichos analitos pasando finalmente al espectrómetro de masas (MS). Por lo tanto, se puede decir que el mejor método en cuanto a resultados y para analizar varios analitos en la misma medida es SPE-UHPLC-MS/MS (Wu, 2021).

En el análisis de PPCPs en matrices semisólidas como son las algas se realiza una extracción sólido líquido (SLE) en presencia de un adsorbente previo a la extracción en fase sólida (SPE) que se utiliza en el caso de matrices líquidas y el análisis cromatográfico y detección posterior es idéntica que en matrices líquidas (UHPLC-MS/MS). El proceso de preconcentración, separación y detección es prácticamente idéntico al de matrices líquidas añadiendo un paso de extracción sólido líquido asistida por ultrasonidos (Ruas, 2022).

4 Objetivos del trabajo

- Conocer la incidencia de contaminantes emergentes en aguas residuales urbanas.
- Conocer la capacidad de un fotobiorreactor con microalgas para la eliminación de contaminantes emergentes en aguas residuales urbanas.

5 Parte experimental

5.1 Material y reactivos

A lo largo del proceso experimental se usaron varios instrumentos, reactivos y material.

- **Instrumentación:**

1. Equipo de cromatografía Sciex Exion UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) con una columna de fase inversa (5 cm x 2.1 mm) Phenomenex con partículas de Kinetic EVO C18 de 1.7 μm de diámetro. Posee una bomba binaria, cuatro depósitos de disolventes, un sistema de eliminación de burbujas (desgasificador) y un sistema automatizado de inyección de muestra.
2. Equipo de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) Sciex 6500+ QqQ con ionización de electrospray con ambos modos de ionización, positiva y negativa, en el mismo ciclo de análisis.
3. Equipo de obtención de agua Milli-Q ultrapura: El agua ultrapura se obtiene con el sistema de purificación Milli-Q Advantage A10 de Merck Millipore de la marca Waters Chromatography.
4. Evaporador asistido por nitrógeno: El sistema utilizado para evaporar es el Organomation N-Evap 11250.
 - Centrífuga de tubos Falcon de 50 mL: El modelo de centrífuga utilizado es la Thermo Cientific Legent RT+.
 - Agitador Advanced Vortex Mixer Velp Scientifica
5. Equipo de ultrasonidos. Modelo Sonorex Digitex Bandelin Ultrasonic bath

- **Material de laboratorio:**

- Instrumentación habitual de laboratorio.
- Capilares de vidrio Vitrex (20, 50, 100 y 200 μL).
- Micropipeta y puntas de micropipeta.
- Cartuchos extracción en fase solida OASIS HLB 3CC 60 mg fase estacionaria.
- Jeringas de plástico de 2 y 5 mL con sus puntas (microlances).
- Filtro de jeringa de Nylon de 0.45 μm poro y de PTFE de 0.22 μm .
- Filtros de fibra de vidrio de 0.7 μm , de celulosa de 0.45 μm y de PTFE de 0.22 μm .
- Tubos Falcon de polietileno de 50 mL.

- **Reactivos:**

6. Nitrógeno seco 99.9% de pureza.
7. Metanol, acetonitrilo y ácido fórmico pureza LC/MS (>99%).
8. Ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) con pureza mayor 99.9%.
9. Disolventes orgánicos para lavado del material (agua Milli-Q, etanol y acetona).

10. Patrones de los 60 analitos a estudiar y patrones internos deuterados de 16 de ellos.

11. Adsorbente PSA ExtraBond Scharlau

5.2 Muestreo de las matrices analizadas

Se van a analizar muestras de dos tandas de funcionamiento de un fotobiorreactor en condiciones similares: una de invierno (primera quincena de febrero del año 2021) y otra de verano (primera quincena de julio del año 2021) para ver si hay variaciones en la eliminación y actuación de las microalgas del fotobiorreactor.

Se analizan además dos reactores diferentes (uno dopado y uno sin dopar). A lo largo de la quincena estudiada se recogen alícuotas de agua (efluente, influente) como de biomasa algal en 6 días diferentes (cada tres días) para su análisis en el laboratorio.

Por tanto, se van a analizar grupos de muestras acuosas (entrada y salida del fotobiorreactor) y muestras semisólidas (biomasa algal) para una tanda de invierno y otra de verano en cada reactor estudiado.

5.2.1 Reactor dopado

Se dopa con grandes concentraciones de 6 PPCPs (Sulfamethoxazole, Trimethoprim, Metronidazole, Ofloxacin, Ciprofloxacina y Diclofenac) para determinar el alcance de la capacidad de eliminación que tiene el fotobiorreactor en estos 6 analitos. En el caso del reactor dopado se dopa continuamente el influente el reactor llena dos veces (dos muestras acuosas de entrada), y se muestrea dos veces: una al principio de la quincena y otra al final, entre ellas se van sacando porciones de líquido (6 muestras acuosas de salida) y alga (6 muestras de alga) para analizarlas cada tres días.

Tabla 5: Días de muestreo de cada matriz estudiada del fotobiorreactor dopado

Muestreo	Día (febrero o julio)	Muestras de análisis
1	3	Entrada 1 / Salida 1 / Biomasa algal 1
2	5	Salida 2 / Biomasa algal 2
3	8	Salida 3 / Biomasa algal 3
4	10	Salida 4 / Biomasa algal 4
5	12	Salida 5 / Biomasa algal 5
6	15	Entrada 6 / Salida 6 / Biomasa algal 6

5.2.2 Reactor no dopado

Un reactor no dopado, en el que se analizan 60 PPCPs para determinar en una matriz acuosa real de agua residual urbana la eliminación lograda con el fotobiorreactor para esos analitos. En el caso del reactor no dopado se muestrea cada tres días de agua y algas (6 muestras acuosas de entrada, salida y de algas).

Tabla 6: Días de muestreo de cada matriz estudiada del fotobiorreactor no dopado

Muestreo	Día (febrero o julio)	Muestras de análisis
1	3	Entrada 1 / Salida 1 / Biomasa algal 1
2	5	Entrada 2 / Salida 2 / Biomasa algal 2
3	8	Entrada 3 / Salida 3 / Biomasa algal 3
4	10	Entrada 4 / Salida 4 / Biomasa algal 4
5	12	Entrada 5 / Salida 5 / Biomasa algal 5
6	15	Entrada 6 / Salida 6 / Biomasa algal 6

5.3 Preparación de patrones de calibración

En el procedimiento experimental se van a determinar concentraciones de PPCPs en disoluciones de muestras acuosas y biomasa algal mediante un calibrado matriz-patrón, para lo que es necesario dopar las muestras de efluente, influente y algas antes de llevar a cabo la preparación de muestra. Para la realización de estos calibrados se preparó un composite con las alícuotas de muestra del mismo tipo que se recogieron en diferentes días.

Este dopado de muestras va a realizarse añadiendo a las muestras a estudiar cierto volumen de disolución estándar ya preparada. Cada patrón preparado de esta manera tendrá por lo tanto una concentración y al medirse se obtendrá la recta de calibrado matriz-patrón a partir de la cual se determinará la concentración de la muestra sin dopar.

Para preparar estos patrones se usan varias disoluciones patrón ya preparadas, con concentraciones distintas para facilitar la preparación de las disoluciones del calibrado patrón deseado. Sus concentraciones son las siguientes (mostradas también en tabla 7):

- Standard Solution (SS): Disolución estándar de 20 mg/L.
- Standard Solution' (SS'): Disolución estándar de 2 mg/L (1:10 de la SS).

- T: Disolución estándar de 0.5 mg/L (1:4 de la SS').
- T': Disolución estándar de 0.05 mg/L (1:10 de la T).
- T'': Disolución estándar de 0.005 mg/L (1:10 de la T').
- T^x: Disolución estándar de 0.5/10^x mg/L (1:10 de la T^{x-1}).

Además, hay ciertos analitos de los que se dispone de un patrón interno disponible, el mismo compuesto deuterado. Se utilizan estos patrones internos para preparar otras disoluciones estándar con ellos de igual manera que con los patrones de los propios analitos. Son las siguientes:

- Internal Standard Solution (iSS): Disolución de patrones internos estándar de 20 mg/L.
- Internal Standard Solution' (iSS'): Disolución de patrones internos estándar de 2 mg/L.
- C: Disolución de patrones internos estándar de 0.5 mg/L.

Estas disoluciones contienen los siguientes patrones deuterados:

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| 1. Sulfadiazine-d4 | 9. Methylparaben-d4 |
| 2. Sulfadimidine-d4 | 10. Ethylparaben-d5 |
| 3. Ciprofloxacin-d8 | 11. Propylparaben-d7 |
| 4. Sulfamethoxazole-d4 | 12. Clofibric acid-d4 |
| 5. Danofloxacin-d3 | 13. Naproxen-d3 |
| 6. Enrofloxacin-d3 | 14. Diclofenac-d4 |
| 7. Salicylic acid-d4 | 15. Ibuprofen-d3 |
| 8. Bisphenol A-d8 | 16. Triclosan-d3 |

Tabla 7: Disoluciones madre utilizadas y sus concentraciones

Disolución madre		Concentración (mg/L)	Concentración (µg/L)
SS	iSS	20	
SS'	iSS'	2	
T	C	0,5	500
T'		0,05	50
T''		0,005	5
T'''		0,0005	0,5
T ^{IV}		0,00005	0,05

*Todas ellas son preparadas en metanol.

5.4 Preparación de muestra

5.4.1 Muestras acuosas

En el análisis de muestras acuosas se realiza un pretratamiento que consiste en una centrifugación inicial y, tras ello, una doble filtración (por 0.7 μm y 0.45 μm) de dicha fase acuosa retirando el sólido precipitado y una congelación final hasta que se vaya a usar para preparar la línea de calibrado.

En el paso de centrifugación se usan frascos de 250 mL en la centrífuga. El programa usado para eliminar las partículas en suspensión fue de 10000 rpm durante 10 minutos. Al sacar los frascos se observan partículas en el fondo y una fase acuosa.

En el paso de filtración se realiza primero con discos de fibra de vidrio de 0.7 μm echando la muestra acuosa directamente de los frascos de la centrífuga y evitando en lo posible que caiga el precipitado para no saturar el filtro. Tras ello se toma esa muestra y se vuelve a filtrar con un filtro de disco de celulosa de 0.45 μm . La primera filtración fue para minimizar las partículas de gran tamaño en el filtro de 0.45 μm y evitar así su obturación.

Terminado el pretratamiento tenemos la muestra acuosa filtrada por 0.45 μm y pasamos a introducirla en frascos de 500 mL de PET ámbar (es ámbar debido a que algunos de los analitos como las ciclinas son fotosensibles y se degradan) y se congelan (para evitar que bacterias en la muestra degraden algunos analitos).

La noche antes del día de preparación se descongelan las muestras. Si se observan partículas en suspensión tras esa descongelación se vuelve a filtrar con un filtro de 0.45 μm .

Se pasa a preparar las disoluciones con que se realizarán las líneas de calibrado matriz-patrón. Dependiendo el punto de la recta de calibrado se añadirá a un matraz de 100 mL un volumen de una determinada disolución estándar y se añadirán 100 μL de la disolución C (patrones internos de 0.5 mg/L) para, finalmente enrasar con la matriz-composite (agua residual entrada o salida del fotobiorreactor).

En el caso de las muestras acuosas no es necesario más pretratamiento como hacer una extracción en fase sólida ya que se pueden inyectar por inyección directa dichas muestras dopadas preparadas en el cromatógrafo (UHPLC-MS/MS) y cuantificarse mediante inyección directa de 200 µL en el caso de agua residual de entrada a la depuradora y 400 µL en el caso del efluente de ella (Serna, 2021).

Para ello se toman 1,5 mL de disolución del matraz preparado y se vierten en un vial cromatográfico ámbar que se congela a -82°C hasta el día de inyectar que se descongela y se inyecta directamente.

La preparación para las muestras analizadas es similar a la preparación de las muestras usadas para hacer la línea de calibrado, excepto que se dopaban sólo con los patrones internos.

