



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MASTER

MASTER EN GESTION Y TECNOLOGIA AMBIENTAL

**ESTUDIO DE ECOTOXICIDAD Y
BIODEGRADABILIDAD DE IBUPROFENO EN
UN REACTOR AEROBIO DE LODOS ACTIVOS
DE MEZCLA COMPLETA**

Johanna Vanessa Zambrano Flores
Julio, 2013

RUBEN IRUSTA MATA, profesor del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid, y SHEYLA ANDREA ORTIZ, estudiante de doctorado del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid, INFORMAN:

Que D^a.JOHANNA VANESSA ZAMBRANO FLORES ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Máster, del Máster en Gestión y Tecnología Ambiental, titulado ESTUDIO DE ECOTOXICIDAD Y BIODEGRADABILIDAD DE IBUPROFENO EN UN REACTOR AEROBIO DE LODOS ACTIVOS DE MEZCLA COMPLETA.

Valladolid, 11 de Julio de 2013

Fdo. TUTORES

Reunido el Tribunal designado por el Comité Académico del Máster en Gestión y Tecnología Ambiental, para la evaluación de los Trabajos Fin de Máster, y después de estudiar la memoria y atender a la defensa del trabajo “ESTUDIO DE ECOTOXICIDAD Y BIODEGRADABILIDAD DE IBUPROFENO EN UN REACTOR AEROBIO DE LODOS ACTIVOS DE MEZCLA COMPLETA”, presentado por el alumno D^a.JOHANNA VANESSA ZAMBRANO FLORES, decidió otorgarle la calificación de _____.

Valladolid, 11 de Julio de 2013

El Presidente

El Secretario

Fdo.:

Fdo.:

Vocal

Fdo.:

RESUMEN

El ibuprofeno es uno de los analgésicos de mayor consumo mundial, ha sido reportado en aguas residuales hospitalarias, aguas superficiales y aguas residuales urbanas. Últimamente el estudio de este contaminante ha aumentado significativamente, pues estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) carecen de mecanismos capaces de eliminarlo totalmente. Por lo tanto, es importante conocer qué efectos de ecotoxicidad aguda y crónica presenta el ibuprofeno, así como los posibles efectos tóxicos que a largo plazo puedan producirse sobre la biomasa activa presente en las plantas depuradoras de aguas residuales contaminadas con este compuesto. Para ello, se realizó el montaje de un reactor aerobio de fangos activos de mezcla completa (CMAS) operando durante 69 días. La investigación consta de tres etapas. Primero, el reactor fue alimentado únicamente con agua residual sintética para el arranque y operación estacionaria del mismo. En la segunda, el reactor se alimentó con agua residual sintética y elevada carga orgánica de ibuprofeno para comprobar la respuesta y adaptación de la biomasa activa ante una perturbación intensa y prolongada. Finalmente, al observar un buen comportamiento del sistema en la segunda etapa, se redujo la carga orgánica de ibuprofeno a niveles menores y nuevamente se correlacionaron los efectos. Se tomaron muestras diarias del influente y del efluente para determinar la evolución temporal de la biodegradabilidad del sustrato y del ibuprofeno. Se determinó la demanda química de oxígeno (DQO) del influente y efluente y la concentración de ibuprofeno mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para determinar la evolución temporal de la ecotoxicidad del influente y del efluente, se tomaron muestras diarias y se analizaron mediante el ensayo MICROTOX®. Se concluye que el ibuprofeno no tiene efecto tóxico crónico sobre la biomasa activa, ya que la continua exposición de los microorganismos al ibuprofeno permitió que éstos se adaptasen al contaminante y que lo pudieran degradar al 100%. Adicionalmente, se demostró que el agua residual presenta un efecto beneficioso sobre la ecotoxicidad del ibuprofeno.

Palabras claves: Biodegradabilidad; Ecotoxicidad; Ibuprofeno; Biomasa activa; Hormesis.

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos farmacéuticos anteriormente no eran considerados contaminantes ambientales debido a que se desconocía su acumulación o la de sus productos de transformación en suelos, cuerpos de agua, aire, tejidos vegetales y tejidos animales. Después de su administración, estos medicamentos son absorbidos y metabolizados por el organismo y luego excretados junto con las aguas residuales (Suárez *et al.*, 2008). Las primeras evidencias de la presencia de fármacos en el medio acuático se produjeron en los años setenta con la identificación del ácido clofíbrico en aguas residuales de los Estados Unidos, compuesto que es el metabolito activo de varios reguladores de lípidos en la sangre (Barceló *et al.*, 2011). Pero fue a partir de los años noventa cuando se empezaron a cuantificar en aguas concentraciones entre partes por billón (ppb) y partes por trillón (ppt) de estas sustancias. En publicaciones recientes, se reporta que en países como España, Francia (Ortiz *et al.*, 2013) y Alemania (Heberer, 2002) hay descargas al agua de aproximadamente 500 toneladas de analgésicos por año, en donde el ácido salicílico y el diclofenaco han alcanzado concentraciones de 0,22µg/L y 3,02µg/L, respectivamente (Cartagena, 2011). Un informe de científicos alemanes establece que sea cual sea el cuerpo de agua escogido pueden encontrarse entre 30 y 60 productos farmacéuticos (Raloff, 1998).

Los medicamentos son creados para que tengan ciertas características, así por ejemplo, están diseñados para ser muy activos e interactuar con receptores específicos en el hombre y animales, o bien para resultar tóxicos para organismos infecciosos como las bacterias, hongos, parásitos, etc. (Torre, 2007). Además, aproximadamente el 30 % de los medicamentos son lipofílicos, por lo que se disuelven en grasa pero no en agua (Quesada, 2009). Esta característica les permite pasar a través de las membranas de la célula y actuar dentro de las mismas. Además, éstos se diseñan para que sean persistentes, por lo que mantienen su estructura química un tiempo suficientemente prolongado como para ejercer su acción terapéutica, así que una vez que entran al medio ambiente persisten en el mismo (Peñate *et al.*, 2009).

Los daños ambientales de estos contaminantes en algunos casos no están muy claros, pero en otros existe un riesgo evidente y alarmante. Así, por ejemplo, el diclofenaco, aparte de afectar a los riñones en los mamíferos, se ha asociado con la desaparición de los buitres blancos en la India y Pakistán, numerosos trabajos presentan evidencias de la feminización de peces en presencia de sustancias disruptoras endocrinas, tales como el anticonceptivo etinilestradiol (Barceló *et al.*, 2011). Otras investigaciones realizadas en España han dejado ver los efectos sobre el zooplancton, así como sobre los organismos bentónicos (Quesada, 2009). Se han detectado además, alteraciones en el comportamiento y

fisiología de los insectos, inhibición o estimulación del crecimiento en plantas acuáticas y algas, y desarrollo de bacterias resistentes. En general, estos compuestos presentan efectos significativos alterando al sistema endocrino y bloqueando o perturbando las funciones hormonales, y afectando a la salud de los seres humanos y de especies animales aun cuando se encuentren en bajas concentraciones (García-Gómez, 2011).

Los mecanismos de incorporación de los productos farmacéuticos en los cuerpos de agua tienen lugar mediante los vertidos de la industria farmacéutica, los residuos hospitalarios, la disposición inadecuada de fármacos caducados y principalmente las aguas residuales urbanas a las que llegan los medicamentos tras ser excretados por la orina y las heces (García-Gómez, 2011). En los últimos años el estudio de estos contaminantes ha aumentado de forma significativa, puesto que las estaciones depuradoras de aguas residuales no tienen aún mecanismos capaces de eliminar totalmente estos compuestos. Por ejemplo en EDARs de España tras un tratamiento secundario se elimina hasta un 8,5% de omeprazol, 80% de amoxicilina, 60% de diclofenaco y 97% de ibuprofeno (Ortiz *et al.*, 2013). Se ha establecido que en aguas superficiales, donde se ha producido una eliminación incompleta en plantas de depuración o en aguas subterráneas, debido a la escasa atenuación que experimentan algunos compuestos durante la filtración a través de suelos, las concentraciones se sitúan normalmente en el rango de ng/L o $\mu\text{g/L}$ (Suárez *et al.*, 2008), mientras que en suelos y sedimentos, donde pueden persistir durante largos periodos de tiempo, alcanzan concentraciones de hasta g/kg (Barceló *et al.*, 2011). Pero la mayor preocupación la ha generado el hallazgo de algunos de ellos (como el ibuprofeno, el diclofenaco, la carbamacepina, o el ácido clofíbrico) en aguas potables (Peñate *et al.*, 2009).

Los productos farmacéuticos derivados, sintetizados, e inspirados a partir de compuestos producidos de forma natural, como por ejemplo, la penicilina del moho *Penicillium notatum*, el ácido salicílico de la corteza de los sauces, y lovastatina a partir del microorganismo fúngico *Aspergillus terreus*, podrían inducir efectos tóxicos en los organismos no objetivo (Brian *et al.*, 2008). La ecotoxicología de productos farmacéuticos apoya esta noción, en particular debido a que los compuestos farmacéuticos son biológicamente activos y pueden afectar a otros organismos.

En este sentido, se han realizado diversos estudios sobre antibióticos de uso común, incluyendo sulfonamidas, tetraciclinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y betalactámicos por su ecotoxicidad acuática aguda y crónica utilizando organismos estándar por ejemplo, *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Moina macrocopa* y *Oryzias latipes*. Entre los antibióticos probados para la ecotoxicidad aguda, la neomicina fue más tóxica seguido de trimetoprim, sulfametoxazol y enrofloxacin, mientras que sulfametazina, oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfadimetoxina y sulfatiazol eran de ecotoxicidad intermedia; se estableció también que la ampicilina y la amoxicilina fueron menos tóxicos para los organismos de ensayo. En el ensayo de ecotoxicidad crónica, la neomicina afectaba a la reproducción y a la supervivencia de adultos de *Daphnia magna* y *Moina macrocopa* (Park & Choi, 2008).

Otros estudios realizados sobre ecotoxicología aguda de antimicrobianos, analgésicos y sedativos sobre la pulga del agua *Daphnia magna* Strauss, revelaron la siguiente secuencia de ecotoxicidad decreciente: diazepam, paracetamol, ibuprofeno, ciprofloxacina, trimetoprima, sulfametoxazol y amoxicilina. La ecotoxicidad indicó que el diazepam junto con el paracetamol generó el mayor riesgo en el ambiente acuático. Sin embargo, se menciona que no se excluye el efecto potencial de ecotoxicidad crónica en el ambiente de estos fármacos ensayados (Iannacone & Alvario, 2009).

