



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE MÁSTER

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

**“INFLUENCIA DE LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE EL TRATAMIENTO DE AGUA
RESIUDAL DE PURINES DE CERDO UTILIZANDO FOTOBIOREACTORES”**

Autor: Carlos Alonso Martínez

Tutoras: Javiera Collao Torres y Silvia Bolado Rodríguez

ÍNDICE

1. Introducción.....	3
1.1 Agua residual de cerdo	3
1.2 Antibióticos en el medio ambiente	3
1.3 Tratamiento de aguas residuales con fotobiorreactores	4
1.4 Microalgas	5
1.5 Consorcio microalga-bacteria	7
1.6 Tetraciclina, Sulfadiazina y Ciprofloxacina	7
2. Objetivos	10
2.1 Objetivo general	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. Materiales y métodos	11
3.1 Agua residual de purín de cerdo e inculo	11
3.2 Fotobiorreactores y condiciones de cultivo	11
3.3 Diseño experimental	12
3.4 Preparación disoluciones dopado	12
3.5 Procedimientos analíticos	13
3.6 Determinación de antibióticos	15
3.6.1 Extracción en fase sólida (SPE)	16
3.6.2 Evaporación	17
3.6.3 Acondicionamiento para la inyección en UHPLC-MS/MS	17
3.6.4 Condiciones de trabajo UHPLC-MS/MS	17
4. Resultados y discusión	19
4.1 Crecimiento microalgal	18
4.2 Quantum Yield	19
4.3 Sólidos suspendidos totales	21
4.4 Carbono Total Orgánico	22
4.5 Nitrógeno Total	24
4.6 Amonio	26
4.7 Remoción de antibióticos en los fotobiorreactores	28
5. Discusión	32
6. Conclusiones	34
7. Bibliografía	35

- **Abstract.**

In recent years, wastewater treatment systems based on photosynthetic microorganisms have been widely studied for their ability to simultaneously remove organic matter and nutrients with a low energy cost. In addition, they offer the possibility of revaluing the cultivated biomass to obtain value-added products.

The main advantages of the biomass of microalgae cultivated in photobioreactors are the high reproduction capacity, the growth capacity in adverse environments, such as in salt water, wastewater, ice, etc., the low nutritional requirement and the tolerance to a high range. pH, temperature and contaminants.

Disadvantages of microalgae cultivation include the high costs of cultivation using synthetic media and the consumption of water. The cultivation of microalgae in wastewater can solve these problems. Microalgae and bacteria grow symbiotically in wastewater treatment photobioreactors, which also purify wastewater at a very low cost and without using chemicals, maximizing the recovery of nutrients and with a low energy cost. The biomass generated can be used in different applications such as in the fertilizer industry, animal feed, or bioenergy production, among others.

However, the presence of organic pollutants and antibiotics in wastewater can affect this type of photobioreactor, altering their microbiota and affecting the treatment of wastewater, the effluents obtained and the biomass grown in these systems.

In this work, the influence of three antibiotics (tetracycline, sulfadiazine and ciprofloxacin) on the communities of microorganisms present in them is studied experimentally, using eight photobioreactors. For this, several experimental parameters are controlled during three stages, an initial stage where the photobioreactors are allowed to function correctly, followed by a second stage in which the feeding of the photobioreactors is doped with the study antibiotics, and a third stage in which the feed is stopped doping and the recoverability of the photobioreactors is checked.

In addition, the concentration of antibiotics present both in the feed to the photobioreactors and in their effluent is determined using UHPLC-MS / MS.

Finally, it is concluded that after the beginning of doping with antibiotics, the microalgal community begins to decrease in all the doped reactors. In addition, studying the removal of nutrients and antibiotics, it is observed that the microalgal community can effectively eliminate tetracycline, but not sulfadiazine or ciprofloxacin, and at the cost of deteriorating performance in photobioreactors.

- **Resumen.**

En los últimos años, los sistemas de tratamiento de aguas residuales basados en microorganismos fotosintéticos han sido ampliamente estudiados por su capacidad para eliminar simultáneamente materia orgánica y nutrientes con un bajo coste energético. Además, ofrecen la posibilidad de revalorizar la biomasa cultivada para obtener productos de valor añadido.

Las principales ventajas de la biomasa de microalgas cultivadas en fotobiorreactores son la elevada capacidad de reproducción, la capacidad de crecimiento en ambientes adversos, como en aguas saladas, aguas residuales, hielo, etc., el bajo requerimiento nutricional y la tolerancia a un elevado rango de pH, temperatura y contaminantes.

Como desventajas del cultivo de microalgas cabe destacar los elevados costes de cultivo empleando medios sintéticos y el consumo de agua. El cultivo de microalgas en aguas residuales permite resolver estos problemas. En los fotobiorreactores de tratamiento de aguas residuales crecen simbióticamente microalgas y bacterias que además depuran las aguas residuales con muy bajo coste económico y sin usar productos químicos, maximizando la recuperación de nutrientes y con un bajo coste energético. La biomasa generada puede ser empleada en distintas aplicaciones como en la industria de los fertilizantes, alimentación animal, o producción de bioenergía, entre otras.

Sin embargo, la presencia de contaminantes orgánicos y antibióticos en las aguas residuales puede afectar a este tipo de fotobiorreactores, alterando la microbiota de los mismos y afectando al tratamiento de las aguas residuales, a los efluentes obtenidos y a la biomasa crecida en estos sistemas.

En este trabajo se estudia, experimentalmente, empleando ocho fotobiorreactores la influencia de tres antibióticos (tetraciclina, sulfadiazina y ciprofloxacina) en las comunidades de microorganismos presentes en estos. Para ello se controlan varios parámetros experimentales durante tres etapas, una etapa inicial donde se deja que los fotobiorreactores funcionen correctamente, seguida de una segunda etapa en la que la alimentación de los fotobiorreactores es dopada con los antibióticos de estudio, y una tercera etapa en la que la alimentación se deja de dopar y se comprueba la capacidad de recuperación de los fotobiorreactores.

Además, se determina la concentración de antibióticos presentes tanto en la alimentación de los fotobiorreactores como en el efluente de estos, mediante UHPLC-MS/MS.

Finalmente se concluye, que después del comienzo del dopaje con antibióticos la comunidad microalgal comienza a disminuir en todos los reactores dopados. Además, estudiando la remoción de nutrientes y antibióticos, se observa que la comunidad microalgal puede eliminar efectivamente la tetraciclina, pero no la sulfadiazina ni la ciprofloxacina, y con el coste del empeoramiento del rendimiento en los fotobiorreactores.

1. Introducción.

1.1. Agua residual de cerdo.

El aumento de la población mundial ha supuesto un aumento en el consumo de carne. El cerdo como una de las carnes más populares en el mundo representa alrededor del 38% de la producción a nivel mundial de carne en todo el mundo [1].

Con una demanda de carne de cerdo tan grande las granjas de cerdos se están expandiendo rápidamente lo que conlleva una mayor cantidad de aguas residuales porcinas, llegándose a producir 460 millones de toneladas de aguas residuales en 2011 en China, además, la tendencia de la demanda mundial de carne de cerdo esta al alza, por lo que la cantidad de aguas residuales porcinas seguirán aumentando en el futuro [1].

Es ampliamente conocido que las aguas residuales porcinas contienen gran cantidad de materia orgánica, sólidos, coliformes fecales y nutrientes. Sin embargo, desde principios de la década de 1950, cuando se comenzó a utilizar una gran variedad de medicamentos y aditivos alimentarios en la ganadería para tratar infecciones y mejorar el crecimiento y la eficiencia alimentaria, elevadas cantidades de antibióticos empezaron aparecer en las aguas residuales porcinas. Según un informe, aproximadamente el 88% de los cerdos en crecimiento en los EE.UU reciben antibióticos [1]. Sin embargo, solo el 70-80 % de los antibióticos son absorbidos por los cerdos, la mayoría de ellos no se metabolizan por completo, siendo excretados a través de las heces y la orina en formas inalteradas o como metabolitos. Por lo tanto, los desechos porcinos son una fuente importante de antibióticos en el medio ambiente [2].

1.2. Antibióticos en el medio ambiente.

Los antibióticos son un tipo de medicamentos ampliamente utilizados en el mundo, no sólo para el tratamiento de las enfermedades en los humanos, sino también en los animales. El uso de antibióticos en la ganadería responde a la necesidad de luchar contra una amplia variedad de enfermedades e infecciones. En líneas generales, un uso adecuado de estos tratamientos promueve la salud y el bienestar de los animales y garantiza el suministro de alimentos seguros a los consumidores [3].

Los antibióticos presentes en las aguas residuales porcinas, se descargan continuamente en plantas de tratamiento de residuos ganaderos y terminan en ambientes acuáticos [4]. Adicionalmente, debido a las prácticas agrícolas en la mayoría de los países en desarrollo y algunos países desarrollados, los desechos porcinos son ampliamente utilizados como fertilizantes. Por lo que se consideran fuentes importantes de estos contaminantes ambientales [5]. Varios estudios han reportado la detección de antibióticos en aguas superficiales, aguas subterráneas y suelos cercanos a las granjas de cerdos [1].

Es ampliamente conocido que la aparición y los residuos de los antibióticos plantean serias amenazas para la salud humana y el medio ambiente, porque podrían generar bacterias resistentes a los antibióticos. Los estudios de ecotoxicidad demostraron que tales contaminantes podrían afectar el crecimiento, la reproducción y el comportamiento de aves, peces, invertebrados, plantas y bacterias, incluso a niveles tan bajos como ng/L [6].

Los antibióticos en el suelo también influyen en los microorganismos presentes en el suelo. Ha sido reportado que los antibióticos en el suelo pueden alterar la constitución y función microbiana del suelo inhibiendo los microbios esenciales necesarios para suministrar nutrientes a las plantas. Esto se ha demostrado en informes que indicaron que los antibióticos en el suelo perturbaban la salud y crecimiento de plantas y dan como resultado cultivos atrofiados y la disminución del rendimiento cuando la tierra de cultivo es fertilizada con purines de cerdo que contienen antibióticos [7].

En la *Tabla 1*. se indican las concentraciones de los antibióticos mayoritarios encontrados en aguas residuales de cerdos.

Tabla 1. Concentraciones de antibióticos encontrados en aguas residuales de cerdos.

Familia	Fármacos	Concentración (µg/L)	Referencia
Tetraciclinas	Clortetraciclina	13 - 34	[8]
	Doxiciclina	1004 - 2554	
	Oxitetraciclina	37 - 150	
	Tetraciclina	120 - 1532	
Sulfonamidas	Sulfadiazina	99	[9]
	Sulfametacina	0.008-1.59	
	Sulfatiazol	0.44 - 324	
Fluoroquinolones	Enrofloxacina	62 - 269	[8]
	Ciprofloxacina	15 - 45	

1.3. Tratamiento de aguas residuales con fotobiorreactores.

Debido a la naturaleza antibacteriana, muchos antibióticos no se pueden eliminar eficazmente en las plantas de tratamiento de aguas residuales mediante lodos de depuradora activados, compuestos por bacterias. Muchos procesos como adsorción, oxidación avanzada, microalgas y fotocatalisis se han estudiado para eliminar antibióticos [10].

El proceso de tratamiento de aguas residuales con microalgas es un proceso sencillo y necesita pocos agentes químicos. Además, puede diseñarse para eliminar eficazmente los contaminantes emergentes como los antibióticos. Recientemente, se ha estudiado la tecnología basada en microalgas como un método eficaz para tratar aguas municipales e industriales con ventajas como la fijación de CO₂ y eliminación de contaminantes [10].

También se ha introducido tecnología basada en microalgas para tratar aguas residuales que contienen productos farmacéuticos como antibióticos. Los estudios han demostrado que las microalgas pueden eliminar eficazmente los antibióticos de las aguas residuales [11].

Los fotobiorreactores (PBR, por sus siglas en inglés) son los equipos más utilizados para este fin, se desarrollaron para el cultivo masivo de microalgas. Para su correcto funcionamiento se debe mantener el medio estable (temperatura, pH y concentración de oxígeno disuelto) además de proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento, incluyendo la luz. Existen

dos tipos de PBRs, abiertos y cerrados. En los PBRs abiertos existe un menor control del entorno a un menor coste y en los PBRs cerrados se consigue unas condiciones muy controladas que permiten a las microalgas crecer a una velocidad optima a cambio de un mayor coste económico [12]. Habitualmente se emplean PBRs cerrados para crecimiento de monocultivo de microalgas destinadas a la producción de compuestos de alto valor añadido para el consumo humano. Los fotobiorreactores empleados para el tratamiento de aguas residuales son siempre abiertos, y en ellos crecen cultivos mixtos de diferentes especies de microalgas y de bacterias.

La tasa de eliminación de antibióticos en los PBRs de tratamiento de aguas residuales depende en gran medida de las especies de algas, aunque existen pocos estudios experimentales sobre la capacidad de eliminación de antibióticos por parte de microalgas y en muchos casos se trabaja en medios sintéticos. Por ejemplo, *Microcystis aeruginosa* presentó un porcentaje de remoción del 33% para la espiramicina y del 34% para la amoxicilina. La eliminación de ciprofloxacina por *Chlamydomonas mexicana* fue del 13%, *Nannochloris sp.* consigue eliminar el 11% de trimetoprima y el 32% de sulfametoxazol. Sin embargo, la especie *Chlorella* es muy eficaz para la eliminación de muchos antibióticos y se usa comúnmente para eliminar el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), la amoxicilina, la cefalexina y la cefixima [10].

El potencial de la tecnología basada en microalgas para la eliminación de antibióticos debe evaluarse más a fondo utilizando aguas residuales reales, explorando la capacidad de remoción de antibióticos de las diferentes especies de microalgas. Debido al escaso estudio de la influencia de antibióticos como la tetraciclina, la sulfadiazina y la ciprofloxacina sobre microalgas de la especie *Chlorella*, ampliamente empleada en plantas de tratamiento de aguas residuales, el presente trabajo tendrá como objetivo su investigación.

