

ESTUDIO DEL **COMPOSTAJE** COMO TÉCNICA PARA LA **ELIMINACIÓN DE** **CONTAMINANTES EMERGENTES**

Programa de Doctorado en Contaminación, Toxicología y Sanidad
Ambientales

Dña. LUPE MARIMÓN VICENTE

Facultad de Farmacia

Departamento de Biología Vegetal

Enero 2017



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

DIRIGIDA POR LOS DOCTORES

Rafael Boluda Hernández

Salvador Mormeneo Bernat

María Iranzo Ródenas



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Facultad de Farmacia

Departamento de Biología Vegetal

**ESTUDIO DEL COMPOSTAJE COMO TÉCNICA PARA
LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES**

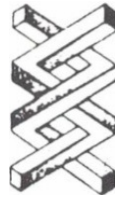
Tesis doctoral presentada por Dña. Lupe Marimón Vicente para
optar al grado de Doctora por la Universitat de València

Programa de Doctorado en Contaminación, Toxicología y
Sanidad Ambientales

Dirigida por los Doctores

Rafael Boluda Hernández
Salvador Mormeneo Bernat
María Iranzo Ródenas

VALÈNCIA, 2017



UNIDAD DOCENTE
DE MICROBIOLOGÍA

Dr. Rafael Boluda Hernández, Catedrático del Departamento de Biología Vegetal de la Universitat de València

Dr. Salvador Mormeneo Bernat, Catedrático del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universitat de València

Dra. María Iranzo Ródenas, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universitat de València

CERTIFICAN: que la investigación del presente trabajo titulado “Estudio del compostaje como técnica para la eliminación de contaminantes emergentes”, presentado para optar al grado de Doctora por la Universitat de València, ha sido realizado bajo su dirección por la Licenciada en Ciencias Ambientales, Lupe Marimón Vicente, en la Unidad de Investigación Suelos, Residuos y Medio Ambiente del Dpto. de Biología Vegetal y en la Unidad de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València.

Fdo. Rafael Boluda Hernández

Fdo. Salvador Mormeneo Bernat

Fdo. María Iranzo Ródenas

Me gustaría agradecer a:

- A mis directores, los Dres. María Iranzo Ródenas, Salvador Mormeneo Bernat y Rafael Boluda Hernández.
- A los Dres. Miguel Gamón y Jose Sancenón (Laboratorio Agroalimentario de la Generalitat Valenciana), por su ayuda en el análisis de los medicamentos mediante HPLC/MS/MS.
- Al Dr. Jesús Zueco y a la Licenciada Begoña Bort (Unidad de Microbiología de la Facultad de Farmacia) por su ayuda en todo momento en los aspectos microbiológicos.
- A todos los estudiantes que han participado en este trabajo con la realización de proyectos final de Grado y de Máster.
- A la empresa CINFA (INFARCO, SA) por su aportación de los fármacos puros.

Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyecto AGL2011-29382), el cual incluye mi Beca FPI, y la Generalitat Valenciana (ACOMP/2013/153).

*A ma mare i a mon pare,
per ser tan pacients amb mi
des que vaig nàixer, i a la meua germana*

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Contaminantes emergentes y problemática ambiental..... | 3 |
| 1.2. Estaciones de depuración de aguas | 8 |
| 1.3. Problemática de la paja de arroz y de los lodos de depuradora..... | 12 |
| 1.4. Compostaje | 14 |
| 1.5. Estrategias de biorremediación | 18 |
| 2. Objetivos..... | 27 |
| 2.1. General | 29 |
| 2.2. Específicos..... | 29 |
| 3. Material y métodos..... | 31 |
| 3.1. Reactivos químicos y materiales | 33 |
| 3.2. Determinación de fármacos y micotoxinas en muestras ambientales y estudio de su distribución en estaciones depuradoras de aguas residuales | 44 |
| 3.2.1. Toma de muestras ambientales | 45 |
| 3.2.2. Muestreo en las estaciones depuradoras de aguas residuales..... | 45 |
| 3.2.3. Optimización del método analítico para la determinación de fármacos y micotoxinas..... | 48 |
| 3.2.3.1. Tratamiento de las muestras y cromatografía líquida | 49 |
| 3.2.3.2. Espectrometría de masas | 50 |
| 3.2.3.3. Validación del método para la determinación de fármacos y micotoxinas..... | 53 |
| 3.3. Ensayos de compostaje a escala de laboratorio | 53 |
| 3.4. Ensayos de degradación de fármacos en diferentes condiciones..... | 57 |
| 3.5. Adición de compost a un suelo agrícola contaminado con fármacos | 59 |
| 3.6. Determinaciones analíticas | 60 |
| 3.6.1. Residuos y compost..... | 60 |
| 3.6.2. Suelos | 64 |
| 3.7. Análisis microbiológicos | 65 |
| 3.7.1. Microorganismos utilizados | 65 |
| 3.7.2. Medios de cultivo utilizados | 65 |
| 3.7.3. Determinación de microorganismos totales..... | 69 |
| 3.7.4. Aislamiento de hongos procedentes de la paja del arroz | 69 |
| 3.7.5. Aislamiento de microorganismos capaces de degradar diferentes fármacos | 70 |
| 3.7.6. Identificación de los microorganismos aislados | 71 |

| | |
|--|-----------|
| 3.7.7. Determinación de las actividades enzimáticas | 71 |
| 3.7.7.1. Actividad celulasa | 72 |
| 3.7.7.2. Actividad xilanasa | 73 |
| 3.7.8. Inoculación de microorganismos exógenos al compostaje..... | 73 |
| 3.8. Análisis estadístico..... | 74 |
| 4. Resultados y discusión | 75 |
| 4.1. Estudio de la presencia de fármacos y micotoxinas en muestras ambientales..... | 77 |
| 4.1.1. Validación del método para la determinación de fármacos y micotoxinas..... | 77 |
| 4.1.2. Presencia de los diferentes compuestos en las muestras de estudio..... | 81 |
| 4.1.3. Efecto del tratamiento de las depuradoras de aguas residuales sobre la concentración de fármacos..... | 90 |
| 4.2. Caracterización de la paja de arroz y de los lodos de depuradora para su compostaje..... | 97 |
| 4.3. Análisis del efecto del compostaje sobre los fármacos de estudio..... | 100 |
| 4.4. Influencia de la relación C/N sobre la eliminación de los fármacos durante el compostaje | 108 |
| 4.5. Efecto del compostaje sobre la degradación de fármacos adicionados en ensayos independientes..... | 119 |
| 4.5.1. Correlación entre la concentración de los fármacos y los parámetros analíticos | 126 |
| 4.6. Estudio del efecto de la temperatura y los materiales sobre la eliminación de los fármacos | 128 |
| 4.7. Cuantificación, aislamiento e identificación de microorganismos presentes en el compostaje..... | 139 |
| 4.7.1. Aislamiento de hongos con capacidad de degradar la paja de arroz | 140 |
| 4.7.1.1. Determinación de actividades enzimáticas..... | 145 |
| 4.8. Aislamiento de microorganismos capaces de degradar medicamentos..... | 150 |
| 4.9. Efecto de la bioaumentación sobre el proceso de compostaje y la eliminación de fármacos..... | 153 |
| 4.9.1. Influencia de la bioaumentación en el compostaje con una cepa aislada de campos de cultivo del arroz..... | 154 |
| 4.9.2. Influencia de microorganismos modificados genéticamente sobre el compostaje | 158 |
| 4.9.3. Influencia de la bioaumentación con <i>Brevundimonas naejangsanensis</i> y <i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> en la eliminación de azitromicina durante el compostaje | 165 |

Índice

| | |
|---|------------|
| 4.9.4. Influencia de la bioaumentación con <i>Klebsiella oxytoca</i> en la eliminación de ibuprofeno durante el compostaje | 171 |
| 4.9.5. Correlación entre la concentración de los fármacos y los parámetros analíticos | 174 |
| 4.10. Efecto de la aplicación de diferentes compost sobre la eliminación de fármacos en un suelo agrícola contaminado en condiciones de laboratorio | 176 |
| 4.10.1. Caracterización del suelo agrícola..... | 177 |
| 4.10.2. Evolución de la concentración de los fármacos y de los parámetros fisicoquímicos y biológicos en el suelo enmendado y sin enmendar..... | 178 |
| 5. Conclusiones..... | 199 |
| 6. Bibliografía | 205 |

ABREVIATURAS

| | |
|--|---|
| ADH: actividad deshidrogenasa | PD: potencial de desfragmentación |
| AF-C: fracción de ácidos fúlvicos | PFC: compuesto perfluorado |
| AH-C: fracción de ácidos húmicos | PPCP: producto farmacéutico y de cuidado personal |
| AH/AF: relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos | R: porcentaje de reducción |
| CE: conductividad eléctrica | RA: residuo de arroz |
| CEs: contaminantes emergentes | RH: residuo hortícola |
| CIC: capacidad de intercambio catiónico | RSD: residuos sólidos domésticos |
| C _{org} : carbono orgánico | RSU: residuos sólidos urbanos |
| C _{orgO} : carbono orgánico oxidable | SH-C: fracción de sustancias húmicas |
| C _s : carbono soluble | UFC: unidades formadoras de colonias |
| C _t : carbono total | YPD: yeast extract peptone dextrose |
| DER: desviación estándar relativa | |
| EC: energía de colisión | |
| EDAR: estación de depuración de aguas residuales | |
| EDC: disruptor endocrino | |
| ETAP: estaciones de agua potable | |
| HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos | |
| IH: índice de humificación | |
| INTF: iodonitrotetrazolio formazan | |
| LD: lodo de depuradora | |
| LDC: límite de cuantificación | |
| LDD: límite de detección | |
| MM: medio de cultivo mínimo | |
| MMC: medio mínimo con fuente de carbono | |
| MMN: medio mínimo con fuente de nitrógeno | |
| MOT: materia orgánica total | |
| m/z: relación masa/carga ión | |
| N-SH: fracción de sustancias no húmicas | |
| N _t : nitrógeno total | |
| PA: principio activo | |
| PCA: plate count agar | |

RESUMEN

Desde hace unos años está surgiendo una nueva clase de contaminantes químicos utilizados por el hombre con distintas finalidades y denominados contaminantes emergentes, entre los cuales se incluyen los productos farmacéuticos. Todos estos compuestos se encuentran en las aguas residuales, y como las estaciones de depuración de aguas residuales no están acondicionadas para eliminarlos, acaban liberándose en el medio ambiente. La mayor acumulación de estos compuestos se produce en los lodos que son utilizados en agricultura y compostaje. De hecho, se han encontrado fármacos de uso humano y fungicidas de aplicación agrícola en aguas superficiales, suelos, biosólidos e incluso en agua potable. Es por todo ello que surge la necesidad de paliar el problema de estos contaminantes que forman parte de los residuos antes de su disposición final.

En este trabajo se ha propuesto el estudio de la presencia de estos compuestos en diversos compartimentos ambientales de la Comunidad Valenciana, y las posibilidades de eliminarlos mediante la técnica del compostaje con paja de arroz y lodo de depuradora, dos residuos problemáticos en esta zona. El análisis mediante HPLC/MS/MS ha permitido detectar la presencia de tebuconazol, boscalid, propiconazol, triciclazol, azitromicina, ibuprofeno, irbesartán, telmisartán, fluoxetina, venlafaxina y citalopram en las muestras ambientales. El compostaje a escala de laboratorio ha resultado una técnica efectiva para la degradación de algunos de estos compuestos. Además, se ha investigado la influencia de la temperatura y de la actividad microbiana en su eliminación, así como la identificación de los microorganismos responsables de la degradación de los fármacos. Se ha observado como los factores involucrados en su eliminación son de naturaleza biótica, siendo la actividad de los

microorganismos claves en este proceso. Se ha logrado identificar microorganismos capaces de degradar azitromicina (*Brevundimonas naejangsanensis*, *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* y *Bacillus cereus*), ibuprofeno (*Klebsiella oxytoca*) e irbesartán (*Papiliotrema terrestris*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozanae*, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. michiganensis*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus terreus*). En una segunda fase, se ha estudiado la técnica de bioaumentación del compostaje mediante la inoculación de estos microorganismos con la finalidad de mejorar la eficiencia en la reducción de los fármacos. Los resultados han mostrado una mejora en la tasa de degradación de la azitromicina e ibuprofeno durante el compostaje inoculado con *A. faecalis* y *K. oxytoca*, respectivamente. Por último, se ha investigado la técnica de biorremediación de un suelo agrícola contaminado con medicamentos, que consiste en la adición de una enmienda orgánica que ha sido elaborada con la presencia del contaminante que se desea eliminar. Esta técnica ha resultado efectiva mostrando un efecto conjunto de bioaumentación, aclimatación y bioestimulación del compost sobre el suelo en el caso de la azitromicina.