De igual forma, se ha evaluado la ecotoxicidad de antibióticos como roxitromicina, trimetoprim y cloranfenicol en aguas superficiales y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, realizando pruebas estándar de ecotoxicidad aguda sobre *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Moina macrocopa* y *Oryzias latipes*. Los efectos adversos de roxitromicina, trimetoprim y cloranfenicol se observaron a niveles de mg/L y se sugirió que en base a los cocientes de riesgo calculados para los tres antibióticos, el riesgo en los sistemas acuáticos era mínimo (Choi *et al.*, 2008).

Es importante destacar que para el estudio toxicológico de compuestos farmacéuticos cuyas concentraciones en agua se sitúan normalmente en el rango de $\mu\text{g/L}$, se debe tener en cuenta la hormesis. Hormesis es un fenómeno que causa una respuesta estimuladora en la presencia de niveles sub-inhibitorios de sustancias tóxicas, las mismas que a dosis altas causan efectos inhibitorios o letales al organismo (Christofi *et al.*, 2002). Este comportamiento tiene típicamente una característica bifásica en la relación dosis-respuesta que posee forma de "J" (Ge *et al.*, 2010). Existen varias teorías acerca de las causas de hormesis, una de ellas propone que la hormesis se debe a un exceso de compensación en respuesta a una interrupción en la homeostasis (Calabrese, 2008). Esta respuesta a una interrupción temporal puede tener

una ventaja en la adaptación a niveles bajos de estrés biológico, ya que esto es suficiente para provocar una sobrecompensación y, como resultado, niveles más altos de estrés biológico son menos propensos a afectar al organismo después de esta exposición inicial (Stebbing, 1997). Bajo estas condiciones de estrés los organismos deben reparar el daño inducido por el estrés biológico para asegurar la supervivencia, y así sobrecompensando tales actividades se asegura que la reparación se haya completado y puede alcanzar nuevamente la homeostasis (Calabrese & Baldwin, 2002).

Los analgésicos constituyen uno de los fármacos de mayor consumo mundial y son considerados los de mayor automedicación (Cartagena, 2011). El ibuprofeno es uno de los analgésicos de mayor dispersión, en el 2010 su consumo fue 218527 kg en España, 250792 kg en Alemania, 22471 kg en Suiza y 58353 kg en Francia (Ortiz *et al.*, 2013). Ha sido reportado en aguas residuales hospitalarias, aguas superficiales y aguas residuales urbanas (García-Gómez, 2011). Actualmente, existen diversos estudios sobre eliminación de ibuprofeno por medios físico-químicos, por ejemplo, se han utilizado procesos de oxidación con ozono, pero este proceso no logra degradar el compuesto. Se han realizado también otros ensayos usando procesos de oxidación avanzada con ozono y peróxido de hidrogeno, logrando una eliminación del 90% (Zwiener *et al.*, 2000). De igual manera en otros estudios, la coagulación resultó ineficiente para la eliminación de ibuprofeno, el valor máximo alcanzado fue del 50% usando sulfato de hierro (Vieno *et al.*, 2006). Mientras que procesos de eliminación utilizando carbón activado mostraron eficacias entre el 16% y el 30% (S.A. Snyder *et al.*, 2007).

Existen además, estudios sobre tratamientos biológicos para la eliminación del ibuprofeno. Se han operado plantas piloto de tratamiento de aguas residuales en las que se ha conseguido una eliminación del 60%, además se han usado reactores aerobios de biopelícula que han conseguido una eliminación de hasta el 65% (Zupanc *et al.*, 2012). Otros estudios en los que se utilizaron procesos combinados formados por un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) seguido por dos humedales de flujo horizontal presentaron una eliminación del 20% (Reyes-Contreras *et al.*, 2011). Similares estudios realizados en reactores aerobios de fangos activos (CAS) y reactores de biofilm de lecho móvil (MBBR) mostraron una eliminación entre el 63 y 94% (Zwiener & Frimmel, 2003).

Estos estudios muestran la versatilidad en los tratamientos para la eliminación de compuestos farmacéuticos del agua; sin embargo, los tratamientos biológicos son los que generan mayor interés debido a la posibilidad de biodegradar los compuestos. Ensayos realizados en reactores de lodos activados convencionales a escala de laboratorio, en condiciones de trabajo nitrificantes (aeróbica) y desnitrificantes (anóxica) indicaron que la fluoxetina y los estrógenos naturales se transformaron en gran medida bajo condiciones aeróbicas y anóxicas, mientras que el naproxeno, etinilestradiol, roxitromicina y la eritromicina eran sólo transformados significativamente en el reactor aerobio. El antidepresivo citalopram fue moderadamente biotransformado bajo las dos condiciones aeróbicas y anóxicas. Algunos compuestos, como carbamazepina, diazepam, sulfametoxazol y trimetoprim, manifiestan una alta resistencia a la transformación biológica. En el caso del ibuprofeno se observó la transformación eficiente anóxica (Suárez *et al.*, 2010). Algunos autores indican que los compuestos farmacéuticos exhiben cierta resistencia a la biodegradación anaeróbica. Por ejemplo, Khan y Ongerth (2002) señalaron que la mayoría de los compuestos de su estudio (20 productos farmacéuticos y 2 de sus metabolitos) persisten en la fracción acuosa del lodo digerido. En general, al considerar la biodegradabilidad de compuestos ácidos tales como el ibuprofeno y el diclofenaco, estos muestran un comportamiento distinto. Aunque ambos tienen baja afinidad para los sólidos, difieren en sus coeficientes cinéticos de biodegradación. El ibuprofeno presenta valores altos de biodegradabilidad, mientras que la biodegradabilidad de diclofenac es muy baja (Suárez *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

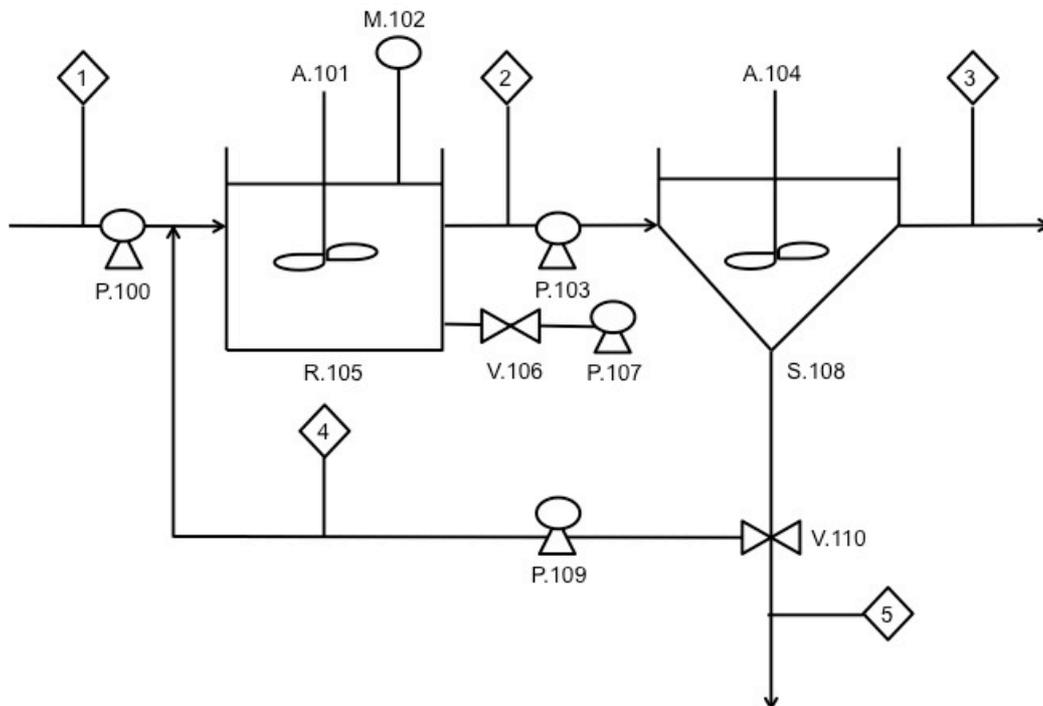
Todos los aspectos tratados anteriormente, dejan en evidencia la importancia de conocer qué efectos de ecotoxicidad aguda y crónica puede presentar el ibuprofeno, así como determinar los posibles efectos tóxicos que a largo plazo puedan producirse sobre la biomasa activa presente en las plantas depuradoras de aguas residuales contaminadas con este compuesto.

En este contexto, se desarrolló este trabajo como una aproximación (un indicador proxy) de ecotoxicidad crónica sobre la biota presente en las EDARs. Por ello, el objetivo general de este trabajo fue "Estudiar la ecotoxicidad y biodegradabilidad del ibuprofeno en un reactor aerobio de lodos activos de mezcla completa". Con el fin de cumplir este objetivo, se desarrollaron las fases indicadas a continuación en la metodología.

3. METODOLOGÍA

3.1 Montaje y puesta a punto de un reactor aerobio de fangos activos de mezcla completa (CMAS).

Se utilizó un reactor de fangos activos de 5 litros de volumen junto con un sedimentador circular de 16 litros. La aireación del reactor se realizó mediante una bomba de diafragma y difusores dispuestos adecuadamente para obtener una aireación uniforme en todo el reactor y asegurar una buena mezcla. Además, para mejorar la mezcla se utilizó un agitador magnético. En el sedimentador se colocó un agitador temporizado para evitar la creación de caminos preferentes y asegurar una buena recirculación del fango. Para controlar los caudales de alimentación, recirculación y salida del efluente se utilizaron tres bombas peristálticas *Watson Marlow*. Estos equipos permitieron una operación continua del reactor. En la figura 1 se muestra el diagrama de flujo del CMAS con sus accesorios.



Código	Equipo	Código	Equipo
P.100	Bomba de alimentación	V.106	Válvula reguladora de oxígeno
A.101	Agitador magnético	P.107	Bomba de diafragma
M.102	Medidor multiparamétrico	S.108	Sedimentador
P.103	Bomba del efluente del reactor	P.109	Bomba de recirculación de fango
A.104	Agitador temporizado	V.110	Válvula de purga
R.105	Reactor aerobio de fangos activos		

Figura 1: Diagrama de flujo del reactor aerobio de fangos activos

El fango utilizado provino de la cuba de aireación de la EDAR de la ciudad de Valladolid. La alimentación del reactor se realizó con agua residual sintética (ARS) según la formulación recomendada por la EPA (OPPTS 835.3240) para la simulación de tratamiento aeróbico de aguas residuales mediante lodos activados. Esta alimentación contiene los compuestos y concentraciones que se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Composición química de la alimentación del reactor

Compuesto	Concentración (mg/L)	Proveedor
Peptona	8,18	Fluka Analytica
Extracto de carne	5,62	Fluka Analytica
Urea	3,07	Panreac Química S.A
Hidrogenofosfato de potasio (K ₂ HPO ₄)	2,86	Panreac Química S.A
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,12	Panreac Química S.A
Cloruro de sodio (NaCl)	0,74	Panreac Química S.A
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,41	VWR International

El control periódico del reactor se realizó mediante la determinación de los siguientes parámetros: pH, temperatura, oxígeno disuelto (OD), demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos totales (SST). Para la medición de pH, temperatura y OD, se utilizó el medidor multiparamétrico Professional Plus de YSI Environmental. Los análisis de DQO, SSV y SST fueron realizados por el Laboratorio de Análisis del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid. La DQO fue determinada por el método de reflujo cerrado con dicromato como oxidante fuerte. Los SSV y SST fueron analizados usando el método gravimétrico (APHA *et al.*, 1998).