1.4. Microalgas.

Las algas forman parte de un variado grupo de organismos fotosintéticos que van desde el reino procariota al reino eucariota [13]. Este grupo se puede dividir en dos subgrupos, las microalgas, especies unicelulares de tamaños hasta 0.2µm; y las macroalgas con estructura multicelular y tamaños de hasta 60m. En PBRs comúnmente se emplean microalgas, cuyos componentes mayoritarios son proteínas, carbohidratos y lípidos. El contenido de estos compuestos varía según la especie y las condiciones de cultivo [14].

El uso de microalgas por parte de los humanos comienza a principios de los años 50, cuando debido al aumento de población mundial y la posible escasez de alimentos proteicos, se comenzaron a buscar fuentes de proteínas alternativas, lo que impulso el estudio de los usos y aplicaciones de las microalgas [15].

Los grandes esfuerzos en investigación han hecho que las microalgas sean una realidad comercial, existiendo en la industria diferentes tipos de microalgas comerciales como *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Nannochloris*, *Nitzschia*, *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis* y *Skeletonema* [13].

Las microalgas son consideradas una materia prima renovable, y a través de las biorrefinerías, pueden producir biocombustible, energía y productos de alto valor. Las microalgas producen una serie de sustancias funcionales como ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos, proteínas, pigmentos naturales, minerales esenciales, vitaminas, aminoácidos esenciales y otras moléculas bioactivas [17].

Otra de las aplicaciones de las microalgas se encuentra en el tratamiento de residuos generados por la industria, la agricultura y las zonas residenciales. Las microalgas presentan una serie de características que las hacen idóneas para este fin [18]:

- Son capaces de utilizar los nutrientes presentes en las aguas residuales, cuya composición mayoritaria son carbono, nitrógeno y fósforo.
- La producción de oxígeno por la fotosíntesis favorece la eliminación de la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) a la vez que favorece la degradación de la materia orgánica y evita la necesidad de aporte de oxígeno a los reactores.
- A través de la modificación del pH del medio, de la concentración de oxígeno disuelto o liberando al medio metabolitos inhibidores son capaces de la eliminación de patógenos.

La biomasa microalgal producida presenta múltiples aplicaciones, algunas de las cuales se ven limitadas por los controles de seguridad y toxicidad, como son las aplicaciones en los campos de la fabricación de alimentos, cosmética y cuidado de la piel. Aun así, la biomasa microalgal producida en aguas residuales presenta una gran cantidad de aplicaciones.

- El elevado contenido en nitrógeno y fósforo de las microalgas cultivadas en aguas residuales, hacen que su biomasa sea un excelente fertilizante [19].
- Algunas microalgas como *Spirulina* y *Chlorella* se utilizan como suplemento alimentario animal, sobre todo en especies acuáticas [20].
- Una de las alternativas en la obtención de biocombustible a escala comercial de forma económica y sostenible es el empleo de biomasa algal [21].
- A partir de biomasa microalgal se ha conseguido producir bioplásticos, aunque las propiedades mecánicas son mucho más limitadas en comparación con otros bioplásticos [22].

Sin embargo, existe un problema en el uso de microalgas para la remoción de antibióticos y es que se puede producir la inhibición de las microalgas por el efecto de los antibióticos. Los antibióticos pueden afectar el crecimiento de las algas a través de inhibición de la síntesis de sustancias químicas como la clorofila y mediante la alteración de la actividad de enzimas como la catalasa y el superóxido dismutasa [23].

La inhibición de las microalgas se mide a través de la concentración efectiva máxima CE_{50} , que se define como la concentración de antibiótico que inhibe el 50% del crecimiento de algas. Para *Chlorella*, se han publicado los valores de CE_{50} de ciprofloxacina, tetraciclina y sulfametoxazol de 9.7 mg/L [10].

1.5. Consorcio microalga-bacteria.

La simbiosis entre microalgas y bacterias existente en los PBRs facilita la depuración de aguas residuales, maximizando la recuperación de nutrientes con un bajo consumo energético, minimizando así la huella de carbono del proceso. Esta tecnología iniciada en los años 50 por William J. Oswald en California ha experimentado un gran avance en los últimos 7 años debido a la posibilidad de recuperar y transformar las diferentes fracciones de carbohidratos, lípidos y proteínas para su posterior valorización [24].

En los sistemas microalga-bacteria se produce una relación de simbiosis en la que las microalgas generan el oxígeno que necesitan las bacterias para consumir la materia orgánica del medio. Cuando las bacterias degradan la materia orgánica producen dióxido de carbono y otros compuestos simples, que son utilizados por las microalgas para crecer y producir más oxígeno mediante fotosíntesis, necesitando únicamente el aporte de luz externa al medio. Además, el nitrógeno y el fósforo presente en el medio son eliminados de las aguas residuales por las microalgas que utilizan estos nutrientes para su crecimiento. En todo este proceso se genera biomasa, que como ya se ha comentado anteriormente puede ser empleada en una futura valorización [25].

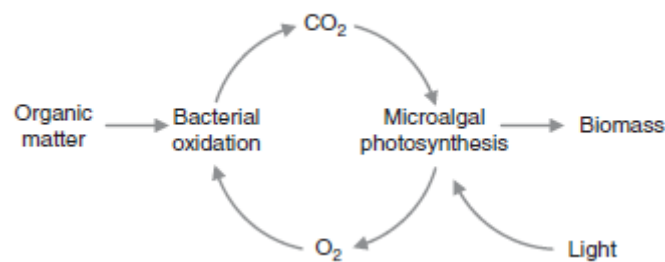


Figura 1. Interacción microalga-bacteria. Extraído de [25].

Actualmente, la presencia de elevadas concentraciones de contaminantes orgánicos y antibióticos en las aguas residuales se ha convertido en un problema real. La presencia de antibióticos en las aguas residuales tiene efectos problemáticos sobre los microorganismos, la estabilidad y el desempeño de procesos que se producen en los PBRs [25].

Existen estudios para cuantificar la concentración necesaria de antibióticos que podrían alterar esta simbiosis en el tratamiento de aguas residuales. Los resultados muestran que concentraciones de 0.1 mg/L de sulfadiazinas y tetraciclinas fueron suficientes para disminuir la eficacia de los PBRs [26].

1.6. Tetraciclina, sulfadiazina y ciprofloxacina.

Experimentalmente los tres antibióticos de trabajo van a ser la tetraciclina (TC), la sulfadiazina (SDZ) y la ciprofloxacina (CIP). Por lo que a continuación se van a estudiar algunas características de estos compuestos.

➤ **Tetraciclina.**

La tetraciclina es un antibiótico de la familia de las tetraciclinas, es uno de los antibióticos más empleado, en 1953 aparece por primera vez en la farmacopea británica y en 1955 ya se registran cepas resistentes a este antibiótico.

La tetraciclina como antibiótico tiene varios mecanismos de actuación:

- Desacopla la fosforilación oxidativa de las bacterias.
- Altera la membrana citoplasmática de organismos susceptibles permitiendo la salida de componentes intracelulares.
- Provoca la inhibición de los ribosomas 30S de las bacterias.

En cuanto a sus usos es empleado en ganado porcino para tratar la neumonía enzoótica porcina, pasteurelosis porcina, leptospirosis porcina causadas por cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* y *Leptospira spp* [27].

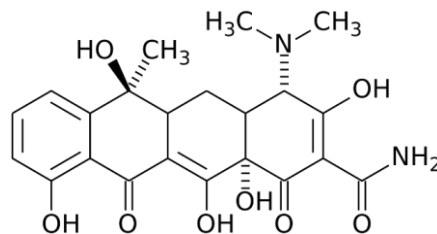


Figura 2. Estructura de la tetraciclina.

➤ **Sulfadiazina.**

La sulfadiazina es un antibiótico que pertenece a la familia de las sulfonamidas, su mecanismo de acción es la inhibición la enzima dihidropteroato sintetasa, la cual inhibe la utilización del ácido paraaminobenzoico en la síntesis de ácido fólico, un metabolito importante en la síntesis del ADN en bacterias. Como los animales no sintetizan el ácido fólico por esta vía se facilita una toxicidad selectiva para células bacterianas

En el ganado porcino el uso de la sulfadiazina está indicado para el tratamiento del síndrome metritis-mamitis-agalaxia (MMA), rinitis atrófica y diarrea causada por *Escherichia coli* [28].

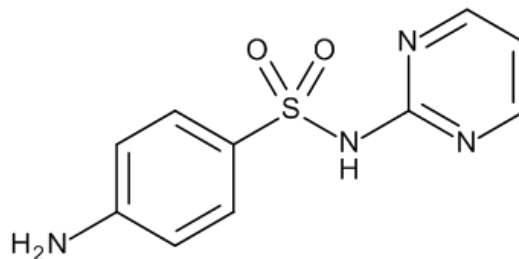


Figura 3. Estructura de la sulfadiazina.

➤ **Ciprofloxacina.**

La ciprofloxacina es un antibiótico de la familia de las fluoroquinolonas. Actúa paralizando la replicación del ADN de las bacterias al unirse con una enzima llamada ADN girasa, la cual queda bloqueada impidiendo el superenrollamiento del ADN, lo que no permite a otras enzimas llevar a cabo la replicación del material genético, por lo que la bacteria que incapacitada para dividirse y acaba muriendo [29].

En cuanto a su uso la ciprofloxacina se emplea para la prevención y tratamiento de las infecciones causadas por bacterias Gram positivas, Gram negativas y *mycoplasmas*, así como en infecciones respiratorias, digestivas, septicémicas y genitourinarias de ganado porcino [29].

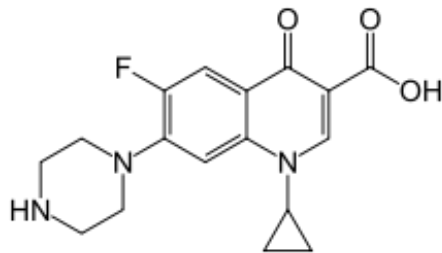


Figura 4. Estructura de la ciprofloxacina.

2. Objetivos.

2.1. Objetivo general.

El presente trabajo tiene como objetivo principal estudiar el efecto de la presencia de antibióticos en el rendimiento y crecimiento de microalgas durante tratamiento de agua residual de cerdo con PBRs.

2.2. Objetivos específicos.

- Cultivar microalgas en PBRs abiertos que tratan agua residual de cerdo.
- Caracterizar el contenido físico-químico y de antibióticos en agua residual de purín de cerdo utilizada como alimentación en PBRs.
- Exponer PBRs que tratan agua residual de cerdo a concentraciones de 1.5 mg/L de tetraciclina, 1.5 mg/L de sulfadiazina y 0.1 mg/L de ciprofloxacina.
- Determinar la concentración de los antibióticos en el efluente de los PBRs mediante UHPLC-MS/MS para determinar la remoción por parte de las microalgas.
- Evaluar el efecto de la presencia de antibióticos sobre el rendimiento de fotobiorreactores durante el tratamiento de agua residual de purín de cerdo mediante la estimación de la concentración y remoción de nutrientes en los efluentes obtenidos y determinar el efecto en el crecimiento de microalgas.

3. Materiales y métodos.

3.1 Agua residual de purín de cerdo e inóculo.

El agua residual de purín de cerdo (PWW, siglas en inglés) se obtuvo de una granja cercana en Cantalejo (España) y se conservó siempre a 4 °C. El PWW fue centrifugado a 10.000 rpm durante 5 minutos (centrífuga ThermoScientific Sorvall Leyenda RT+) y el sobrenadante obtenido fue diluido al 5% (v/v) con agua del grifo para ser utilizado como alimentación. Cabe mencionar que la alimentación fue preparada cada dos días y conservada a una temperatura de 4°C.

El inóculo de microalga fue obtenido desde un reactor abierto cultivado bajo condiciones indoor en el Departamento de Ingeniería Química y Medio Ambiente Tecnología de la Universidad de Valladolid (España).

3.2 Fotobiorreactores y condiciones de cultivo.

El sistema empleado para llevar a cabo la experimentación bajo condiciones de laboratorio (*Figura 5*), consistió en ocho fotobiorreactores abiertos de 3 L de capacidad nombrados como R1, R2, R3, R4, RA, RB, RC y RD. Cada PBR fue diseñado con una tubería de entrada y salida. En la tubería de entrada se introducía la alimentación, la cual era bombeada mediante una bomba peristáltica (auto control 205U7CA multicanal, Watson-Marlow, UK) y la tubería de salida estaba conectada a un recipiente en el que se recuperaba el efluente de cada uno de los PBRs obtenido por rebose. Cada PBR estaba equipado en su interior con un agitador, que permitía mantener el cultivo mezclado homogéneamente; un pHmetro (Crison multimeter M44), que estaba conectado a un equipo el cual permitía medir continuamente el pH y mantenerlo a 8.0 mediante adición automática de CO₂. Todos los PBR estaban iluminado por un panel LED, en el que se alternan ciclos de luz y oscuridad a 12:12 horas (8:00 a 20:00). Además, los reactores fueron mantenidos en una cámara de cultivo bajo condiciones de crecimiento indoor con temperatura ambiental controlada, la cual se encontraba a 28 ± 3 °C.

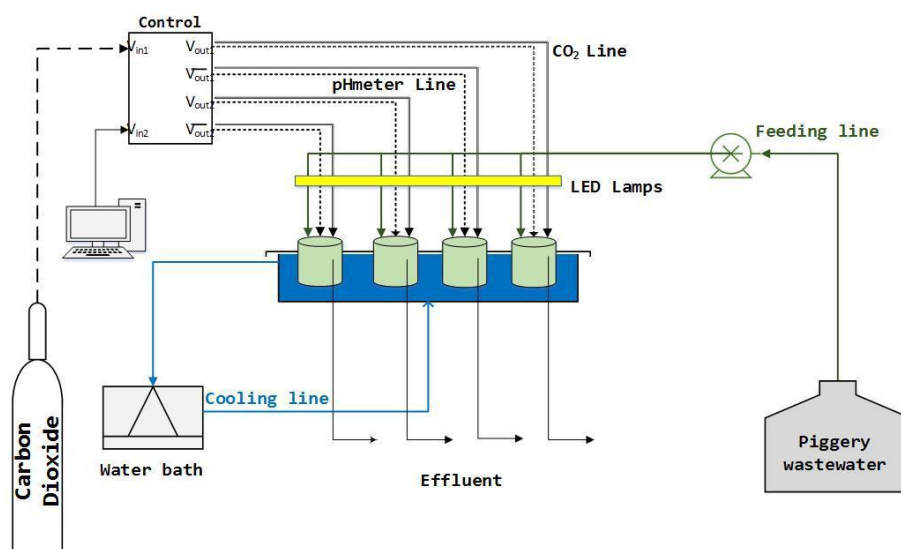


Figura 5. Diagrama del sistema de PBRs. Extraído de [30].