Los resultados obtenidos en este trabajo tienen importancia en la prevención y mitigación de los problemas toxicológicos derivados de los contaminantes emergentes. Así, las técnicas de compostaje y biorremediación de suelos con la adición de enmiendas orgánicas y su mejora en la eficiencia mediante el uso de microorganismos, pueden ser una buena solución al problema.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminantes emergentes y problemática ambiental

A lo largo de la historia, los principales objetivos en el tratamiento de las aguas residuales han sido la eliminación de la materia orgánica y los nutrientes, así como la eliminación de microorganismos patógenos (You y col., 2015). Desde hace unos años, están surgiendo una nueva clase de compuestos químicos denominados contaminantes emergentes (CEs) que se definen como:

“Cualquier sustancia química sintética o natural o cualquier microorganismo que no están sujetos a un seguimiento de forma común en el medio ambiente, pero que presentan un potencial para introducirse en él, causando efectos adversos ecológicos y en la salud humana, que en algunos casos son conocidos y en otros, se desconocen” (Smital, 2008).

Los CEs engloban una gran variedad de compuestos en la que se incluyen toxinas de algas y cianobacterias, retardadores de llama, hormonas y otros compuestos disruptores endocrinos (EDCs), productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs), subproductos de desinfección, aditivos y agentes industriales, antisépticos, compuestos organometálicos, nanomateriales, pesticidas polares, compuestos perfluorados (PFCs), etc. y los metabolitos de todos ellos. El peligro que suponen los CEs radica en el hecho de que la toxicología ambiental y humana de la mayoría de estos compuestos todavía no ha sido estudiada y en el hecho de que muchos de ellos no han sido analizados en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs). Un estudio realizado por la European Chemical Bureau indicó que solamente habían

algunos datos relevantes para la evaluación de los riesgos en el ser humano y en el medio ambiente del 28% de las 1000 toneladas de químicos producidas anualmente (Smital, 2008).

Se ha demostrado que los criterios ecotoxicológicos típicamente empleados para caracterizar los CE son limitados, entre ellos, la persistencia, lipofilidad y toxicidad (aguda y crónica), ya que estos compuestos pueden presentar lo que se conoce como “pseudo-persistencia”, mediante la cual un contaminante está siempre presente en el ambiente debido a que está siendo liberado continuamente por las EDARs. En cuanto a la lipofilidad, que se usa como indicador de la facilidad con que un contaminante es capaz de atravesar las membranas celulares o entrar en los tejidos, tampoco es una herramienta adecuada para su caracterización debido a que muchos CE están diseñados farmacéuticamente para ser transportados dentro de las células y tejidos. De hecho, nuestra capacidad para detectar y cuantificar estos compuestos es superior al conocimiento sobre sus efectos tóxicos. Además, para que los toxicólogos puedan establecer una relación causa-efecto, no es suficiente con estudiar la ocurrencia y los efectos adversos de estos contaminantes, sino más bien, investigar su absorción, modo de acción y disposición final de cada uno de ellos (Rosenfeld y Feng, 2011).

En el caso en concreto de los PPCPs, estos se definen según la EPA (2012) como:

“Cualquier producto utilizado por un individuo con fines de salud personal o para uso cosmético o utilizado por la agroindustria para mejorar el crecimiento y la salud del ganado”.

Estos compuestos incluyen fármacos con y sin prescripción, medicamentos ilegales, fármacos de uso veterinario, así como sus metabolitos y conjugados, cremas solares, jabones, cremas hidratantes,

barras de labios, perfumes y repelentes de insectos (Cizmas y col., 2015). Los PPCPs pueden entrar al medio ambiente como componentes de desecho humanos o animales, después de su absorción incompleta y excreción del cuerpo, o pueden formar parte de los residuos médicos, industriales, agrícolas o domésticos (Figura 1.1).

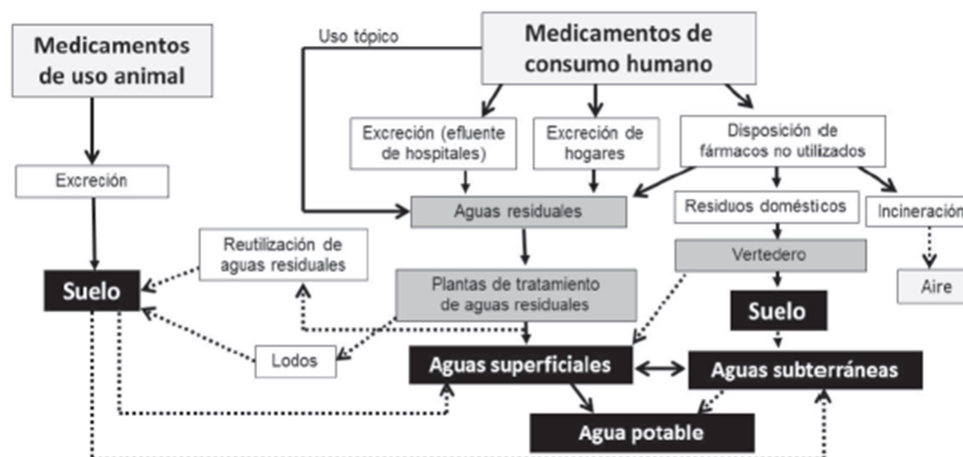


Figura 1.1. Esquema de las posibles fuentes y rutas de transporte de los residuos farmacéuticos en el ambiente acuático (Correia y Marcano, 2015).

Cabe destacar que estos productos farmacéuticos son formulaciones complejas y que sus coadyuvantes también generan productos de transformación, que interactúan con la materia orgánica y que bajo las condiciones propias del ecosistema, pueden ser potencialmente más tóxicos, más recalcitrantes e incluso más bioacumulables (García-Galán y col., 2016). A medida que se avanza en la investigación, se puede encontrar más bibliografía sobre los efectos que pueden provocar los PPCPs en los organismos vivos. Maranhó y col. (2015) observaron como la carbamazepina, el ibuprofeno, el propranolol, la fluoxetina y el etinilestradiol causaban alteraciones neuroendocrinas en la

biota bentónica. Pino y col. (2015) indicaron que cuatro fármacos antiinflamatorios y tres reductores de lípidos sanguíneos provocaban toxicidad aguda en el organismo terrestre *Eisenia fetida* en condiciones de laboratorio. Otros resultados mostraron que algunos PPCPs eran responsables de más del 50% de las unidades de toxicidad para algas y peces en ríos de la Península Ibérica y que las aguas superficiales reciben cantidades relevantes de fármacos que podrían interferir en la organización natural de la biota, así como afectar al ecosistema e incluso a los humanos (Osorio y col., 2016). También se ha demostrado como los antibióticos pueden inducir el desarrollo de poblaciones microbianas resistentes y alterar los microorganismos del suelo y sus funciones, entre otros muchos numerosos efectos (Du y Liu, 2012).

Por otra parte, aunque los pesticidas han sido de gran beneficio para la agricultura, así como para el control de vectores causantes de enfermedades (Fabro y Varca, 2012), su uso desmesurado ha puesto en peligro la salud de los seres humanos y animales causando verdaderos problemas ambientales y ecotoxicológicos debido a su persistencia en el medio ambiente y su acumulación en la cadena alimentaria (Castillo y col., 2011). Además, los plaguicidas también tienen un importante potencial para bioacumularse en los peces y otros organismos acuáticos (Fabro y Varca, 2012). En los últimos años los fungicidas azólicos (ciproconazol, difenoconazol, miclobutanil, piraclostrobin, propiconazol, tebuconazol y triciclazol) se aplican con frecuencia a los cultivos mezclados con piretroides (Norgaard y Cedergreen, 2010).

Como se ha descrito anteriormente, tras el consumo de PPCPs y el uso de fungicidas en la agricultura, estos compuestos pueden llegar a la red de alcantarillado y como las EDARs no están diseñadas para eliminar este tipo de sustancias, acaban liberándose en el medio ambiente. En este sentido, se han encontrado PPCPs y fungicidas en aguas superficiales,

aguas residuales, suelos, biosólidos, sedimentos e incluso en un caso en particular, en aguas de consumo (Tabla 1.1).

Tabla 1.1

Presencia de PPCPs y fungicidas de uso agrícola en los compartimentos ambientales.

| Grupo | Compuesto | Tipo de muestra | Referencia |
|-------------------|------------------|---------------------|-----------------------|
| Quimioterápicos | Azitromicina | Aguas superficiales | Yi y col., 2015 |
| | Claritromicina | | |
| | Eritromicina | | |
| | Cloranfenicol | | |
| | Sulfamerazina | | |
| | Sulfametazina | | |
| | Sulfametoxazol | | |
| | Tilosina | Suelos | Yi y col., 2015 |
| | Eritromicina | | |
| | Lincomicina | | |
| Antipsicóticos | Clozapina | Aguas superficiales | Matongo y col., 2015 |
| | | Aguas residuales | |
| | | Biosólidos | |
| Antiinflamatorios | Olanzapina | Aguas residuales | Yuan y col., 2013 |
| | Ibuprofeno | Suelos | Aznar y col., 2014 |
| | Ácido salicílico | | |
| | Paracetamol | | |
| | Fenoprofeno | | |
| Antihipertensivos | Atenolol | Aguas residuales | Subedi y Kannan, 2015 |
| | Propranolol | | |
| | Diltiazem | | |
| | Verapamilo | | |

Tabla 1.1. Presencia de PPCPs y fungicidas de uso agrícola en los compartimentos ambientales (continuación).

| Grupo | Compuesto | Tipo de muestra | Referencia |
|----------------------------|---------------|---------------------|----------------------|
| Antidepresivos | Diazepam | Agua potable | Wu y col., 2015 |
| | Temazepam | | |
| | Alprazolam | | |
| | Carbamazepina | Aguas superficiales | |
| | Diazepam | Aguas residuales | |
| | Oxazepam | | |
| | Estazolam | | |
| | Temazepam | | |
| | Alprazolam | | |
| | Fluoxetina | | |
| | Lorazepam | | |
| Fungicidas de uso agrícola | Triadimefon | Suelos | Liu y col., 2016 |
| | Buprofezina | Aguas superficiales | Moschet y col., 2014 |
| | Azoxistrobina | | |
| | Tebuconazol | | |
| | Propiconazol | | |
| | Boscalid | | |

PPCPs: productos farmacéuticos y de cuidado personal.

1.2. Estaciones de depuración de aguas

Se estima que en el año 1990, se consumían en la región mediterránea 280 km³ de agua, el 99% de la cual provenía de los recursos naturales. Esta demanda se ha duplicado en el siglo XXI, incrementándose hasta un 60% en los últimos 25 años. Se estima que en el año 2025, prácticamente ningún país del Sur del Mediterráneo podrá disponer de más de 500 m³ de recursos por habitante/año, lo cual agrava en mayor medida el problema de disponibilidad de agua potable. Es por todo ello que cada vez hay más necesidad de recurrir a las EDARs y a las estaciones de agua potable (ETAP) (Barceló y Petrovic, 2011). Es importante destacar la

diferencia entre los dos tipos de aguas. Así, el agua residual es un producto de la actividad humana y por tanto, es recogida por el sistema de alcantarillado y transportado a la EDAR, donde es tratada para posteriormente ser vertida a un medio receptor (río, lago, embalse o mar). Respecto al agua de consumo humano, esta es captada de un medio hídrico, transportada a la ETAP y distribuida a los consumidores mediante un sistema de abastecimiento (Doménech, 2003).

Las aguas residuales que entran a las EDARs, además de patógenos, contienen muchas otras sustancias contaminantes, entre ellas destacar la materia orgánica, constituida por compuestos de naturaleza reductora, por lo que consumirá oxígeno y podrá estar presente en forma coloidal o disuelta. Además, dependiendo de si las aguas son de origen industrial, agrícola o doméstico, existe la presencia de elementos que pueden ser de muy distinta composición, desde nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, hasta sustancias tóxicas como son los hidrocarburos, cianuros, metales pesados, trihalometanos, etc. (Osorio y col., 2010). El agua a tratar en las EDARs pasa por diversas etapas (Figura 1.2), entre las cuales destacan de manera general:

- ◆ Pretratamiento: se efectúa en dos fases claramente diferenciadas. En una primera etapa de desbaste se eliminan primero los sólidos de mayor tamaño. Seguidamente las rejillas gruesas eliminan los sólidos grandes flotantes, mientras que las rejillas finas, retienen los sólidos flotantes menores de 10 mm. La segunda etapa de este pretratamiento se realiza en los desarenadores-desengrasadores, donde se insufla aire para hacer flotar las grasas y aceites que serán retirados, y la arena sedimentará y será evacuada por otra vía.