Las variables controladas para la operación del reactor fueron: caudales de entrada, salida, recirculación y purga. Para la determinación de la carga orgánica volumétrica, carga másica y el tiempo de retención de sólidos se utilizaron las ecuaciones 1, 2 y 3 respectivamente.

$$L_{org} = \frac{Q \cdot S_o}{V} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\frac{F}{M} = \frac{Q \cdot S_o}{V \cdot X} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$SRT = \frac{V \cdot X}{(Q - Q_w) \cdot X_e + Q_w \cdot X_R} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde Q es el caudal de alimentación al reactor, Q_w es el caudal de purga, V es el volumen del reactor, X, X_e y X_R son la concentración de biomasa activa en el reactor, en el efluente, y en la corriente de recirculación, respectivamente, y S_o es la concentración de sustrato en el influente.

3.2 Ensayos de biodegradabilidad

3.2.1 Biodegradabilidad del sustrato

Se tomaron muestras diarias de la alimentación al reactor y de la salida del sedimentador para determinar la evolución temporal de la biodegradabilidad del sustrato; para ello se determinó la DQO de las muestras mediante el método de reflujo cerrado con dicromato como oxidante fuerte. Las muestras se llevan a ebullición con reflujo en presencia de sulfato de mercurio (II), de una cantidad conocida de dicromato potásico y de un catalizador de plata en medio fuertemente acidificado por ácido sulfúrico, durante 2 horas a 150°C. Después de la digestión, el dicromato no reducido se determina por valoración con sulfato de amonio ferroso. El valor de la DQO se determina a partir del dicromato reducido, que es el equivalente a la cantidad de materia oxidada.

3.2.2 Biodegradabilidad del ibuprofeno

Se determinó la DQO de muestras de ibuprofeno a diferentes concentraciones mediante el método de reflujo cerrado con dicromato como oxidante fuerte. Adicionalmente, se tomaron muestras diarias de la alimentación al reactor y de la salida del sedimentador para determinar la evolución temporal de la biodegradabilidad del ibuprofeno. Estas muestras se analizaron mediante HPLC.

El equipo de HPLC consta de un desgasificador en línea AF, una bomba 515 HPLC, un inyector 717 plus, un detector de conductividad 432 y una columna LC18; todos estos componentes son de marca Waters. La presión de la bomba es de 1,965 psi para proporcionar un caudal de 2ml/min. Se preparó un litro de diluyente usando 600 ml de acetonitrilo, 400 ml de H₂O MilliQ y 4 g de ácido cloroacético. La recta de calibración para el ibuprofeno se realizó con patrones de concentración desde 10mg/L a 100mg/L y se obtuvo un r² de 0,999.

3.3 Ensayos de ecotoxicidad

3.3.1 Concentración efectiva (EC₅₀) del ibuprofeno

La EC₅₀ representa la concentración del compuesto que afecta al 50% de una población de microorganismos inhibiendo algunas de sus propiedades (Mendoza *et al.*, 1998).

Para determinar la EC₅₀ del Ibuprofeno se utilizó el ensayo MICROTOX® diseñado por Strategic Diagnostic Inc. (Azur Environmental). Este ensayo se basa en la reducción de la luminiscencia de una bacteria marina, *Vibrio fischeri*, después de una breve exposición a productos químicos tóxicos, ya que éstos interfieren en su metabolismo (Shemer *et al.*, 2007). Estos cambios en la luminiscencia son medidos por medio de un fotómetro (analyzer Microtox modelo 500) y comparados con una muestra control.

El procedimiento de MICROTOX® incluye la medición de la luminiscencia en una suspensión de bacterias y la posterior medición de este parámetro en varias diluciones de la muestra a distintos periodos de tiempo (los más comunes son 5 y 15 minutos). Los cambios en la emisión de luz en cada dilución son ajustados con los cambios que ocurren naturalmente en la muestra control. La luz emitida por la bacteria disminuye dependiendo del grado de ecotoxicidad de la muestra (Vighi *et al.*, 2009).

Para cada ensayo se obtienen las mediciones de luz a tiempo 0, 5 y 15 minutos. Se calcula el parámetro "Gamma" para cada concentración y tiempo de exposición, que es el cociente entre la intensidad de luz perdida y la intensidad de luz remanente tras exponer el reactivo (suspensión de bacterias) a la muestra problema. Esta relación se calcula mediante la ecuación 4.

$$\text{Gamma} = \frac{\text{BR} \cdot I_0 - I_t}{I_t} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde BR es la razón del blanco (intensidad de luz emitida en la cubeta del blanco a tiempo t con respecto a la intensidad de luz emitida a tiempo cero) que corrige el efecto de la pérdida natural de luz (sin el contacto del reactivo con la muestra problema) que se produce al transcurrir el tiempo del ensayo, y donde I₀ e I_t son respectivamente, la intensidad de luz emitida a tiempo 0 y tiempo t por la muestra. Así mismo, se calcula el porcentaje de efecto (o porcentaje de pérdida de luz) de cada concentración de la muestra, comparado con el blanco (Ecuación 5).

$$\text{Efecto}(\%) = \frac{\text{Gamma}}{1 + \text{Gamma}} * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Por definición la EC₅₀ tiene lugar cuando Gamma=1. Así pues, el valor de la EC₅₀ se determina por interpolación cuando Gamma vale 1, a partir del gráfico de log(Gamma) vs. log(Concentración) en el cual existe relación lineal entre ambas variables.

3.3.2 Ecotoxicidad del influente y efluente

Para determinar la evolución temporal de la ecotoxicidad del influente y del efluente, se tomaron muestras diarias tanto de la alimentación al reactor como de la salida del sedimentador, y se analizaron mediante el ensayo MICROTOX®.

3.3.3 Hormesis del ibuprofeno sobre *Vibrio fischeri*

Se alimentó el reactor con cargas distintas de ibuprofeno para comprobar la respuesta de la bacteria *Vibrio fischeri* a concentraciones altas y bajas del compuesto. Para ello, se tomaron muestras diarias tanto de la alimentación al reactor como de la salida del sedimentador, y se analizaron mediante el ensayo MICROTOX®. Adicionalmente, los ensayos MICROTOX® se realizaron a diferentes diluciones de las muestras, lo que posibilitará poner de manifiesto la hormesis en el caso de que exista.

3.4 Caracterización del fango

Las características físico-químicas del ibuprofeno indican que potencialmente se puede transportar mayoritariamente en los sistemas acuíferos hasta las aguas superficiales y subterráneas, con un bajo potencial de afinidad por los suelos (Ramos, 2009). A pesar de ello, se realizaron análisis a los fangos para determinar si existía adsorción del ibuprofeno en la biomasa activa.

Se tomaron muestras de 100 mL de biomasa del reactor, este volumen se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante se separó y el sólido húmedo se llevó a una estufa a 105°C durante 24 horas. Al sólido seco se le adicionaron 15 mL de NaCl al 3.5% wt de concentración y se agitó durante 30

minutos. La mezcla resultante se sonicó durante 30 minutos. Posterior a la sonicación, la mezcla se centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, de este sobrenadante se extrajo la muestra para analizarla mediante HPLC.

Adicionalmente, se analizó una muestra de fango proveniente de la cuba de aireación de la EDAR de la ciudad de Valladolid y se la comparó con una muestra de fango del reactor utilizado en esta investigación, tomada a los 23 días de operación. Para ello se tomaron 20 μ L de cada muestra que se analizaron por microscopía de fluorescencia, con la ayuda de una cámara de color digital Leica DFC300 FX.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Montaje y puesta a punto de un reactor aerobio de fangos activos de mezcla completa (CMAS).

Mediante la variación de caudales y modificando la alimentación de carga orgánica al reactor se consiguió operarlo de forma continua dentro de los parámetros recomendados en la literatura (Metcalf & Eddy, 2003). En la tabla 2 se muestran los valores de los parámetros de operación del reactor durante todo el periodo de investigación.

Tabla 2: Parámetros de operación

Día de operación	V (L)	Q (L/d)	Q _r (L/d)	Q _w (L/d)	X (gSSV/L)	X _e (gSSV/L)	X _r (gSSV/L)	S _o (Sustrato + Ibu) (mgDQO/L)	L _{org} Sustrato (kgDQO/m ³ /d)	L _{org} Ibu (kgDQO/m ³ /d)	F/M (gDQO/gSSVLM/d)	SRT (d)	pH*	Temperatura* (°C)	OD* (mg O ₂ /L)
1	4,5	18,57	9,19	0,10	2,45	0,03	4,89	316	1,30	0,00	0,53	11	6,73	18,7	2,60
2	4,5	18,57	9,19	0,10	2,62	0,03	5,24	316	1,30	0,00	0,50	11	6,73	18,7	2,60
3	4,5	18,57	9,19	0,10	2,62	0,03	5,24	316	1,30	0,00	0,50	11	6,73	16,6	2,70
4	4,5	18,57	9,19	0,10	2,62	0,03	5,24	316	1,30	0,00	0,50	11	6,73	17,9	2,75
5	4,5	18,57	9,19	0,10	2,62	0,03	5,24	316	1,30	0,00	0,50	11	6,73	18,2	2,95
6	4,5	18,57	9,19	0,10	2,88	0,03	6,71	316	1,30	0,00	0,45	11	6,73	17,0	2,35
7	4,5	21,62	9,19	0,10	3,94	0,03	9,20	291	1,41	0,00	0,35	11	6,73	17,7	2,30
8	4,5	21,62	9,19	0,10	3,94	0,03	9,20	291	1,41	0,00	0,35	11	6,73	17,4	2,23
9	4,5	21,62	9,19	0,10	2,52	0,03	5,86	294	1,41	0,00	0,56	9	6,73	17,7	2,65
10	4,5	21,62	9,19	0,10	2,52	0,03	5,86	294	1,41	0,00	0,56	9	6,73	18,7	2,50
11	4,5	21,62	9,19	0,10	2,52	0,03	5,86	294	1,41	0,00	0,56	9	6,73	17,6	2,65
12	4,5	21,62	9,19	0,10	2,52	0,03	5,86	294	1,41	0,00	0,56	9	6,73	17,7	2,00
13	4,5	21,62	9,19	0,10	2,52	0,03	5,86	294	1,41	0,00	0,56	9	6,73	16,7	2,20
14	4,5	21,62	9,19	0,10	3,80	0,03	8,87	468	1,31	0,94	0,59	11	6,73	17,1	2,03
15	4,5	21,62	9,19	0,10	3,80	0,03	8,87	468	1,31	0,94	0,59	11	6,73	17,0	2,71
16	4,5	21,62	9,19	0,10	3,22	0,03	7,51	468	1,31	0,94	0,70	10	6,73	18,1	3,40
17	4,5	21,62	9,19	0,10	3,22	0,03	7,51	468	1,31	0,94	0,70	10	6,73	17,8	2,19
18	4,5	21,62	9,19	0,10	3,22	0,03	7,51	468	1,31	0,94	0,70	10	6,73	17,7	2,95
19	4,5	21,62	9,19	0,10	3,22	0,03	7,51	468	1,31	0,94	0,70	10	6,73	17,7	2,95
20	4,5	21,62	12,13	0,10	3,22	0,03	5,69	468	1,31	0,94	0,70	12	6,73	17,7	2,95
21	4,5	21,62	12,13	0,10	4,32	0,03	7,65	408	1,02	0,94	0,45	14	6,73	17,0	3,58
22	4,5	21,62	12,13	0,10	4,32	0,03	7,65	408	1,02	0,94	0,45	14	6,55	18,6	2,28
23	4,5	21,62	12,13	0,10	3,68	0,03	6,51	408	1,02	0,94	0,53	13	6,58	18,6	2,56
24	4,5	21,62	12,13	0,10	3,68	0,03	6,51	408	1,02	0,94	0,53	13	6,96	19,4	2,45
25	4,5	21,62	12,13	0,10	3,68	0,03	6,51	408	1,02	0,94	0,53	13	6,95	17,2	2,54
26	4,5	21,62	12,13	0,10	3,68	0,03	6,51	408	1,02	0,94	0,53	13	6,90	14,7	3,00
27	4,5	21,62	12,13	0,10	3,68	0,03	6,51	408	1,02	0,94	0,53	13	6,90	14,7	3,00