3.3 Diseño experimental.

El diseño experimental consistió en tres fases operacionales con el objetivo de observar un efecto antes, durante y después de la exposición de antibióticos en el rendimiento de los reactores.

En primer lugar, cada PBR fue inoculado con un cultivo de microalgas al 10% v/v de su capacidad y completado los 3L con alimentación de purín de cerdo diluida al 5% v/v con agua de grifo, la cual fue añadida de modo continuo a un tiempo de retención hidráulica (HRT) de 6 días. Una vez obtenida la fase estacionaria de cultivo y los parámetros físicos-químicos fueron estables (fase I) se llevó a cabo la fase II que consistió en mantener los dos sistemas de cuatro PBRs con la alimentación dopada con los tres antibióticos de estudio (TC, SDZ y CIP). En cada sistema de cuatro PBRs uno de ellos se mantenía como control (R1), otro PBR fue dopado con 1.5 mg/L de TC (R2), otro fue dopado con 0.1 mg/L de CIP (R3) y otro con 1.5 mg/L de SDZ (R4), como se indica en la *Figura 6*. En el otro sistema de PBRs se reprodujo el mismo diseño experimental, pero nombrando RA al PBR control, RB al PBR dopado con TC, RC al PBR dopado con CIP y RD al PBR dopado con SDZ. La fase II, correspondiente a la fase de dopaje, fue mantenida durante 23 días, transcurrido ese tiempo se detuvo el dopaje de antibióticos y todos los reactores fueron alimentados nuevamente con alimentación basal (fase III), es decir, purín diluido al 5% v/v.

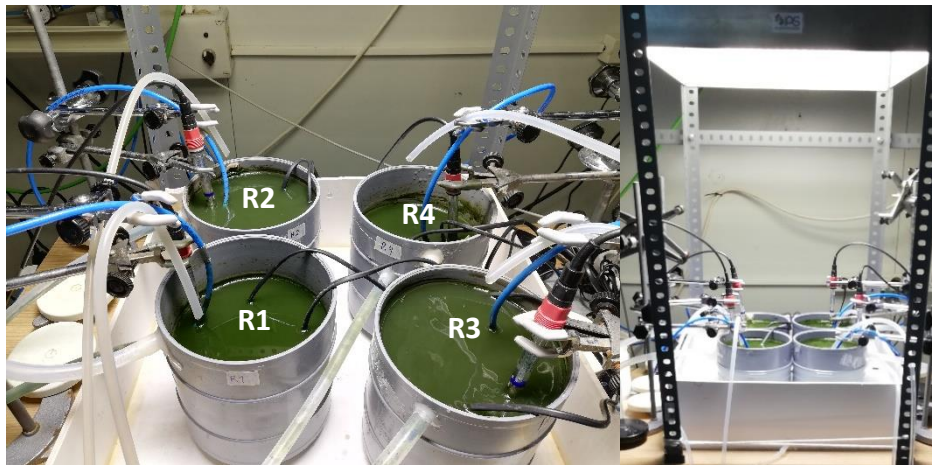


Figura 6. Sistema de cuatro PBRs empleado durante la investigación.

3.4 Preparación disoluciones dopado.

Para añadir las concentraciones de antibióticos en la alimentación de los reactores dopados fue necesario preparar tres disoluciones (llamadas disoluciones madres) a una concentración de 15.000 mg/L de TC y SDZ y 500 mg/L de CIP a partir de los estándares de alta pureza (>95%) proporcionados por Sigma-Aldrich. Para preparar la disolución de TC se empleó Tetracycline hydrochloride/Sigma Aldrich/31741/250MG, para la disolución de SDZ Sulfadiazine/Sigma Aldrich/S8626/25G y para la de CIP Ciprofloxacin: PHR1167-1G. Para ello se pesaron en balanza analítica los pesos exactos de los estándares comerciales y se disolvieron en metanol (MeOH), excepto la CIP que se diluyó en una mezcla MeOH/H₂O (1:1, v/v) con un 0.2%

de ácido clorhídrico, para evitar su precipitación. Cabe mencionar que las disoluciones contienen MeOH, por lo tanto, a los reactores control (R1 y RA) se les añadió la cantidad equivalente de esta disolución (200 µL) para determinar un posible efecto tóxico de este disolvente en el rendimiento de los reactores.

Una vez preparadas las disoluciones madre, estas se conservaron a -20 °C. Posteriormente, a partir de las disoluciones madres se prepararon las disoluciones “hija”, estas disoluciones fueron preparadas para evitar la degradación de estos compuestos, ya que se degradan fácilmente debido a cambios de temperatura o exposición lumínica. Para preparar las disoluciones “hija” se tomó 1 mL desde la disolución madre de TC y SDZ y 2mL en el caso de la CIP para ser diluidas en 100 mL de agua miliQ, obteniéndose disoluciones hijas de concentración 150 mg/L para TC y SDZ y 10 mg/L para CIP. Estas disoluciones hijas fueron conservadas a 4 °C y en oscuridad. Finalmente, desde las disoluciones hijas se cogían 20 mL y se añadían a 2 L de alimentación para obtener la concentración de antibiótico deseado para cada reactor. En la *Tabla 2*. se encuentra un esquema de cómo fueron preparadas estas disoluciones.

Tabla 2. Preparación de disoluciones de dopaje.

Antibiótico	Peso/g	V _{final} /mL	[Madre]/mgL ⁻¹	Dilución	[Hija] /mgL ⁻¹	Dilución	[dopado]/mg/L ⁻¹
Tetraciclina	0.0854	5	15000	1/100	150	1/100	1.5
Ciprofloxacina	0.0051	10	500	1/50	10	1/100	0.1
Sulfadiazina	0.0758	5	15000	1/100	150	1/100	1.5

3.5 Procedimientos analíticos.

Para determinar la calidad de vertido de efluentes durante el desarrollo del experimento, diversos análisis físicos-químicos fueron llevados a cabo de manera rutinaria. La temperatura fue medida en el interior de los PBRs mediante una sonda térmica (OXI 330i oximete, WTW, Germany). La alimentación y el efluente fueron muestreados continuamente para determinar el contenido de sólidos suspendidos totales (SST), carbono orgánico total (TOC), nitrógeno total (TN), amonio (N-NH₄⁺) y el contenido de antibióticos.

El efluente recuperado en cada PBR fue separado en dos fracciones, una se utilizó para determinar los SST, donde cada la muestra fue filtrada en un filtro de nylon con tamaño de poro 0.7 µm, y secada en una estufa a 105 °C durante 24 horas. La segunda fracción de efluente fue utilizada para determinar los parámetros químicos. El efluente fue centrifugado en centrífuga refrigerada (centrífuga ThermoScientific Sorvall Leyenda RT+) a 10.000 rpm durante 5 minutos, posteriormente el sobrenadante es filtrado a través de un filtro de nylon con tamaño de poro 0.7 µm. Posteriormente, se procede a determinar TOC y TN mediante un analizador TOC V CSH equipado con el módulo TNM-1 (Shimadzu, Japan). El N-NH₄⁺ fue determinado mediante un electrodo ion selectivo de amonio. El procedimiento de análisis de antibióticos se detalla en el punto 3.6.

La remoción de TOC, TN, N-NH₄⁺ y antibióticos fue determinada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$RE(\%) = \frac{\text{Concentración}_{\text{entrada}} \times \text{Caudal}_{\text{entrada}} - \text{Concentración}_{\text{salida}} \times \text{Caudal}_{\text{salida}}}{\text{Concentración}_{\text{entrada}} \times \text{Caudal}_{\text{entrada}}}$$

Ecuación 1. Porcentaje de remoción de nutrientes.

Donde la concentración corresponde a la concentración de nutrientes a la entrada y salida del PBR y el caudal al flujo de entrada y salida correspondiente a la alimentación y al efluente.

Además, se analizaron las poblaciones de microalgas presentes en cada fotobiorreactor mediante identificación taxonómica por microscopía. Para esto, se procedía a tomar 2 mL de muestras desde el interior de los reactores con tubos estériles y preservadas con lugol al 5% y formaldehído al 10% para ser guardadas a 4 °C hasta su análisis.

El crecimiento microalga fue determinado mediante recuento directo utilizando una cámara de Neubauer de 0,100 mm de profundidad y un microscopio óptico (Olympus CX31). En la cámara se cargaron 10 µL de muestra (Figura 7 A). Una vez realizado esto, se procedió a contar cada cuadrante (Figura 7 B). La concentración de células por mL de cultivo fue calculada de acuerdo a la *Ecuación 2*.

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{A + B + C + D}{4} \times 10000$$

Ecuación 2. Concentración de células por mL de cultivo.

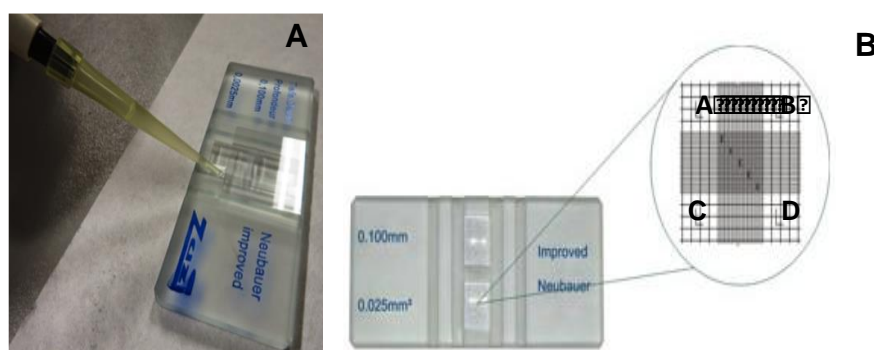


Figura 7. Cámara de Neubauer (A). Se muestran los cuadrantes en letras denominadas: A, B, C y D (B).

También se determinó el estado fisiológico del cultivo de microalgas como indicador de estrés por la exposición a contaminantes [31]. La cuantificación fue realizada mediante la determinación del QY, que corresponde a la máxima eficiencia fotosintética del fotosistema II, definido como la relación (F_v/F_m), donde F_v es la fluorescencia variable y F_m la máxima fluorescencia. Se empleó un fluorómetro AquaPen AP 100 (instrumentos del sistema de fotones), donde se siguieron las instrucciones del fabricante. Específicamente, se procedía a coger 5 mL de cultivo de microalgas desde dentro de los reactores y se mantenían en la oscuridad durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se mide con el fluorómetro obteniendo el resultado de este parámetro.

3.6 Determinación de antibióticos.

Se realizó el método analítico desarrollado por el grupo de investigación [32]. Las muestras de efluentes obtenidas en cada PBR fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 minutos y filtradas, primero por un filtro de nylon de tamaño del poro de 0.7 μm y luego por un filtro de fibra de vidrio de 0.45 μm . El filtrado resultante fue recuperado en botella ámbar, con el fin de evitar la degradación de los compuestos y congelado a -20 $^\circ\text{C}$ hasta el momento del análisis.

Para determinar la concentración de antibiótico en las muestras fue necesario realizar una curva de calibrado de concentraciones desde 0 ng/L a 40000 ng/L, para ello a cada punto de la recta se le añadió la concentración de cada antibiótico indicada en la *Tabla 3*. A continuación se añadieron 2 mL de ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) al 5% v/v, y una concentración de 0.5 mg/L de patrón interno en dilución, finalmente se llevó a un volumen final de 100 mL con la muestra correspondiente de alimentación o efluente de cada PBR.

Como patrón interno se emplean compuestos deuterados de los antibióticos de interés, para la sulfadiazina se utiliza la sulfadiazina-d4 y para la ciprofloxacina se emplea la ciprofloxacina-d8. En el caso de la tetraciclina no se utilizó ningún patrón interno debido a la no disponibilidad de este.

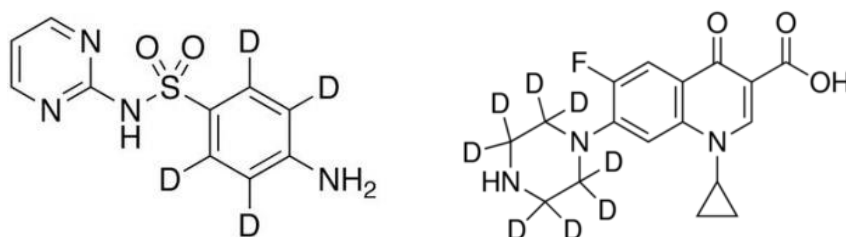


Figura 8. Estructura de la sulfadiazina-d4 (izquierda) y de la ciprofloxacina-d8 (derecha).

Tabla 3. Concentraciones añadidas de antibióticos, patrón interno y AEDT para llevar a cabo la recta de calibrado.

	B-1	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8
[Antibiótico]/ ng L ⁻¹	0	10	50	500	2000	10000	20000	30000	40000
[Patrón interno]/ mg L ⁻¹	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
V(AEDT 5%) /mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Vfinal /mL	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Como los reactores fueron dopados con antibióticos, algunos efluentes podrían presentar concentraciones superiores a la de la curva de calibrado por lo que fue necesario realizar diluciones 1:10 y 1:100 utilizando agua milliQ. Las muestras cuya dilución es 1:10 se prepararon tomando 10 mL del efluente de cada PBR y se llevaron a un volumen final de 100 mL con agua miliQ. Cuando la dilución es 1:100, se toma 1mL del efluente de cada PBR y se lleva a un volumen final de 100mL con agua miliQ. Una vez están preparadas todas las muestras se pasan a una botella de vidrio ámbar con tapa y se comienza la extracción en fase sólida (SPE). Se emplean Cartuchos desechables OASIS HLB con una capacidad de 3 ml y 60mg de adsorbente.