- ◆ Tratamiento primario: se pretende eliminar la materia en suspensión sedimentable por acción de la gravedad mediante el uso de

decantadores. Este proceso se puede potenciar con un tratamiento físico-químico, en el cual se produce la coagulación y floculación de las partículas.

- ◆ Tratamiento biológico: en esta fase el objetivo principal es la eliminación de la materia orgánica. Los microorganismos presentes en esta etapa consumen el sustrato, produciéndose el crecimiento biológico, que es el encargado de llevar a cabo el proceso de depuración. Finalmente, la etapa de desaparición de la biomasa tiene lugar cuando la aportación de energía externa es menor que la necesaria para el mantenimiento de las células, y éstas obtienen la energía mediante la degradación de reservas energéticas. Como residuo se obtienen los lodos, una parte de los cuales se recirculan y el resto se purgan del sistema.
- ◆ Tratamiento terciario: es la última etapa y tiene como finalidad eliminar los restos que puedan quedar de materia orgánica, sólidos suspendidos, nitrógeno, fósforo y microorganismos patógenos. Para ello, se pueden combinar diversas técnicas tanto físicas, químicas como biológicas, entre las cuales destacan la filtración, coagulación, nitrificación-desnitrificación, ósmosis inversa, intercambio iónico y desinfección (cloración, ozonización, ultravioleta, ácido peracético, etc.).
- ◆ Línea de fangos: son el producto de desecho del tratamiento primario y biológico. Se caracterizan por ser sumamente inestables, putrescibles y poseen una patogenicidad muy notable. Solo una pequeña parte de los lodos es materia sólida, de manera que su contenido en agua puede ser mayor de un 90%. Los lodos pasan por una primera etapa de espesamiento para reducir su volumen mediante centrifugación, gravedad o flotación. Posteriormente el

objetivo es estabilizarlos utilizando técnicas como la digestión aerobia/anaerobia o la estabilización con cal y finalmente son deshidratados en las eras de secado o por deshidratación mecánica, antes de su disposición final.

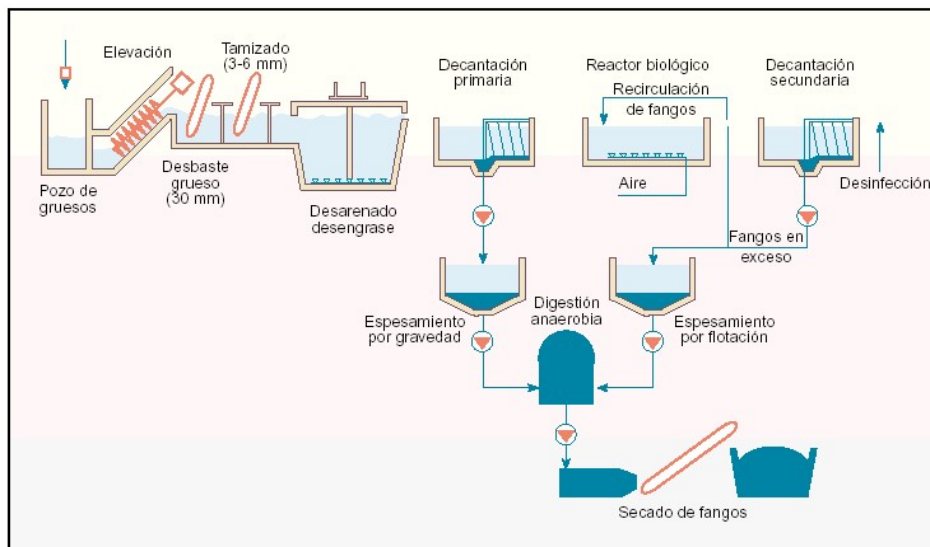


Figura 1.2. Esquema general del funcionamiento de una estación de depuración de aguas residuales (EDAR) (Doménech, 2003).

Las ETAP en la región Mediterránea surgieron debido a las características de sus ríos, los cuales presentan un caudal irregular y escaso y junto con la alta demanda de agua en esta región, apareció la necesidad de utilizar tecnologías avanzadas en la depuración de estas aguas. Las ETAP combinan tratamientos mediante el uso de membranas de ultrafiltración y ósmosis, así como la nanofiltración y electrodiálisis reversible (Gabarrón y col., 2016). Sin embargo, tal y como se ha mostrado en la Tabla 1.1, existen estudios que han encontrado PPCPs en los efluentes de las ETAP y a pesar de que se detectaron a bajas concentraciones y que no presentaron potencial tóxico, algunos de ellos

debido a su persistencia deberían ser candidatos para su regulación y seguimiento (Lin y col., 2016).

1.3. Problemática de la paja de arroz y de los lodos de depuradora

Según las estadísticas de la FAO, en un promedio de diez años, en España la producción de arroz fue de 726.000 toneladas anuales, siendo la segunda mayor producción de Europa. La producción de arroz de la zona del Parque Natural de l'Albufera de València se estima en el 17% de la producción total del país, con un área cultivada de más de 16.000 hectáreas. Este cultivo genera todos los años unas 100.000 toneladas de paja que se queman entre septiembre y octubre. Esta práctica genera emisiones contaminantes de dióxido de carbono y problemas de salud como son trastornos respiratorios, cardio-respiratorios y alérgicos (López y Boluda, 2008). Estos hechos no son exclusivos de la agricultura Valenciana, también están afectadas otras áreas del cultivo del arroz tanto en ámbito nacional (el Delta del Ebro en Cataluña), como internacional (Japón, China, etc.) (Iranzo y col., 2004). Algunos agricultores trituran la paja y la entierran con los laboreos; pero los suelos de los arrozales se inundan, y la degradación anaeróbica de la paja genera gas metano, un gas de efecto invernadero con un potencial 21 veces superior al CO₂. Otros efectos secundarios de este procedimiento son una mayor virulencia de las plagas e infecciones de las plantas y una menor fijación de nitrógeno, lo cual conduce a uso más extensivo de plaguicidas y abonos químicos. La alternativa generalizada de triturar y enterrar la paja, aunque económica a corto plazo, degeneraría en un problema medioambiental mucho más grave que el actual (Navarro, 2006).

Desde hace unos años hasta la actualidad se están proponiendo nuevas soluciones a la problemática de la paja de arroz. Una de ellas es el proyecto Sostrice cofinanciado por la Unión Europea (UE), mediante el cual la paja pasaría por dos digestores anaerobios para convertirla en biogás para su posterior aprovechamiento energético. En la bibliografía científica se pueden encontrar otras propuestas como la de Singh y col. (2015), que someten la paja a licuefacción hidrotérmica con la finalidad de obtener hidrocarburos líquidos o la de Lee y Yeom (2015), cuyo propósito fue evaluar el uso de las balas de paja y la cascarilla de arroz carbonizada como aislante natural en las casas.

En cuanto a los lodos de depuradora, la sucesiva aplicación de la Directiva 91/271/CEE sobre tratamiento de las aguas residuales urbanas por todos los Miembros de la UE ha provocado un aumento notable de lodos en los últimos años. De hecho, se predice que en el año 2020 estos países generarán más de 13 millones de toneladas de este tipo de residuo (Bondarczuk y col., 2016). En concreto, la cantidad de lodos generados en la Comunidad Valenciana es de aproximadamente 130.000 toneladas secas por año (Roca-Pérez y col., 2009). La UE considera que se debe promover la reutilización de los lodos por tratarse de una buena solución a largo plazo. A nivel europeo, el porcentaje de lodos destinados a fines agrícolas alcanzó un 50% en Alemania, 54% en España, 65% en Francia y 71% en el Reino Unido (Eljarrat y col., 2013). En concreto, en el caso de España, las principales vías de eliminación de lodos son el uso agrícola que representa el 80% del total generado, el depósito en vertederos (8%) y la incineración que se sitúa en un 4% actualmente, pero se encuentra en crecimiento (MAGRAMA, 2012).

Según Lynn y col. (2015), mediante el proceso de incineración los lodos se reducen aproximadamente un 70% en masa y un 90% en volumen, dejando como residuo cenizas que se pueden utilizar posteriormente en la producción de cemento. Sin embargo, debido al

elevado contenido en humedad y a su bajo poder calorífico, se requiere mucho consumo de energía y de combustible en este tipo de instalaciones (Joo y col., 2015). La aplicación agrícola se ha convertido en el método de disposición final más generalizado debido a que es la vía más económica en comparación con la incineración y al mismo tiempo, ofrece la oportunidad de reciclar y aportar materia orgánica y nutrientes al suelo estimulando así su actividad biológica (Zuloaga y col., 2012). Esta práctica constituye un grave problema, ya que los lodos de depuradora contienen CE's, metales pesados y otros contaminantes orgánicos que podrían tener efectos tóxicos en los organismos vivos (Alvarenga y col., 2015). Así, se han detectado entre 60 y 80 PPCPs en lodos primarios, secundarios y tratados biológicamente (Verlicchi y Zambello, 2015). En la revisión de Petrie y col. (2015), se muestra la presencia de 16 CE's, entre ellos el ibuprofeno y la fluoxetina, en biosólidos en diferentes países del mundo.

1.4. Compostaje

La historia de este sistema de tratamiento de residuos ha transcurrido entre el entusiasmo por aprovechar la energía y nutrientes contenidos en los tejidos animales y vegetales, por imitar a la naturaleza que recicla y no acumula residuos, y el desencanto producido por resultados inconsistentes de las instalaciones y el consiguiente escepticismo por parte de los posibles usuarios del compost (Soliva y col., 2008). Según O'Callaghan (2016), el proceso de compostaje se define como:

“Tecnología de degradación biológica y aeróbica en la cual la materia orgánica se procesa para obtener un material relativamente estabilizado que ya no consume oxígeno ni genera metabolitos tóxicos”.

Para que el compostaje se lleve a cabo se necesita materia orgánica, población microbiana inicial y las condiciones óptimas para que esta se desarrolle con multiplicidad de funciones y actividades sinérgicas (Figura 1.3).

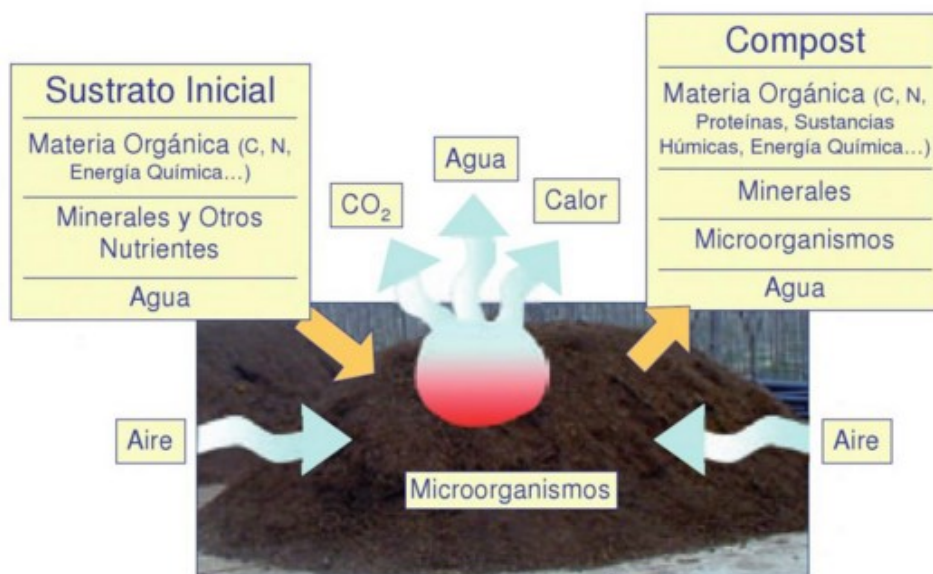


Figura 1.3. Esquema general del proceso de compostaje (Moreno y Mormeneo, 2008).