5.4.2 Muestras de biomasa algal

Para las muestras de alga la preparación de muestra es como sigue:

1. Se trituran 0,3 gramos de biomasa y se echan en el tubo Falcon.
2. Se dopa con las disoluciones patrón la biomasa algal y se deja evaporar el metanol (disolvente de la disolución patrón) durante una noche.
3. Se añade 0.3 gramos de PSA activado (90°C durante 16 horas) al tubo Falcon, de modo que este en proporción 1:1 con la biomasa.
4. Se vierten 10 mL de disolución MeOH/H₂O (10/90 v/v) al tubo Falcon.
5. Se agita el tubo Falcon con Vortex durante 1 minuto.
6. Se realiza una primera extracción asistida con ultrasonidos de dicha mezcla durante 15 minutos a 25°C (60 Hz, 50W).
7. Se centrifuga la mezcla resultante durante 10 minutos a 7800 rpm.
8. Se toman 6 mL del sobrenadante centrifugado y se filtra con un filtro de fibra de vidrio de 0,7 µm de tamaño de poro pasando los 6 mL a un matraz de 100 mL.
9. Se realiza una segunda extracción del centrifugado restante con 15 mL MeOH/H₂O (10/90 v/v) y echando los 9 mL del sobrenadante final de esa última extracción en el mismo matraz de la primera extracción.
10. Se vierten 2 mL de una disolución de AEDT al 5% al matraz.
11. Se enrasa todo ello a 100 mL en el matraz con agua Milli-Q.

5.4.2.1 Extracción en fase sólida (SPE)

Se realiza con los extractos de biomasa algal, partiendo del volumen preparado en el matraz de 100 mL y se sigue el mismo procedimiento de extracción. Para la SPE se emplean de cartuchos OASIS HLB 3CC con 60 mg fase estacionaria en una cubeta que permite la extracción con hasta 20 cartuchos a la vez conectados a vacío. El proceso de extracción es el siguiente (Lopez-Serna, 2022):

1. **Activación del cartucho:** Se rellenan los cartuchos con metanol (2x3 mL aproximadamente) y se deja que vaya cayendo por gravedad por los cartuchos activándolos.

2. **Acondicionamiento del cartucho:** Se rellenan los cartuchos con agua Milli-Q (3 mL aproximadamente) dejándolo caer igual que antes por gravedad. Se repite de nuevo de forma que pasan también cerca de 6 mL de agua ultrapura.

3. **Extracción de la muestra con el cartucho:** Se conectan los cartuchos a los recipientes que contienen nuestras disoluciones preparadas y activando la bomba de vacío se va realizando la extracción de todas ellas simultáneamente.

4. **Lavado del cartucho:** Se rellena el cartucho con una disolución del 5% de metanol en agua y se deja caer por gravedad, ayudándose a veces con un pequeño encendido de la bomba de vacío para ayudar a pasar esta mezcla que pasa muy lentamente.

5. **Secado del cartucho:** Se enciende la bomba durante 20 minutos con el fin de secar totalmente los cartuchos.

6. **Elución del cartucho:** Tras la extracción hay que realizar el paso de elución, cuya finalidad es redissolver los compuestos que se han extraído en el cartucho. Ha de usarse un disolvente capaz de redissolver los compuestos (mucho solubilidad de los analitos en el disolvente y poca de posibles impurezas).

La elución se lleva a cabo en la cubeta usada en la extracción colocando bajo el cartucho un tubo de ensayo para recoger dicho líquido. Finalmente se realiza la elución con 2x3 mL de acetonitrilo y dejando que caiga por gravedad.

7. **Evaporación:** Se lleva a cabo la evaporación del extracto a temperatura ambiente bajo una corriente de nitrógeno.

Tras ello, los analitos se encontrarán en las paredes del tubo de ensayo, por ello se realiza una redisolución de estos con 1.5 mL de metanol (en 3 vertidas de 0.5 mL cada una) sobre las paredes del tubo y se recoge el metanol con una pipeta Pasteur y se deja caer por las paredes varias veces. Todo esto para tratar de lograr que no quede apenas nada adherido en las paredes superiores.

Se pasan esos 1.5 mL de metanol a un vial de inyección y se repite la evaporación bajo nitrógeno y cuando no queda líquido se congelan dichos viales ``vacíos`` (en realidad los analitos estarán adheridos a las paredes) a -82°C .

En el momento de la inyección se saca esos viales y se vierte en ellos 1 mL de la fase móvil que se usará en la cromatografía (5% de metanol en agua con 0.1 % de ácido fórmico), se agita bien y se toma todo con una jeringa y usando un filtro de jeringa de PTFE de $0.22\ \mu\text{m}$ se filtra sobre un vial de cromatografía ámbar que es finalmente inyectado.

5.5 Determinación cromatográfica

5.5.1 Separación cromatográfica

Para determinar la concentración de los analitos a estudiar, la separación cromatográfica se realizó en una columna EVO-C18 (Phenomenex) de 5 cm de longitud, un diámetro interno de 2.1 mm y un tamaño de partícula de $1.7\ \mu\text{m}$.

La fase móvil utilizada es una mezcla agua/metanol, de proporciones variables según un gradiente, con 0.1% de ácido fórmico. El gradiente de concentraciones comienza siendo metanol al 5% en agua durante 1 minuto, aumenta la concentración del metanol al 95% durante 2 minutos y se mantiene constante en ese valor durante 3 minutos, tras ello disminuye la concentración de metanol hasta el 5% durante 4 minutos y se mantiene en esa concentración otros 4 minutos (reequilibrio del sistema).

El flujo de fase móvil se mantiene constante en 0.5 mL/min, la temperatura de operación también es fija en 40°C . El volumen de inyección sin embargo es variable según el tratamiento sea inyección directa en el agua residual urbana (200 μL para el influente y 400 μL para el efluente) o SPE-Offline en biomasa algal (10 μL).

5.5.2 Detección cromatográfica

Para realizar la detección y determinación de los analitos estudiados se ha utilizado un sistema de espectrometría de masas acoplado al sistema cromatográfico UHPLC. Un sistema de espectrometría de masas está formado por varias partes:

- Sistema de introducción de muestra: es un capilar de nebulización.
- Fuente de ionización: por la cual se ionizan los analitos y compuestos coextraídos, nuestro aparato ha utilizado una ionización blanda de tipo electrospray en modo positivo y negativo con los siguientes parámetros:

- Flujo de N₂ (gas de nebulización): 45 unidades
- Capilar de ionización o voltaje del electrodo: 4500 V
- Gas cortina (N₂): 35 unidades
- Gas de secado: 45 unidades
- Temperatura del gas de secado: 400°C

- Analizador de masas: es el encargado de separar los iones con diferente relación de masa/carga (m/z) aplicando un ultra alto vacío con el fin de evitar colisiones de los iones de analito con otras partículas gaseosas. En este caso se ha utilizado un triple cuadrupolo (QQQ) ya que se trata de un espectrómetro de masas en tándem.

En el primer cuadrupolo se selecciona el pseudoión molecular de cada droga que se fragmenta en el 2º cuadrupolo mediante una energía de colisión aplicada por el gas N₂ en condiciones de alta energía.

Esto permite monitorizar dos de las transiciones (ión padre-fragmento) que son característicos de cada compuesto, siendo normalmente la primera transición la más intensa y, por ello la utilizada para cuantificar. La segunda transición sirve para comprobar que se está integrando el pico correcto ya que debe aparecer al mismo tiempo de retención que la primera transición.

- Detector: permite revelar el ión que nos interesa y proporcionar una señal eléctrica que es proporcional a la concentración del compuesto.

5.5.3 Parámetros de análisis por compuesto

Tabla 8: Parámetros de análisis del espectrómetro de masas para cada analito

RT (min)	Compuesto	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
0.64	Amoxicillin 1	365.9	348.9	26	13	28
	Amoxicillin 2		114.2	26	29	12
0.8	Atenolol 1	267.1	145.1	11	33	24
	Atenolol 2		190.3	11	29	4
0.91	Metronidazole 1	172.0	128.4	41	21	6
	Metronidazole 2		82.1	41	35	14
1.13	Acetaminophen 1	151.9	110.0	61	23	16
	Acetaminophen 2		108.9	61	55	14
1.15	Iohexol 1	821.8	804.1	126	33	26
	Iohexol 2		602.8	126	43	46
1.5	Sulfadiazine 1	251.0	155.9	71	23	20
	Sulfadiazine 2		108.2	71	31	12
1.84	Sulfathiazole 1	255.9	155.9	96	21	8
	Sulfathiazole 2		108.1	96	33	12
1.93	Sulfapyridine 1	250.1	156.1	61	23	10
	Sulfapyridine 2		108.1	61	35	12
2.18	Trimethoprim 1	291.0	230.1	51	33	18
	Trimethoprim 2		261.1	51	35	16
2.77	Marbofloxacin 1	362.9	320.1	66	23	24
	Marbofloxacin 2		326.7	66	25	24
3.3	Tetracycline 1	445.0	410.2	51	27	32
	Tetracycline 2		427.1	51	19	32
3.57	Apramycin 1	271.0	156.1	50	20	19
	Apramycin 2		180.0	50	40	19
3.61	Sulfamethizole 1	270.9	156.1	31	21	10
	Sulfamethizole 2		108.1	31	35	12
3.64	Oxytetracycline 1	460.9	426.1	151	27	30
	Oxitetracycline 2		442.9	151	19	32
3.68	Caffeine 1	195.0	137.9	71	27	18
	Caffeine 2		110.6	71	31	16
3.76	Sulfadimidine 1	278.9	186.7	86	25	22
	Sulfadimidine 2		124.1	86	33	6

3.82	Ofloxacin 1	362.0	318.3	86	29	26
	Ofloxacin 2		261.1	86	37	14
3.9	Levofloxacin 1	362.0	318.1		27	20
	Levofloxacin 2		261.0		37	24
3.93	Norfloxacin 1	320.1	276.2	96	27	18
	Norfloxacin 2		233.1	96	37	16
4.04	Ciprofloxacin 1	332.0	313.9	31	29	38
	Ciprofloxacin 2		231.1	31	57	16
4.15	Sulfamethoxazole 1	253.9	156.2	66	23	24
	Sulfamethoxazole 2		108.0	66	33	16
4.16	Danofloxacin 1	357.9	340.1	86	33	24
	Danofloxacin 2		314.1	86	27	38
4.18	Enrofloxacin 1	359.9	316.2	91	29	38
	Enrofloxacin 2		341.9	91	33	38
4.18	Florfenicol 1	357.8	339.9	66	13	24
	Florfenicol 2		241.3	66	25	14
4.43	4-Hydroxybenzoic acid 1	136.8	92.8	-5	-16	-15
	4-Hydroxybenzoic acid 2		64.9	-5	-40	-13
4.42	Salicylic acid 1	136.9	93.5	-40	-22	-15
	Salicylic acid 2		94.7	-40	-38	-33
4.46	Bisphenol A 1	227.0	227.1	-60	-14	-15
	Bisphenol A 2		211.1	-60	-26	-13
4.47	Propranolol 1	260.1	183.1	66	25	12
	Propranolol 2		116.1	66	25	8
4.48	Methylparaben 1	152.9	120.9	66	21	14
	Methylparaben 2		108.9	66	15	30
4.52	Doxycycline 1	444.9	427.9	111	27	34
	Doxycycline 2		410.1	111	37	36
4.72	Tiamulin 1	494.1	192.2	51	29	10
	Tiamulin 2		119.7	51	59	12
4.79	Tylosin 1	916.2	772.3	156	43	36
	Tylosin 2		174.1	156	51	10
4.84	Ethylparaben 1	164.9	136.9	-35	-20	-11
	Ethylparaben 2		136.8	-35	-20	-13
4.86	Nalidixic acid 1	233.1	187.1	21	37	18
	Nalidixic acid 2		159.9	21	45	18