Tabla 2 Cont.2: Parámetros de operación

Día de operación	V (L)	Q (L/d)	Q _r (L/d)	Q _w (L/d)	X (gSSV/L)	X _e (gSSV/L)	X _r (gSSV/L)	S _o (Sustrato + Ibu) (mgDQO/L)	L _{org} Sustrato (kgDQO/m ³ /d)	L _{org} Ibu (kgDQO/m ³ /d)	F/M (gDQO/gSSVLM/d)	SRT (d)	pH*	Temperatura* (°C)	OD* (mg O ₂ /L)
28	4,5	21,62	12,13	0,10	3,68	0,03	5,12	408	1,02	0,94	0,53	14	6,73	18,7	2,60
29	4,5	21,62	12,13	0,10	3,68	0,03	5,12	408	1,02	0,94	0,53	14	6,73	18,7	2,60
30	4,5	21,62	12,13	0,10	3,68	0,03	6,51	408	1,02	0,94	0,53	13	6,73	16,6	2,70
31	4,5	21,62	12,13	0,10	3,68	0,03	6,51	408	1,02	0,94	0,53	13	6,73	17,9	2,75
32	4,5	21,62	12,13	0,10	3,68	0,03	6,51	408	1,02	0,94	0,53	13	6,73	18,2	2,95
33	4,5	21,62	12,13	0,10	3,68	0,03	6,51	160	0,59	0,18	0,21	13	6,73	17,0	2,35
34	4,5	21,62	12,13	0,10	3,68	0,03	6,51	174	0,66	0,18	0,23	13	6,73	17,7	2,28
35	4,5	21,62	12,13	0,10	3,12	0,03	5,51	174	0,66	0,18	0,27	12	6,73	17,4	2,23
36	4,5	21,62	12,13	0,10	3,12	0,03	5,51	174	0,66	0,18	0,27	12	6,73	17,7	2,65
37	4,5	21,62	12,13	0,10	2,66	0,03	4,69	153	0,56	0,18	0,28	11	6,73	18,7	2,50
38	4,5	21,62	15,07	0,10	2,66	0,03	3,77	153	0,56	0,18	0,28	12	6,73	17,6	2,65
39	4,5	21,62	15,07	0,10	2,66	0,03	3,77	153	0,56	0,18	0,28	12	6,73	17,7	2,00
40	4,5	21,62	15,07	0,10	2,66	0,03	3,77	153	0,56	0,18	0,28	12	6,73	16,7	2,20
41	4,5	21,62	15,07	0,10	2,66	0,03	3,77	153	0,56	0,18	0,28	12	6,73	17,1	2,03
42	4,5	21,62	15,07	0,10	2,66	0,03	3,77	182	0,70	0,18	0,33	12	6,73	17,0	2,81
43	4,5	21,62	15,07	0,10	2,66	0,03	3,77	182	0,70	0,18	0,33	12	6,73	18,1	3,40
44	4,5	21,62	15,07	0,10	2,26	0,03	3,20	213	0,84	0,18	0,45	11	6,73	17,8	2,19
45	4,5	21,62	15,07	0,10	2,26	0,03	3,20	213	0,84	0,18	0,45	11	6,73	17,7	2,95
46	4,5	21,62	15,07	0,10	2,26	0,03	3,20	213	0,84	0,18	0,45	11	6,73	17,7	2,95
47	4,5	21,62	15,07	0,10	2,26	0,03	3,20	213	0,84	0,18	0,45	11	6,73	17,7	2,95
48	4,5	21,62	15,07	0,10	2,26	0,03	3,20	213	0,84	0,18	0,45	11	6,73	17,0	3,58
49	4,5	21,62	15,07	0,10	2,32	0,03	3,29	242	0,98	0,18	0,50	11	6,55	18,6	2,28
50	4,5	21,62	15,07	0,10	2,62	0,03	3,72	242	0,98	0,18	0,44	12	6,58	18,6	2,56
51	4,5	21,62	15,07	0,10	2,62	0,03	3,72	242	0,98	0,18	0,44	12	6,96	19,4	2,45
52	4,5	21,62	15,07	0,10	2,62	0,03	3,72	242	0,98	0,18	0,44	12	6,95	17,2	2,54
53	4,5	21,62	15,07	0,10	2,62	0,03	3,72	242	0,98	0,18	0,44	12	6,90	14,7	3,00
54	4,5	21,62	15,07	0,10	2,62	0,03	3,72	242	0,98	0,18	0,44	12	6,90	14,7	3,00

Tabla 2 Cont.3: Parámetros de operación

Día de operación	V (L)	Q (L/d)	Q _r (L/d)	Q _w (L/d)	X (gSSV/L)	X _e (gSSV/L)	X _r (gSSV/L)	S _o (Sustrato + Ibu) (mgDQO/L)	L _{org} Sustrato (kgDQO/m ³ /d)	L _{org} Ibu (kgDQO/m ³ /d)	F/M (gDQO/gSSVLM/d)	SRT (d)	pH*	Temperatura* (°C)	OD* (mg O ₂ /L)
55	4,5	21,62	15,07	0,10	2,62	0,03	3,72	242	0,98	0,18	0,44	12	6,73	18,7	2,60
56	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	18,7	2,60
57	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	16,6	2,70
58	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	17,9	2,75
59	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	18,2	2,95
60	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	17,0	2,35
61	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	17,7	2,29
62	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	17,4	2,23
63	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	17,7	2,65
64	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	18,7	2,50
65	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	17,6	2,65
66	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	17,7	2,00
67	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	16,7	2,20
68	4,5	21,62	15,07	0,10	2,76	0,03	3,92	240	0,97	0,18	0,42	12	6,73	18,7	2,60
69	4,5	21,62	15,07	0,10	3,58	0,03	5,09	240	0,97	0,18	0,32	14	6,73	18,7	2,60

*pH ± 0,01; T ± 0,1°C; OD ± 0,01mg O₂/L.

4.2 Ensayos de biodegradabilidad

El desarrollo de esta actividad de investigación se extendió a lo largo de 69 días, pasando por tres etapas bien diferenciadas. La primera etapa, entre los días 0 y 13, la segunda entre los días 14 y 32, y por último, la tercera etapa entre los días 33 y 69. En la figura 2 se ilustra la evolución temporal de las cargas orgánicas de sustrato e ibuprofeno aplicadas al reactor y las eficacias de eliminación de las correspondientes DQOs durante el periodo completo de experimentación.

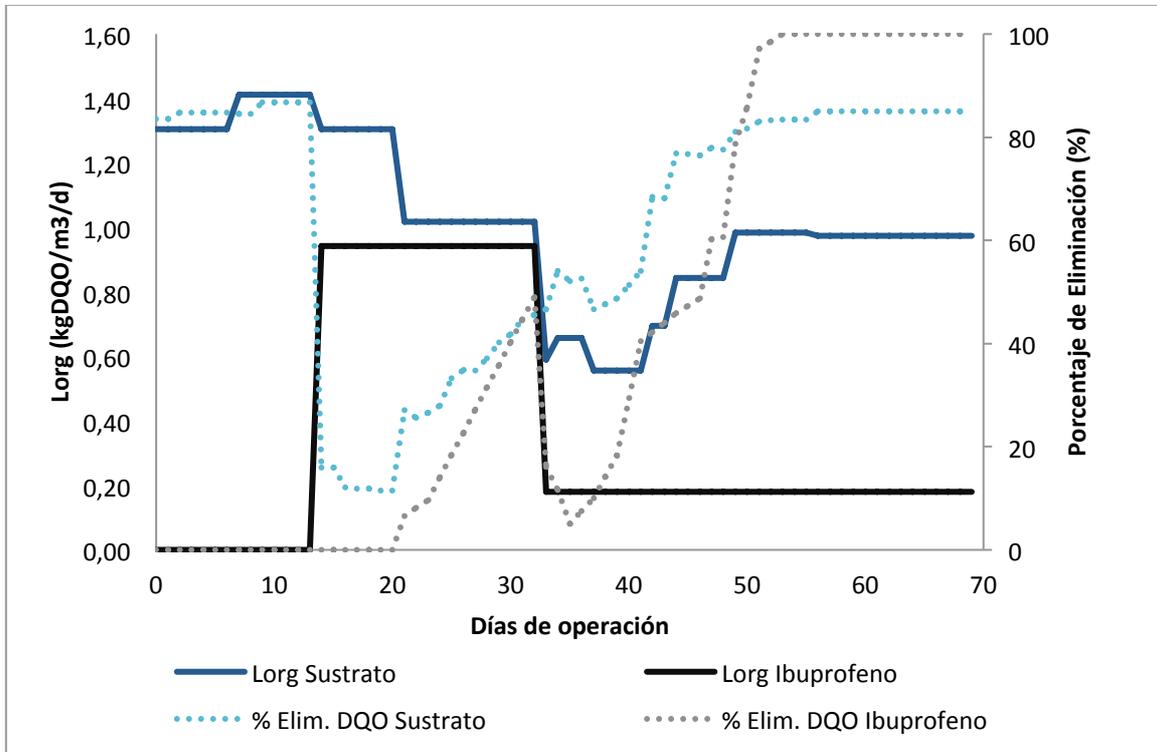


Figura 2: Biodegradabilidad del sustrato e ibuprofeno

La curva L_{org} Sustrato representa la carga orgánica alimentada al reactor (expresada en términos de DQO) por unidad de volumen de éste. En una primera etapa (desde el día 0 hasta el día 13), se fue aumentando la L_{org} del Sustrato (desde 1,30 hasta 1,41 kg DQO/m³/d), sin aplicar ninguna carga de ibuprofeno, hasta estabilizar la tasa de biodegradación del sustrato. Como se puede ver en la figura 2 la biodegradación del sustrato aumentó al incrementar la carga orgánica. A partir del día 9 se obtuvo una biodegradación del 87%. Una vez alcanzado este porcentaje de eliminación de sustrato, y comprobado el buen funcionamiento del sistema, se prosiguió con la segunda etapa del estudio (desde el día 14 hasta el día 32).