Los residuos orgánicos, prácticamente en todos los casos, están colonizados por diversos microorganismos endógenos que al disponer de las condiciones adecuadas se reproducen y favorecen la aparición de una sucesiva diversidad microbiana, que puede afectar al proceso tanto positiva como negativamente. En el grupo de los microorganismos beneficiosos se encuentra los que biotransforman la materia orgánica en presencia de oxígeno, que conducen a la obtención de compost de calidad; los microorganismos degradadores de compuestos contaminantes, que

permiten aplicar el compostaje en biodescontaminación; y los microorganismos que ejercen actividad antagónica frente a patógenos, que contribuyen a la higienización del producto final. Entre los microorganismos indeseables o que pueden afectar negativamente al proceso o a la calidad del producto se encuentran los implicados en la generación de olores y los patógenos (Moreno y Mormeneo, 2008). El incremento de la actividad biológica durante el compostaje, genera calor y, al considerarse los residuos una masa auto aislante, es retenido provocando un incremento de la temperatura (Soliva y col., 2008). Así, durante el proceso de descomposición aeróbica se pueden diferenciar tres fases: fase mesófila inicial ($T < 45\text{ }^{\circ}\text{C}$), al final de la cual se producen ácidos orgánicos; fase termófila ($T > 45\text{ }^{\circ}\text{C}$); y fase mesófila final, considerándose finalizado el proceso cuando se alcanza de nuevo la temperatura inicial. Las variables más importantes que afectan a este proceso son la temperatura, la humedad, el pH, la aireación, la porosidad, el tamaño de partícula, la relación C/N, los nutrientes, la materia orgánica y la conductividad eléctrica (Bueno y col., 2008). Un proceso de compostaje con estos parámetros bien controlados y aplicado a los materiales adecuados, reduce la humedad, el peso, el volumen de los residuos tratados y conduce a un producto estabilizado, almacenable, transportable y utilizable en los suelos. Este producto final, el compost, al ser aplicado en un suelo, puede mejorar la infiltración y retención de agua, disminuir las fluctuaciones de temperatura, reducir la erosión, mejorar la sanidad de los cultivos al favorecer un control natural de plagas y aportar nutrientes para el sustento de las plantas (Soliva y col., 2008).

Investigaciones recientes muestran como los PPCPs y los fungicidas de uso agrícola pueden ser degradados mediante el compostaje (Tabla 1.2).

Tabla 1.2

Investigaciones en la degradación de PPCPs y fungicidas de uso agrícola mediante el compostaje.

| Grupo | Compuesto | Material | Referencia | |
|-------------------|-------------------|---|---------------------------|---------------------|
| Quimioterápicos | Amoxicilina | Serrín Heces humanas | Kakimoto y Funamizu, 2007 | |
| | Clortetraciclina | Virutas de álamo | Dolliver y col., 2008 | |
| | Monensin | Cascarilla de girasol | | |
| | Sulfametazina | | | |
| | Tilosina | | | |
| | Clortetraciclina | Estiércol de pavo Estiércol de gallina | Bao y col., 2009 | |
| | Salinomicina | Heno Gallinaza | Ramaswamy y col., 2010 | |
| | Clortetraciclina | Serrín | Kim y col., 2012 | |
| | Sulfametacina | Estiércol de cerdo | | |
| | Tilosina | | | |
| | Kitasamicina | Serrín Residuos lácteos | Ding y col., 2014 | |
| | Sulfonamida | Paja de maíz Estiércol de cerdo | Liu y col., 2015a | |
| | Antiinflamatorios | Paracetamol | Lodos | Martín y col., 2015 |
| | | Diclofenaco | | |
| Ibuprofeno | | | | |
| Ketoprofeno | | | | |
| Naproxeno | | | | |
| Ácido salicílico | | Lodos | Butkovskiy y col., 2016 | |
| Diclofenaco | | Madera | | |
| Antihipertensivos | Ibuprofeno | | | |
| | Triadimefon | Suelos | Liu y col., 2016 | |
| | Atenolol | Lodos | Martín y col., 2015 | |
| Antidepresivos | Propranolol | | | |
| | Fluoxetina | Lodos | Vasskog y col., 2009 | |
| | Citalopram | Corteza de abeto | | |

Tabla 1.2. Investigaciones en la degradación de PPCPs y fungicidas de uso agrícola mediante el compostaje (continuación).

| Grupo | Compuesto | Material | Referencia |
|----------------------------|---------------|-----------------------|---------------------|
| Fungicidas de uso agrícola | Iprodiona | - | Vanni y col., 2000 |
| | Procimidona | Residuos vegetales | Kupper y col., 2008 |
| | Azoxistrobina | Estiércol de caballo | |
| | Carbendazima | Residuos alimentarios | |
| | Cimoxanilo | | |
| | Ciproconazol | | |
| | Difenoconazol | | |
| | Tebuconazol | | |

PPCPs: productos farmacéuticos y de cuidado personal

1.5. Estrategias de biorremediación

Debido a su alta diversidad metabólica, los microorganismos son capaces de vivir en una gran variedad de hábitats “naturales”, lo cual les permite aprovecharse de cualquier nicho ecológico. Además, debido a la intensa competitividad existente en el medio ambiente, han diseñado estrategias para sobrevivir como por ejemplo, el metabolizar de forma más rápida los nutrientes que los demás microorganismos, así como producir ácidos, antibióticos u otras sustancias que inhiban el crecimiento de los otros. En ambientes no competitivos con condiciones extremas de temperatura, salinidad o acidez, los microorganismos necesitan características fisiológicas especiales que les permiten vivir (Iranzo y col., 2001).

La biorremediación de zonas contaminadas se basa en las estas inmensas capacidades metabólicas del mundo microbiano, que les permiten transformar contaminantes orgánicos que han sido fabricados por los humanos, en compuestos inofensivos o al menos, en otros menos peligrosos (Figura 1.4).

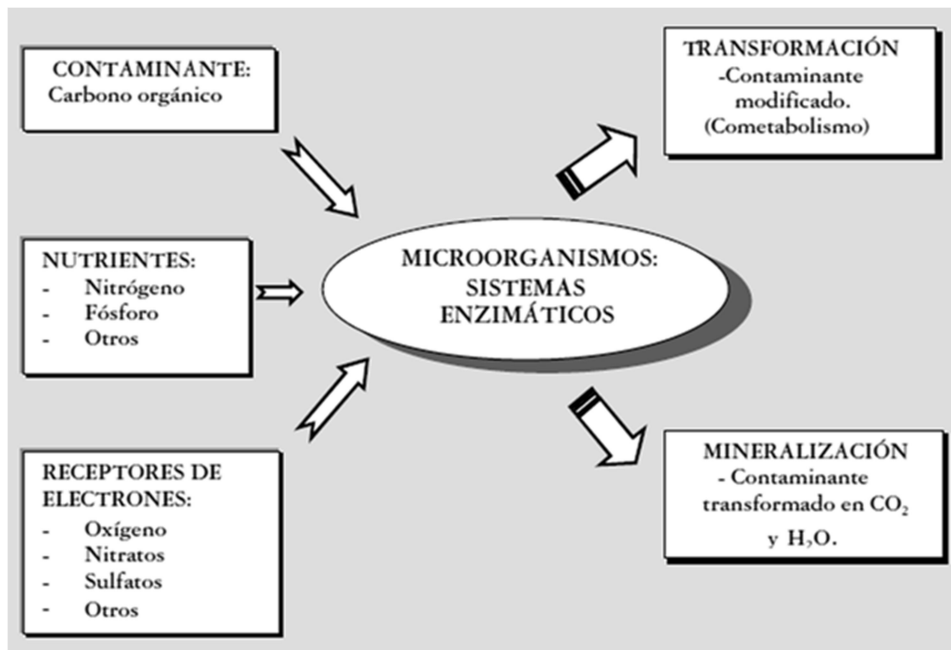


Figura 1.4. Actividad microbiana en el proceso de biorremediación (Sánchez y Rodríguez, 2003).

Uno de los principales atractivos de este conjunto de tecnologías es su compatibilidad con las principales rutas naturales de reciclaje de la Tierra, conocidas como ciclos biogeoquímicos, que hacen de la biorremediación una aproximación sostenible y medioambientalmente “verde”. Este proceso de degradación/atenuación natural de los contaminantes se conoce como bioatenuación:

“El conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos que espontáneamente ocurren en un espacio determinado, con posterioridad a la aparición de la contaminación en el mismo y que son capaces de reducir, sin la intervención humana, la masa, la toxicidad, la movilidad, el volumen o la concentración del contaminante” (Watanabe, 2001).

Este proceso se lleva a cabo por los microorganismos autóctonos, principalmente bacterias, del medio afectado. Estas utilizan su potencial enzimático para mineralizar (biodegradar completamente hasta CO₂) los compuestos orgánicos o bien simplemente degradarlos hasta productos intermedios, ya sea en un ambiente aerobio o anaerobio. En otras ocasiones las transformaciones co-metabólicas llevadas a cabo por enzimas que metabolizan simultáneamente otros compuestos como fuente de carbono son las responsables de la biodegradación (Sánchez y Gallego, 2005; Hua y col., 2010; Masciandaro y col., 2013). En cualquier caso los procesos suelen tener lugar mediante una gran variedad de interacciones biogeoquímicas entre los componentes del suelo, el agua, los microorganismos y los contaminantes. La capacidad intrínseca de asimilación de un medio depende de las habilidades metabólicas de los microorganismos nativos, del tipo de contaminante y lógicamente de la geoquímica y la hidrogeología en la zona (Gallego y col., 2006).

A pesar de ello, las condiciones ambientales locales podrían ser desfavorables para los microorganismos. En algunos casos, la comunidad microbiana que está presente de forma natural en una zona contaminada, no muestra el apropiado potencial metabólico para la degradación y la completa mineralización de la sustancia en moléculas más pequeñas y estables. Esto podría ser debido a la presencia de un número muy bajo de un único tipo de microorganismo que posee los enzimas capaces de transformar productivamente el contaminante, hecho que suele ocurrir si el compuesto se trata de una molécula compleja o de una mezcla de compuestos que solamente pueden ser fragmentados por una vía o una combinación específica de microorganismos. En estos casos, para llevar a cabo una biorremediación satisfactoria se podría aplicar la bioaumentación (El Fantroussi y Agathos, 2005; Festa y col., 2016), la cual se define como:

“Técnica que mejora la capacidad de la matriz microbiana para biodegradar compuestos recalcitrantes, y que puede ser utilizada en suelos y otros ecosistemas para eliminar la contaminación mediante la introducción de cepas competentes específicas o consorcios de microorganismos” (Xenofontos y col., 2016).

Además, existe otra solución, la bioestimulación, que consiste en:

“Adición de componentes al medio a tratar como son minerales, nutrientes orgánicos fácilmente biodegradables o incluso aire u oxígeno disuelto, los cuales potencian el crecimiento microbiano de manera que la biomasa formada es capaz de eliminar el contaminante usándolo como fuente de carbono y energía o indirectamente a través del co-metabolismo de reacciones enzimáticas inespecíficas” (Semrany y col., 2012).

El proceso de compostaje en sí puede ser considerado un proceso de bioestimulación en el que los materiales se mezclan en proporciones adecuadas, se humectan, se airean y se disponen de forma tal que se promueva o bioestime el crecimiento de poblaciones microbianas originalmente presentes en los sustratos. La actividad microbiana y los cambios que esta induce en el material van estimulando la actividad de un determinado tipo de población en cada fase del proceso. Pero aplicando además la bioaumentación, se pueden incorporar nuevos microorganismos que hayan sido previamente aislados a partir del propio material sometido a compostaje o de cualquier otra fuente. Esta operación podría mejorar la conversión de los sustratos orgánicos, reducir reacciones indeseables como la generación de olores, o incrementar actividades degradativas durante procesos de biodescontaminación (Moreno y Mormeneo, 2008). En este sentido, los biorreactores representan un método seguro para el tratamiento de contaminantes, ya que permite el control de los parámetros

como son la temperatura, el pH, la cantidad de nutrientes y el periodo de agitación, y por lo tanto se puede optimizar al máximo el proceso (Iranzo y col., 2001).

A pesar de los buenos resultados obtenidos en diversos ensayos, la efectividad de la inoculación es controvertida, y en ocasiones no conduce a mejoras significativas respecto a la actividad demostrada por la biota autóctona. Esto puede atribuirse a razones tales como una cantidad insuficiente de inóculo, escasa competitividad frente a microorganismos autóctonos o baja capacidad adaptativa al ambiente variable durante el proceso de compostaje (Moreno y Mormeneo, 2008; Szulc y col., 2014).

Existen pocos trabajos que hayan investigado la mejora del proceso de compostaje o la eliminación de contaminantes mediante la bioaumentación, y solamente uno de ellos tiene como objetivo la eliminación de un PPCP (Tabla 1.3).