4.92	Clarithromycin 1	748.3	590.2	96	25	40
	Clarithromycin 2		157.9	96	41	26
4.93	Carbomazepine 1	237.0	194.2	66	29	12
	Carbomazepine 2		193.3	66	47	6
4.98	Penicillin G 1	334.9	160.0	111	23	18
	Penicillin G 2		176.6	111	19	16
5.02	Atrazine 1	216.0	173.9	71	25	22
	Atrazine 2		103.9	71	41	16
5.03	DEET 1	192.0	119.3	56	23	10
	DEET 2		90.3	56	41	10
5.03	Propylparaben 1	178.9	137.1	-60	-20	-13
	Propylparaben 2		136.1	-60	-24	-7
5.06	Erythromycin 1	734.2	576.1	46	25	36
	Erythromycin 2		157.8	46	37	22
5.06	Dexamethasone 1	392.9	355.1	41	19	20
	Dexamethasone 2		147.3	41	39	10
5.13	4-nonylphenol 1	219.1	132.9	-65	-42	-7
	4-nonylphenol 2		117.0	-65	-80	-13
5.14	Clofibric acid 1	212.9	127.1	-35	-24	-15
	Clofibric acid 2		85.0	-35	-14	-9
5.14	Naproxen 1	231.1	185.1	56	21	12
	Naproxen 2		170.5	56	37	10
5.14	Fenbendazol 1	299.9	268.1	96	29	22
	Fenbendazol 2		159.9	96	49	10
5.25	Octylphenol 1	204.9	205.1	-200	-14	-19
	Octylphenol 2		148.3	-200	-26	-7
5.32	Atorvastatin 1	559.2	440.2	26	33	38
	Atorvastatin 2		250.1	26	59	18
5.37	Diclofenac 1	293.9	250.3	-10	-18	-7
	Diclofenac 2		214.1	-10	-28	-9
5.37	Ibuprofen 1	205.0	159.1	-35	-10	-15
	Ibuprofen 2		160.9	-35	-12	-21
5.38	Clofibrate 1	243.0	169.4	86	17	22
	Clofibrate 2		197.2	86	13	10
5.39	Progesterone 1	315.1	109.2	141	31	10
	Progesterone 2		297.2	141	23	28

5.5	Triclosan 1	286.8	286.9	-90	-6	-17
	Triclosan 2		141.8	-90	-48	-15
5.54	Estrone (E1) 1	271.1	253.3	101	19	10
	Estrone (E1) 2		133.1	101	35	12
5.55	β -Estradiol (E2) 1	273.0	255.0	46	17	14
	β -Estradiol (E2) 2	273.1	107.8	61	41	14
5.56	17- α -Ethinylestradiol 1	297.1	107.7	81	33	12
	17- α -Ethinylestradiol 2	297.1	77.1	71	79	10
5.63	Crotamiton 1	204.1	69.4	61	35	12
	Crotamiton 2		136.1	61	27	14
5.9	Gemfibrozil 1	248.9	121.0	-5	-30	-7
	Gemfibrozil 2		127.5	-85	-14	-5
5.84	Acetylsalicylic acid 1	181.1	160.9	71	17	14
	Acetylsalicylic acid 2		125.1	71	19	16
5.95	1,4-Benzoquinone 1	109.0	80.9	121	19	4
	1,4-Benzoquinone 2		53.3	121	29	12

Tabla 9: Parámetros de análisis del espectrómetro de masas para cada patrón interno deuterado

RT (min)	Compuesto	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
1.5	Sulfadiazine-d4	255.075	160	51	23	16
3.76	Sulfadimidine-d4	283.053	186	61	25	20
4.04	Ciprofloxacin-d8	340.107	322.1	46	31	20
4.15	Sulfamethoxazole-d4	258.064	160.1	41	23	10
4.16	Danofloxacin-d3	361.059	343.1	66	35	20
4.18	Enrofloxacin-d5	364.923	321	91	29	20
4.42	Salicylic acid-d4	140.93	97	-30	-22	-5
4.46	Bisphenol A-d8	235.064	137	-80	-38	-7
4.48	Methylparaben-d4	156.971	125.1	81	23	12
4.84	Ethylparaben-d5	169.898	137.9	-45	-20	-7
5.03	Propylparaben-d7	185.991	136.1	-45	-24	-9
5.14	Clofibric acid-d4	216.924	130.8	-5	-28	-13
5.14	Naproxen-d3	234.107	188.1	41	21	10
5.37	Diclofenac-d4	297.961	254	-5	-18	-31
5.37	Ibuprofen-d3	208.034	161.1	-15	-12	-17
5.5	Triclosan-d3	289.897	289.9	-5	-6	-21

Las tablas 8 y 9 muestran los diferentes parámetros de operación óptimos para cada compuesto como son la masa del pseudoión molecular (Q1), la masa del fragmento (Q3), el potencial de entrada al orificio (entrada al espectrómetro de masas, DP), la energía de colisión (necesaria para la fragmentación del pseudoión molecular, CE) y el potencial de salida de la celda de colisión (focaliza los iones antes de su entrada al Q3, CXP). El voltaje EP necesario para la colimación inicial de los iones se ha mantenido constante en un valor de 10 V y el tiempo de observación para cada transición ha sido de 7 ms. Para la adquisición de datos se ha utilizado el software OS de Sciex.

6 RESULTADOS Y DISCURSIÓN

6.1 Líneas de calibrado

Se realizan los calibrados para cada matriz y época estudiada para poder determinar la concentración de los analitos estudiados en cada una de ellas. Por ello, se tienen que realizar 6 calibrados diferentes para verano y otros 6 para invierno: influentes y efluentes acuosos y biomasa algal del fotobiorreactor no dopado; influentes y efluentes acuosos y biomasa algal del reactor dopado (teniendo en cuenta que en cada matriz y calibrado se ha de hacer el calibrado para cada compuesto individualmente).

Para cada una de las matrices se procede a realizar un calibrado de matriz-patrón, debiéndose hacer primero un calibrado adiciones patrón para determinar la concentración de analito presente. Para ello se prepara un composite (mezcla homogénea de las 6 muestras a estudiar de cada matriz) y se realiza el calibrado adiciones patrón dopando alícuotas del composite, y preparando dos blancos. Posteriormente se prepara el calibrado matriz-patrón representativo de cada matriz que es el que se utiliza para cuantificar los analitos en las 6 muestras individuales.

Con ese calibrado preparado a partir del composite se cuantifica cada analito si aparece señal en los blancos de muestra. Si no aparece señal en los blancos del composite es previsible que ninguna de las 6 muestras contenga el analito por encima del límite de detección (LOD).

Con la concentración calculada en el composite se recalculan las concentraciones reales de cada patrón (sumando la concentración sin dopar determinada y sumándole la

concentración de dopaje) y se prepara el mencionado calibrado matriz-patrón con esas concentraciones reales.

Además de los patrones, se analizan las 6 muestras de forma individual. Con la señal obtenida de esas muestras se determina por interpolación de la recta del calibrado matriz-patrón la concentración de cada una de las muestras.

Este procedimiento de preparación de patrones a partir de un composite que contenga una mezcla homogénea de las muestras, preparación de muestras individuales y posterior análisis de todo ello se lleva a cabo para las 3 matrices diferentes (influyente, efluente y biomasa) para los 2 fotobiorreactores (dopado y no dopado) y en las 2 épocas del año estudiadas (verano e invierno).

Es importante destacar que en el fotobiorreactor dopado solo se va a analizar la presencia de los 6 analitos dopados (Sulfamethoxazole, Trimethoprim, Metronidazole, Ofloxacin, Ciprofloxacin y Diclofenac).

Las líneas de calibrado realizadas son diferentes para cada una de las matrices acuosas estudiadas, tanto en las concentraciones añadidas de los patrones para dopar las diferentes alícuotas de las líneas de calibrado como en las diluciones del composite según la concentración esperada en las muestras:

Tabla 10: Rango de calibración y diluciones utilizadas para cada matriz líquida estudiada

Invierno y verano							
Influyente no dopado		Efluente no dopado		Influyente dopado		Efluente dopado	
Rango de patrones (mg/L)	0.005-40	Rango de patrones (mg/L)	0.005-40	Rango de patrones (mg/L)	0.025-5	Rango de patrones (mg/L)	0.01-20
Dilución composite	1:1	Dilución composite	1:1	Dilución composite	1:200	Dilución composite	1:4
Dilución muestras	1:1	Dilución muestras	1:1	Dilución muestras	1:200	Dilución muestras	1:4

En el caso de influente y efluente del reactor no dopado no se realiza ninguna dilución ni en el composite ni en las muestras individuales. Para el composite se toman 200 mL de cada muestra (1200 mL) y para las muestras individuales se toman 100 mL de cada una a un matraz sin diluir.

En el caso del influente del reactor dopado se diluye 200 veces. Se toman 5 mL de cada muestra (10 mL totales) enrasando a 2000 mL con agua Milli-Q teniendo la matriz diluida 1:200. Las muestras individuales se toman 0.5 mL enrasando a 100 mL estando por ello diluidas 1:200 también.

En el caso del efluente del reactor dopado por ejemplo se tenían 6 muestras individuales y para preparar el composite se mezclaron 100 mL de cada muestra (600 mL) y se llevan a 2400 mL enrasando con agua Milli-Q teniendo por ello diluida la matriz de muestra 1:4. Para las muestras individuales se tomaron 25 mL de muestra y se enrasó a 100 mL con agua Milli-Q estando también por ello diluidas 1:4.

Las líneas de calibrado para la biomasa algal son iguales en el reactor dopado y no dopado y en ambas etapas estudiadas como puede verse en la tabla 11.

Tabla 11: Rango de calibración y diluciones utilizadas para el estudio de biomasa

Biomasa algal	
Rango de patrones (ng/g liofilizado)	16.6-2000
Dilución composite	1:1
Dilución muestras	1:1

En el caso de la biomasa, el composite se prepara mezclando 0,7 gramos de cada muestra de algas trituradas (4,2 g totales). Para cada muestra individual se toman 0,3 gramos de cada muestra. No hay ninguna dilución.

Se muestra en la tabla 12 los puntos de calibrado estudiados en cada matriz para invierno y verano. En esta se muestra el nombre de patrón y la concentración de dopado del mismo para tanto la campaña de invierno como la de verano.

Tabla 12: Líneas de calibrado para cada matriz estudiada

Invierno y verano							
Influente y efluente no dopado		Influente dopado		Efluente dopado		Biomasa algal	
Nombre patrón	C dopado (µg/L)	Nombre patrón	C dopado (µg/L)	Nombre patrón	C dopado (µg/L)	Nombre patrón	C dopado (ng/g liofilizado)
P1	40	P1	5	P1	20	P1	2000
P2	30	P2	4	P2	10	P2	1333
P3	20	P3	3	P3	4	P3	667
P4	10	P4	2	P4	3	P4	333
P5	2	P5	1,50	P5	2,5	P5	167
P6	1	P6	1	P6	2	P6	100
P7	0,5	P7	0,75	P7	1,5	P7	67
P8	0,05	P8	0,50	P8	1	P8	50
P9	0,01	P9	0,25	P9	0,75	P9	33
P10	0,005	P10	0,10	P10	0,5	P10	17
		P11	0.05	P11	0,05		
		P12	0.025	P12	0,03		
				P13	0,05		
				P14	0,01		

Conociendo estos valores de dopado de cada matriz, en cada fotobiorreactor y cada época estudiada se procede a integrar las áreas de pico en los cromatogramas para poder determinar las concentraciones de cada analito en cada estudio y los límites de cuantificación de cada analito para cada matriz.

6.2 Límites de cuantificación

A partir del programa Sciex OS obtenemos parámetros del cromatograma como es la relación señal-ruido, a partir de la que se puede determinar el límite de cuantificación y detección del método (MLQ y MLD) para cada analito y matriz. Los límites de detección y cuantificación para las muestras acuosas se determinaron en un trabajo previo (citas TFG). Los límites de detección variaban aproximadamente entre 1 – 985 ng/L para el efluente y, 1 - 2192 ng/L para el influente (Serna, 2021). Los límites de cuantificación eran un 3-4 veces superiores. Los límites de detección y cuantificación en el análisis de la biomasa algal se han determinado en este trabajo después de conocer la relación señal-ruido en cromatogramas de extractos con bajas concentraciones de analito.