3.6.1 Extracción en fase sólida (SPE)

Para llevar a cabo la SPE, en primer lugar, se debe activar los cartuchos dejando pasar 3 mL de MeOH por el interior del cartucho dejándolo caer por gravedad. Una vez pasado el MeOH se procede hace lo mismo, pero con agua miliQ.

Una vez activados los cartuchos, se procede a pasar la muestra por los cartuchos, para ello se coloca el adaptador encima del cartucho con el extremo del tubo en la muestra (básicamente es una tubería que conecta la muestra con el cartucho) y se enciende la bomba de vacío para pasar toda la muestra por el cartucho, donde serán retenidos los antibióticos de interés. Una vez pasada toda la muestra los cartuchos se lavan con 3 mL de una disolución al 5% de MeOH en agua, dejando caer la disolución por gravedad, tras esto se activa la bomba y se deja que se seque durante 20 minutos. Finalmente, los cartuchos de extracción se conservan a -20 °C.

Una vez finalizada la etapa de extracción se lleva a cabo la etapa de elución de los analitos. Los cartuchos son descongelados antes del comienzo del proceso y se colocan en el manifold. Debajo de cada cartucho se coloca una gradilla con tubo de ensayo para recuperar los analitos que serán eluidos desde los cartuchos. La elución consistió en añadir 3 mL de acetonitrilo (ACN) el cual se deja caer por gravedad, el proceso se repite, pasando en total 6 mL de ACN. Al terminar este proceso, se obtiene tubo de ensayo con muestras de antibióticos que serán llevadas al proceso de evaporización.

3.6.2 Evaporación.

Para llevar a cabo la evaporación del ACN se utiliza el evaporador de N₂ ya que este gas es inerte y no interfiere en el análisis. Para ello se colocan los tubos de ensayo en el evaporador de N₂, y se ajusta el flujo y la altura de evaporación. En un tiempo de entre 2 y 3 horas habrá acabado la evaporación del ACN.

Una vez finalizado este proceso, se procede hacer una redisolución, cada tubo de ensayo se “lava” tres veces con MeOH de calidad UHPLC, donde se va añadiendo 0.5 mL de MeOH hasta completar 1.5 mL de volumen total. El volumen de MeOH es recuperado en viales de 2 mL. Una vez redisolutos los analitos se debe evaporar el MeOH, para ello se emplea nuevamente el evaporador de N₂. Transcurridos aproximadamente 120 minutos todo el MeOH se habrá evaporado, momento en el cual los viales se pueden cerrar y congelar a -20 °C hasta el momento de su cuantificación por cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS).

3.6.3 Acondicionamiento para la inyección en UHPLC-MS/MS.

Previo a la inyección de las muestras en el UHPLC-MS/MS, los viales de 2 mL se debe acondicionar. Para ello a cada vial, que ha sido conservado a -20 °C, se le añade 1 mL de MeOH-H₂O (5:95) al 0,1% en ácido fórmico, el vial se agita en el vortex durante 1 minuto, y su contenido se recoge con una jeringa acoplada a una aguja de 2 mL, posteriormente se retira la aguja de la jeringa y se coloca un filtro de 0,22 µm de teflón (PTFE). El contenido del interior de la aguja se filtra sobre un nuevo vial, el cual estará listo para su inyección en el sistema UHPLC-MS/MS.

3.6.4 Condiciones de trabajo UHPLC-MS/MS

La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando el equipo de AB Sciex y una columna de fase inversa EVO C18 (50 × 2,1 d.i. mm, tamaño de partícula de 1,7 µm). La fase móvil consistió en una disolución 0,1% (v/v) de ácido fórmico en H₂O (A) y ácido fórmico al 0,1% (v/v) en MeOH (B). La elución comenzó al 5% de B durante 1 min y, luego, se incrementó linealmente a 95% de B en 2 min y se mantuvo isocrático durante 3 min. El tiempo de reequilibrio fue 4 min. La columna se termostató a 40 °C, el flujo de la fase móvil fue de 0,5 mL min⁻¹ y el volumen de inyección fue de 10 µL.

La detección de MS / MS se realizó mediante el triple cuadrupolo 6500+ de AB Sciex. Los análisis se realizaron en ionización por electropulverización positiva, trabajando en el modo de monitoreo de reacción seleccionado (SRM). Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador. Para cada compuesto, SRM hace transiciones entre el ion precursor y los dos iones de fragmentos más abundantes, las cuales aparecen detalladas en la Tabla 4.

Tabla 4. Transiciones y condiciones de trabajo del tripe cuadrupolo. Donde TR es el tiempo de retención en el sistema UHPLC; ESI indica si la electropulverización es positiva (+) o negativa (-); Q1 indica el ion precursor m/z; Q3 indica el ion fragmento m/z; DP el potencial de desagrupamiento; CE la energía de colisión; CXP el potencial de salida de la celda de colisión.

TR	Transiciones	ESI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
1.50	Sulfadiazina 1	+	251.0	155.9	71	23	20
	Sulfadiazina 2	+	251.0	108.0	71	31	12
1.95	Tetraciclina 1	+	445.0	410.0	51	27	32
	Tetraciclina 1	+	445.0	427.1	51	19	32
4.01	Ciprofloxacina 1	+	332.0	288.1	86	25	16
	Ciprofloxacina 2	+	332.0	313.7	86	25	38

La adquisición de datos y la integración se realizaron a través de los softwares Analyst y OS (AB Sciex). Las áreas de los picos se utilizaron para la cuantificación.

4. Resultados y discusión.

Para estudiar el efecto de TC, SDZ y CIP en el rendimiento de los PBRs durante el tratamiento de agua residual de cerdo, se realizaron experimentos en duplicado, donde dos PBRs fueron dopados con 1.5 mg/L de TC en los PBR R2 y RB, con 1.5 mg/L de SDZ en R3 y RC y con 0.1 mg/L de CIP en R4 y RD, dejando R1 y RA como reactores control, es decir, fueron alimentados con agua residual de cerdo diluida al 5% v/v durante toda la experimentación sin adición extra de antibióticos.

4.1 Crecimiento microalgal.

De acuerdo a las observaciones microscópicas, la única especie de microalgas que creció en los reactores fue identificada como *Chlorella sp.* El crecimiento de esta microalga mostró una disminución en los reactores dopados con antibióticos (R2-TC, R3-CIP, R4-SDZ, RB-TC, RC-CIP y RD-SDZ) durante la fase estacionaria de la fase II (últimos tres días de la fase II) con respecto al control (Figura 9 A y B). Los reactores dopados con antibióticos disminuyeron la concentración de números de células microalgales con respecto al control mostrando diferencias significativas, mediante un test estadístico t, obteniendo en todos los casos un valor $p < 0.05$. También se puede observar una ligera disminución en el número de células de microalgas en los reactores control (R1-control y RA-control), el cual puede ser debido a un efecto tóxico de MeOH sobre las microalgas, ya que este fue agregado a los reactores control durante la fase II debido a que las soluciones de antibióticos añadidas a los reactores dopados contenían MeOH. Existen estudios que evidencian el efecto tóxico del MeOH en microalgas, aun cuando este se añade en bajas concentraciones [33].

Tras finalizar la etapa de dopado con antibióticos (fase III) se puede apreciar que las poblaciones microalgales no son capaces de recuperar el crecimiento a los niveles previos a la exposición a los contaminantes (fase I), excepto en el PBR RD-SDZ, donde se puede observar un aumento de la población microalgal al terminar la fase III (Figura 9B). Llevando a cabo una prueba estadística t para dos muestras en este PBR se obtiene que no existen diferencias significativas entre la población microalgal del RA-control y RD-SDZ ($p > 0.05$). Esto podría deberse al efecto del consorcio microalga-bacteria, pero no se puede asegurar ya que las bacterias no han sido estudiadas en esta investigación. El PBR RD-SDZ ha sido capaz de recuperar su población microalgal tras estar expuesto a una concentración de 1.5 mg/L de SDZ.

Cabe mencionar que uno de los parámetros físicos que puede inhibir el crecimiento de microalgas es la temperatura, en este estudio la temperatura en el interior de los PBRs tuvo un promedio de 20 ± 3 °C. En ese contexto, la temperatura óptima de crecimiento de microalga oscila entre 15 - 35 °C [34]. Por lo tanto, la temperatura alcanzada en los reactores fue considerada óptima para el crecimiento de microalgas sin impacto considerable en el crecimiento de estas.

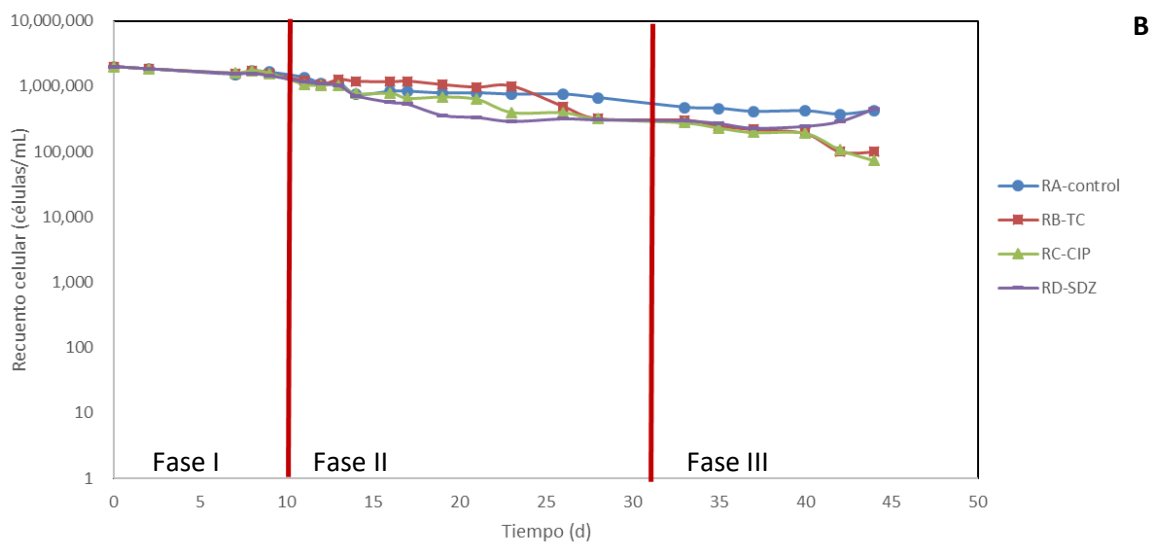
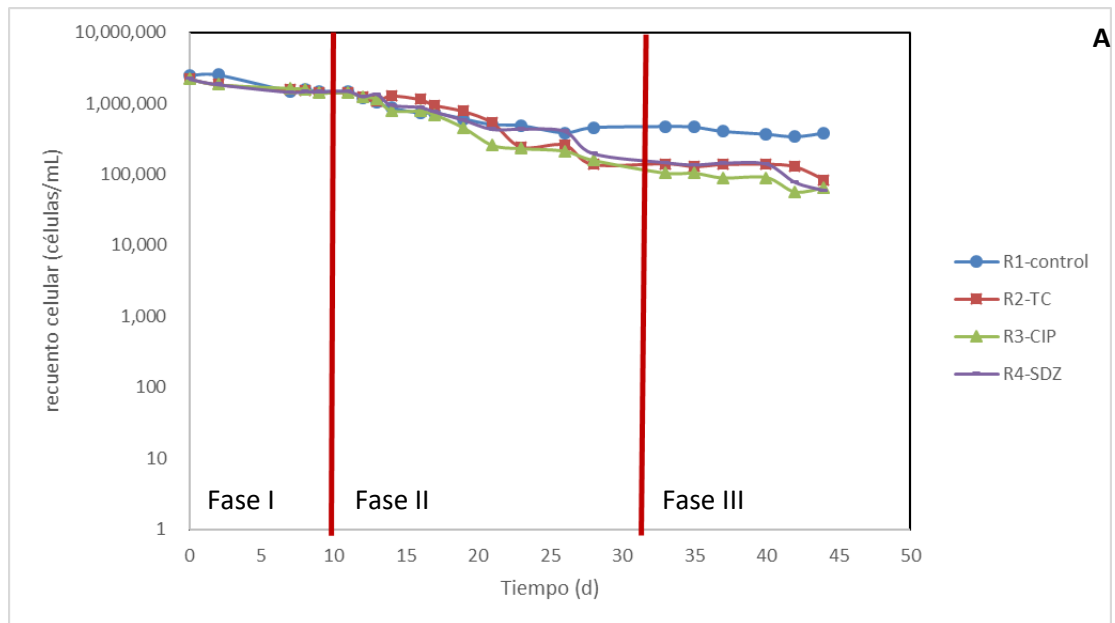


Figura 9. Evolución del recuento algal en los PBRs. Reactores R1 a R4 (A) y reactores RA a RD (B).

4.2 Quantum Yield.

Los valores obtenidos del QY se muestran en la *Figura 10*. Los valores de QY esperados para microalgas crecidas en PBRs con PWW, se encuentran entre 0.4 y 0.5, por debajo de este intervalo se dice que los contaminantes están afectando a las microalgas [35].

Se puede observar que el valor QY al inicio del experimento se mantiene más o menos estable en todos los reactores y en valores óptimos, pero transcurridos tres días del comienzo del dopado con antibióticos (fase II) el estrés que sufren las algas comienza a aumentar, por lo que hay una disminución en su QY en los reactores dopados (R2-TC, R3-CIP, R4-SDZ, RB-TC, RC-CIP y RD-SDZ), debido al efecto contaminante de los antibióticos. Sin embargo, observando estos gráficos podemos ver que en el RD-SDZ dopado con SDZ no experimenta una disminución tan importante en sus valores de QY como el resto de PBRs (*Figura 10 B*). Los reactores que no han

sidio dopados con antibiótico, pero a los cuales se les había añadido metanol (R1-control y RA-control) no sufren esta disminución en su valor de QY.