Tabla 1.3

Bioaumentación para la eliminación de contaminantes y/o mejora del proceso de compostaje.

| Organismo | Compuesto/mejora | Material | Referencia |
|---|---------------------------|---|---------------------------|
| <i>Trametes versicolor</i> | Carbofurano | Cascarilla de arroz Compost de jardín Suelo | Ruiz-Hidalgo y col., 2016 |
| <i>Staphylococcus</i> sp. | Oxitetraciclina | Serrín Estiércol de cerdo | Zhang y col., 2015a |
| Bact. mesófilas Bact. termófilas Hongos | Calidad producto | Plantas de tomate Astillas de pino | Jurado y col., 2014a |
| <i>Nitrosomonas</i> | Oxidación NH ₃ | RSD Lodo | Zeng y col., 2014 |

Tabla 1.3. Bioaumentación para la eliminación de contaminantes y/o mejora del proceso de compostaje (continuación).

| | | | |
|---------------------------|-----------------|------------------|--------------------------|
| <i>Gordonia</i> | HAPs | Caña | García-Díaz y col., 2013 |
| <i>Mycobacterium</i> | | Vermicompost | |
| <i>Rhodococcus</i> | | Estiércol bovino | |
| <i>Pseudomonas</i> | Diésel | Compost RSU | Taccari y col., 2012 |
| <i>Aspergillus</i> | Propiedades F-Q | <i>Jatropha</i> | Chaturvedi y col., 2010 |
| <i>Trichoderma viride</i> | | Calabaza | |
| <i>Phanerochaete</i> | | Tomate | |
| | | Berenjena | |

HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos; RSU: residuos sólidos urbanos; RSD: residuos sólidos domésticos; Bact.: bacterias; F-Q: fisicoquímicas.

Por otra parte, el compostaje se considera una de las tecnologías más económicas y efectivas para la biorremediación de suelos contaminados (Taiwo y col., 2016). Como consecuencia, su aplicación se está incrementando debido a que las técnicas de remediación convencionales que utilizan métodos fisicoquímicos son muy costosas y además, el proceso de eliminación de residuos a menudo es incompleto, debido a la conversión de los compuestos de origen en metabolitos, que en muchas ocasiones son más persistentes y más tóxicos que los productos originales. Las estrategias de compostaje para la biorremediación de suelos son muy diversas, incluyendo el compostaje del suelo, la adición de compost, la bioaumentación, la incorporación de materiales estructurantes y la aplicación de surfactantes (Figura 1.5).

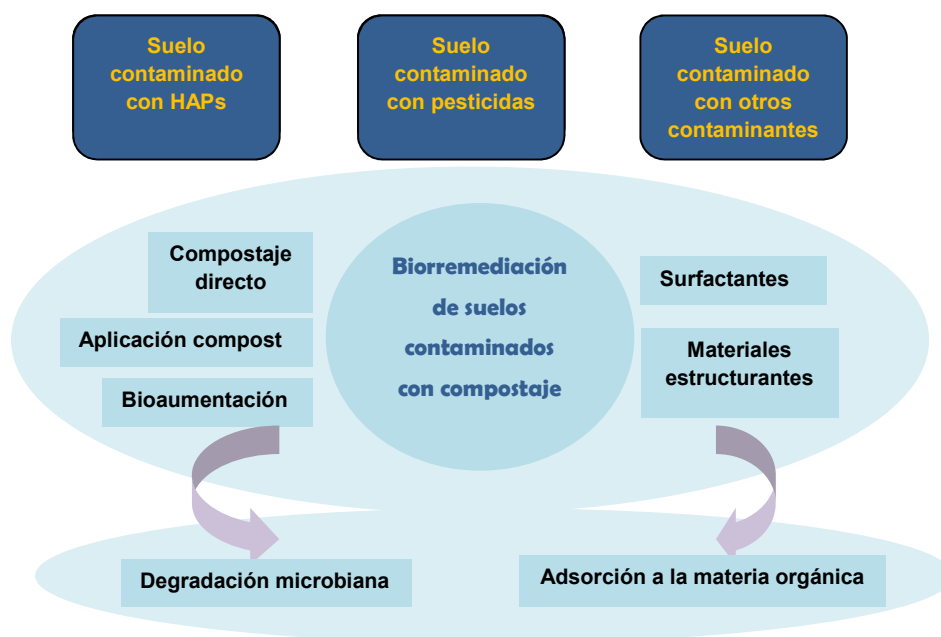


Figura 1.5. Principales estrategias para la biorremediación de suelos contaminados mediante compostaje (adaptación de Chen y col., 2015).

A menudo los investigadores no utilizan una única estrategia, sino una combinación de ellas para alcanzar sus objetivos. Así, una forma de unir la bioestimulación y bioaumentación sería la adición de un material compostado a un suelo contaminado. Con esta práctica y debido a la presencia de materia orgánica estabilizada, se contribuye a mejorar las características estructurales del suelo, incrementando de este modo su disposición para actuar como hábitat idóneo para la microbiota edáfica. Además, la incorporación de compost supone una importante aportación nutricional y un incremento de la población microbiana en el suelo procedente de la riqueza que el producto compostado puede aportar (Vargas-García y Suárez-Estrella, 2008; Megharaj y col., 2011).

La mayoría de estudios relacionados con la biorremediación de suelos mediante la aplicación directa de compost tienen como objetivo la eliminación o reducción de hidrocarburos (Hamdi y col., 2007; Tejada y

col., 2008; Chiu y col., 2009; Ros y col., 2010; Sayara y col., 2011; Russo y col., 2012; Khamforoush y col., 2013; Dados y col., 2014; García-Delgado y col., 2015) y de biocidas (Álvarez-Martín y col., 2016; Bosso y col., 2015; Pose-Juan y col., 2015). Sin embargo, solamente se han encontrado algunos trabajos que apliquen esta estrategia de biorremediación para PPCPs (Guerin, 2001; Grenni y col., 2012; Topp y col., 2016) y dos estudios más acerca del aislamiento de microorganismos que presentan potencial para la degradación de enrofloxacin (Randhawa y Kullar, 2011) y carbamazepina (Popa y col., 2014).

Por todo lo expuesto en los apartados anteriores, es necesario eliminar los restos de fármacos y otros contaminantes de los residuos procedentes de las actividades agrícolas, municipales o industriales, cuyo destino sea su reutilización, así como la búsqueda de una alternativa mejor para su disposición final. En este sentido, numerosos autores están de acuerdo en que el compostaje es la opción más efectiva y económica (López y Boluda, 2008; Dorival-García y col., 2015; López y col., 2015; Varma y col., 2015; Zeng y col., 2016; Villar y col., 2016). Además, en trabajos anteriores se ha demostrado como la paja de arroz y los lodos de depuradora son dos residuos compatibles para llevar a cabo el compostaje de forma correcta (Iranzo y col., 2004; Roca-Pérez y col., 2005; Roca-Pérez y col., 2009).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. General

Debido a la falta de información sobre las repercusiones del problema de los contaminantes emergentes y al elevado riesgo para la agricultura, salud pública y la contaminación ambiental, algunos autores insisten en la gran necesidad de estudiar estrategias que favorezcan la eliminación de los contaminantes emergentes que ayuden a paliar el problema.

El objetivo principal de esta Tesis es estudiar la influencia de los mecanismos físicos, químicos y biológicos inherentes al proceso de compostaje de lodos de depuradora y paja de arroz, sobre la eliminación o reducción de contaminantes emergentes. Así como identificar las prácticas de biorremediación más adecuadas y estudiar el efecto de la inoculación de microorganismos sobre este sistema de tratamiento de residuos orgánicos, para ayudar a mitigar los problemas potenciales para la agricultura y salud pública derivados de su presencia en el medioambiente.

2.2. Específicos

Para alcanzar este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Optimización de un método de análisis rápido, simple y fiable, basado en HPLC-MS/MS para la determinación y el estudio de la presencia, distribución y comportamiento de contaminantes orgánicos a partir de muestras ambientales con diferentes matrices.

2. Estudio de la efectividad del proceso de compostaje con paja de arroz y lodos de depuradora para la eliminación de fármacos, así como investigar los principales factores que están involucrados en su degradación.
3. Investigar la influencia de un microorganismo aislado del cultivo del arroz y de microorganismos modificados genéticamente sobre la mejora del proceso de compostaje.
4. Aislamiento e identificación de microorganismos procedentes del compostaje capaces de degradar los fármacos y evaluación de su influencia sobre la eliminación de estos compuestos durante este proceso.
5. Estudio del efecto de la aplicación de diversos compost sobre la eliminación de fármacos como técnica de biorremediación en un suelo contaminado con estos compuestos en condiciones de laboratorio.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Reactivos químicos y materiales

Los estándares de referencia para los compuestos analizados se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos), Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Alemania), y fueron donados por los laboratorios farmacéuticos CINFA (INFARCO, SA) (Pamplona, España). Los patrones puros de los fármacos también se obtuvieron por estos últimos laboratorios. El metanol, el acetonitrilo, el diclorometano, el ácido fórmico $\approx 98\%$ (todos ellos de grado análisis HPLC), el nitrato de plata de grado reactivo, ACS, ISO, el peróxido de hidrógeno 30%, la N,N-dimetilformamida 99,8% anhidra, el tris hidroximetil aminometano de grado reactivo, ACS, la urea grado reactivo, ACS, los cloruros, el hidróxido de sodio, el etanol absoluto, los ácidos y todos los reactivos utilizados para la preparación de los medios de cultivo se obtuvieron de Scharlab (Barcelona, España). El agua de grado análisis HPLC se obtuvo mediante el sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos). El formiato amónico ($\approx 99\%$, grado de reactivo), los reactivos de iodonitrotetrazolio (INT e INTF), el acetato de bario, la resina Superlite DAX-8, la solución de Rojo Congo, el Remazol Brilliant Blue, el xilano de madera de abedul, los filtros de nylon y los tampones Tris HCl fueron proporcionados por Sigma Aldrich. El sulfato ferroso (II) 7-hidrato para análisis, ACS, el dicromato potásico PA-ACS-ISO, 1-10-fenantrolina monohidratada PA-ACS, tetra-sodio pirofosfato 10-hidrato PA y el bicarbonato de sodio se obtuvieron de Panreac (Barcelona, España). El test de fosfatos y el de amonio se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los papeles de filtro utilizados se adquirieron de Filter-Lab (Barcelona, España). El sensor GLUCOCARDTM G se obtuvo por A.MENARINI diagnostics (Badalona, España).

En este trabajo se seleccionaron los 50 compuestos que se muestran en la Tabla 3.1 para su análisis. Dentro de estos compuestos, 33 son fungicidas de aplicación agrícola (azoxistrobina, boscalid, bromuconazol, carbendazima, cimoxanilo, ciproconazol, difenoconazol, dimetomorf, dimoxistrobina, fenamidona, fenbuconazol, fenhexamida, fenpropidina, fenpropimorf, fluopicolida, hexaconazol, metconazol, miclobutanil, penconazol, picoxistrobina, piraclostrobina, pirimetanil, propamocarb, propiconazol, protioconazol-destio, quinoxifen, tebuconazol, tetraconazol, tiofanato-metilo, triciclazol, triticonazol, trifloxistrobina y triflumizol) debido a que la Comunidad Valenciana se encuentra entre las cuatro primeras comunidades autónomas que más utilizan este tipo de plaguicidas (IAEST, 2015); 9 compuestos son los medicamentos de uso humano más frecuentemente consumidos en la Comunidad Valenciana durante los últimos años (AEMPS, 2009; AEMPS, 2014; AEMPS, 2015) (azitromicina, bencilpenicilina, ibuprofeno, irbesartán, telmisartán, citalopram, fluoxetina, venlafaxina y olanzapina) y 8 son las micotoxinas más importantes desde el punto de vista de la seguridad alimentaria (Bhat y Reddy, 2017) (aflatoxina B1, ocratoxina A, fumonisina B1, fumonisina B2, toxina HT-2, toxina T2, zearalenona y deoxinivalenol).

Tabla 3.1
Propiedades fisicoquímicas de los 50 compuestos analizados.