El límite de cuantificación del método se calcula:

1. Primero, se determina la relación señal/ruido de un patrón del que se conoce su concentración.
2. Se determina el límite de cuantificación del método (MLQ) multiplicando la concentración del patrón por 10 y dividiendo el resultado por la relación señal/ruido de ese patrón.

$$MLQ = \frac{10 * Concentración patrón}{Relación Señal/ruido}$$

En la tabla 13 se muestran los MLQ de la biomasa algal en verano e invierno respectivamente para los 40 analitos detectados en dicha matriz. Los MLD de esos mismos analitos son aproximadamente 3 veces menores que los MLQ calculados y mostrados en dicha tabla. En verano el Sulfamethoxazole no fue detectado por lo que no se muestra su MLQ.

Tabla 13: MLD y MLQ determinados para cada analito en biomasa algal en verano e invierno

Verano		
Analito	MLQ (ng L ⁻¹)	MLD (ng L ⁻¹)
PenicillinG	342	114
Oxytetracycline	12	4
Doxycycline	18	6
Marboflaxin	4	1
Erofloxacin	62	20.7
Danofloxacin	13	4
Sulfathiazole	21	7
Sulfamethizole	10	3
Sulfadimidine	12	4
Sulfamethoxazole	4	1
Tylosin	25	8
Tiamulin	44	15
Apramycin	25	8
Trimethoprim	6	2
Florfenicol	291	97
Fenbendazol	5	2
Dexamethasone	60	20
Progesterone	9	3
Methylparaben	13	4
Carbamazepine	2	1
Propanolol	72	24
Metronidazole	48	16
Ofloxacin	7	2
Naproxen	39	13
Clarithromycin	25	8
Erythromycin	434	145
Levofloxacin	9	3
Norfloxacin	799	266
Atorvastatin	8	3
Atenolol	46	15
Atrazine	12	4
DEET	2	1
Ciprofloxacin	18	6
Crotamiton	18	6
Ethylparaben	47	16
Propylparaben	243	81
Diclofenac	147	49
Ibuprofen	861	287
Clofibric acid	146	49
Gemfibrocil	137	46

Invierno		
Analito	MLQ (ng L ⁻¹)	MLD (ng L ⁻¹)
PenicillinG	649	216
Oxytetracycline	8	3
Doxycycline	337	112
Marboflaxin	99	33
Erofloxacin	0.2	0.1
Danofloxacin	23	8
Sulfathiazole	60	20
Sulfamethizole	-	-
Sulfadimidine	14	5
Sulfamethoxazole	526	175
Tylosin	0.6	0.2
Tiamulin	358	119
Apramycin	33	11
Trimethoprim	0.2	0.1
Florfenicol	397	132
Fenbendazol	7	2
Dexamethasone	37	12
Progesterone	297	99
Methylparaben	199	66
Carbamazepine	14	5
Propanolol	338	113
Metronidazole	30	10
Ofloxacin	19	6
Naproxen	56	19
Clarithromycin	20	7
Erythromycin	777	259
Levofloxacin	19	6
Norfloxacin	0.7	0.2
Atorvastatin	12	4
Atenolol	248	83
Atrazine	17	6
DEET	3	1
Ciprofloxacin	34	11
Crotamiton	21	7
Ethylparaben	472	157
Propylparaben	256	85
Diclofenac	256	85
Ibuprofen	1864	621
Clofibric acid	212	71
Gemfibrocil	177	59

6.3 Análisis y tratamiento de datos

6.3.1 Estudio de cromatogramas y obtención de datos

Para el análisis de los cromatogramas se utiliza el programa Sciex OS, a partir del cual realizamos las integraciones de los mismos y extraemos los valores que nos interesan de ellos, como son el área o la relación señal/ruido.

Como se comentó en el apartado 5.5.3 de parámetros cromatográficos, se van a analizar dos transiciones por analito, la principal y la correspondiente a su fragmentación. Se utilizó la primera transición (la más intensa) para la cuantificación y la segunda transición para confirmar que es el analito buscado. Para confirmar que el compuesto detectado es el analito buscado, se comprueba que el tiempo de retención de las dos transiciones es idéntico.

Se muestran a continuación dos ejemplos de cromatogramas de analitos, para ambas transiciones para un patrón de 100 µg/L en biomasa algal no dopada en invierno:

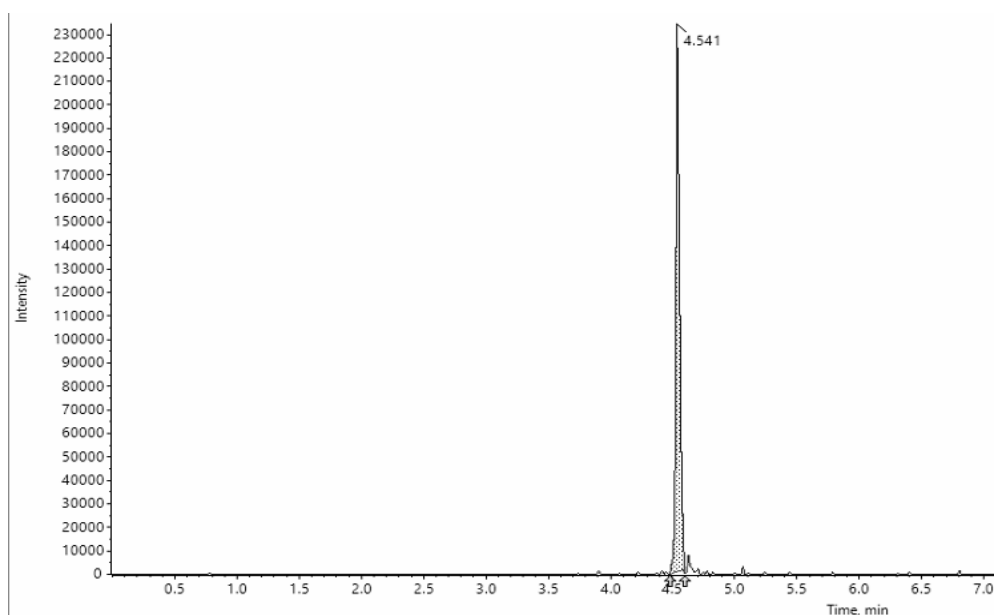


Figura 10: Cromatograma obtenido en la transición 1 del Tiamulin en el análisis de biomasa no dopada de invierno

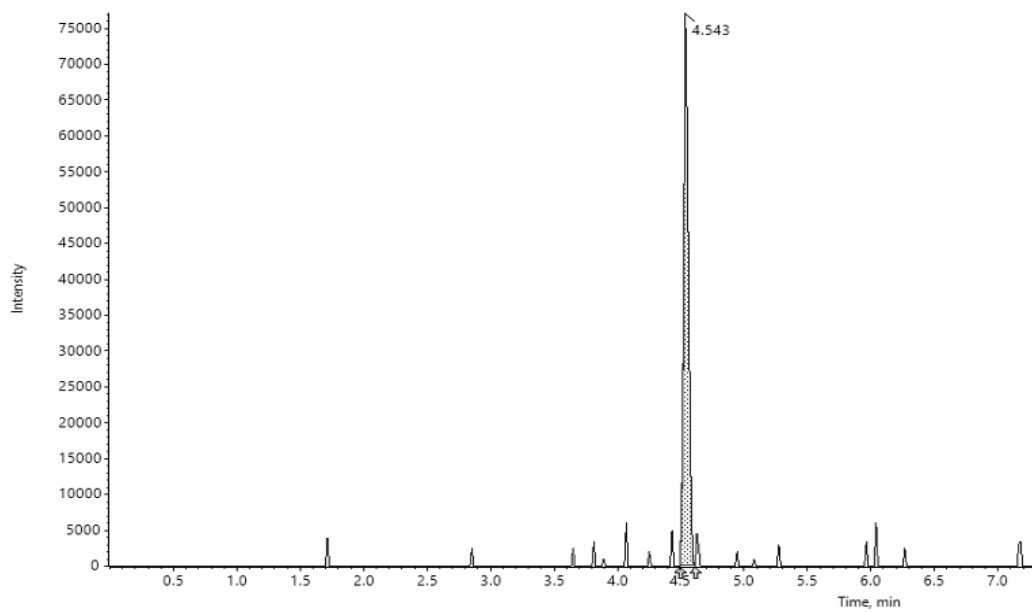


Figura 11: Cromatograma obtenido en la transición 2 del Tiamulin en el análisis de biomasa no dopada de invierno

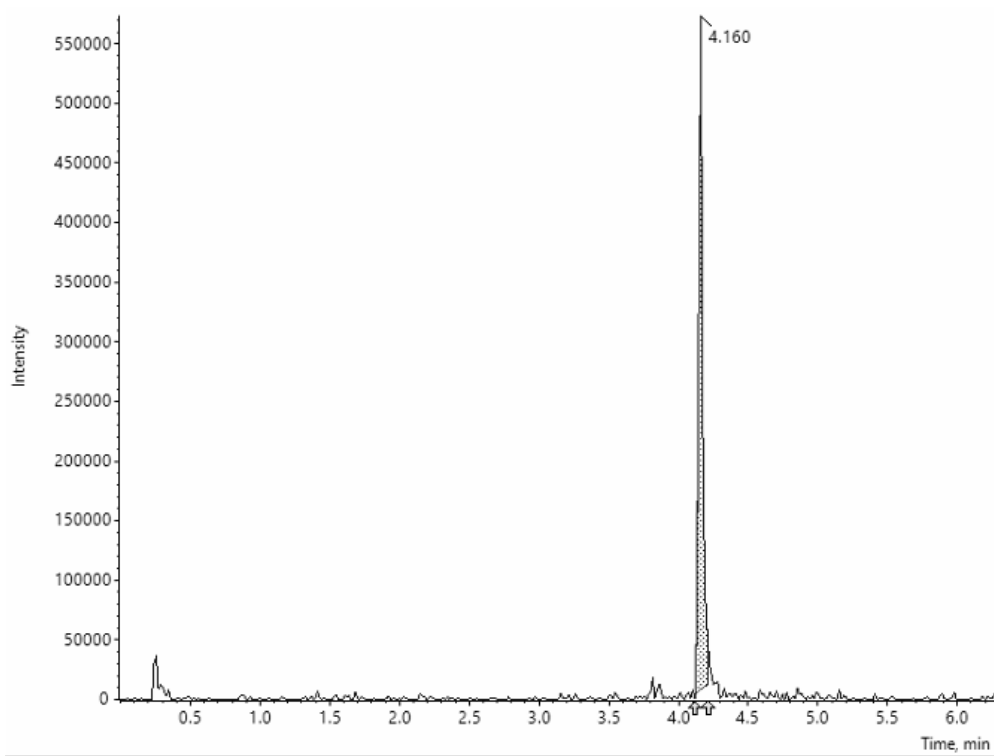


Figura 12: Cromatograma obtenido en la transición 1 del Propanolol en el análisis de biomasa no dopada de invierno

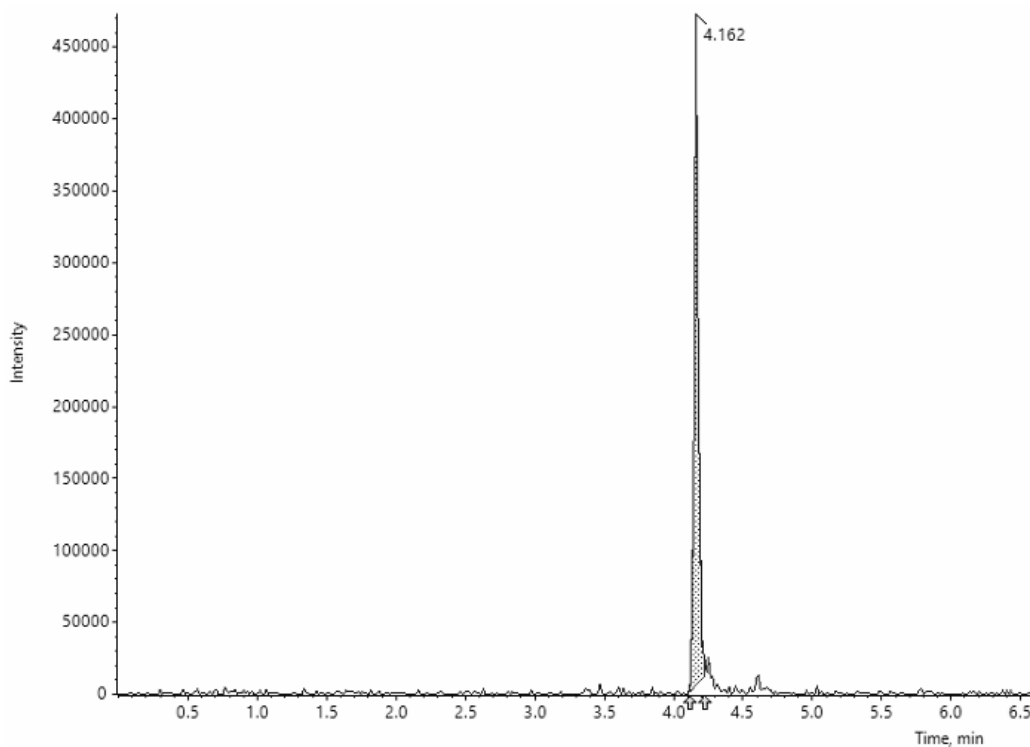


Figura 13: Cromatograma obtenido en la transición 2 del Propanolol en el análisis de biomasa no dopada de invierno

Como puede verse los tiempos de retención son idénticos.