El día 14 se adicionó ibuprofeno a la corriente de alimentación, con una concentración de 90 mg/L (equivalente a una L_{org} del ibuprofeno de 0,94 kg DQO/m³/d). Como se puede observar en la figura 2, esto provocó que la biodegradación del sustrato se redujera del 87% al 16%. El aumento de la carga orgánica global (sustrato + ibuprofeno), a la vez que la aplicación de una dosis tan elevada de ibuprofeno en el reactor, pudieron ser las causantes de esa drástica disminución en la degradación del sustrato. Para discriminar la influencia de ambos efectos, el día 21 se decidió reducir la carga orgánica del sustrato aplicada al reactor (hasta 1,02 kg DQO/m³/d) de modo que la carga orgánica total (sustrato + ibuprofeno) se mantuviera en valores no muy superiores a los de la etapa 1. Se puede ver en la figura 2 que al disminuir la carga orgánica del sustrato, su porcentaje de biodegradación fue aumentando gradualmente hasta alcanzar un 45,6% al final de esta segunda etapa del estudio, lo que evidencia ciertos efectos tóxicos debidos al ibuprofeno que sin embargo se fueron reduciendo con el paso del tiempo. Por otro lado, no se observó biodegradación apreciable del ibuprofeno en esta segunda etapa hasta el día 21. A partir de este momento, la biomasa activa del reactor se vio sometida a una considerable reducción de sustrato, lo que originó un notable aumento en el porcentaje de biodegradación del ibuprofeno, alcanzándose un 49% al final de esta segunda etapa. Como conclusión, se ha podido observar durante la segunda etapa que altas cargas de ibuprofeno han producido efectos tóxicos que han dado lugar a una menor eliminación del sustrato

biodegradable, si bien estos efectos se han ido reduciendo a medida que la biomasa activa se ha ido aclimatando y se ha visto sometida a una menor carga de sustrato biodegradable.

Por último, el sistema se sometió a una tercera etapa (desde el día 33 hasta el día 69) en la que se redujo la carga orgánica de ibuprofeno a un valor constante de 0,18 kg DQO/m³/d y la carga orgánica del sustrato se modificó de forma decreciente y creciente. Se decidió empezar esta etapa con una carga orgánica de sustrato baja (0,59 kg DQO/m³/d) para aumentarla paulatinamente y observar su efecto sobre el porcentaje de biodegradación tanto del sustrato como del ibuprofeno. La biodegradación del sustrato aumentó a medida que aumentó la carga orgánica del sustrato alimentada al reactor. Sin embargo, a partir del día 44 se mantiene constante alrededor de un 80% de biodegradación. Así mismo, se puede ver en la figura 2 que a pesar de aumentar o disminuir la carga orgánica del sustrato, a partir del día 49 el porcentaje de biodegradación se mantiene prácticamente constante en valores en torno al 81-85%. De igual forma, la biodegradación del ibuprofeno, alimentado a bajas cargas, fue aumentando con el tiempo, hasta alcanzar una biodegradación del 100% el día 53. La biodegradación del ibuprofeno aumentó a medida que se incrementó la aplicación de carga orgánica del sustrato al reactor. No obstante una vez alcanzado el 100% de biodegradación del ibuprofeno, la disminución de la carga orgánica del sustrato no afectó sobre la eficacia de biodegradación del ibuprofeno.

Se puede concluir que el porcentaje de biodegradación máximo del sustrato que se ha podido conseguir en un reactor aerobio de lodos activos de mezcla completa bajo las condiciones de operación indicadas en la tabla 2 para la tercera etapa, ha sido del 85%. Adicionalmente, este sistema ha sido capaz de llevar a cabo la biodegradación completa del ibuprofeno.

4.3 Ensayos de ecotoxicidad

Los ensayos de ecotoxicidad se realizaron utilizando dos tipos de análisis: el *test básico* que emplea diluciones de la muestra al 5, 11, 22 y 45% de la concentración inicial; y, el *test de inhibición* que analiza la muestra a un 90% de la concentración inicial. En las figuras siguientes se reporta el efecto del ibuprofeno (de concentración inicial conocida, expresada en mg/L, y medida por HPLC) sobre la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri*.

Los ensayos de ecotoxicidad a diferentes diluciones de la muestra permiten conocer el efecto que tendría el contaminante al llegar a un curso fluvial o cualquier medio en el que sea vertido y experimente dilución.

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos al realizar el análisis de ecotoxicidad a una muestra de ibuprofeno con una concentración de 90 mg/L. Se puede observar que la EC₅₀ del ibuprofeno es de 40 mg/L. Además, se muestran los resultados obtenidos al realizar el mismo análisis a una muestra de la alimentación del reactor que contiene agua residual sintética e ibuprofeno con una concentración de 90 mg/L. En este caso, se alcanza la EC₅₀ del ibuprofeno, a una concentración de 81 mg/L. Estas curvas, describen un comportamiento típico de una curva dosis-efecto, a mayor dosis del contaminante (concentración de ibuprofeno) mayor efecto tóxico sobre las bacterias *Vibrio fischeri*.

Adicionalmente, se muestran los resultados obtenidos al realizar el mismo análisis a una muestra de la alimentación del reactor que contiene únicamente agua residual sintética, preparada según se indica en la metodología, con una concentración de 272mgCOD/L. Se puede observar que el ARS no presenta un efecto tóxico, por el contrario se evidencia un efecto de hormesis. Mediante este resultado se puede concluir que el efecto ecotoxicológico del ibuprofeno se ve reducido cuando éste se encuentra disuelto en ARS.

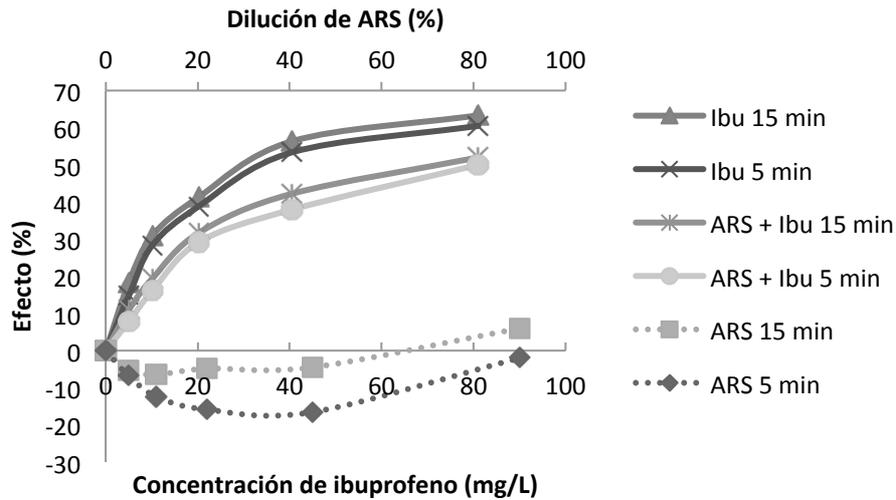


Figura 3: Evaluación ecotoxicológica de la alimentación del reactor con 90 mg/L de ibuprofeno

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos al realizar el análisis de ecotoxicidad a una muestra de ibuprofeno con una concentración de 10 mg/L. No se llegó a alcanzar la EC_{50} ; a una concentración de 9 mg/L se consigue el efecto de inhibición más alto del 35%. Además, se muestran los resultados obtenidos al realizar el mismo análisis a una muestra de la alimentación del reactor que contiene agua residual sintética (272 mgCOD/L) e ibuprofeno con una concentración de 10 mg/L. En este caso, tampoco se alcanza la EC_{50} del ibuprofeno; a una concentración de 9 mg/L se consigue el efecto de inhibición más alto del 27%. Adicionalmente, se muestran los resultados obtenidos al realizar el mismo análisis a una muestra de la alimentación del reactor que contiene únicamente ARS. Se puede observar que el ARS no presenta un efecto tóxico; por el contrario, se evidencia un efecto de hormesis.

Al comparar las figuras 3 y 4 se puede observar que la ecotoxicidad del ibuprofeno disminuye al disminuir su concentración. De igual forma se puede apreciar que a concentraciones altas de ibuprofeno la diferencia en el efecto inhibitorio a 5 y 15 minutos es mínima; mientras que a bajas concentraciones la inhibición de emisión de luz es mayor a los 15 minutos; este resultado muestra que el ibuprofeno no tiene un efecto tóxico agudo inicial, pero que al transcurrir el tiempo el efecto tóxico aumenta sobre las *Vibrio fischeri*. Adicionalmente, se puede advertir que el efecto de hormesis del ARS (272 mgCOD/L), que reduce la ecotoxicidad del ibuprofeno con respecto a su disolución en agua, tiene un mayor efecto a concentraciones altas de ibuprofeno.