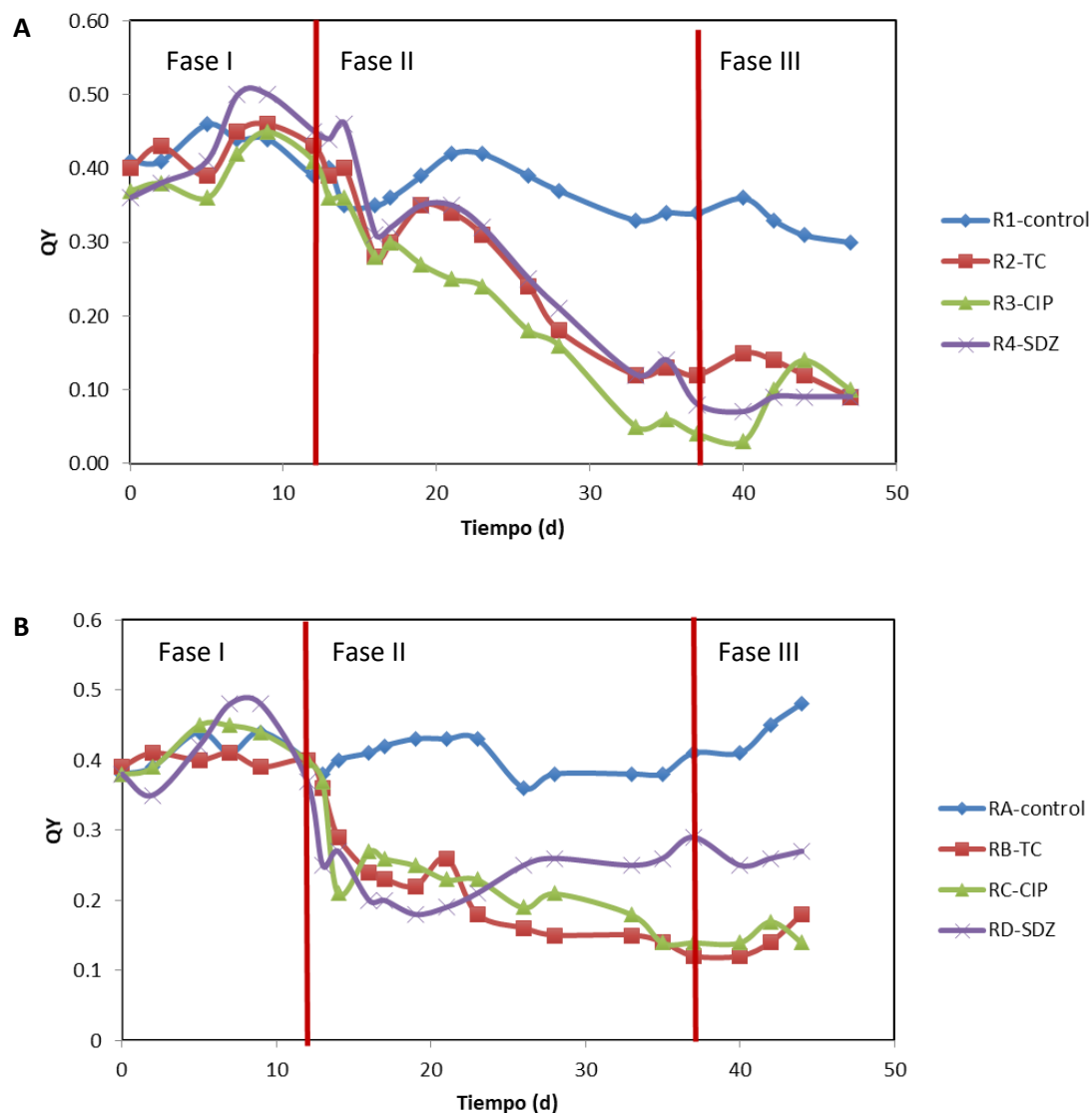


Figura 10. Evolución del QY en los PBRs. Reactores R1 a R4 (A) y reactores RA a RD (B).

4.3 Sólidos Suspendidos Totales.

Si se analizan los resultados obtenidos en la *Figura 11*. para la presencia de SST en los PBRs se puede observar que en los PBRs R1-control, R2-TC y R4-SDZ no existen grandes diferencias en los niveles de SST encontrados, mientras que, en el R3-CIP, tras el transcurso de unos días desde el inicio del dopado de antibióticos (fase II), la concentración de SST disminuye bruscamente y estos valores no vuelven a la normalidad con el fin del dopado (fase III). En los PBRs RA-control a RD-SDZ, se observa que en las fases II y III el reactor control siempre presenta valores superiores de SST con respecto a los reactores que han sido sometidos al dopado de antibióticos, observándose una disminución en estos PBRs de los SST tras el comienzo de la fase II y que no se recupera en la fase III.

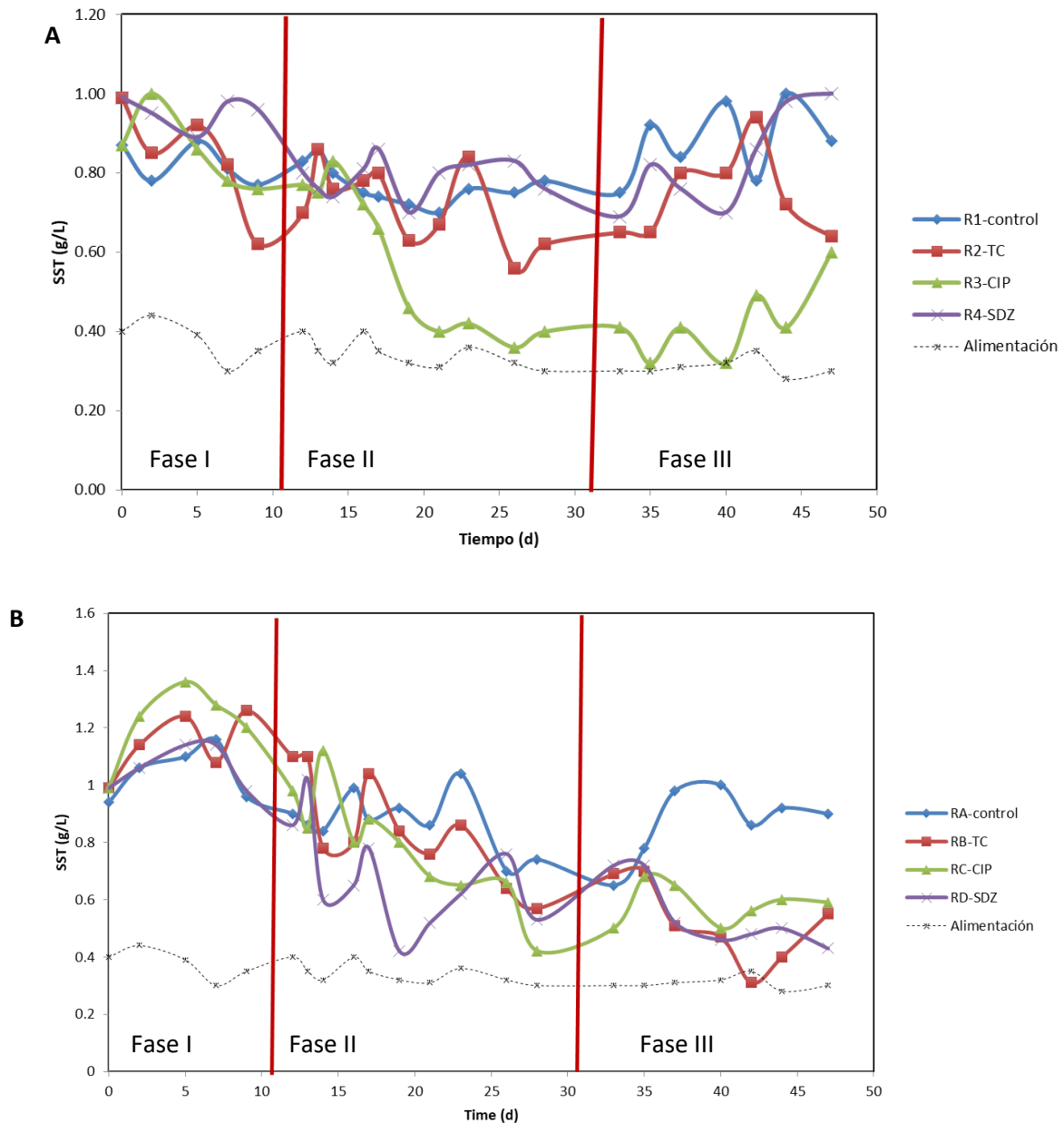


Figura 11. Evolución de los SST en los PBRs. Reactores R1 a R4 (A) y reactores RA a RD (B).

4.4 Carbono Total Orgánico.

Analizando los resultados obtenidos en la Figura 12. se observa que los valores de TOC son casi siempre inferiores en el PBR control (R1-control) que en el resto de PBRs que han sido sometidos al dopado con antibióticos. Con el comienzo de la etapa de dopaje (fase II) los PBRs R2-TC y R3-CIP experimentan un aumento del TOC, al finalizar el dopado (fase III) los valores vuelven a ser muy similares a los de la etapa inicial (fase I)

Empleando la *Ecuación 1.* y utilizando los puntos en los que los PBRs se encuentran en estado estacionario para cada fase se obtiene la Figura 13. En la que podemos observar que la remoción del TOC siempre es mayor en la fase I, que en la fase II y fase III, excepto en el RA-control donde es a la inversa, pero la diferencia entre fases es mínima. Llevando a cabo una

prueba estadística t para dos muestras, se observa que en la fase control no existen diferencias significativas entre los PBRs, pero en la fase II y III todos los reactores (R2-TC, R3-CIP, R4-SDZ, RB-TC, RC-CIP y RD-SDZ) presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) en sus valores de TOC con respecto a los reactores control (R1-control y RA-control).

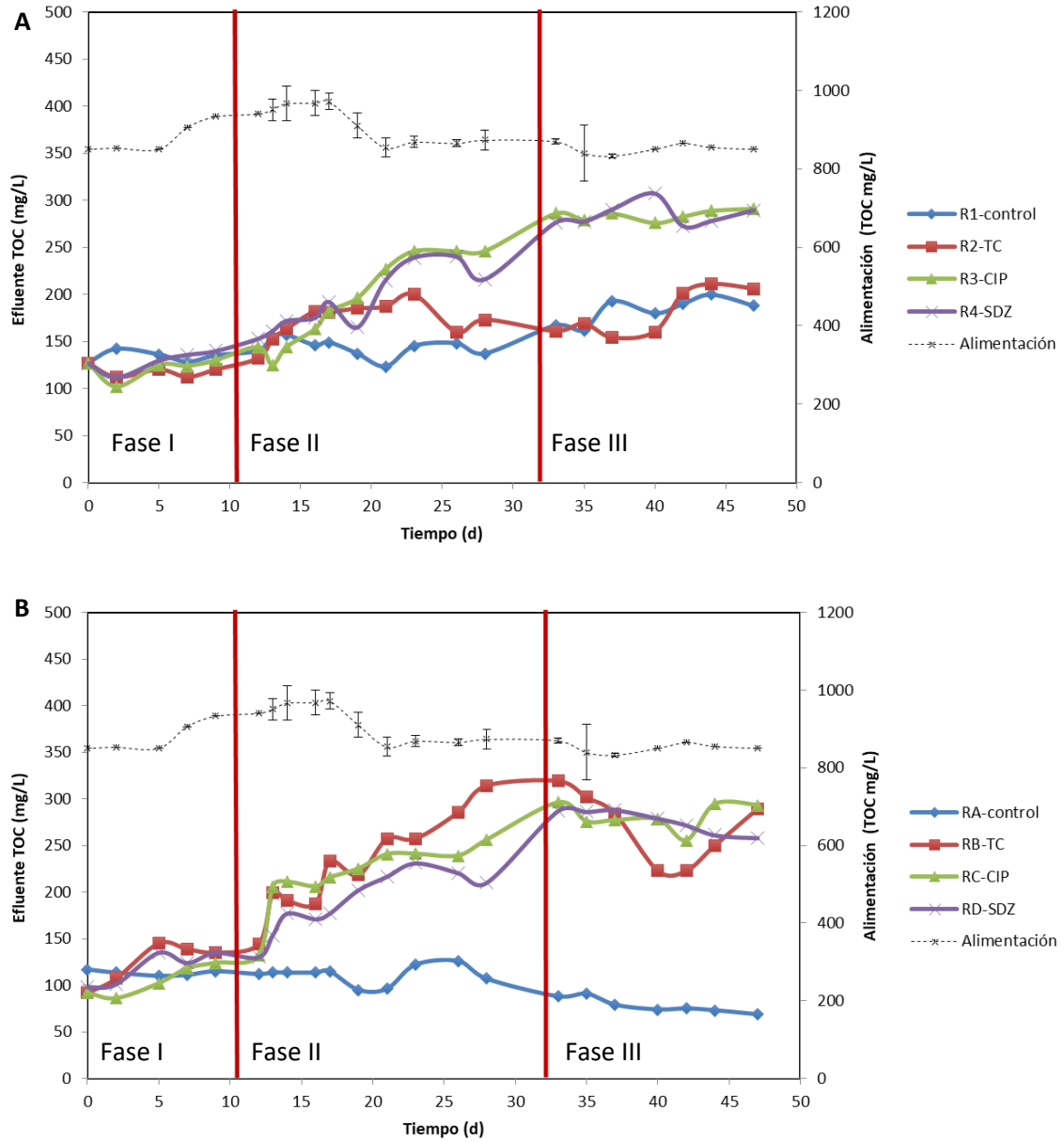


Figura 12. Evolución del TOC en los PBRs R1 a R4 (A) y RA a RB (B).