Tras realizar la integración y obtención de los datos del cromatograma de cada patrón de analito preparado se procede a determinar la concentración del blanco del composite (la mezcla de las muestras individuales con las que se prepara el calibrado).

Para la cuantificación de la concentración del blanco se realiza el método de adiciones patrón (MAP) mediante los calibrados mostrados en el apartado de líneas de calibrado (apartado 6.1). Mediante los parámetros de la representación del área de pico frente la concentración de dopado se determina la concentración del blanco (concentración equivalente) determinando la concentración correspondiente a área nula.

$$\text{Área} = \text{pendiente} * \text{Concentración} + \text{ordenada} = 0$$

$$\text{Concentración equivalente} = - \frac{\text{ordenada}}{\text{pendiente}}$$

Se muestran a continuación dos ejemplos de calibrados de adiciones patrón para el efluente acuoso en invierno en las figuras 14 y 15:

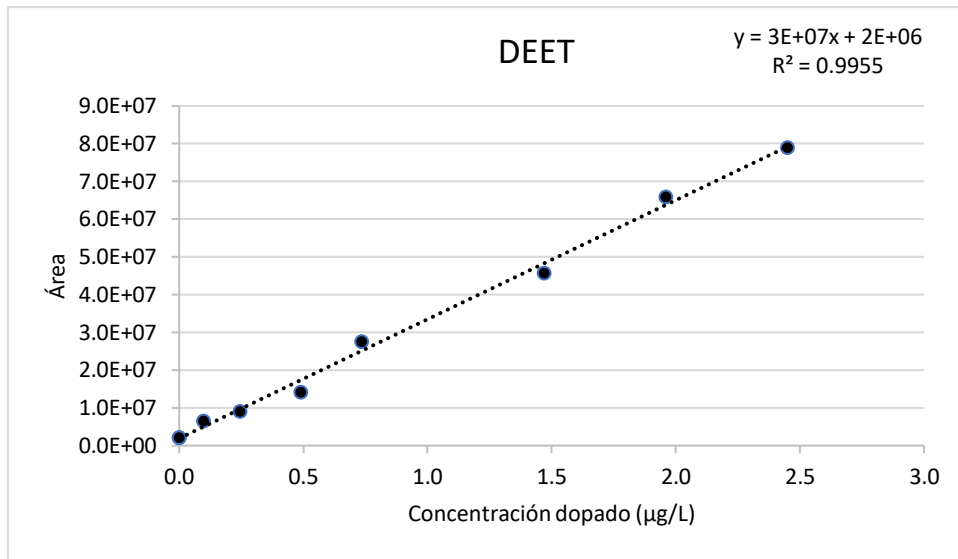


Figura 14: Representación del MAP obtenida para el DEET en el análisis de efluente no dopado de invierno

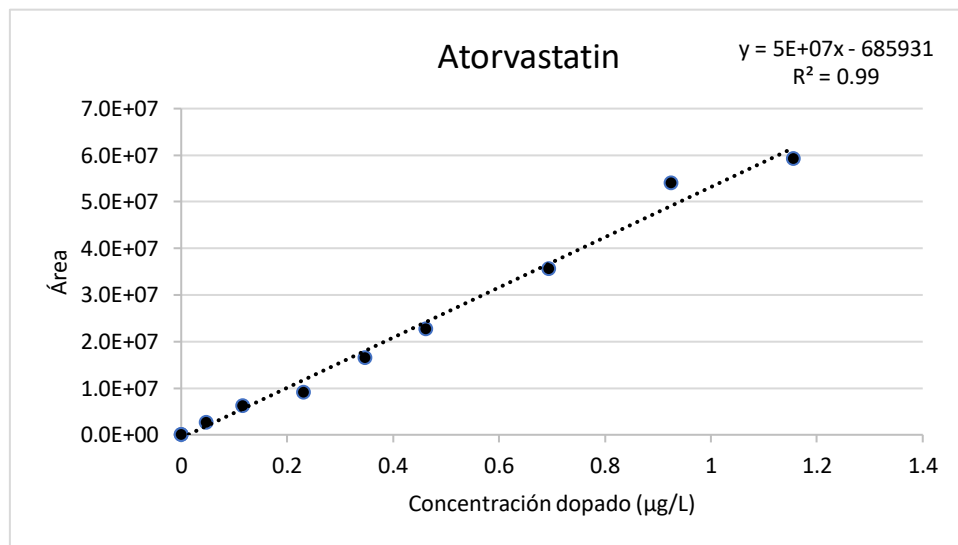


Figura 15: Representación del MAP obtenida para el Atorvastatin en el análisis de efluente no dopado de invierno

Con esas concentraciones equivalentes obtenidas, las del blanco del composite se recalculan las concentraciones reales en cada patrón (la suma de la concentración de dopado más la concentración del blanco).

Con los valores de las concentraciones reales se recalcula el calibrado (calibrado matriz-patrón) y se determinan los parámetros de regresión del mismo. Con esa recta de calibrado determinada y los valores de área de las muestras individuales mediante interpolación se pueden determinar las concentraciones de cada muestra.

Se muestran a continuación esos dos mismos ejemplos de calibrados de adiciones patrón para los calibrados matriz-patrón en el efluente acuoso en invierno:

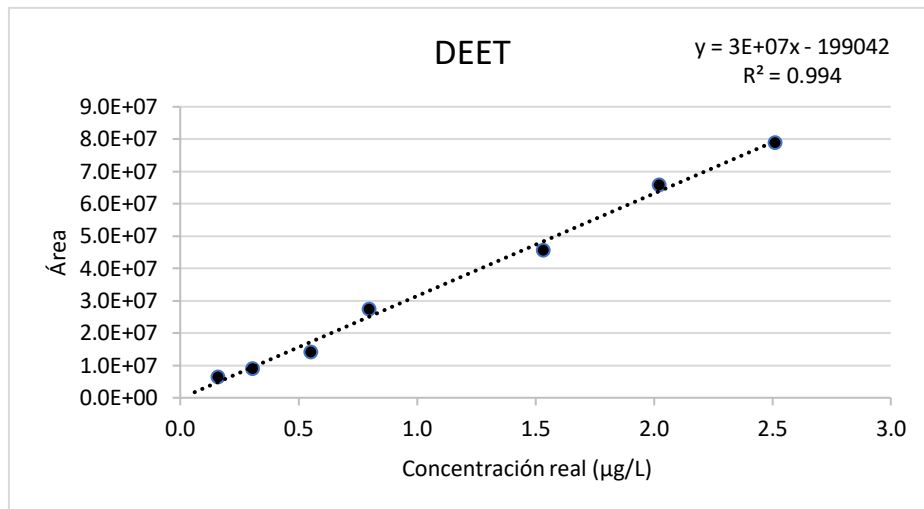


Figura 16: Representación matriz-patrón obtenida para el DEET en el análisis de efluente no dopado de invierno

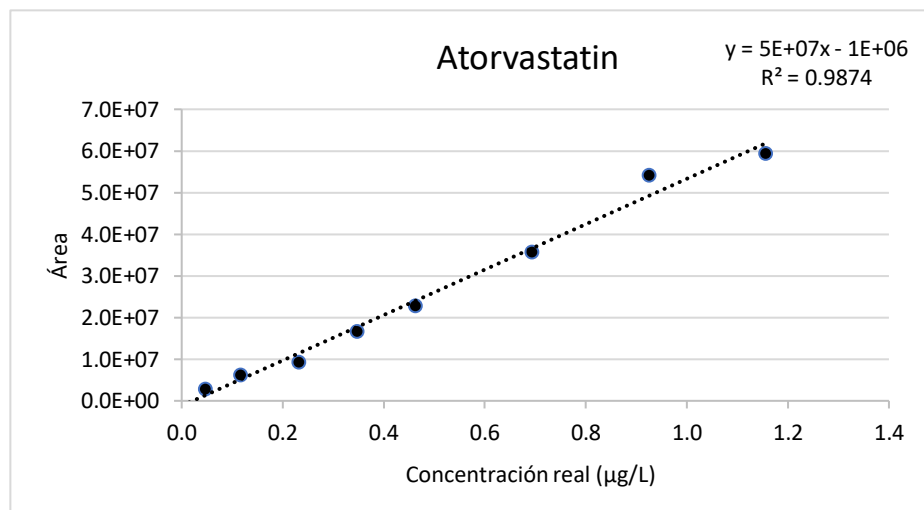


Figura 17: Representación matriz-patrón obtenida para el Atorvastatin en el análisis de efluente no dopado de invierno

Como puede observarse en las figuras 16 y 17 los calibrados dan rectas con pendientes prácticamente idénticas (mismo área y concentraciones iguales con suma de una constante que es la concentración calculada en el MAP) pero ordenadas en el origen muy diferentes.

Con estas rectas mediante interpolación del área de muestras individuales en la ecuación de las mismas, se puede obtener el valor de concentración real de cada muestra.

Es a partir de esas concentraciones ya calculadas individualmente por muestra cuando se deshace la dilución multiplicando por la misma los valores para tener los valores reales sin diluir.

6.3.2 Cálculo de eliminaciones y retención en biomasa

Teniendo los valores de concentración para cada analito en la entrada, salida y biomasa de cada fotobiorreactor (dopado y no dopado) en cada época (invierno y verano) se obtienen los parámetros de: porcentaje de eliminación y retención en biomasa.

El porcentaje de eliminación se determina mediante el cociente de la diferencia de concentraciones entre la entrada y salida del fotobiorreactor frente la concentración de entrada al fotobiorreactor en la misma tanda de la eliminación, es decir, se hace el ratio entre el efluente y el influente separados por tres días (el efluente obtenido en el muestreo siguiente al de influente).

La retención en la biomasa se determina mediante el cociente entre la concentración detectada en la biomasa y la detectada en el efluente en el mismo muestreo.

Se muestran los valores de concentración, porcentaje de eliminación y ratio de retención para dos ejemplos (Trimethoprim y Ofloxacin en el fotobiorreactor dopado en verano). Para que esas concentraciones medidas sean comparables se tiene que deshacer la dilución y, además se muestran en ng/L (en el influente x200000, en el efluente x4000 y en la biomasa no hay dilución que deshacer).

Se muestra en las tablas 14 y 15 dichas concentraciones y parámetros para los ejemplos comentados. Se puede ver fácilmente que las concentraciones detectadas en el efluente son mucho menores que en el influente, es decir, tras el proceso de depuración llevado a cabo por las microalgas en el fotobiorreactor la concentración de estos analitos disminuye.

Se puede deducir por lo tanto que las microalgas del fotobiorreactor actúan como agentes depuradores de este tipo de analitos de forma efectiva.