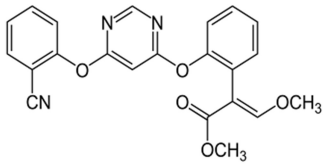
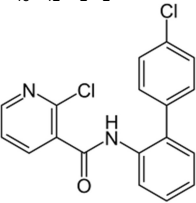
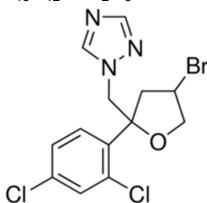
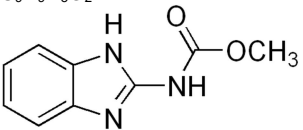
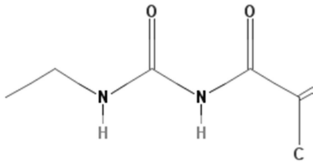
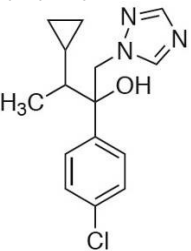
| Nombre Num CAS | Fórmula Estructura | M (g mol ⁻¹) | Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) | K _{ow} |
|------------------------------|---|-----------------------------|---|-----------------|
| Azoxistrobina 131860-33-8 | C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅  | 403,4 | 6,0 | 3,70 |
| Boscalid 188425-85-6 | C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O  | 343,2 | 4,6 | 2,96 |
| Bromuconazol 116255-48-2 | C ₁₃ H ₁₂ BrCl ₂ N ₃ O  | 377,1 | 50,0 | 3,24 |
| Carbendazima 10605-21-7 | C ₉ H ₉ N ₃ O ₂  | 291,2 | 8,0 (pH 7) | 1,52 |
| Cimoxanilo 57966-95-7 | C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃  | 198,2 | 890,0 | 0,67 (pH 7) |
| Ciproconazol 94361-06-5 | C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O  | 291,8 | 140,0 | 2,90 |

Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los 50 compuestos analizados (continuación).

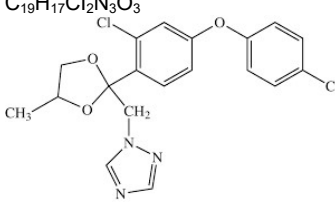
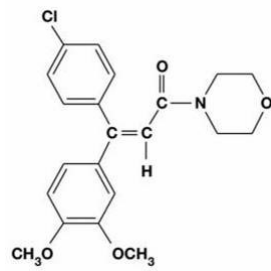
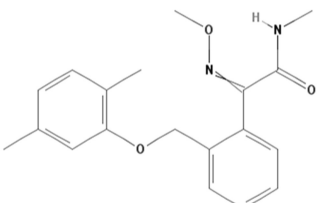
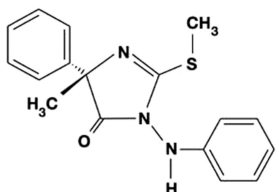
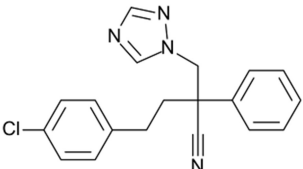
| Nombre Num CAS | Fórmula Estructura | M (g mol ⁻¹) | Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) | K _{ow} |
|-------------------------------|--|-----------------------------|---|-----------------|
| Difenoconazol 119446-68-3 | C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃  | 406,3 | 16,0 | 4,00 |
| Dimetomorf 110488-70-5 | C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄  | 389,9 | 49,2 (pH 7) | 2,63 |
| Dimoxistrobina 149961-52-4 | C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₃  | 326,4 | 4,3 | 3,90 |
| Fenamidona 161326-34-7 | C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS  | 311,4 | 7,8 | 4,10 |
| Fenbuconazol 114369-43-6 | C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄  | 336,8 | 2,5 | 3,2 |

Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los 50 compuestos analizados (continuación).

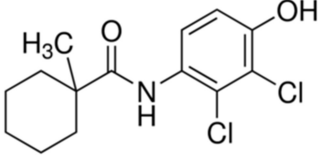
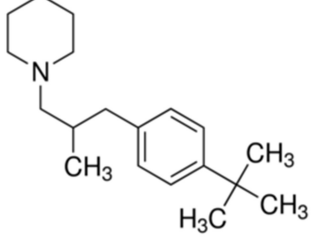
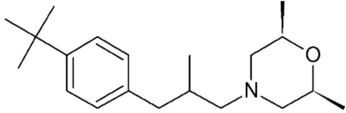
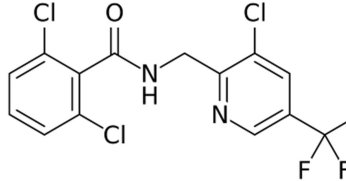
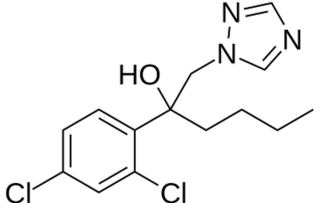
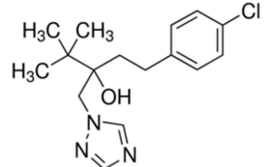
| Nombre Num CAS | Fórmula Estructura | M (g mol ⁻¹) | Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) | K _{ow} |
|-----------------------------|--|-----------------------------|---|-----------------|
| Fenhexamida 126833-17-8 | C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂  | 302,2 | 20 | 3,51 |
| Fenpropidina 67306-00-7 | C ₁₉ H ₃₁ N  | 273,5 | 530 (pH 7) | 5,50 |
| Fenpropimorf 67564-91-4 | C ₂₀ H ₃₃ NO  | 303,5 | 4,3 | 5,20 |
| Fluopicolida 239110-15-7 | C ₁₄ H ₈ Cl ₃ F ₃ N ₂ O  | 383,6 | 2,8 (pH 7) | 3,26 |
| Hexaconazol 79983-71-4 | C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O  | 314,2 | 0,018 | 3,70 |
| Metconazol 125116-23-6 | C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O  | 319,8 | 18,7 | 3,70 |

Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los 50 compuestos analizados (continuación).

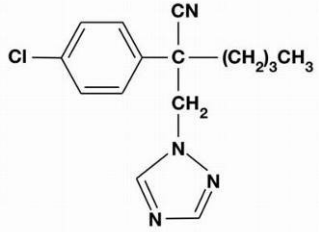
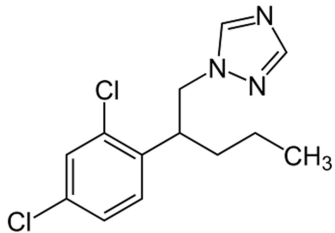
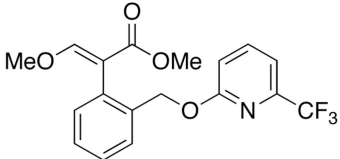
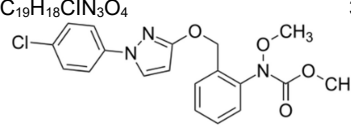
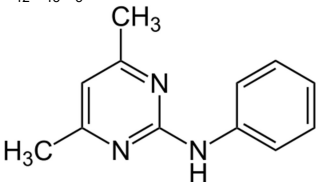
| Nombre Num CAS | Fórmula Estructura | M (g mol ⁻¹) | Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) | K _{ow} |
|--------------------------------|--|-----------------------------|---|-----------------|
| Miclobutanil 88671-89-0 | C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄  | 288,8 | 142 | 2,94 |
| Penconazol 66246-88-6. | C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃  | 284,2 | 73 | 3,72 |
| Picoxistrobina 117428-22-5 | C ₁₈ H ₁₆ F ₃ NO ₄  | 367,3 | 3,1 | 3,60 |
| Piraclostrobina 175013-18-0 | C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄  | 387,8 | 1,9 | 4,10 |
| Pirimetanil 53112-28-0 | C ₁₂ H ₁₃ N ₃  | 199,3 | 121 | 2,84 |

Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los 50 compuestos analizados (continuación).

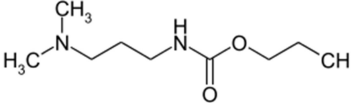
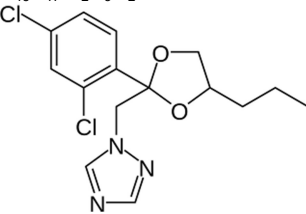
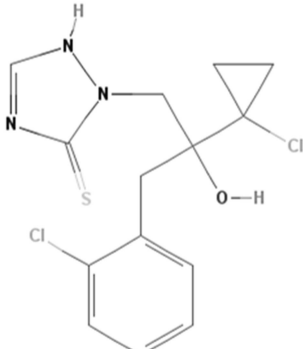
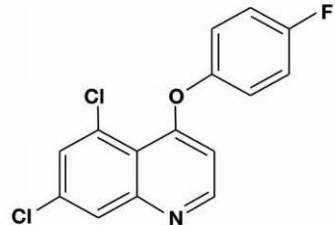
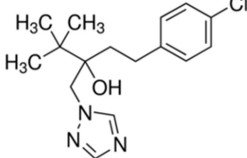
| Nombre Num CAS | Fórmula Estructura | M (g mol ⁻¹) | Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) | K _{ow} |
|-------------------------------------|--|-----------------------------|---|-----------------|
| Propamocarb 24579-73-5 | C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₂  | 188,3 | 700 x 10 ³ | 1,20 |
| Propiconazol 60207-90-1 | C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂  | 342,2 | 100 | 3,72 |
| Protioconazol-destio 178928-70-6 | C ₁₄ H ₁₅ Cl ₂ N ₃ OS  | 344,3 | 300 | 4,05 |
| Quinoxifen 124495-18-7 | C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO  | 308,1 | 47 (pH 7) | 4,66 |
| Tebuconazol 107534-96-3 | C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O  | 307,8 | 36 | 3,70 |

Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los 50 compuestos analizados (continuación).

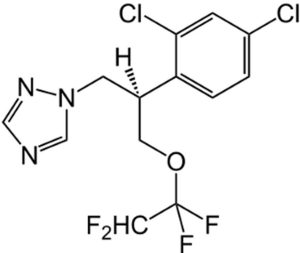
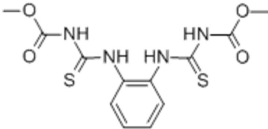

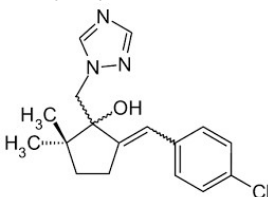
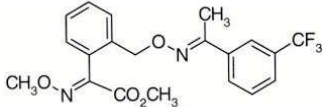
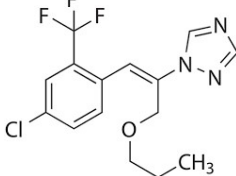
| Nombre Num CAS | Fórmula Estructura | M (g mol ⁻¹) | Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) | K _{ow} |
|---------------------------------|--|-----------------------------|---|-----------------|
| Tetraconazol 112281-77-3 | C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O  | 372,1 | 150 | 3,56 |
| Tiofanato-metilo 23564-05-8 | C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂  | 342,4 | 26,6 | 1,40 |
| Triclazol 41814-78-2 | C ₉ H ₇ N ₃ S  | 189,2 | 700 | 1,70 |
| Triticonazol 131983-72-7 | C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O  | 317,8 | 9,3 | 3,29 |
| Trifloxistrobina 141517-21-7 | C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄  | 408,4 | 0,61 | 4,50 |
| Triflumizol 99387-89-0 | C ₁₅ H ₁₅ ClF ₃ N ₃ O  | 345,7 | 12,5 | 1,40 |

Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los 50 compuestos analizados (continuación).

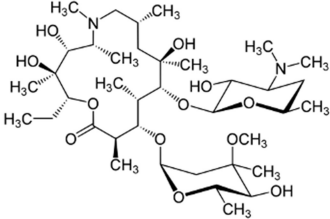
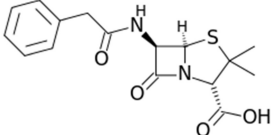
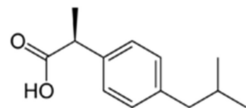
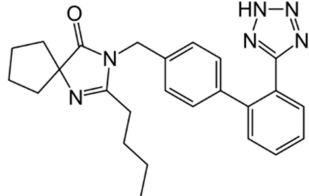
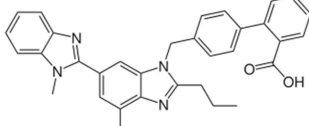
| Nombre Num CAS | Fórmula Estructura | M (g mol ⁻¹) | Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) | K _{ow} |
|-------------------------------------|--|-----------------------------|---|-----------------|
| Azitromicina 83905-01-5 | $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$  | 749 | 2,37 | 4,02 |
| Bencilpenicilina 61-33-6 | $C_{16}H_{18}N_2O_4S$  | 334,4 | 210 | 1,83 |
| Ibuprofeno 15687-27-1 | $C_{13}H_{18}O_2$  | 206,3 | 21 | 3,97 |
| Irbesartán 138402-11-6 | $C_{25}H_{28}N_6O$  | 428,5 | $5,9 \times 10^{-2}$ | 5,31 |
| Telmisartán $C_{33}H_{30}N_4O_2$ | $C_{33}H_{30}N_4O_2$  | 514,6 | $2,8 \times 10^{-6}$ | 8,42 |

Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los 50 compuestos analizados (continuación).