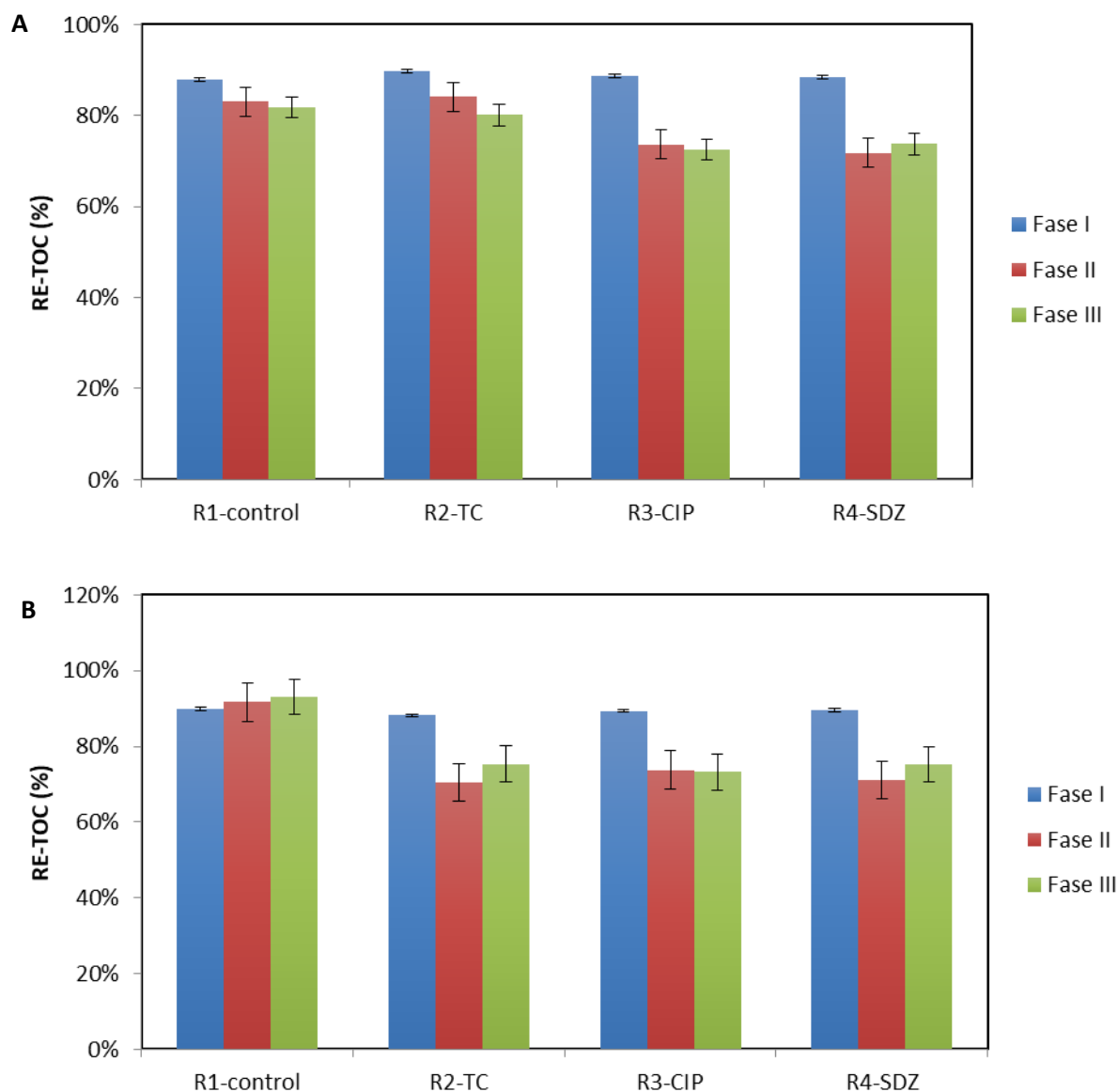


Figura 13. Remoción del TOC en los PBRs R1 a R4 (A) y RA a RB (B), cuando estos se encuentran en estado estacionario.

4.5 Nitrógeno Total.

Analizando los resultados obtenidos en la Figura 13. se observa que los valores de TN son siempre casi siempre inferiores en los PBRs control (R1-control y RA-control) que en el resto de PBRs que han sido sometidos al dopado con antibióticos. Excepto en la fase III del PBR R1-control, donde se observa un aumento muy importante de los valores del TN. No se observan diferencias entre las tres etapas del experimento en lo que a evolución del TN en el efluente se refiere.

Empleando la *Ecuación 1.* y utilizando los puntos en los que los PBRs se encuentran en estado estacionario para cada fase se obtiene la Figura 15. En la que podemos observar que la remoción del TN siempre es mayor en la fase I, que en la fase II y fase III. Llevando a cabo una prueba estadística t para dos muestras, se observa que en la fase control no existen diferencias

significativas entre los PBRs, pero en la fase II los reactores (R2-TC, R3-CIP, R4-SDZ, RB-TC, RC-CIP y RD-SDZ) presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) en sus valores de TOC con respecto a los reactores control (R1-control y RA-control). En la fase III encontramos que únicamente los reactores R4-SDZ y RB-TC presentan diferencias significativas con los reactores control.

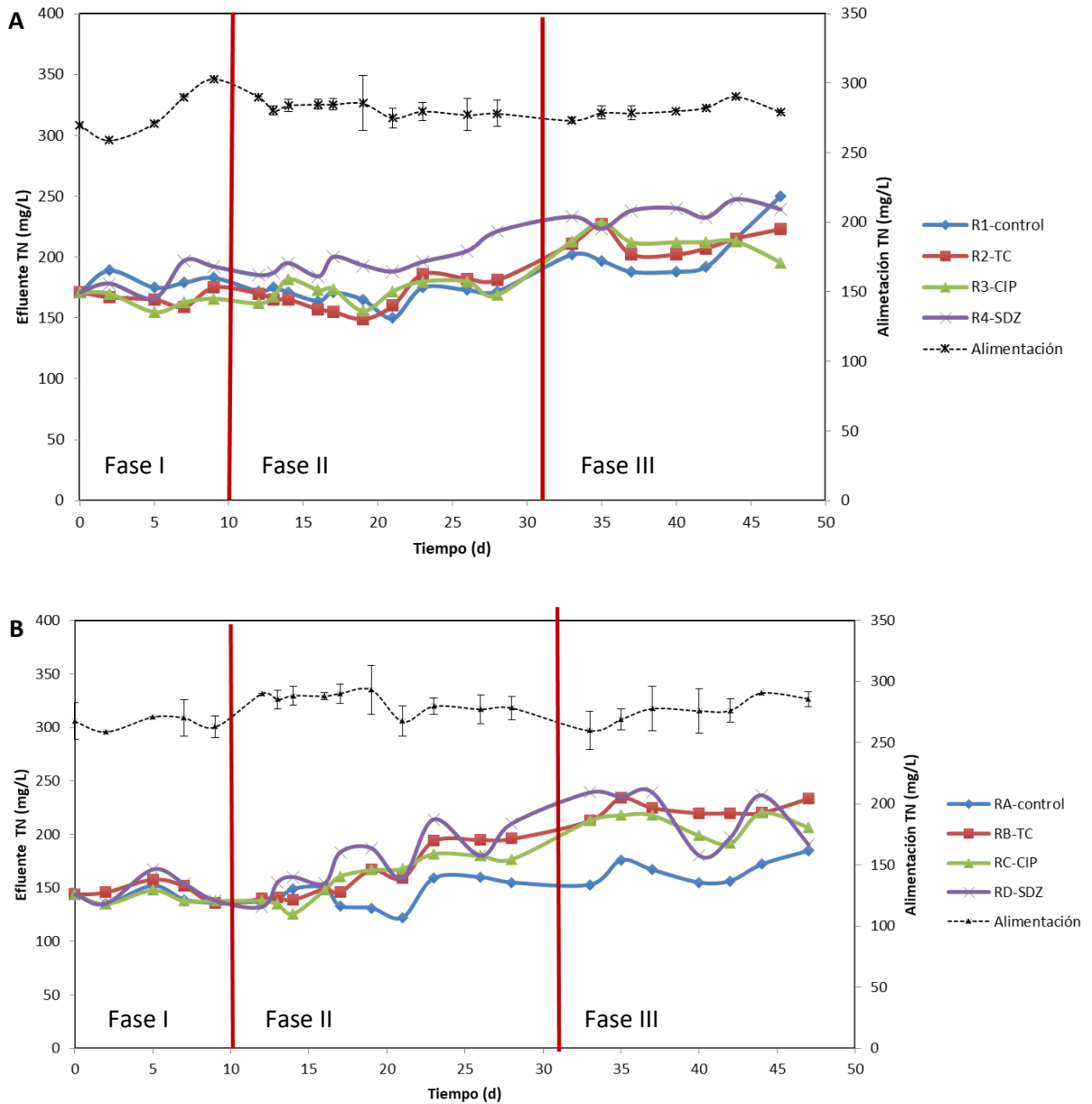


Figura 14. Evolución del TN en los PBRs R1 a R4 (A) y RA a RB (B).

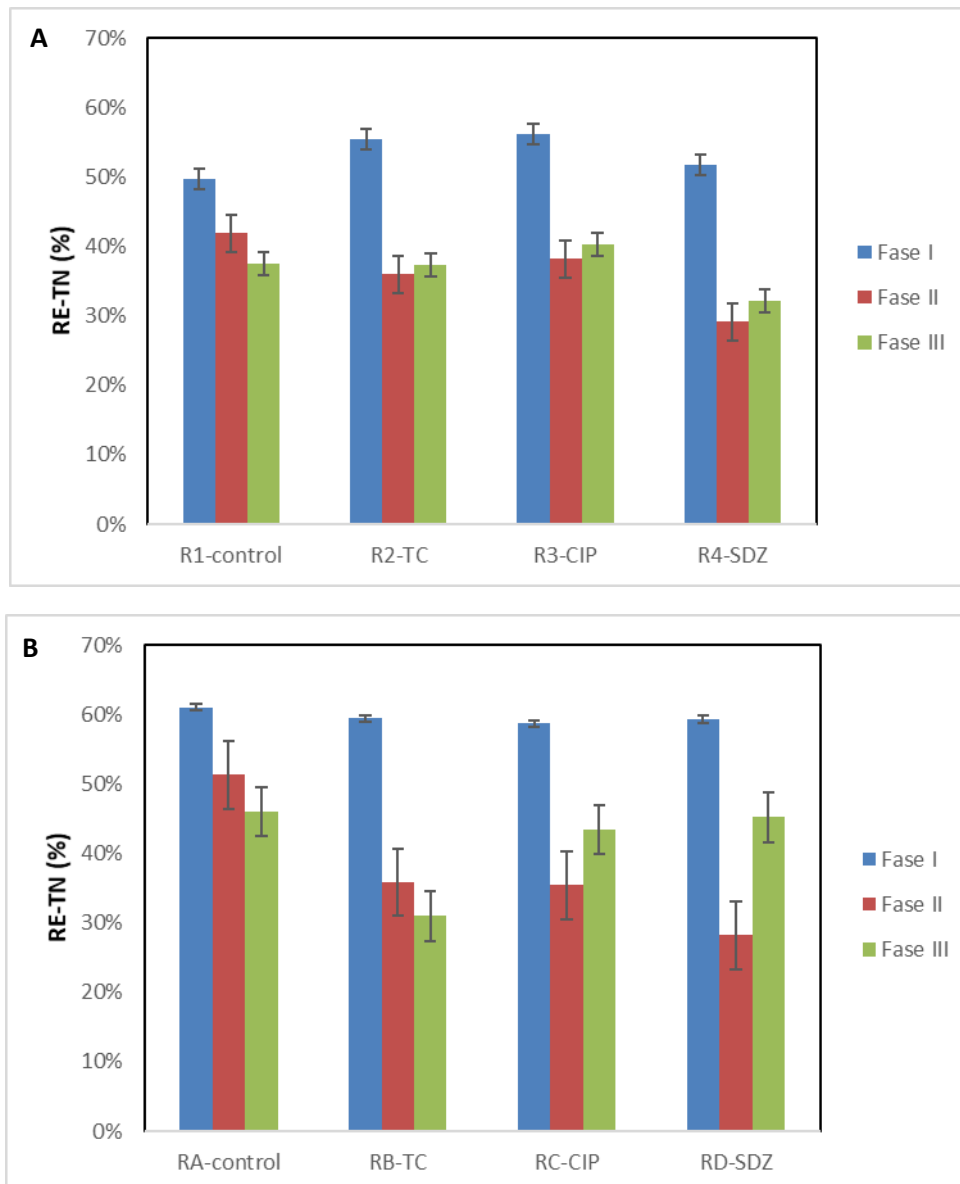


Figura 15. Remoción del TN en los PBRs R1 a R4 (A) y RA a RB (B), cuando estos se encuentran en estado estacionario.

4.6 Amonio.

Analizando los resultados obtenidos en la Figura 16. se observa que los valores de amonio los PBRs RA-control a RD-SDZ durante las fases II y III son siempre casi siempre inferiores en el control (RA-control) que en el resto de PBRs (RB-TC, RC-CIP y RD-SDZ) que han sido sometidos al dopado con antibióticos. En los PBRs R1 a R4 no se observan diferencias entre los reactores ni las fases en cuanto a la concentración de amonio. En todos los reactores dopados con antibiótico (R2-TC, R3-CIP, R4-SDZ, RB-TC, RC-CIP y RD-SDZ) se observa una disminución de la concentración de amonio en la fase III.

Empleando la *Ecuación 1.* y utilizando los puntos en los que los PBRs se encuentran en estado estacionario para cada fase se obtiene la Figura 16. En la que podemos observar que la remoción del amonio en los reactores R1 a R4, presenta diferencias significativas durante la fase

El únicamente entre el reactor control R1-control y el PBR R4-SDZ, mientras que en la fase III encontramos diferencias significativas en la capacidad de las microalgas para la remoción del amonio en los PBRs R2-TC y R4-SDZ con respecto al control. En los PBRs RA a RD, tanto durante la fase II como en la fase III existen diferencias significativas entre la capacidad de remoción de amonio entre los PBRs dopados (RB, RC y RC) con el control.