Tabla 14: Concentraciones cuantificadas en Trimethoprim en las 3 matrices estudiadas del fotobiorreactor dopado en verano

Muestra	Conc influente medida (µg/L)	Conc real influente (ng/L)	Conc efluente medida (µg/L)	Conc real efluente (ng/L)	Conc biomasa (ng/g liofilizado)
1	2.539	507707	0.287	1148	223
2			0.309	1237	206
3			0.237	948	215
4			0.293	1172	280
5			0.463	1851	220
6	2.554	510863	0.294	1175	160

Tabla 15: Concentraciones cuantificadas en Ofloxacin en las 3 matrices estudiadas del fotobiorreactor dopado en verano

Muestra	Conc influente medida (µg/L)	Conc real influente (ng/L)	Conc efluente medida (µg/L)	Conc real efluente (ng/L)	Conc biomasa (ng/g liofilizado)
1	2.068	413601	0.089	356	263
2			0.180	721	261
3			0.183	733	298
4			0.133	531	204
5			0.144	575	211
6	1.709	341719	0.050	199	173

Como se había comentado en el caso del reactor dopado solo se realizan dos muestreos del influente, al inicio y al final del estudio de esa época. Por tanto, para las eliminaciones se tiene en cuenta siempre el valor medio de la concentración de influente ya que éste se introduce continuamente a lo largo de los 6 días. Los valores de influente se determinan de igual manera que todos los demás comentados en los ejemplos y se muestra para poder determinar las eliminaciones.

Se muestran a continuación en la tabla 16 los resultados de porcentajes de eliminación y retención determinadas para estos dos analitos en las matrices comentadas:

Tabla 16: Resultados de eliminación y retención del Trimethoprim y Ofloxacin para el fotobiorreactor dopado en verano

Muestreo	Porcentaje eliminación		Ratio biomasa/efluente	
	Trimethoprim	Ofloxacin	Trimethoprim	Ofloxacin
1	-	-	0.1942	0.7391
2	99	99	0.1668	0.3622
3	99	99	0.2272	0.4070
4	99	99	0.2390	0.3838
5	99	99	0.1190	0.3671
6	99	99	0.1363	0.8682

Como puede verse en la tabla 16, con el muestreo 1 no se tienen valores de eliminación porque las concentraciones determinadas en el efluente del muestreo 1 no son relativas al muestreo 1 de influente que es con el que se determinan todas las demás.

Mientras que los resultados de eliminaciones son bastante similares entre estos dos compuestos puede verse que el cociente de retención en la biomasa es mucho mayor en el caso del Ofloxacin que en el del Trimethoprim.

Para todos los demás analitos, matrices y épocas se determinan todos estas concentraciones y parámetros de la misma forma.

6.4 Concentraciones encontradas. Resultados de eliminaciones y retenciones en biomasa algal

Teniendo todos los valores de concentraciones para cada analito en cada matriz, fotobiorreactor y época estudiada se muestran los valores en ANEXO I y ANEXO II.

En las tablas 17 y 18 se puede observar la concentración media (y número de detecciones) de entrada al fotobiorreactor (influyente), la de salida del mismo (efluente), la de la biomasa algal resultante del proceso de depuración (biomasa), el porcentaje de eliminación (% eliminación) y el cociente de retención de la biomasa frente al efluente (retención). Todas las concentraciones mostradas están en unidades de ng/L, excepto la biomasa en ng/g liofilizado, la eliminación en tanto por ciento y la retención en tanto por uno. Estos datos se muestran en dos tablas, una para cada fotobiorreactor.

Tabla 17: Tabla de valores medios de concentración, eliminación y retención del fotobiorreactor no dopado para los analitos detectados

Compuestos	Invierno					Verano				
	C influente (mg/L)	C efluente (mg/L)	C biomasa (mg/g liof)	% eliminación	Retención	C influente (mg/L)	C efluente (mg/L)	C biomasa (mg/g liof)	% eliminación	Retención
Doxycycline	18987 (n=6)	1295 (n=6)	n.d	93	0	445 (n=6)	n.d	n.d	100	-
Danofloxacin	220 (n=6)	n.d	91 (n=6)	100	1	148 (n=4)	n.d	17 (n=3)	100	1
Sulfamethoxazole	223 (n=6)	217 (n=4)	13 (n=6)	48	0.1543	24 (n=3)	98 (n=6)	4 (n=2)	<0	0.004508
Trimethoprim	80 (n=6)	135 (n=5)	98 (n=6)	<0	0.7393	20 (n=4)	41 (n=6)	11 (n=6)	<0	0.2884
Fenbendazol	4 (n=6)	3 (n=3)	n.d	63	0	13 (n=6)	34 (n=6)	n.d	<0	0
Carbamazepine	43 (n=6)	21 (n=6)	2 (n=1)	53	0.01451	87 (n=6)	139 (n=6)	n.d	<0	0
Propanolol	25 (n=6)	19 (n=5)	39 (n=3)	43	0.9154	52 (n=6)	17 (n=6)	14 (n=4)	74	1
Sulfapyridine	143 (n=4)	n.d	16 (n=6)	100	1	n.d	n.d	n.d	-	-
Ofloxacin	353 (n=6)	137 (n=6)	56 (n=6)	69	0.5182	382(n=6)	94 (n=6)	11 (n=6)	78	0.1312
Nalidixic acid	79 (n=4)	33 (n=2)	54 (n=6)	66	0.6785	12 (n=1)	10 (n=1)	11 (n=6)	17	1
Naproxen	133 (n=6)	114 (n=6)	n.d	10	0	140 (n=6)	n.d	n.d	100	-
Erythromycin	7754 (n=3)	n.d	n.d	100	-	2751 (n=5)	n.d	n.d	100	-
Atorvastatin	6 (n=3)	4 (n=4)	n.d	57	0	20 (n=4)	n.d	21 (n=4)	100	1
Caffeine	281 (n=6)	338 (n=6)	103 (n=6)	<0	0.4091	208 (n=6)	166 (n=6)	50 (n=6)	<0	0.3005
DEET	240 (n=6)	92 (n=6)	3 (n=6)	41	0.03089	283 (n=6)	458 (n=6)	5 (n=6)	<0	0.01126
Ciprofloxacin	214 (n=5)	n.d	70 (n=6)	100	1	42 (n=5)	n.d	80 (n=6)	100	1
Diclofenac	277 (n=6)	n.d	n.d	100	-	409 (n=6)	n.d	n.d	100	-
Clofibric acid	10 (n=3)	n.d	2 (n=6)	100	1	n.d	n.d	n.d	-	-
Gemfibrocil	1636 (n=3)	n.d	n.d	100	-	1370 (n=6)	n.d	n.d	100	-
Media	1616	201	46	73	0.2883	377	117	22	88	0.3196

*n.d: no detectado

Tabla 18: Tabla de resultados de valores medidos de concentración, eliminación y retención del fotobiorreactor dopado para los analitos detectados

Compuestos	Invierno					Verano				
	C influente (mg/L)	C efluente (mg/L)	C biomasa (mg/g liof)	% eliminación	Retención	C influente (mg/L)	C efluente (mg/L)	C biomasa (mg/g liof)	% eliminación	Retención
Sulfamethoxazole	23628 (n=2)	115 (n=6)	35 (n=6)	100	0.4662	308390 (n=2)	308 (n=6)	14 (n=6)	100	0.03827
Trimethoprim	179523 (n=2)	1313 (n=4)	202 (n=6)	99	0.1470	509285 (n=2)	1255 (n=6)	218 (n=6)	100	0.1776
Metronidazole	166872 (n=2)	609 (n=3)	67 (n=6)	100	0.04922	260512 (n=2)	n.d	n.d	100	-
Ofloxacin	110656 (n=2)	1304 (n=6)	220 (n=6)	99	0.2356	377660 (n=2)	519 (n=6)	235 (n=6)	100	0.4777
Ciprofloxacin	n.d	2195 (n=4)	338 (n=6)	<100	0.1237	894666 (n=2)	152 (n=6)	327 (n=6)	100	>1
Diclofenac	52349 (n=1)	1962 (n=5)	n.d	98	0	624037 (n=2)	n.d	n.d	100	-

*n.d: no detectado

En las tablas 17 y 18 se muestran los valores promedio de concentraciones, eliminación y retención. Se muestra al lado de los valores de concentración promedio el número de detecciones ($n=x$) de cada analito en cada matriz, siendo 6 el máximo debido a que son 6 los muestreos totales realizados. Se muestran además las medias de las concentraciones de entrada, salida, biomasa y las de las eliminaciones y retenciones en cada época estudiada.

Se puede ver como las eliminaciones son prácticamente totales en el fotobiorreactor dopado, mayores que en el fotobiorreactor no dopado para esos mismos analitos, debido a que las concentraciones de entrada eran muchísimo más elevadas y siempre se observa una concentración residual en la salida del reactor, lo que provoca que los porcentajes de eliminación, aunque en la salida sean algo mayor también esas concentraciones residuales, sean aun así mayores que en el no dopado.

En la época de verano aparecen más porcentajes negativos de eliminación también, lo que indica una acumulación de los contaminantes en el reactor. Las medias de eliminación (sin contar los valores negativos debidos a la posible saturación) son ligeramente superiores en verano frente a las obtenidas en invierno. Las eliminaciones superiores pueden ser debidas a que en verano hay más horas de luz y las microalgas presentes en el fotobiorreactor tienen condiciones más favorables para realizar la fotosíntesis y por tanto digerir mejor los analitos estudiados. Aquellos compuestos que no se eliminan en verano parece ser aquellos compuestos que presentan una menor retención en la biomasa que es en principio la responsable de su degradación.

Los compuestos más proclives a la degradación son Doxycycline, Danofloxacin, Erythromycin, Ciprofloxacin, Diclofenac y Gemfibrocil (todos ellos mínimo 93% de eliminación en ambas épocas estudiadas). Se deducen observando el reactor no dopado ya que en el reactor dopado los 6 estudiados (Sulfamethoxazole, Trimethoprim, Metronidazole, Ofloxacin, Ciprofloxacin y Diclofenac) son mayores al 98%.

Los compuestos que más se retienen en la biomasa algal son el Danofloxacin, Propanolol, Ciprofloxacín (mayores al 0.9 en ambas épocas estudiadas). Atendiendo a épocas aisladas en invierno el Clofibríc acid, Sulfapyridine se retienen mucho y en verano el Nalidixic acid y el Atorvastatin. El Ciprofloxacín en verano en el reactor dopado se encuentra muy retenido (ratio=6.7).

Los compuestos en mayor concentración en la biomasa algal son la Caffeine, Ciprofloxacín, Trimethoprim y Danofloxacin estando en concentraciones mayores a 70 ng/g liofilizado en invierno y en verano siendo los mismos quitando el Trimethoprim y añadiendo el Atorvastatin siendo superiores a 17 ng/g liofilizado.

Se deduce de este estudio que con concentraciones muy elevadas de algunos analitos, como son los 6 analitos del fotobiorreactor dopado, las microalgas siguen comportándose como buenos agentes depuradores de este tipo de contaminantes no solo manteniendo el porcentaje de eliminación, sino incluso aumentándolo.

7 CONCLUSIONES

- Se han detectado 19 contaminantes emergentes en las aguas residuales (reactor no dopado) en invierno y 17 en verano, un rango de concentración de entre 4-19000 ng/L en invierno y de entre 12-2751 ng/L en verano. En el efluente depurado se detectan 12 compuestos en invierno y 9 en verano, y en un rango de concentraciones de entre 3-1295 ng/L en invierno y de entre 10-458 ng/L en verano. Los rangos de concentraciones detectadas y el número de detecciones en verano son menores.

- El uso de microalgas permite disminuir la concentración de ciertos contaminantes emergentes en ciertos casos. Los compuestos para los que logra una mayor depuración son Doxycycline, Danofloxacin, Erythromycin, Ciprofloxacín, Diclofenac y Gemfibrocil (tienen una eliminación mayor al 93% todos ellos en ambas épocas).

- En invierno el grado de eliminación es mayor para Sulfamethoxazole, Fenbendazol, Carbamazepine, Nalidixic acid, Sulfapyridine y DEET. En verano el porcentaje de eliminación es mayor para Doxycycline, Propanolol, Ofloxacin, Naproxen y Atorvastatin.