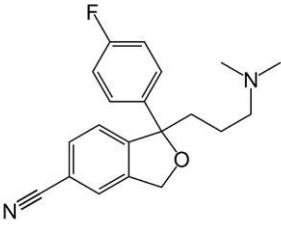
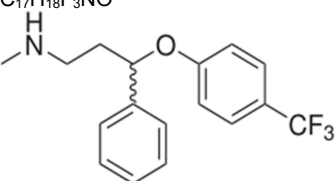
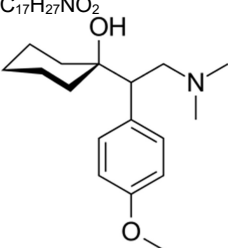
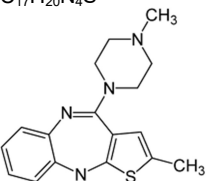
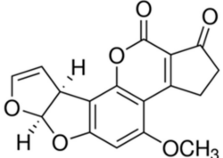
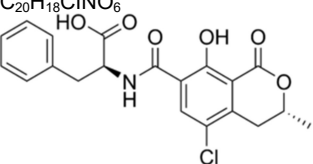
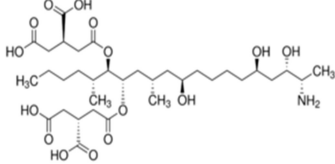
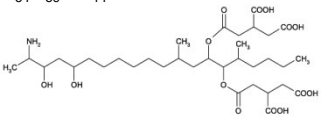
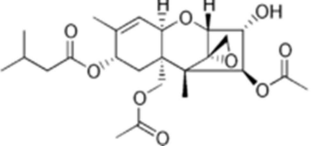
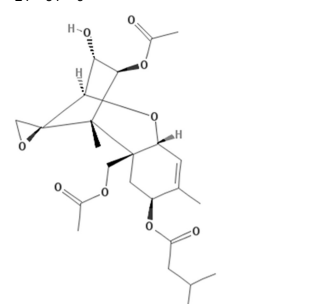
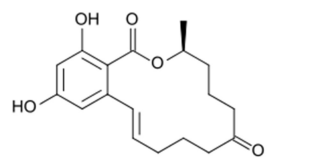
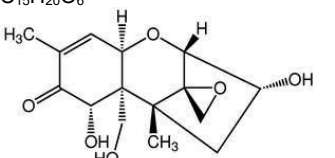
| Nombre Num CAS | Fórmula Estructura | M (g mol ⁻¹) | Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) | K _{ow} |
|----------------------------|---|-----------------------------|---|-----------------|
| Citalopram 59729-33-8 | <chem>C20H21FN2O</chem>  | 324,4 | 5,88 | 3,50 |
| Fluoxetina 54910-89-3 | <chem>C17H18F3NO</chem>  | 309,3 | 50 x 10 ³ | 4,05 |
| Venlafaxina 93413-69-5 | <chem>C17H27NO2</chem>  | 277,4 | 267 | 3,20 |
| Olanzapina 132539-06-1 | <chem>C17H20N4S</chem>  | 312,4 | 39,88 | 2,00 |
| Aflatoxina B1 1402-68-2 | <chem>C17H12O6</chem>  | 312,3 | 16,14 | 1,23 |
| Ocratoxina A 303-47-9 | <chem>C20H18ClNO6</chem>  | 403,8 | 0,42 | 4,74 |

Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los 50 compuestos analizados (continuación).

| Nombre Num CAS | Fórmula Estructura | M (g mol ⁻¹) | Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) | K _{ow} |
|------------------------------|--|-----------------------------|---|-----------------|
| Fumonisina B1 116355-83-0 | <chem>C34H59NO15</chem>  | 721,8 | 25 x 10 ³ | 1,84 |
| Fumonisina B2 116355-84-1 | <chem>C34H59NO14</chem>  | 705,8 | 25 x 10 ³ | nd |
| Toxina HT-2 21259-20-1 | <chem>C22H32O8</chem>  | 424,5 | Nd | 0,40 |
| Toxina T2 21259-20-1 | <chem>C24H34O9</chem>  | 466,5 | 95,9 | 0,90 |
| Zearalenona 17924-92-4 | <chem>C18H22O5</chem>  | 318,4 | 100 | 3,60 |
| Deoxivalenol 51481-10-8 | <chem>C15H20O6</chem>  | 296,3 | 5,5 x 10 ⁴ | -0,70 |

M: peso molecular; K_{ow}: coeficiente de reparto octanol-agua; nd: no disponible.

Fuente: PubChem, 2016.

Los medicamentos que fueron añadidos artificialmente a las mezclas iniciales fueron adquiridos en oficinas de farmacia (Tabla 3.2).

Tabla 3.2

Descripción de las formulaciones comerciales de cada fármaco añadido artificialmente a las mezclas iniciales.

| Medicamentos | Formato | Cantidad | mg PA | Laboratorio |
|------------------|-------------|-----------|------------------------|-----------------|
| Azitromicina | Polvo | 3 sobres | 500 | Cinfa S.A. |
| Olanzapina | Comprimidos | 56 | 10 | Cinfa S.A. |
| Bencilpenicilina | Agua/polvo | 4 mL/0,6g | 12 x 10 ⁵ U | Reig Jofré S.A. |
| Ibuprofeno | Polvo | 200 mL | 100 mg/100 mL | Cinfa S.A. |
| Irbesartán | Comprimidos | 28 | 300 | Cinfa S.A. |
| Telmisartán | Comprimidos | 28 | 80 | Bayer |
| Fluoxetina | Comprimidos | 60 | 20 | Cinfa S.A. |
| Venlafaxina | Comprimidos | 60 | 37,5 | Almirall |
| Citalopram | Comprimidos | 28 | 30 | Cinfa S.A. |

PA: principio activo.

3.2. Determinación de fármacos y micotoxinas en muestras ambientales y estudio de su distribución en estaciones depuradoras de aguas residuales

En la primera etapa de este trabajo se investigó la presencia, ausencia y distribución de 50 compuestos orgánicos en muestras ambientales con matrices diferentes, todas ellas originarias de un área agrícola de Valencia, influenciada por una intensa actividad urbana e industrial. Al detectar estos compuestos en lodos de depuradora y en aguas tratadas, tal y como también observaron numerosos autores (Tabla 1.1), se propuso el estudio de su distribución en diferentes EDARs, así como el efecto de estas sobre la presencia o ausencia de los compuestos.

3.2.1. Toma de muestras ambientales

Para llevar a cabo este estudio, se muestrearon 7 lodos de depuradora, 13 suelos, 8 residuos hortícolas, 15 compost y 8 aguas. Todas las muestras procedían de un área de influencia de las EDARs de la ciudad de Valencia y de los principales municipios de los alrededores (Paterna, Pinedo, Pobla de Farnals, Carraixet, Quart de Poblet, Picanya, Sueca y Guadassuar). En el caso de las muestras sólidas, se recogieron unos 3 kg y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior análisis. Aproximadamente se muestrearon 2 L de las aguas, las cuales se mantuvieron refrigeradas a 4 °C hasta su recepción en el laboratorio dónde fueron rápidamente analizadas. El muestreo se realizó durante la primavera y el verano del año 2012 (Figura 3.1).

3.2.2. Muestreo en las estaciones depuradoras de aguas residuales

Se realizaron dos campañas durante el año 2015, de manera que la EDAR de Quart-Benàger y la de Pinedo I se muestrearon en invierno, mientras que la EDAR de Paterna-Fuente del Jarro y la de Alcoi en verano e invierno. En la Tabla 3.3 se puede observar como la principal diferencia entre ellas hace referencia a que la EDAR de Alcoi es la única que no dispone de tratamiento terciario ni de desinfección. Se muestrearon las aguas de entrada urbanas e industriales, (algunas de ellas contenían sólidos en suspensión), las aguas de salida ya tratadas y el lodo deshidratado procedente del tratamiento primario y secundario de la planta. Para el caso de las muestras de agua, se llenaron aproximadamente botellas de 1 L, mientras que las muestras de lodo se transportaron en envases de plástico (Figura 3.2).



Figura 3.1. Fotografías de la zona de muestreo de cuatro muestras de suelos y dos muestras de aguas.

Material y métodos

Tabla 3.3

Principales características y técnicas de tratamiento de las EDARs de estudio.

| Características | EDARs | | | |
|--|--------------------------|---|--------------------------------|---------------|
| | Paterna-Fuente del Jarro | Quart-Benàger | Alcoi | Pinedo I |
| Municipios servidos | San Antonio de Benagéber | Alaquàs Mislata Aldaia Quart de Poblet Manises Xirivella | Alcoi Cocentaina | València |
| Caudal (m ³ día ⁻¹) | 10149 | 30136 | 14302 | 96142 |
| Línea de agua | | | | |
| Pretratamiento | Reja gruesos | Reja gruesos | Reja gruesos | Reja gruesos |
| | Reja finos | Reja finos | Reja finos | Reja finos |
| | Tamizado | Tamizado | Tamizado | Tamizado |
| | Homog. | Homog. | Homog. | |
| | Desarenador | Desarenador | Desarenador | Desarenador |
| | Deseng. | Deseng. | Deseng. | Deseng. |
| Tratamiento primario | F-Q | F-Q | F-Q | F-Q |
| | Decantación | Decantación | Decantación | Decantación |
| Tratamiento secundario | F. activados | F. activados | F. activados | F. activados |
| | Eliminación N | Eliminación N Eliminación P | Eliminación N Eliminación P | |
| Tratamiento terciario | Coag-Floc | Coag-Floc | | Coag-Floc |
| | Filtración | Filtración | | Filtración |
| Desinfección | Ultravioletas | Ultravioletas | | Ultravioletas |
| Línea de fangos | | | | |
| Espesador | Mecánico | Gravedad | Gravedad | Gravedad |
| | | Flotación | Flotación | Flotación |
| Estabilización | Anaerobia Cal | Anaerobia | Anaerobia | Anaerobia |
| | | | | |
| Deshidratación | Centrífuga | Centrífuga | Centrífuga | Centrífuga |

Homog.: homogeneización; Deseng.: desengrasador; F-Q: físico-químico; F.: fangos; N: nitrógeno; P: fósforo; Coag-Floc: coagulación-floculación.

Fuente: EPSAR, 2015 (Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales de la Comunidad Valenciana).



Figura 3.2. Fotografías del muestreo del agua urbana, industrial y del lodo deshidratado en las EDARs.

3.2.3. Optimización del método analítico para la determinación de fármacos y micotoxinas

El método de análisis corresponde al que clásicamente se utiliza para la determinación de micotoxinas en vegetales. En este trabajo, el método se ha optimizado con la finalidad de determinar de forma conjunta los 50 compuestos en las diferentes matrices tal y como se describe a continuación.

3.2.3.1. Tratamiento de las muestras y cromatografía líquida

Para las muestras sólidas, se pesaron aproximadamente 5 g de cada una de ellas en tubos de centrifuga de 50 mL. Para realizar el procedimiento de extracción, se añadieron 20 mL de una solución extractante agua/acetonitrilo 25/75 con 1% de ácido fórmico (v/v). Todo ello se agitó durante 60 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min.

Para el caso de las muestras líquidas, se tomaron 250 mL de cada muestra de agua y se introdujeron en un embudo de decantación. El procedimiento de extracción se llevó a cabo mediante la adición de 70 mL de diclorometano, tras agitación y separación de las dos fases formadas. Los extractos se evaporaron hasta sequedad con un rotavapor y se redisolviaron con 2 mL de acetonitrilo. En aquellos casos en que las muestras de aguas contenían sólidos en suspensión, estas se filtraron previamente al vacío y se aplicó el mismo procedimiento descrito para muestras sólidas. Todos los extractos se filtraron usando filtros de nylon de 0,22 μm para el sistema HPLC/MS/MS.

La cromatografía líquida se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo HPLC HP1200 (Agilent Technologies) equipado con un desgasificador, una bomba binaria y un muestreador automático. La separación cromatográfica se realizó con una columna Atlantis T3-C18 (3 μm , 150 x 2,1 mm I.D, Waters, Milford, MA, Estados Unidos) con un flujo de 0,3 mL min^{-1} . Para la fase móvil se empleó un gradiente programado (0, 1, 1,1, 14, 15, 15,2, 21 min), combinando un solvente A (5 mmol L^{-1} formiato amónico con un 0,1% (v/v) ácido fórmico) (95, 95, 70, 5, 5, 95, 95) y un solvente B (metanol) (5, 5, 30, 95, 95, 5, 5). El volumen de inyección fue de 5 μL y 10 μL , manteniendo a 40 °C la temperatura de la muestra y a 5 °C la temperatura de la columna.