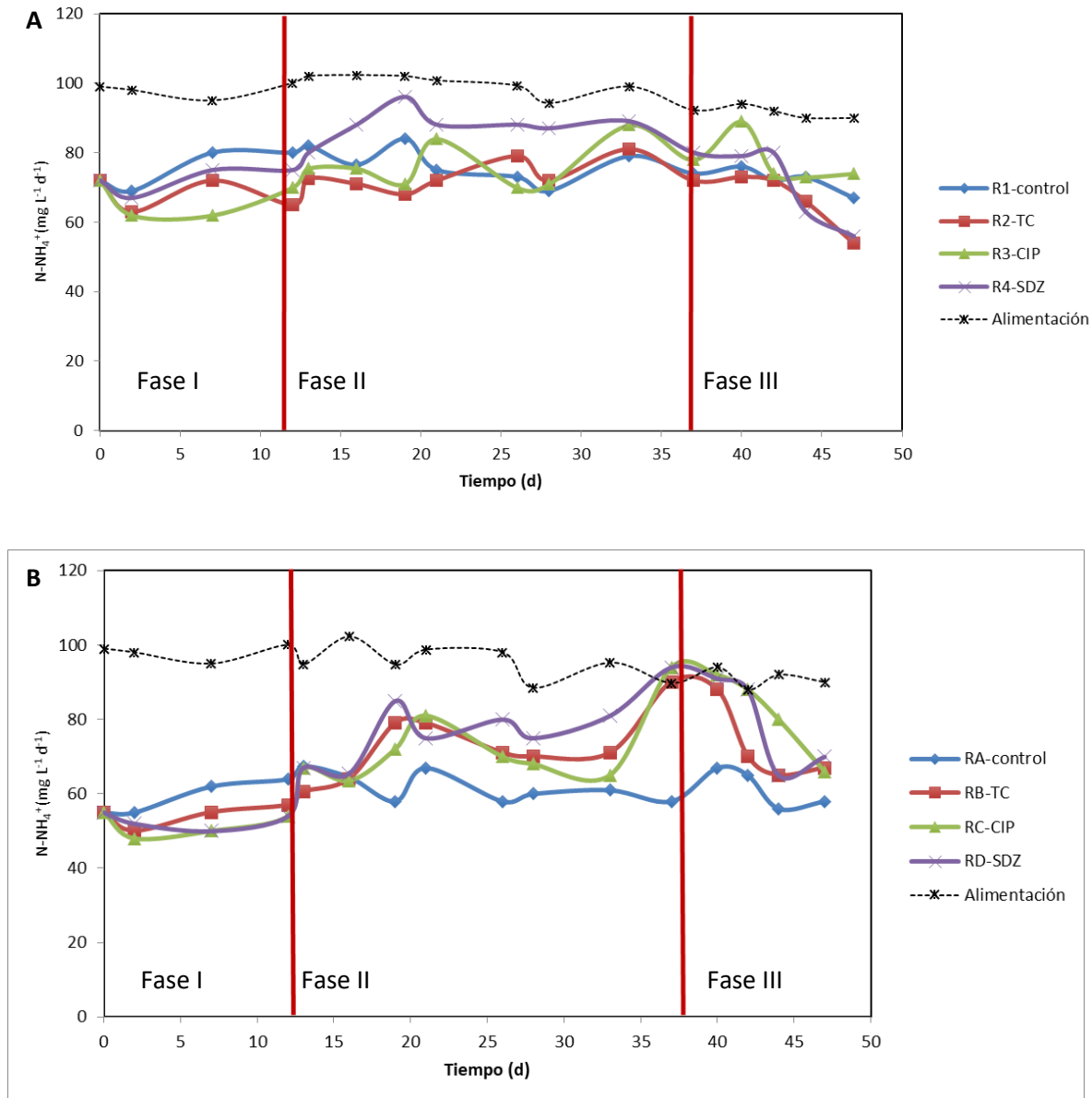


Figura 16. Evolución del amonio en los PBRs R1 a R4 (A) y RA a RB (B).

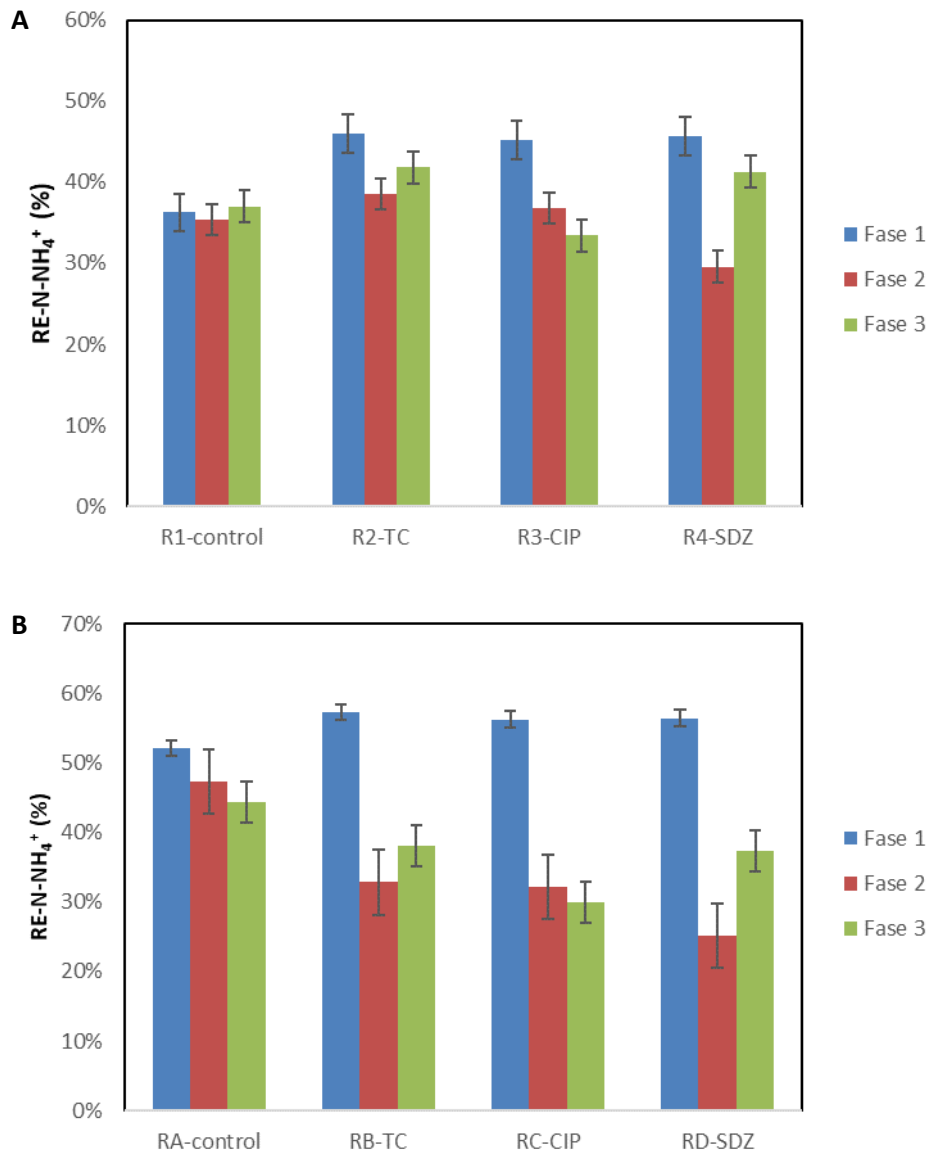


Figura 17. Remoción del TN en los PBRs R1 a R4 (A) y RA a RB (B), cuando estos se encuentran en estado estacionario.

4.7 Remoción de antibióticos en los fotobiorreactores.

En la Tabla 5 se indican las concentraciones de los tres antibióticos de estudio tanto en el purín de cerdo bruto (PWW), es decir la concentración de antibióticos obtenida una vez recibido el purín, y en la alimentación diluida al 5% v/v, la cual fue analizada al inicio de la etapa de dopaje (día 11) y al final del experimento (día 47). Se puede observar que las concentraciones en la alimentación estuvieron bajo el límite de detección y cuantificación por el cual no influyo en la concentración de dopaje de antibiótico añadida. Las concentraciones de TC, SDZ y CIP encontradas en el PWW se asemejan a los valores máximos de estos compuestos encontrados en la bibliografía (Tabla 1).

Tabla 5. Concentración de antibióticos presentes en las muestras de alimentación diluidas al 5%. Donde nd es no detectado y d es detectado por debajo del límite de cuantificación.

	[Tetraciclina] / ng L ⁻¹	[Sulfadiazina] / ng L ⁻¹	[Ciprofloxacina] / ng L ⁻¹
Alimentación 5% v/v (Día 0)	d	311	D
Alimentación 5% v/v (Día 11)	nd	467	D
Alimentación 5% v/v (Día 47)	d	155	D

Las concentraciones de antibióticos encontrados en el efluente de los PBRs medidos durante la fase I se muestran en la *Tabla 6*. Se puede observar que los tres antibióticos estudiados se encuentran bajo el límite de identificación o cuantificación, el cual nos indica que la concentración de antibióticos en la alimentación en la fase I fue del 25% para TC y SDZ y del 20% para CIP.

En la *Figura 18*, se muestran los datos de la remoción de antibióticos por parte de las microalgas en los PBRs, en el gráfico no se muestran datos para la fase III debido a que al haber presencia de antibióticos en el interior del reactor los resultados obtenidos no son representativos.

Observando los resultados obtenidos en la *Figura 18*, se puede observar que en la fase I no existen diferencias significativas en la remoción de antibióticos por parte de las microalgas, pero en la fase II se encuentra que la capacidad de remoción de antibióticos por parte de *Chlorella*, solo es comparable con el control en el caso de la TC, mientras que la capacidad para eliminar la SDZ es mucho menor y nula para el caso de la CIP.

Tabla 6. Concentración de antibióticos presentes en la muestra de efluente al inicio del experimento. Donde nd es no detectado y d es detectado por debajo del límite de cuantificación.

EFLUENTE INICIO EXPERIMENTO			
	[Tetraciclina] / ng L ⁻¹	[Sulfadiazina] / ng L ⁻¹	[Ciprofloxacina] / ng L ⁻¹
Día 5	nd	d	Nd

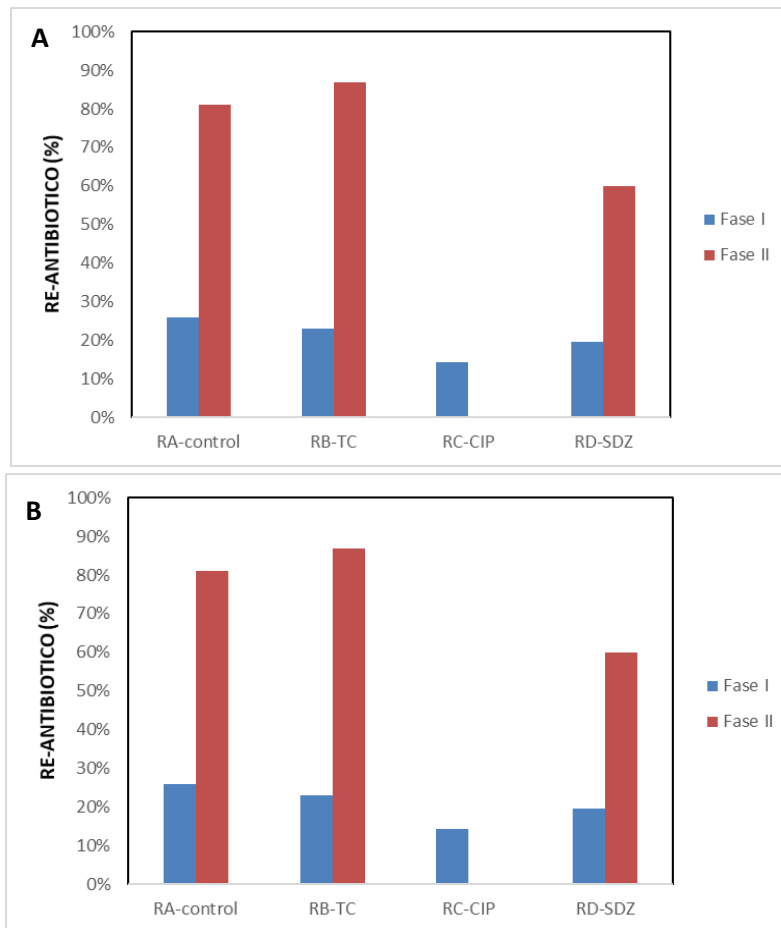


Figura 18. Remoción de antibióticos en los PBRs R1 a R4 (A) y RA a RB (B), cuando estos se encuentran en estado estacionario.

En la fase II de dopaje de los PBRs se llevó a cabo el análisis de la concentración de antibióticos de manera individual para cada PBR, los resultados obtenidos se indican en la *Tabla 7*. Se puede observar que la concentración de CIP presente en el efluente es del orden de la concentración de CIP con la que se dopó, mientras que en el caso de TC y SDZ si ha habido una disminución de la concentración con respecto a la concentración de dopaje.

Tabla 7. Concentración de antibióticos presentes en la muestra de efluente durante la etapa de dopaje. Donde nd es no detectado y d es detectado por debajo del límite de cuantificación.

EFLUENTE DURANTE DOPAJE			
	[Tetraciclina] / ng L ⁻¹	[Sulfadiazina] / ng L ⁻¹	[Ciprofloxacina] / ng L ⁻¹
R1	d	d	D
R2	437300	-	-
R3	-	-	134492
R4	-	861200	-
RA	d	110	D
RB	253300		
RC	-	-	128523
RD	-	737300	-

Por último, en la fase III, tras el cese del dopado en la alimentación de los PBRs la concentración de antibióticos en el efluente se recoge en la Tabla 8. Se observa que las concentraciones de todos los antibióticos continúan disminuyendo, pero aun así las concentraciones en las que se encuentran son muy superiores a las de la fase I.