- Las concentraciones detectadas en la biomasa algal son del orden de entre 2-103 ng/g liofilizada en invierno y de entre 4-80 ng/g liofilizada en verano.
- Los compuestos con mayor tendencia a retenerse en la biomasa algal son Caffeine, Ciprofloxacín, Trimethoprim y Danofloxacín estando en concentraciones mayores a 70 ng/g liofilizado en invierno y en verano siendo los mismos quitando el Trimethoprim y añadiendo el Atorvastatin siendo superiores a 17 ng/g liofilizado.
- Algunos compuestos no se degradan y se acumulan en el fotobiorreactor. Para los demás compuestos su eliminación, y también su acumulación en biomasa, parece ser superior en verano con respecto al invierno.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Acién, F. G. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology advances*, 1344-1353.
- Ahrer, W. (2001). Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 69-78.
- Albero, B. (2015). Ultrasound-assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 110-118.
- Amelin, V. (2012). Separation and quantification of polar pesticides in well, surface, and drinking water by capillary electrophoresis. *J. Anal. Chem.*, 904-924.
- Amenorfenyo, D. K. (2019). Microalgae brewery wastewater treatment: potentials, benefits and the challenges. *International journal of environmental research and public health*, 16.
- Andreozzi, R. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 1319-1330.
- Ansa, E. D. (2011). The role of algae in the removal of *Escherichia coli* in a tropical eutrophic lake. *Ecological Engineering*, 317-324.
- Bester, K. (2003). Triclosan in a sewage treatment process—Balances and monitoring data. *Water Res.*, 3891-3896.
- Bowadt, S. (1995). Supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr*, 549-571.
- Chen, L. (2008). Application of on-line microwave sample-preparation techniques. *Trends Anal. Chem.*, 151-159.
- Dabrowski, L. (2002). Some aspects of the analysis of environmental pollutants in sediments using pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr*, 59-67.
- De Castro, M. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J. Chromatogr*, 2383-2389.

- Delahaye, E. (2005). Use of fixed micro-algae as a direct, simple and quickly measurable indicator of biofilm density in biofilters in order to improve washing operations. *Desalination*, 273-279.
- Delgado, B. (2012). An in-situ extraction-preconcentration method using ionic liquid-based surfactants for the determination of organic contaminants contained in marine sediments. *Talanta*, 972-983.
- Gaffney, A. (2001). Utilization of cyanobacteria in photobioreactors for orthophosphate removal from water. *Appl Biochem Biotechnol*, 185-193.
- Gobel, A. (2005). Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge. *J. Chromatogr*, 179-189.
- Gonçalves. (2013). Analysis of acidic, basic and neutral pharmaceuticals in river waters: clean-up by 1, 2 amino anion exchange and enrichment using an hydrophilic adsorbent. *Environmental Analytical Chemistry*, 1-22.
- Gracia-lor, E. (2012). Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*, 453-462.
- Hashim, M. (2004). Biosorption of cadmium by grown, green and red sea-weeds. *Chem. Eng. J.*, 249-255.
- Hena, S. (2020). Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) from wastewater using microalgae: A review. *Journal of Hazardous Materials*.
- Herrero, M. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *J. Chromatogr.*, 2495-2511.
- Liang, H. (2003). Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standars in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectr.*, 2815-2821.

- López-Serna, R. (2019). Analytical methodologies for the determination of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in sewage sludge: A critical review. *Anal. Chim.*
- Lopez-Serna, R. (2022). Determination of veterinary drugs in microalgae biomass from photobioreactors fed with piggery wastewater. *Chemosphere* 287, 132076.
- Markou, G. (2018). Using agro-industrial wastes for the cultivation of microalgae and duckweeds: Contamination risks and biomass safety concerns. *Biotechnology advances*, 1238-1254.
- Mudiam, R. (2014). Analytical Methods of phenolic endocrine disruptor chemicals in water samples by gas chromatography-triple quadrupole. *Anal. Method*, 1802-1810.
- Ohoro, C. R. (2019). Distribution and chemical analysis of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the environmental systems: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17-49.
- Petrovic, M. (2006). Liquid chromatography—Mass spectrometry in the analysis of emerging contaminants. *Anal. Bioanal. Chem.*, 422-424.
- Rasoul-Amini, S. (2014). Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 126-131.
- Reddersen, K. (2003). Formation of an artifact of diclofenac during acidic extraction of environmental water samples. *J. Chromatogr.*, 221-226.
- Ruas, G. (2022). Influence of the hydraulic retention time on the removal of emerging contaminants in an anoxic-aerobic algal-bacterial photobioreactor coupled with anaerobic digestion. *Science of the total Environment*, 827.
- Salam, K. A. (2019). Towards sustainable development of microalgal biosorption for treating effluents containing heavy metals. *Biofuel Research Journal*, 948.

- Serna, M. d. (2021). Metodología para el análisis de contaminantes emergentes en aguas residuales urbanas y ganaderas. Trabajo de Fin de Grado. *Universidad de Valladolid*, 50-90.
- Shao, B. (2009). Determination of 76 pharmaceutical drugs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in slaughterhouse wastewater. *J. Chromatogr.*, 8312-8318.
- Shraim, A. (2017). Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah. *Arab. J. Chem.*, S719-S729.
- Wu, D. (2021). Identification of indicator PPCPs in landfill leachates and livestock wastewaters using multi-residue analysis of 70 PPCPs: Analytical method development and application in Yangtze River Delta, China. *Science of the total Environment*, 753.
- Zuloaga, O. (2012). Analytica Chimica Acta Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Anal. Chim Acta*, 7-29.

ANEXO I

Tabla de resultados de valores medidos de concentración, eliminación y retención del fotobiorreactor no dopado en cada muestreo

Muestreo	Compuestos	Invierno					Verano				
		C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/ g liof)	% elim	Retención	C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/ g liof)	% elim	Retención
1	Doxycycline	19278	1693	n.d	-	0	859	n.d	n.d	100	-
2	Doxycycline	15786	1519	n.d	92	0	716	n.d	n.d	100	-
3	Doxycycline	16513	1417	n.d	91	0	367	n.d	n.d	100	-
4	Doxycycline	20489	1170	n.d	93	0	313	n.d	n.d	100	-
5	Doxycycline	20542	969	n.d	95	0	274	n.d	n.d	100	-
6	Doxycycline	21312	1001	n.d	95	0	140	n.d	n.d	100	-
1	Danofloxacin	511	n.d	97	-	1	180	n.d	12	-	1
2	Danofloxacin	49	n.d	98	100	1	141	n.d	n.d	100	-
3	Danofloxacin	61	n.d	118	100	1	134	n.d	22	100	1
4	Danofloxacin	316	n.d	55	100	1	137	n.d	18	100	1
5	Danofloxacin	128	n.d	87	100	1	n.d	n.d	n.d	100	-
6	Danofloxacin	256	n.d	92	100	1	n.d	n.d	n.d	-	-
1	Sulfamethoxazole	37	n.d	6	-	1	n.d	55	4	<0	0.07833
2	Sulfamethoxazole	520	n.d	7	100	1	n.d	135	3	<0	0.02254
3	Sulfamethoxazole	271	457	26	12	0.05676	10	83	n.d	<0	0
4	Sulfamethoxazole	159	31	17	89	0.5419	49	134	n.d	<0	0
5	Sulfamethoxazole	279	96	13	40	0.1377	13	76	n.d	<0	0
6	Sulfamethoxazole	71	287	10	<0	0.03523	n.d	103	n.d	<0	0
1	Trimethoprim	334	n.d	101	-	1	n.d	52	11	-	0.2138
2	Trimethoprim	12	126	102	62	0.8084	20	46	14	-	0.3047
3	Trimethoprim	12	153	115	<0	0.7506	13	23	9	<0	0.3971

Muestreo	Compuestos	Invierno					Verano				
		C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/ g liof)	% elim	Retención	C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/ g liof)	% elim	Retención
4	Trimethoprim	54	177	108	<0	0.6087	13	30	7	<0	0.2398
5	Trimethoprim	13	123	70	<0	0.5716	n.d	26	6	<0	0.2477
6	Trimethoprim	54	97	93	<0	0.9572	37	68	17	-	0.2525
1	Fenbendazol	7	n.d	n.d	-	-	11	35	n.d	-	0
2	Fenbendazol	<u>3</u>	3	n.d	56	0	18	37	n.d	<0	0
3	Fenbendazol	<u>3</u>	<u>2</u>	n.d	29	0	16	35	n.d	<0	0
4	Fenbendazol	<u>3</u>	n.d	n.d	100	-	12	32	n.d	<0	0
5	Fenbendazol	<u>3</u>	n.d	n.d	100	-	10	33	n.d	<0	0
6	Fenbendazol	<u>3</u>	<u>2</u>	n.d	29	0	11	33	n.d	<0	0
1	Carbamazepine	30	27	n.d	-	0	79	128	n.d	-	0
2	Carbamazepine	55	17	n.d	41	0	89	146	n.d	<0	0
3	Carbamazepine	55	21	<u>1.5</u>	62	0.07256	93	136	n.d	<0	0
4	Carbamazepine	32	19	n.d	66	0	64	159	n.d	<0	0
5	Carbamazepine	62	21	n.d	35	0	110	125	n.d	<0	0
6	Carbamazepine	27	23	n.d	63	0	87	137	n.d	<0	0
1	Propanolol	16	27	58		2.1151	47	36	18	-	0.5030
2	Propanolol	30	18	16	<0	0.8881	57	9	10	80	1.1247
3	Propanolol	29	16	n.d	45	0	52	6	15	90	2.6594
4	Propanolol	28	n.d	n.d	100	-	46	36	n.d	31	0
5	Propanolol	29	15	43	45	2.7735	53	9	13	81	1.4467
6	Propanolol	16	19	n.d	36	0	59	8	n.d	86	0
1	Sulfapyridine	171	n.d	18	-	1	n.d	n.d	n.d	-	-
2	Sulfapyridine	172	n.d	15	100	1	n.d	n.d	n.d	-	-
3	Sulfapyridine	50	n.d	19	100	1	n.d	n.d	n.d	-	-

Muestreo	Compuestos	Invierno					Verano				
		C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/ g liof)	% elim	Retención	C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/ g liof)	% elim	Retención
4	Sulfapyridine	177	n.d	13	100	1	n.d	n.d	n.d	-	-
5	Sulfapyridine	n.d	n.d	15	100	1	n.d	n.d	n.d	-	-
6	Sulfapyridine	n.d	n.d	15	100	1	n.d	n.d	n.d	-	-
1	Ofloxacin	346	239	47	-	0.1978	447	103	12	-	0.1135
2	Ofloxacin	416	87	62	75	0.7066	446	117	10	74	0.08091
3	Ofloxacin	407	125	75	70	0.5952	436	96	13	79	0.1313
4	Ofloxacin	283	129	37	68	0.2827	349	105	11	76	0.1066
5	Ofloxacin	414	89	52	69	0.5838	396	91	14	74	0.1494
6	Ofloxacin	252	152	64	63	0.4225	220	52	10	87	0.1879
1	Nalidixic acid	205	n.d	61	-	1	n.d	n.d	12	-	1
2	Nalidixic acid	17	n.d	50	100	1	n.d	n.d	10	-	1
3	Nalidixic acid	n.d	23	48	<0	2.1032	12	n.d	13	-	1
4	Nalidixic acid	50	n.d	48	-	1	n.d	10	11	17	1.0946
5	Nalidixic acid	n.d	n.d	62	100	1	n.d	n.d	14	-	1
6	Nalidixic acid	45	43	55	100	1.2895	n.d	n.d	10	-	1
1	Naproxen	127	108	n.d	-	0	128	n.d	n.d	-	-
2	Naproxen	117	99	n.d	23	0	149	n.d	n.d	100	-
3	Naproxen	174	89	n.d	24	0	127	n.d	n.d	100	-
4	Naproxen	117	131	n.d	24	0	94	n.d	n.d	100	-
5	Naproxen	115	118	n.d	<0	0	138	n.d	n.d	100	-
6	Naproxen	147	138	n.d	<0	0	204	n.d	n.d	100	-
1	Erythromycin	7514	n.d	n.d	-	-	3384	n.d	n.d	-	-
2	Erythromycin	n.d	n.d	n.d	100	-	3739	n.d	n.d	100	-
3	Erythromycin	n.d	n.d	n.d	-	-	1940	n.d	n.d	100	-