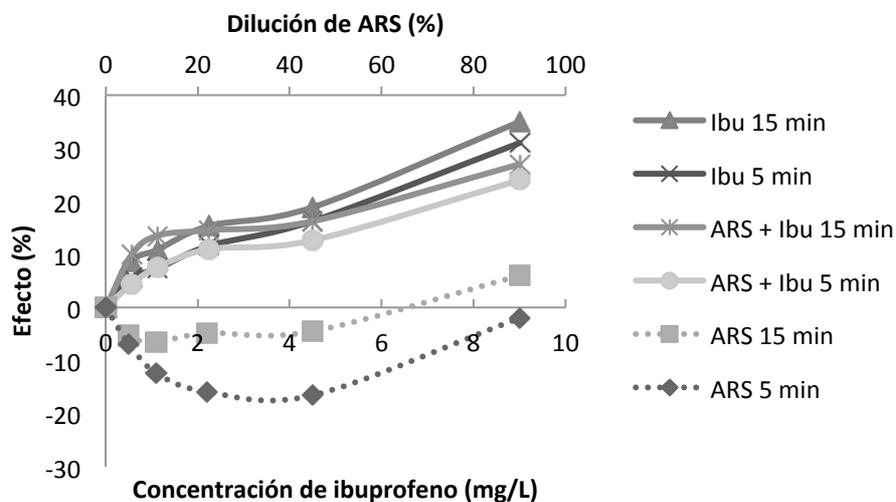


Figura 4: Evaluación ecotoxicológica de la alimentación del reactor con 10 mg/L de ibuprofeno

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos al realizar el análisis de ecotoxicidad a una muestra de efluente del reactor a los 21 días de operación. En este periodo de tiempo la alimentación del reactor fue agua residual sintética (212 mgCOD/L) e ibuprofeno con una concentración de 90 mg/L. No se llegó a alcanzar la EC_{50} del ibuprofeno; a una concentración de 75,6 mg/L de ibuprofeno se consigue el efecto de inhibición más alto del 26%. Comparando con la figura 3 se puede observar que la ecotoxicidad del efluente disminuyó con relación a la de la alimentación en la que a una concentración de 81 mg/L de ibuprofeno se consigue un efecto de inhibición del 50%. Este resultado se puede relacionar con los presentados en la figura 2 donde se observa que para el día 21 de operación la eliminación del ibuprofeno fue de alrededor del 6%.

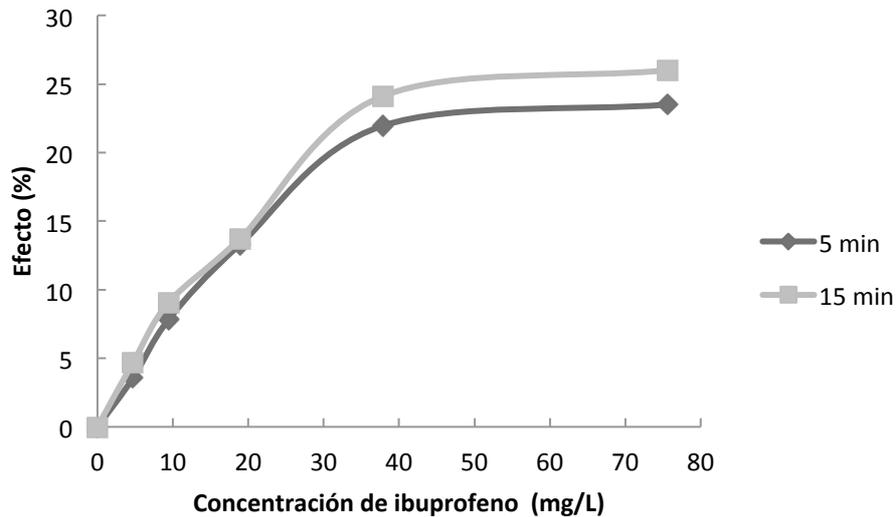


Figura 5: Evaluación ecotoxicológica del efluente a los 21 días de operación

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos al realizar el análisis de ecotoxicidad a una muestra de efluente del reactor a los 44 días de operación. En este periodo de tiempo la alimentación del reactor fue agua residual sintética (176 mgCOD/L) más ibuprofeno con una concentración de 10 mg/L. No se llegó a alcanzar la EC_{50} ; a una concentración de 4,8 mg/L de ibuprofeno se consigue el efecto de inhibición más alto del 16%. Comparando con la figura 4 (ecotoxicidad de la alimentación) se puede observar que la ecotoxicidad del efluente disminuyó en relación a la de la alimentación en la que a una concentración de 9 mg/L se consigue un efecto de inhibición del 27%. Este resultado se puede relacionar con los presentados en la figura 2 donde se observa que para el día 44 de operación la eliminación del ibuprofeno fue de alrededor del 46%.

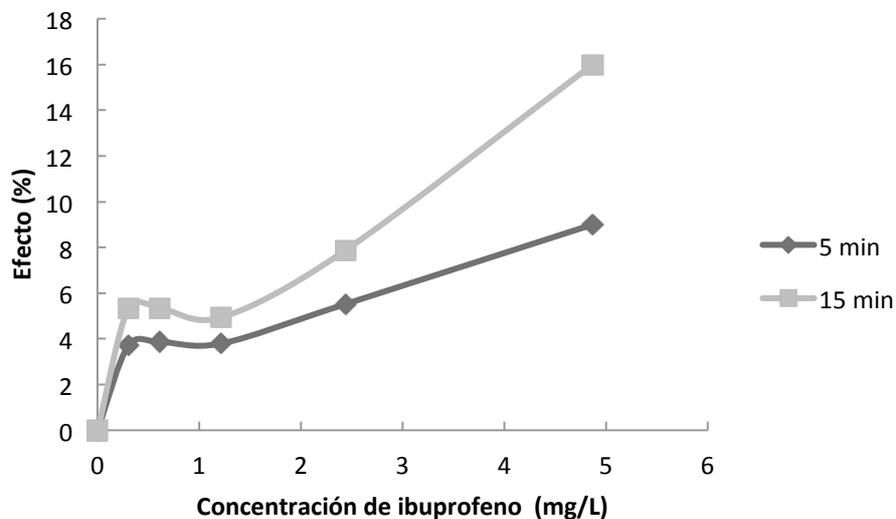


Figura 6: Evaluación ecotoxicológica del efluente a los 44 días de operación

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos al realizar el análisis de ecotoxicidad a una muestra de efluente del reactor a los 50 días de operación. No se llegó a alcanzar la EC_{50} del ibuprofeno, alcanzándose el efecto de inhibición más alto del 15% a una concentración de 1,3 mg/L de ibuprofeno. Este resultado se puede relacionar con los presentados en la figura 2 donde se observa que para el día 50 de operación la eliminación del ibuprofeno fue de alrededor del 86%. Así mismo, se puede señalar que las curvas de la figura 7 no muestran un comportamiento típico de una curva dosis-efecto. Este comportamiento se puede explicar como un efecto de hormesis. Este resultado representa una respuesta de compensación por parte de la bacteria *Vibrio fischeri* como consecuencia de una interrupción inicial en la homeostasis (Calabrese & Baldwin, 2002; Calabrese, 2008). En este sentido la hormesis se presenta como un proceso en el que la exposición a una dosis baja de ibuprofeno, que es tóxico a altas dosis, induce un efecto beneficioso adaptativo en la bacteria *Vibrio fischeri*.

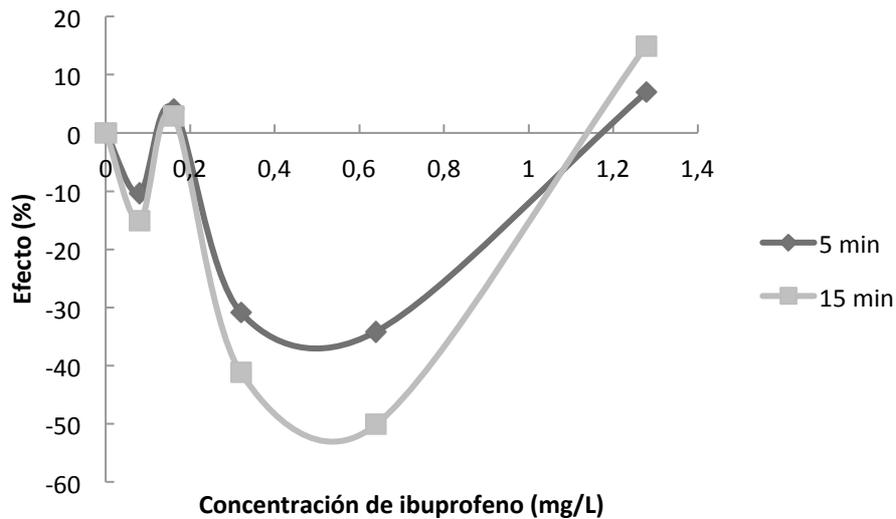


Figura 7: Evaluación ecotoxicológica del efluente a los 50 días de operación

En las figuras 8 y 9 se representan los resultados obtenidos al realizar el análisis de ecotoxicidad a una muestra de efluente del reactor a los 55 y 59 días de operación. Puesto que para estos tiempos de operación la eliminación de ibuprofeno no pudo calcularse ya que la concentración en el efluente se encontraba por debajo del límite de detección del método del HPLC (<1 mg/L), los efectos ecotoxicológicos del efluente se han representado en función de los niveles de dilución del efluente. Al igual que el caso anterior, estas gráficas no describen un comportamiento típico de una curva dosis-efecto, presentando un comportamiento de hormesis. En este caso el efecto de hormesis podría deberse al agua residual sintética (sustrato no biodegradable), a concentraciones traza de ibuprofeno que pudieran quedar en el efluente por debajo de los límites de detección del HPLC o a metabolitos producidos al degradarse el ibuprofeno. Estos resultados son consistentes con los presentados en la figura 3 y 4, donde los análisis a la muestra de agua residual sintética presentan un efecto de hormesis sobre la bacteria *Vibrio fischeri*.