Tabla 8. Concentración de antibióticos presentes en la muestra de efluente después de la etapa de dopaje. Donde nd es no detectado y d es detectado por debajo del límite de cuantificación.

EFLUENTE DESPUES DOPAJE			
	[Tetraciclina] / ng L ⁻¹	[Sulfadiazina] / ng L ⁻¹	[Ciprofloxacina] / ng L ⁻¹
R1	nd	d	D
R2	69597	-	-
R3	-	-	10296
R4	-	154764	-
RA	d	d	Nd
RB	44370	-	-
RC	-	-	10298
RD	-	93520	-

5. Discusión.

Analizando los resultados se puede observar la degradación de los compuestos de estudio presentes en el purín de una granja según avanza el tiempo, la concentración de los tres compuestos va disminuyendo a media que avanza el tiempo de experimentación. Esto puede deberse a dos factores, el primero sería debido a la propia degradación de los compuestos y el segundo a la presencia de bacterias que los emplean como materia orgánica de la cual nutrirse, haciendo que sus concentraciones disminuyan [30].

También se puede observar como en la fase I, cuando las concentraciones de antibióticos eran relativamente bajas, el efecto sobre las microalgas fue apenas imperceptible, y estas fueron capaces de asimilar las bajas concentraciones, ya que en el efluente de los PBRs apenas se encuentran restos de antibióticos. Esto es posible ya que las microalgas tienen mecanismos basados en adsorción, biodegradación, fotodegradación e hidrólisis para la eliminación de estos contaminantes [10].

Cuando la alimentación es dopada con mayores concentraciones de los compuestos de estudio se ha podido observar la disminución de la población de microalgas, y el peor funcionamiento de los PBRs. Aun así, las microalgas han facilitado en gran parte la descomposición de los contaminantes inoculados, ya que se puede observar como la concentración de antibióticos es mucho menor en el efluente que en la alimentación. Los PBRs R2 y RB fueron dopados con 1.5 mg/L de TC y en su efluente encontramos concentraciones de 0.4 mg/L y 0.2 mg/L respectivamente. En el caso de los PBRs R4 y RD fueron dopados con 1.5mg/L de SDZ y en sus efluentes encontramos concentraciones de 0.9 mg/L y 0.7 mg/L respectivamente de SDZ. Es decir, las microalgas han eliminado estos compuestos del medio, debido a los mecanismos ya mencionados, pero al elevado coste de un peor funcionamiento de los PBRs. Apenas existen datos sobre la influencia de estos antibióticos en las microalgas de la especie *Chlorella*, por eso la importancia de este estudio.

Sin embargo, en el caso de los PBRs R3 y RC la concentración de CIP con la que fueron dopados es de 0.1 mg/L y en el efluente encontramos concentraciones de 0.1 mg/L de este compuesto, por lo que las poblaciones microalgales no serían capaces eliminar este contaminante. Existen pocos estudios sobre este tema, pero en los encontrados en la bibliografía se obtienen los mismos resultados para la remoción de CIP [36]. Esto se puede deber a las bajas concentraciones con los que el PBR fue dopado.

Una vez finaliza la etapa de dopado, se observa que las concentraciones de antibióticos continúan disminuyendo en todos los reactores, pero aun así en niveles muy elevados en comparación con las condiciones iniciales, motivo por el cual los PBRs posiblemente no consiguieran recuperar las condiciones iniciales de trabajo. El PBR RD fue el único de los PBRs que consiguió volver a unas condiciones similares a las de la etapa inicial. Esto puede deberse a que la SDZ está presente en la alimentación desde la etapa inicial, en una concentración superior a la del resto de los antibióticos, y por este motivo las microalgas se han adaptado a convivir con este contaminante haciendo que su recuperación sea más sencilla.

En cuanto a la remoción de nutrientes se observa la disminución de la remoción del TN y del $N-NH_4^+$ en las fases II y III, esto es debido a que las microalgas se nutren de nitrógeno, por lo que al descender la población microalgal es normal que también descendan estos

parámetros. Con respecto a la remoción del TOC y SST las bacterias tienen mucho que decir en este aspecto, y al no haber sido estudiadas en profundidad durante la investigación no se pueden extraer los resultados oportunos.

6. Conclusiones.

El uso común y descontrolado de antibióticos ha generado una gran cantidad de efectos negativos sobre la salud y el medio ambiente. Entre ellos se encuentra la aparición de estos compuestos en los residuos de granjas animales. El tratamiento en PBRs de aguas residuales presenta una serie de ventajas que se podrían ver afectadas por la aparición de estos contaminantes.

Durante el desarrollo de este trabajo se ha visto como la presencia de tres antibióticos, tetraciclina, sulfadiazina y ciprofloxacina, es común en los residuos de granjas porcinas, las concentraciones en la que estos compuestos aparecen varían, pero la tendencia actual es a encontrarlos habitualmente.

Estudiando diferentes parámetros analíticos de los PBRs, se ha podido observar como existen diferencias significativas entre los reactores control y los reactores dopados con antibiótico en las fases II y III. Es decir, la acción de los antibióticos ha influido en el correcto funcionamiento de los PBRs, haciendo que estos empeoren sus parámetros analíticos con la consiguiente disminución de su rendimiento.

Además, se ha podido comprobar la degradación los antibióticos en el purín con el paso del tiempo. Así mismo se observa que la remoción de los antibióticos no es siempre posible por las microalgas de la especie *Chlorella*, ya que existen diferencias significativas en la remoción de la sulfadiazina y la ciprofloxacina, es decir, las microalgas de esta especie no eliminan todos los antibióticos con la misma eficacia. Pudiendo ser empleadas para la eliminación de tetraciclina en aguas residuales de cerdo, pero no en la eliminación de sulfadiazina y ciprofloxacina.

Por último, se ha estudiado la influencia que estos compuestos pueden llegar a tener sobre los PBRs. Se ha concluido que las concentraciones en las que aparecen estos compuestos actualmente no ponen en peligro el correcto funcionamiento de estos sistemas, pero cuando las concentraciones aumentan los antibióticos se vuelven un peligro para las poblaciones de microalgas que se encuentran en los PBRs, además el problema se extiende en el tiempo, ya que la recuperación tras estar expuestos a estos contaminantes es un proceso largo, y recuperar los niveles previos a la contaminación se prolonga en el tiempo.

7. Bibliografía.

- [1] D. L. Cheng *et al.*, "Bioprocessing for elimination antibiotics and hormones from swine wastewater," *Sci. Total Environ.*, vol. 621, pp. 1664–1682, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.059.
- [2] D. I. Massé, N. M. C. Saady, and Y. Gilbert, "Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: An overview," *Animals*, vol. 4, no. 2, pp. 146–163, 2014, doi: 10.3390/ani4020146.
- [3] N. Montes, M. Hijosa, E. Bécares, R. Méndez, and M. Martín-Villacorta, "PRESENCIA DE TETRACICLINAS EN PURINES Y ESTUDIO DE SU ELIMINACIÓN EN PROCESOS DE FANGOS ACTIVADOS," *I Simp. Iberoam. Ing. Residuos*, 2008.
- [4] A. J. Ebele, M. Abou-Elwafa Abdallah, and S. Harrad, "Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment," *Emerg. Contam.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–16, 2017, doi: 10.1016/j.emcon.2016.12.004.
- [5] A. Speltini, M. Sturini, F. Maraschi, A. Profumo, and A. Albini, "Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 30, no. 8, pp. 1337–1350, 2011, doi: 10.1016/j.trac.2011.04.011.
- [6] M. De Cazes *et al.*, "Design and optimization of an enzymatic membrane reactor for tetracycline degradation," *Catal. Today*, vol. 236, no. PART A, pp. 146–152, 2014, doi: 10.1016/j.cattod.2014.02.051.
- [7] L. Du and W. Liu, "Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review," *Agron. Sustain. Dev.*, vol. 32, no. 2, pp. 309–327, 2012, doi: 10.1007/s13593-011-0062-9.
- [8] N. Pérez-Lemus, R. López-Serna, S. I. Pérez-Elvira, and E. Barrado, "Analytical methodologies for the determination of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in sewage sludge: A critical review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1083, pp. 19–40, 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.06.044.
- [9] W. Ben, Z. Qiang, C. Adams, H. Zhang, and L. Chen, "Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1202, no. 2, pp. 173–180, 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.07.014.
- [10] L. Leng *et al.*, "Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review," *Chemosphere*, vol. 238, p. 124680, 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124680.
- [11] A. Hom-Díaz, Z. N. Norvill, P. Blánquez, T. Vicent, and B. Guieysse, "Ciprofloxacin removal during secondary domestic wastewater treatment in high rate algal ponds," *Chemosphere*, vol. 180, pp. 33–41, 2017, doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.03.125.
- [12] J. M. F. Sevilla, "Fotobiorreactores para el cultivo masivo de algas," *Universidad de Almería*, 2014. [Online]. Available: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-7-fotobiorreactores.html>.
- [13] C. E. C. C. Ejike, S. A. Collins, N. Balasuriya, A. K. Swanson, B. Mason, and C. C. Udenigwe, "Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 59, Jan. 2017, doi:

10.1016/j.tifs.2016.10.026.

- [14] J. Martín Juárez, A. Lorenzo Hernando, R. Muñoz Torre, S. Blanco Lanza, and S. Bolado Rodríguez, "Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment," *Bioresour. Technol.*, vol. 218, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2016.06.087.
- [15] P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, and A. Isambert, "Commercial applications of microalgae," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 101, no. 2, Feb. 2006, doi: 10.1263/jbb.101.87.
- [16] K. S. Khoo *et al.*, "Recent advances in downstream processing of microalgae lipid recovery for biofuel production," *Bioresour. Technol.*, vol. 304, May 2020, doi: 10.1016/j.biortech.2020.122996.
- [17] K. W. Chew *et al.*, "Microalgae biorefinery: High value products perspectives," *Bioresour. Technol.*, vol. 229, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.006.
- [18] A. Solovchenko, A. Lukyanov, R. Gokare Aswathanarayana, D. Pleissner, and R. R. Ambati, "Recent developments in microalgal conversion of organic-enriched waste streams," *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 24, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.cogsc.2020.03.006.
- [19] Y. Li, W. Zhou, B. Hu, M. Min, P. Chen, and R. R. Ruan, "Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 23, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2011.09.064.
- [20] L. Zhang *et al.*, "Microalgae nourished by mariculture wastewater aids aquaculture self-reliance with desirable biochemical composition," *Bioresour. Technol.*, vol. 278, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.01.066.
- [21] J. K. Pittman, A. P. Dean, and O. Osundeko, "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.035.
- [22] C. J. López Rocha, E. Álvarez-Castillo, M. R. Estrada Yáñez, C. Bengoechea, A. Guerrero, and M. T. Orta Ledesma, "Development of bioplastics from a microalgae consortium from wastewater," *J. Environ. Manage.*, vol. 263, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.jenvman.2020.110353.
- [23] H. V. Perales-Vela, R. V. García, E. A. Gómez- Juárez, M. O. Salcedo-Álvarez, and R. O. Cañizares-Villanueva, "Streptomycin affects the growth and photochemical activity of the alga *Chlorella vulgaris*," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 132, pp. 311–317, 2016, doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.06.019.
- [24] S. Bolado *et al.*, "Tratamiento y valorización de aguas residuales mediante microalgas," *Dpto. Ing. Química y Tecnol. del Medio Ambient. Univ. Valladolid*, 2016.
- [25] R. Muñoz and B. Guieysse, "Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review," *Water Res.*, vol. 40, no. 15, pp. 2799–2815, 2006, doi: 10.1016/j.watres.2006.06.011.
- [26] Z. Tian *et al.*, "Minimum influent concentrations of oxytetracycline, streptomycin and spiramycin in selecting antibiotic resistance in biofilm type wastewater treatment systems," *Sci. Total Environ.*, vol. 720, p. 137531, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137531.
- [27] J. J. Mathers, S. C. Flick, and L. A. Cox, "Longer-duration uses of tetracyclines and

- penicillins in U.S. food-producing animals: Indications and microbiologic effects,” *Environ. Int.*, vol. 37, no. 5, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.envint.2011.01.014.
- [28] E. Scholar, “Sulfadiazine,” in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, 2007.
- [29] A. Doble, “Ciprofloxacin,” in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, 2007.
- [30] D. García *et al.*, “Evaluation of the dynamics of microalgae population structure and process performance during piggery wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors,” *Bioresour. Technol.*, vol. 248, pp. 120–126, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.079.
- [31] F. G. Acién Fernández, C. Gómez-Serrano, and J. M. Fernández-Sevilla, “Recovery of Nutrients From Wastewaters Using Microalgae,” *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 2, no. September, pp. 1–13, 2018, doi: 10.3389/fsufs.2018.00059.
- [32] R. López-Serna *et al.*, “Photobioreactors based on microalgae-bacteria and purple phototrophic bacteria consortia: A promising technology to reduce the load of veterinary drugs from piggery wastewater,” *Sci. Total Environ.*, vol. 692, pp. 259–266, 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.07.126.
- [33] K. Kotzabasis, a Hatzithanasiou, and M. Kentouri, “Methanol as alternative carbon source for quicker efficient production of the microalgae,” vol. 1656, no. 99, pp. 357–362, 1999.
- [34] E. Posadas *et al.*, “Microalgae cultivation in wastewater,” *Microalgae-Based Biofuels Bioprod. From Feed. Cultiv. to End-Products*, pp. 67–91, 2017, doi: 10.1016/B978-0-08-101023-5.00003-0.
- [35] A Richmond, *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- [36] A. Hom-Diaz *et al.*, “Performance of a microalgal photobioreactor treating toilet wastewater: Pharmaceutically active compound removal and biomass harvesting,” *Sci. Total Environ.*, vol. 592, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.224.