Muestreo	Compuestos	Invierno					Verano				
		C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/ g liof)	% elim	Retención	C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/ g liof)	% elim	Retención
4	Erythromycin	8596	n.d	n.d	-	-	2479	n.d	n.d	100	-
5	Erythromycin	n.d	n.d	n.d	100	-	2212	n.d	n.d	100	-
6	Erythromycin	7151	n.d	n.d	-	-	n.d	n.d	n.d	100	-
1	Atorvastatin	5	5	n.d	-	0	7	n.d	21	-	1
2	Atorvastatin	n.d	n.d	n.d	100	-	22	n.d	22	100	1
3	Atorvastatin	n.d	n.d	n.d	-	-	10	n.d	21	100	1
4	Atorvastatin	11	3	n.d	<0	0	n.d	n.d	n.d	100	-
5	Atorvastatin	n.d	5	n.d	57	0	n.d	n.d	n.d	-	-
6	Atorvastatin	3	5	n.d	<0	0	41	n.d	23	-	1
1	Caffeine	650	399	90	-	0.2266	611	204	78	-	0.3831
2	Caffeine	12	650	119	0	0.1836	100	230	42	62	0.1806
3	Caffeine	31	417	118	<0	0.2831	79	116	56	<0	0.4839
4	Caffeine	402	208	92	<0	0.4409	114	129	42	<0	0.3241
5	Caffeine	10	167	90	58	0.5387	89	129	34	<0	0.2619
6	Caffeine	580	183	110	<0	0.5991	255	189	48	<0	0.2518
1	DEET	188	103	3	-	0.02475	273	473	4		0.009261
2	DEET	302	75	2	60	0.03188	355	545	3	<0	0.005931
3	DEET	342	81	3	73	0.03587	223	384	4	<0	0.01114
4	DEET	56	97	3	72	0.03192	262	460	8	<0	0.01814
5	DEET	478	100	2	<0	0.02315	274	428	4	<0	0.01033
6	DEET	72	95	3	80	0.03165	312	458	5	<0	0.01076
1	Ciprofloxacin	790	n.d	75	-	1	91	n.d	76	-	1
2	Ciprofloxacin	n.d	n.d	74	100	1	41	n.d	68	100	1
3	Ciprofloxacin	47	n.d	68	-	1	43	n.d	90	100	1

Muestreo	Compuestos	Invierno					Verano				
		C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/ g liof)	% elim	Retención	C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/ g liof)	% elim	Retención
4	Ciprofloxacín	180	n.d	75	100	1	13	n.d	68	100	1
5	Ciprofloxacín	61	n.d	69	100	1	22	n.d	65	100	1
6	Ciprofloxacín	205	n.d	62	100	1	n.d	n.d	110	100	1
1	Diclofenac	499	n.d	n.d	-	-	570	n.d	n.d	-	-
2	Diclofenac	166	n.d	n.d	100	-	307	n.d	n.d	100	-
3	Diclofenac	185	n.d	n.d	100	-	486	n.d	n.d	100	-
4	Diclofenac	458	n.d	n.d	100	-	405	n.d	n.d	100	-
5	Diclofenac	195	n.d	n.d	100	-	444	n.d	n.d	100	-
6	Diclofenac	157	n.d	n.d	100	-	241	n.d	n.d	100	-
1	Clofibric acid	12	n.d	2	-	1	n.d	n.d	n.d	-	-
2	Clofibric acid	n.d	n.d	2	100	1	n.d	n.d	n.d	-	-
3	Clofibric acid	n.d	n.d	1	-	1	n.d	n.d	n.d	-	-
4	Clofibric acid	14	n.d	3	-	1	n.d	n.d	n.d	-	-
5	Clofibric acid	n.d	n.d	2	100	1	n.d	n.d	n.d	-	-
6	Clofibric acid	5	n.d	3	-	1	n.d	n.d	n.d	-	-
1	Gemfibrocil	1584	n.d	n.d	-	-	1713	n.d	n.d	-	-
2	Gemfibrocil	n.d	n.d	n.d	100	-	1308	n.d	n.d	100	-
3	Gemfibrocil	n.d	n.d	n.d	-	-	1344	n.d	n.d	100	-
4	Gemfibrocil	1719	n.d	n.d	-	-	1351	n.d	n.d	100	-
5	Gemfibrocil	n.d	n.d	n.d	100	-	1315	n.d	n.d	100	-
6	Gemfibrocil	1606	n.d	n.d	-	-	1191	n.d	n.d	100	-

*Siendo los valores subrayados correspondientes a un analito detectado, pero por debajo del MLQ. Se puso el valor de su MLQ/2 para incluirlo en la tabla de resultados. n.d: no detectado

ANEXO II

Tabla de resultados de valores medidos de concentración, eliminación y retención del fotobiorreactor dopado en cada muestreo

Muestreo	Compuestos	Invierno					Verano				
		C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/g liof)	% elim	Retención	C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/g liof)	% elim	Retención
1	Sulfamethoxazole	25487	232	19	-	0.08241	331229	323	30	-	0.09262
2	Sulfamethoxazole	-	91	24	100	0.2653	-	412	10	100	0.02520
3	Sulfamethoxazole	-	100	24	100	0.2342	-	245	14	100	0.05709
4	Sulfamethoxazole	-	79	100	100	1.2625	-	265	11	100	0.03968
5	Sulfamethoxazole	-	56	24	100	0.4359	-	408	10	100	0.02536
6	Sulfamethoxazole	21770	131	17	99	0.1329	285550	196	9	100	0.04403
1	Trimethoprim	137582	n.d	207	-	0	507707	1148	223	-	0.1942
2	Trimethoprim	-	675	191	100	0.2827	-	1237	206	100	0.1668
3	Trimethoprim	-	1415	200	99	0.1412	-	948	215	100	0.2272
4	Trimethoprim	-	2034	264	99	0.1300	-	1172	280	100	0.2390
5	Trimethoprim	-	1130	205	99	0.1810	-	1851	220	100	0.1190
6	Trimethoprim	221464	n.d.	145	100	0	510863	1175	160	100	0.1363
1	Metronidazole	90985	720	70	-	0.09697	278130	n.d	n.d	-	0
2	Metronidazole	-	n.d	58	100	0	-	n.d	n.d	100	0
3	Metronidazole	-	543	64	100	0.1172	-	n.d	n.d	100	0
4	Metronidazole	-	566	73	100	0.1289	-	n.d	n.d	100	0
5	Metronidazole	-	n.d	72	100	0	-	n.d	n.d	100	0
6	Metronidazole	242759	n.d	65	100	0	242894	n.d	n.d	100	0

Muestreo	Compuestos	Invierno					Verano				
		C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/g liof)	% elim	Retención	C influ (mg/L)	C eflu (mg/L)	C biomasa (mg/g liof)	% elim	Retención
1	Ofloxacin	81555	2905	246	-	0.08456	413601	356	263	-	0.7391
2	Ofloxacin	-	1290	244	99	0.1893	-	721	261	100	0.3622
3	Ofloxacin	-	1026	279	99	0.2716	-	733	298	100	0.4070
4	Ofloxacin	-	865	190	99	0.2201	-	531	204	100	0.3838
5	Ofloxacin	-	545	197	100	0.3618	-	575	211	100	0.3671
6	Ofloxacin	139756	1193	161	99	0.1350	341719	199	173	100	0.8682
1	Ciprofloxacina	n.d	n.d	384	-	1	963281	184	373	-	2.0238
2	Ciprofloxacina	-	n.d	420	-	1	-	583	410	100	0.7025
3	Ciprofloxacina	-	2936	390	<0	0.1328	-	<u>36</u>	379	100	10.5803
4	Ciprofloxacina	-	1649	293	<0	0.1780	-	<u>36</u>	281	100	7.8376
5	Ciprofloxacina	-	1386	313	<0	0.2256	-	<u>36</u>	300	100	8.3844
6	Ciprofloxacina	n.d	2809	230	<0	0.08194	826050	<u>36</u>	216	100	6.0376
1	Diclofenac	n.d	4899	n.d	-	0	732955	n.d	n.d	-	n.d
2	Diclofenac	-	1604	n.d	97	0	-	n.d	n.d	100	n.d
3	Diclofenac	-	287	n.d	99	0	-	n.d	n.d	100	n.d
4	Diclofenac	-	921	n.d	98	0	-	n.d	n.d	100	n.d
5	Diclofenac	-	n.d	n.d	100	0	-	n.d	n.d	100	n.d
6	Diclofenac	52349	2100	n.d	96	0	515120	n.d	n.d	100	n.d

*Siendo los valores subrayados correspondientes a un analito detectado, pero por debajo del MLQ. Se puso el valor de su MLQ/2 para incluirlo en la tabla de resultados. n.d: no detectado

9 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Foto aérea de una Depuradora de agua residual	8
Figura 2: Zona de pretratamiento EDAR	9
Figura 3: Zona de decantación primaria EDAR	10
Figura 4: Zona de decantación secundaria EDAR	11
Figura 5: Proceso de tratado de aguas residuales con microalgas y sus productos	13
Figura 6: Metabolización de nutrientes de nitrógeno y fósforo provenientes de agua residual por las microalgas.....	14
Figura 7: Reducción de la demanda de oxígeno biológico y químico en el agua residual gracias a la liberación de oxígeno por las microalgas.....	15
Figura 8: Sitios de unión a metales de una célula de microalga	16
Figura 9: Mecanismos de eliminación de patógenos, metales pesados y otros contaminantes.....	16
Figura 10: Cromatograma obtenido en la transición 1 del Tiamulin en el análisis de biomasa no dopada de invierno	47
Figura 11: Cromatograma obtenido en la transición 2 del Tiamulin en el análisis de biomasa no dopada de invierno	48
Figura 12: Cromatograma obtenido en la transición 1 del Propanolol en el análisis de biomasa no dopada de invierno	48
Figura 13: Cromatograma obtenido en la transición 2 del Propanolol en el análisis de biomasa no dopada de invierno	49
Figura 14: Representación del MAP obtenida para el DEET en el análisis de efluente no dopado de invierno	50
Figura 15: Representación del MAP obtenida para el Atorvastatin en el análisis de efluente no dopado de invierno	50
Figura 16: Representación matriz-patrón obtenida para el DEET en el análisis de efluente no dopado de invierno.....	51
Figura 17: Representación matriz-patrón obtenida para el Atorvastatin en el análisis de efluente no dopado de invierno.....	51

10 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Mecanismo de eliminación del PPCP según la bacteria	19
Tabla 2: Porcentaje de eliminación de PPCPs con microalgas	20
Tabla 3: Ventajas e inconvenientes de la suspensión e inmovilización de microalgas en el fotobiorreactor	21
Tabla 4: Análisis y modo de extracción de PPCPs y concentraciones medidas en múltiples estudios (Ohoro, 2019)	26
Tabla 5: Días de muestreo de cada matriz estudiada del fotobiorreactor dopado	29
Tabla 6: Días de muestreo de cada matriz estudiada del fotobiorreactor no dopado ..	30
Tabla 7: Disoluciones madre utilizadas y sus concentraciones	31
Tabla 8: Parámetros de análisis del espectrómetro de masas para cada analito	37
Tabla 9: Parámetros de análisis del espectrómetro de masas para cada patrón interno deuterado	40
Tabla 10: Rango de calibración y diluciones utilizadas para cada matriz líquida estudiada	42
Tabla 11: Rango de calibración y diluciones utilizadas para el estudio de biomasa	43
Tabla 12: Líneas de calibrado para cada matriz estudiada	44
Tabla 13: MLD y MLQ determinados para cada analito en biomasa algal en verano e invierno	46
Tabla 14: Concentraciones cuantificadas en Trimethoprim en las 3 matrices estudiadas del fotobiorreactor dopado en verano	53
Tabla 15: Concentraciones cuantificadas en Ofloxacin en las 3 matrices estudiadas del fotobiorreactor dopado en verano	53
Tabla 16: Resultados de eliminación y retención del Trimethoprim y Ofloxacin para el fotobiorreactor dopado en verano	54
Tabla 17: Tabla de valores medios de concentración, eliminación y retención del fotobiorreactor no dopado para los analitos detectados	55
Tabla 18: Tabla de resultados de valores medidos de concentración, eliminación y retención del fotobiorreactor dopado para los analitos detectados	56