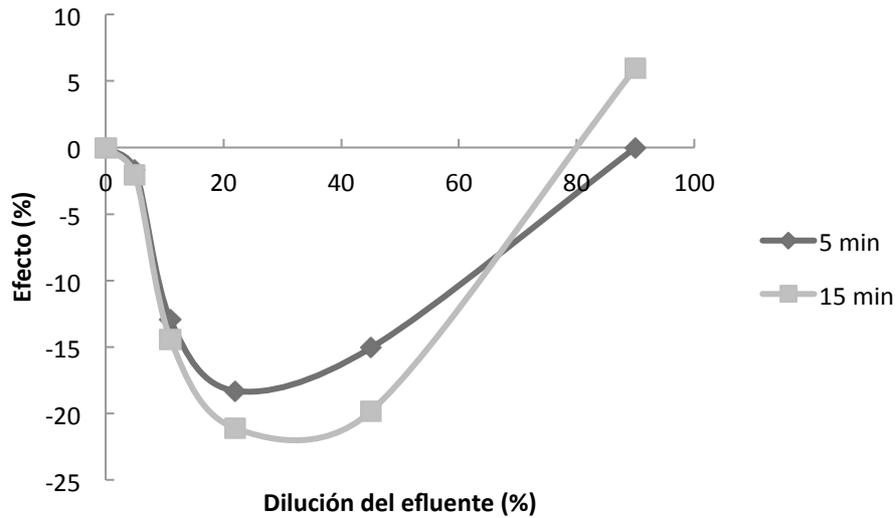


Figura 8: Evaluación ecotoxicológica del efluente a los 55 días de operación

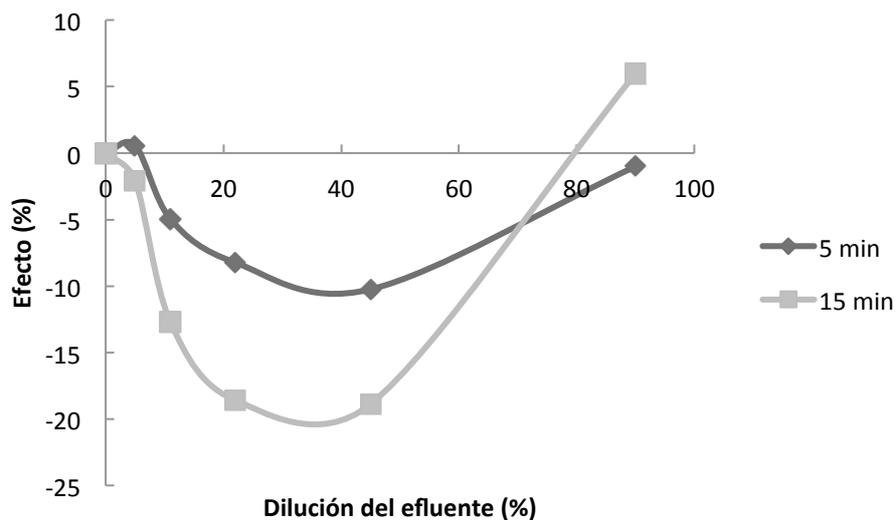


Figura 9: Evaluación ecotoxicológica del efluente a los 59 días de operación

Por último, en la figura 10 se resumen los resultados de los análisis de ecotoxicidad, mostrando la evolución temporal de la ecotoxicidad del influente y del efluente diluidos al 90% para ensayos realizados a 5 y 15 minutos. Se puede observar la reducción del porcentaje de efecto tóxico a medida que pasan los días de operación. Estos resultados demuestran que la biomasa activa se fue adaptando al ibuprofeno y apoyan los resultados obtenidos en los ensayos de biodegradabilidad. Al reducirse el efecto tóxico del ibuprofeno sobre la biomasa activa, las bacterias lo utilizaron como sustrato y lo degradaron hasta alcanzar una eliminación del ibuprofeno de aproximadamente un 100%.

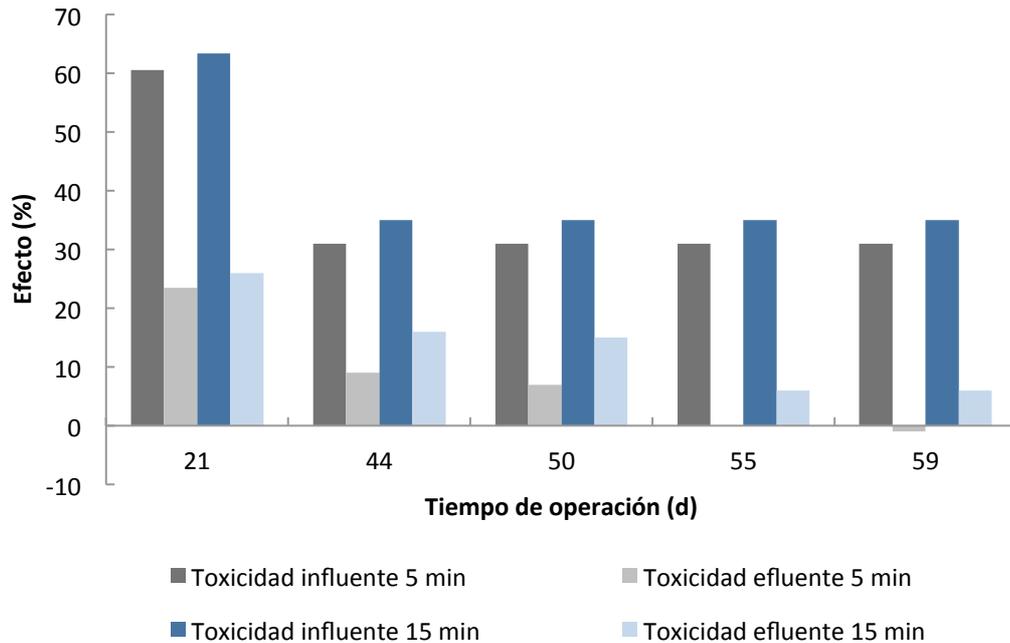


Figura 10: Evolución de la disminución del efecto tóxico

Al haber operado en continuo durante varias semanas, los resultados obtenidos pueden ser utilizados como el resultado de un análisis de ecotoxicidad crónica. Los análisis de Microtox® son análisis de ecotoxicidad aguda, que demuestran el efecto que el contaminante tiene en el momento del análisis sobre una bacteria. Sin embargo, al analizar el comportamiento del reactor durante varias semanas se pudo determinar el efecto que tiene el contaminante a lo largo del tiempo. Tras los 69 días de operación se pudo concluir que el ibuprofeno no tiene un efecto tóxico crónico sobre la biomasa activa; la continua exposición de los microorganismos al ibuprofeno permitió que éstos se adaptasen al contaminante y que lo pudieran degradar prácticamente al 100%.

Adicionalmente, se demostró que el agua residual sintética presenta un efecto beneficioso sobre la ecotoxicidad del ibuprofeno, el efecto tóxico de este compuesto se ve reducido al estar diluido en ARS. Así mismo, se ha comprobado que las concentraciones bajas de ibuprofeno presentaron un efecto estimulador sobre las bacterias *Vibrio fischeri*.

4.4 Caracterización de fango

Las muestras de fangos analizadas por medio de HPLC demostraron que el ibuprofeno no se adsorbía en el fango. Las muestras fueron tomadas a los 51 días de operación, cuando la eliminación de ibuprofeno en la fase acuosa alcanzaba un 97%. Con este resultado y al eliminarse el ibuprofeno de la fase acuosa podemos concluir que el ibuprofeno fue biodegradado por los microorganismos.

En cuanto a las características físicas y biológicas del fango, las muestras de fango provenientes de la cuba de aireación de la EDAR de la ciudad de Valladolid presentaron un color marrón oscuro, al analizarlas mediante microscopía de fluorescencia se pudieron observar los siguientes microorganismos: aspidisca, coleps, gusano, ameba desnuda, suctor, arcella, rotífero, epistylis y filamentosas (ver figura 11). Los microorganismos predominantes fueron las filamentosas, la proliferación de estos microorganismos genera problemas de bulking, su presencia indica bajas cargas másicas y bajas concentraciones de oxígeno disuelto.

Por otro lado, a lo largo de esta investigación el fango tomó un color marrón claro. A los 23 días de operación en una muestra analizada mediante microscopía de fluorescencia se pudieron observar los siguientes microorganismos: ameba desnuda, vorticella, rotífero, aspidisca cicada, gusano, acella y epistylis (ver figura 12). Los microorganismos predominantes fueron las epistylis, este tipo de microorganismo indica una buena calidad de fango y oxigenación adecuada.

Se puede concluir que con el paso del tiempo las filamentosas fueron desapareciendo y las epistylis aumentaron, esto mejoró las características del fango lo que permitió tener altos porcentajes de biodegradabilidad y no se generaron problemas de bulking.

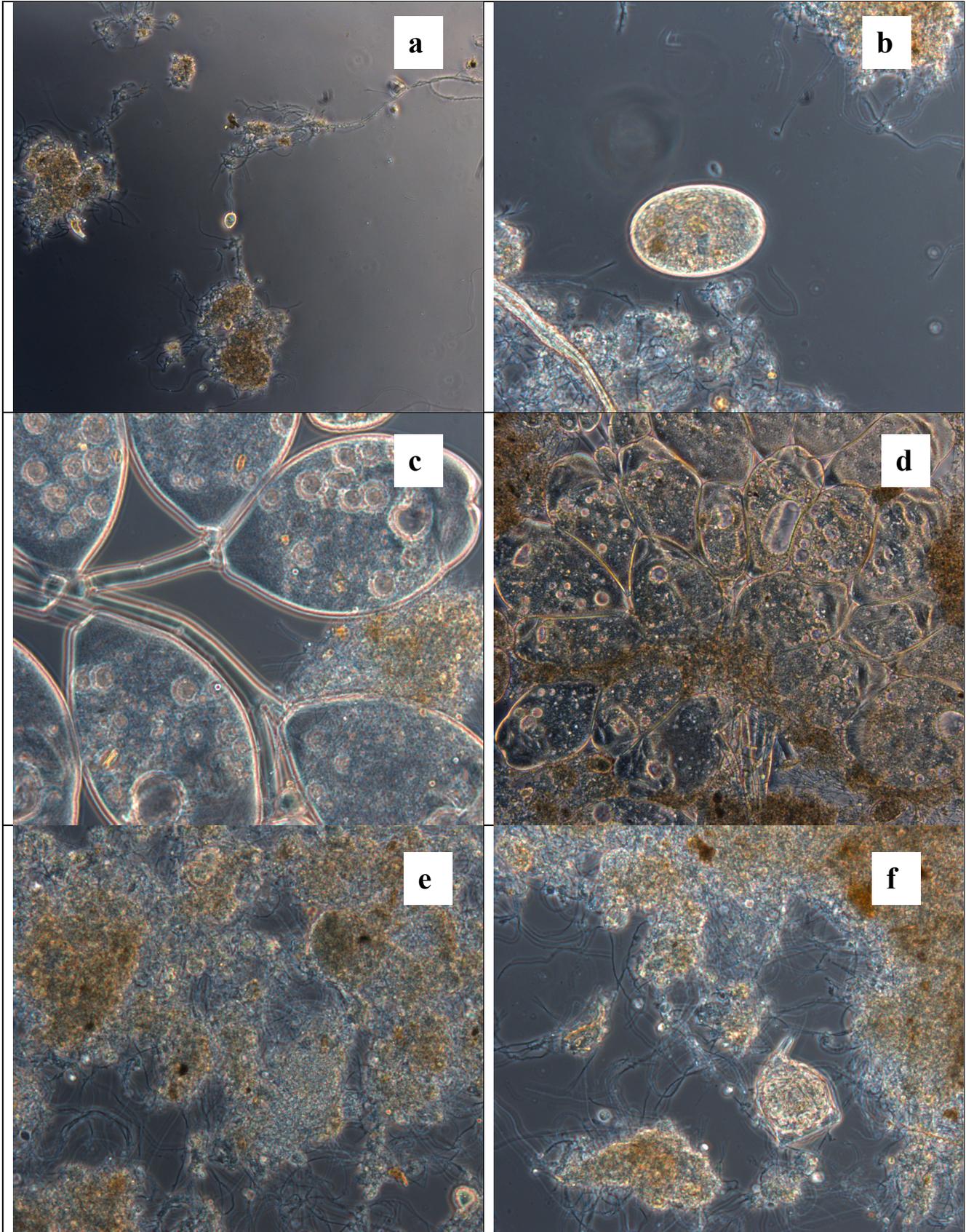


Figura 11: Microorganismos presentes en el fango proveniente de la EDAR de la ciudad de Valladolid
a) Filamentosas; b) Huevo, filamentosas, gusano; c) Opercularia; d) Epistylis; e) Filamentosas; f) Rotífero

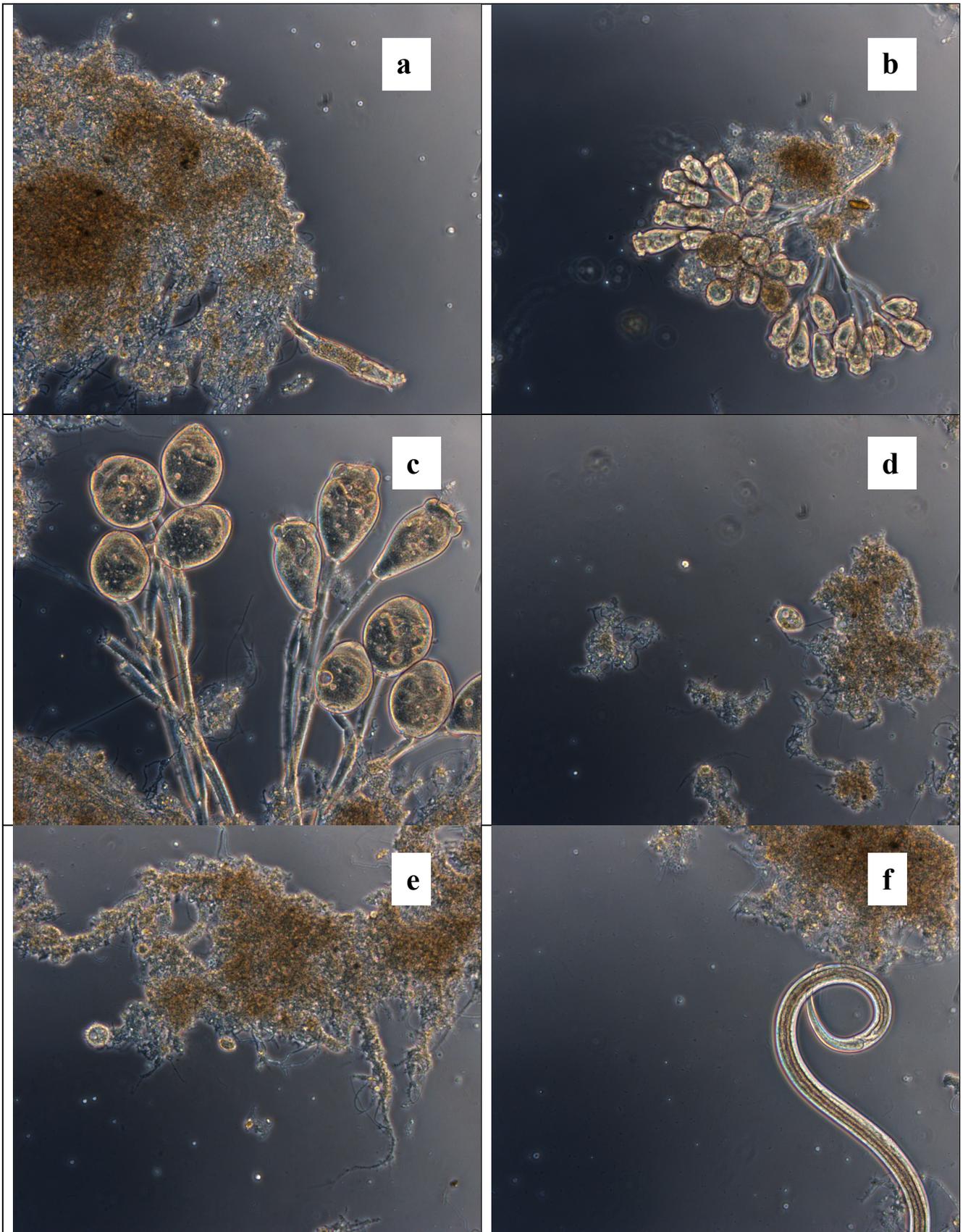


Figura 12: Microorganismos presentes en el fango del reactor biológico a los 23 días de operación
a) Rotífero; b) Epistylis; c) Epistylis; d) Vorticela; e) Aspidisca; f) Gusano

5. BIBLIOGRAFÍA

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition. Washington, APHA, AWWA, WWCF, 1998.
- Brain, R. A., Hanson, M. L., Solomon, K. R., & Brooks, B. W. (2008). Aquatic plants exposed to pharmaceuticals: effects and risks. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 67-115). Springer New York.
- Barceló, L. D., & de Alda, M. J. L. (2011). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. *Informes CSIC*.
- Calabrese, E. J. (2008). Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(7), 1451-1474.
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2002). Defining hormesis. *Human & experimental toxicology*, 21(2), 91-97.
- Cartagena, C. J. (2011). Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos. *Revista Lasallista de Investigación*, 8(2).
- Choi, K., Kim, Y., Jung, J., Kim, M. H., Kim, C. S., Kim, N. H., & Park, J. (2008). Occurrences and ecological risks of roxithromycin, trimethoprim, and chloramphenicol in the Han River, Korea. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(3), 711-719.
- Christofi, N., Hoffmann, C., & Tosh, L. (2002). Hormesis responses of free and immobilized light-emitting bacteria. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52(3), 227-231.
- Collado, N., Buttiglieri, G., Ferrando-Climent, L., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Comás, J., & Rodríguez-Roda, I. (2012). Removal of ibuprofen and its transformation products: Experimental and simulation studies. *Science of The Total Environment*, 433, 296-301.
- Diputación de Valencia. (1998). *Microbiología de la depuración mediante fangos activados*. Valencia: EGEVASA.
- García-Gómez, C., Gortáres-Moroyoqui, P., & Drogui, P. (2011). Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción Emerging contaminants: effects and removal treatments. *Revista Química viva*, 10(2), 96-105.
- Ge, H. L., Liu, S. S., Zhu, X. W., Liu, H. L., & Wang, L. J. (2010). Predicting hormetic effects of ionic liquid mixtures on luciferase activity using the concentration addition model. *Environmental science & technology*, 45(4), 1623-1629.
- Heberer, T. (2002). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*, 266(3), 175-189.
- Iannacone, J., & Alvaríño, L. (2009). Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. *Ecol. apl*, 8(1-2), 71-80.
- Khan, S. J., & Ongerth, J. E. (2002). Estimation of pharmaceutical residues in primary and secondary sewage sludge based on quantities of use and fugacity modelling. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 46(3), 105.
- Metcalf & Eddy, *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse*. 4th Edition. McGraw-Hill, New York, 2003.
- Mendoza, J., Montañés, M. & Palomares, A. (1998). *Ciencia y tecnología del medio ambiente*. Valencia: Servicio de Publicaciones.
- Ortiz, S.A., Irusta, R., Garcia, P., Pinto, G., 2013. Consumption and Occurrence of Pharmaceutical and Personal Care Products in the Aquatic Environment in Spain. *Sci. Tot. Environ.* 444, 451-465.

- Park, S., & Choi, K. (2008). Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*, 17(6), 526-538.
- Peñate, I. Q., Haza, U. J. J., Wilhelm, A. M., & Delmás, H. (2009). Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 40(3), 173-179.
- Quesada Penate, I. (2009). Métodos no convencionales para el tratamiento de aguas contaminadas con productos farmacéuticos. (Doctoral dissertation, Universidad de Toulouse).
- Ramos, Caridad. Medicamentos de consumo humano en el agua, propiedades físico-químicas . *Rev Cubana Hig Epidemiol* [online]. 2009, vol.47, n.2, pp. 0-0. ISSN 1561-3003.
- Raloff, J. (1998). Drugged waters. *Science News*, 153(12), 187-189.
- Reyes-Contreras, C., Matamoros, V., Ruiz, I., Soto, M., & Bayona, J. M. (2011). Evaluation of PPCPs removal in a combined anaerobic digester-constructed wetland pilot plant treating urban wastewater. *Chemosphere*, 84(9), 1200-1207.
- S.A. Snyder, S. Adham, A.M. Redding, F.S. Cannon, J. DeCarolis, J. Oppenheimer, E.C. Wert, Y. Yoon. 2007. Role of Membranes and Activated Carbon in the Removal of Endocrine Disruptors and Pharmaceuticals. *Desalination*. 202, 156.
- Shemer, H., & Linden, K. G. (2007). Photolysis, oxidation and subsequent toxicity of a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 187(2), 186-195.
- Stebbing, A. R. (1997). A theory for growth hormesis. *Belle Newsletter*, 6, All-All.
- Suárez, S., & Omil, F. (2008). Presencia de compuestos farmacéuticos en aguas residuales y posibilidades de eliminación en estaciones depuradoras. *Aguas continentales. Informes CSIC*, 225–240.
- Suárez, S., Carballa, M., Omil, F., & Lema, J. M. (2008). How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters?. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2), 125-138.
- Suárez, S., Lema, J. M., & Omil, F. (2010). Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products(PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *water research*, 44(10), 3214-3224.
- Torre, J. A. C., Lehamann, A. H., González, I. C., Carmona, E. M., & Muñoz, A. H. (2007). Presencia de fármacos en aguas residuales y eficacia de los procesos convencionales en su eliminación (Doctoral dissertation, Universida Politécnica de Madrid).
- Vieno N, Tuhkanen T & Kronberg L, 2006. Removal of pharmacuitcals in drinking water treatment: effect of chemical coagulation. *Environ Technol.*, 27:183-192.
- Vighi, M., Migliorati, S., & Monti, G. S. (2009). Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). I: QSAR equation for narcotics and polar narcotics. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(1), 154-161.
- Zupanc, M., Kosjek, T., Petkovšek, M., Dular, M., Kompare, B., Širok, B., ... & Heath, E. (2012). Removal of pharmaceuticals from wastewater by biological processes, hydrodynamic cavitation and uv treatment. *Ultrasonics sonochemistry*.III
- Zwiener, C., & Frimmel, F.,(2000). Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Research*. 34:1881-1885.
- Zwiener, C., & Frimmel, F. H. (2003). Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibric acid, ibuprofen, and diclofenac. *Science of the Total Environment*, 309(1), 201-211.