3.2.3.2. Espectrometría de masas

El análisis de la espectrometría de masas se realizó con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (3200 Qtrap, AB SCIEX) equipado con una fuente de iones electrospray. El nitrógeno se empleó como gas nebulizador. Los productos fueron identificados por sus tiempos de retención y por dos o más transiciones. La temperatura de interfase se programó a 400 °C y la temperatura de la fuente de iones a 120 °C. Los datos y la integración de los picos se obtuvieron con el software Analyst 1.4 (AB SCIEX).

Las condiciones del MS/MS para los productos fueron obtenidas a partir de la inyección directa de 1 mg L⁻¹ de agua/acetonitrilo (98:2 v/v) de las soluciones estándar individuales con un flujo de 10 µL min⁻¹. Se utilizaron dos transiciones MRM para garantizar la identificación del compuesto; en algunos casos se tuvo que utilizar tres transiciones MRM. Se realizaron curvas de calibración con la finalidad de controlar un posible efecto matriz que pudiese influir en la exactitud. Se elaboró un blanco fortificado añadiéndole diferentes alícuotas de una mezcla de las soluciones estándar a concentraciones de 1 a 500 µg L⁻¹. En la Tabla 3.4 se resumen los parámetros del HPLC/MS/MS y los tiempos de retención para cada uno de los compuestos analizados. La concentración de los compuestos detectados en las muestras sólidas se expresó en µg kg⁻¹ de masa seca (ms).

Tabla 3.4
Condiciones de optimización del HPLC/MS/MS.

| Compuestos | Tiempo (min) | Ion precursor | PD | m/z | EC |
|----------------------|--------------|---------------|-----|-------|-----|
| Azoxistrobina | 14,8 | 404,1 | 61 | 372,3 | 19 |
| | | | | 344,2 | 31 |
| Boscalid | 15,2 | 343 | 81 | 307,1 | 31 |
| | | | | 140,1 | 29 |
| Bromuconazol | 16,1 | 378 | 61 | 159,0 | 19 |
| | | | | 69,9 | 31 |
| Carbendazima | 7,6 | 192,1 | 66 | 160,2 | 37 |
| | | | | 105,2 | 35 |
| Cimoxanilo | 10,3 | 199,1 | 31 | 128,2 | 13 |
| | | | | 111,2 | 21 |
| Ciproconazol | 15,7 | 292,1 | 56 | 69,8 | 29 |
| | | | | 125,0 | 49 |
| Difenoconazol | 17,3 | 406,1 | 61 | 251,1 | 39 |
| | | | | 75,0 | 115 |
| Dimetomorf | 15,2 | 388,2 | 76 | 301,1 | 29 |
| | | | | 165,2 | 41 |
| Dimoxistrobina | 16,5 | 327,1 | 46 | 205,2 | 17 |
| | | | | 116,1 | 45 |
| Fenamidona | 15,0 | 312,1 | 36 | 92,3 | 31 |
| | | | | 236,3 | 21 |
| Fenbuconazol | 16,2 | 337,1 | 66 | 125,1 | 43 |
| | | | | 70,1 | 33 |
| Fenhexamida | 16,0 | 302,1 | 66 | 97,2 | 33 |
| | | | | 55,2 | 57 |
| Fenpropidina | 12,5 | 274,3 | 61 | 117,0 | 71 |
| | | | | 147,3 | 37 |
| Fenpropimorf | 13,0 | 304,0 | 61 | 117,0 | 75 |
| | | | | 147,1 | 43 |
| Fluopicolida | 15,4 | 383,1 | 66 | 173,0 | 33 |
| | | | | 109,0 | 97 |
| Hexaconazol | 17,0 | 313,9 | 51 | 70,0 | 43 |
| | | | | 159,1 | 37 |
| Metconazol | 17,1 | 320,1 | 61 | 70,1 | 43 |
| | | | | 125,2 | 53 |
| Miclobutanil | 15,6 | 289,1 | 49 | 70,1 | 33 |
| | | | | 125,1 | 41 |
| Penconazol | 16,6 | 284,0 | 36 | 159,2 | 41 |
| | | | | 70,1 | 27 |
| Picoxistrobina | 16,3 | 367,9 | 21 | 145,0 | 29 |
| | | | | 205,0 | 17 |
| Piraclostrobina | 16,9 | 387,9 | 161 | 194,0 | 19 |
| | | | | 163,0 | 33 |
| Pirimetanil | 14,2 | 200,2 | 71 | 107,2 | 35 |
| | | | | 183,1 | 33 |
| Propamocarb | 6,6 | 189,2 | 41 | 102,2 | 29 |
| | | | | 144,1 | 17 |
| Propiconazol | 16,8 | 342,0 | 61 | 159,0 | 43 |
| | | | | 69,0 | 35 |
| Protioconazol-destio | 16,2 | 312,2 | 76 | 70,0 | 61 |
| | | | | 124,9 | 49 |
| Quinoxifen | 18,5 | 308,0 | 81 | 197,0 | 41 |
| | | | | 214,2 | 47 |
| Tebuconazol | 16,7 | 308,1 | 46 | 70,2 | 57 |
| | | | | 70,2 | 61 |
| Tetraconazol | 15,9 | 371,9 | 61 | 159,0 | 49 |
| | | | | 70,0 | 51 |
| Tiofanato-metilo | 12,2 | 342,9 | 36 | 151,1 | 25 |
| | | | | 93,1 | 67 |

Tabla 3.4. Condiciones de optimización del HPLC/MS/MS (continuación).

| Compuestos | Tiempo (min) | Ion precursor | PD | m/z | EC |
|------------------|--------------|---------------|-----|-------|-----|
| Triciclazol | 11,0 | 190,0 | 56 | 163,0 | 31 |
| | | | | 136,0 | 37 |
| Triticonazol | 16,0 | 318,1 | 61 | 70,0 | 23 |
| | | | | 125,5 | 55 |
| Trifloxistrobina | 17,4 | 408,9 | 36 | 186,0 | 27 |
| | | | | 145,0 | 57 |
| Triflumizol | 17,5 | 346,0 | 31 | 278,2 | 15 |
| | | | | 43,1 | 41 |
| Azitromicina | 9,2 | 749,5 | 76 | 591,4 | 37 |
| | | | | 158,3 | 51 |
| Irbesartán | 15,1 | 429,2 | 61 | 207,2 | 31 |
| | | | | 195,2 | 29 |
| Olanzapina | 6,8 | 313,1 | 56 | 256,2 | 29 |
| | | | | 198,2 | 55 |
| Bencilpenicilina | 13,1 | 332,9 | -15 | 191,9 | -14 |
| | | | | 73,9 | -40 |
| Fluoxetina | 12,4 | 310,1 | 26 | 148,1 | 13 |
| | | | | 44,1 | 27 |
| Ibuprofeno | 16,3 | 205,0 | -25 | 161,0 | -14 |
| | | | | 158,9 | -10 |
| Telmisartán | 14,3 | 515,2 | 86 | 276,4 | 65 |
| | | | | 497,1 | 43 |
| Venlafaxina | 9,8 | 278,2 | 41 | 121,3 | 37 |
| | | | | 147,1 | 31 |
| Citalopram | 10,4 | 325,3 | 46 | 147,1 | 31 |
| | | | | 262,3 | 23 |
| Aflatoxina B1 | 12,3 | 313,0 | 50 | 234,1 | 39 |
| | | | | 247,0 | 41 |
| Ocratoxina A | 16,0 | 404,0 | 15 | 241,4 | 51 |
| | | | | 285,3 | 31 |
| Fumonisina B1 | 13,2 | 722,5 | 25 | 239,1 | 20 |
| | | | | 358,1 | 8 |
| Fumonisina B2 | 14,7 | 706,4 | 60 | 352,3 | 28 |
| | | | | 334,4 | 28 |
| Toxina HT-2 | 13,9 | 441,9 | 10 | 336,3 | 50 |
| | | | | 318,0 | 50 |
| Toxina T-2 | 14,9 | 484,3 | 12 | 263,2 | 12 |
| | | | | 215,3 | 12 |
| Zearalenona | 15,7 | 319,2 | 30 | 305,2 | 10 |
| | | | | 245,2 | 10 |
| Deoxinivalenol | 8,0 | 297,0 | 15 | 187,1 | 27 |
| | | | | 185,4 | 23 |
| | | | | 203,3 | 8 |
| | | | | 249,5 | 8 |

PD: potencial de desfragmentación; m/z: relación masa/carga de ion; EC: energía de colisión.

3.2.3.3. Validación del método para la determinación de fármacos y micotoxinas

La linealidad del método se estudió analizando las soluciones estándar a cinco concentraciones de 1 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Al aplicar la regresión por mínimos cuadrados, se asumió que la linealidad era satisfactoria cuando el coeficiente de correlación (r^2) fue mayor de 0,99 y el error residual menor del 30%. Se estudiaron la exactitud (expresada como el porcentaje de recuperación) y la precisión (expresada en términos de desviación estándar relativa, DER) a partir de las medias de los experimentos de recuperación.

3.3. Ensayos de compostaje a escala de laboratorio

Para llevar a cabo los diferentes ensayos de compostaje, se realizaron ocho muestreos de lodo de depuradora a lo largo del periodo experimental (resultados Tabla 4.3), todos ellos procedentes de la EDAR de Paterna-Fuente del Jarro debido a su proximidad geográfica. En cada muestreo se cogió aproximadamente 1 kg de lodo de depuradora deshidratado y digerido y se almacenó a 4 °C en cámara hasta su uso. La paja de arroz fue la misma para todos los experimentos, se recogió de los arrozales del Parque Natural de l'Albufera (cosecha 2011) y fue secada a temperatura ambiente y almacenada en bolsas de plástico en un lugar seco. Posteriormente, esta se trituró con una trituradora de residuos vegetales y se cortó manualmente en trozos de 5 cm de tamaño para facilitar el mezclado con el lodo de depuradora, tal y como indicaron anteriormente Roca-Pérez y col. (2009).

Previamente a la realización de los ensayos de compostaje y siguiendo las directrices de Iranzo y col. (2004) y Roca-Pérez y col. (2009),

se llevó a cabo un estudio de las características fisicoquímicas que presentaban los residuos de la paja del arroz y los lodos de depuradora con la finalidad de averiguar si eran compatibles para su compostaje.

El primer ensayo se llevó a cabo para investigar el efecto del proceso de compostaje sobre los compuestos que estaban presentes inicialmente en los residuos. Debido a su importancia, a partir de esta fase, el trabajo se centró en el estudio del grupo de los medicamentos de uso humano durante el proceso de compostaje. Así, se realizaron ensayos de compostaje a diferentes relaciones C/N con los nueve fármacos añadidos artificialmente en conjunto a concentraciones elevadas (Tabla 3.2). Para ello se elaboraron cinco mezclas, de forma que M1 tenía una relación C/N de 37, M2 de 29, M3 de 24, M4 de 20 y M5 de 17. Con estos experimentos se pudo obtener la relación C/N más óptima para la eliminación de los fármacos y así continuar con los siguientes ensayos de compostaje con esta misma proporción de residuos. Seguidamente, se estudió por separado en cuatro ensayos de compostaje, la evolución de la concentración del antibiótico azitromicina; el antiinflamatorio ibuprofeno; los antihipertensivos irbesartán y telmisartán; y los antidepresivos fluoxetina, venlafaxina y citalopram. Se añadieron entre 1000 y 1500 mg kg⁻¹ de cada uno de ellos. Se prepararon dos controles, es decir, mezclas elaboradas en las mismas condiciones pero sin adicionar medicamentos. Además, se volvieron a adicionar entre 500 y 1300 mg kg⁻¹ de azitromicina e irbesartán durante la última fase del proceso de compostaje (a los 23 y 36 días).

Por otra parte, se llevaron a cabo experimentos de bioaumentación de la mezcla inicial a compostar mediante la inoculación de *Paenibacillus barcinonensis*, un microorganismo aislado de arrozales del Delta del Ebro y microorganismos modificados genéticamente procedentes de *Saccharomyces cerevisiae*. Se prepararon controles sin inocular microorganismos. Además, se realizaron otros tres ensayos de bioaumentación con la inoculación de los microorganismos aislados de los

ensayos de compostaje con medicamentos anteriores y capaces de degradar azitromicina e ibuprofeno. Para llevar a cabo estos tres últimos ensayos, se prepararon dos mezclas para cada ensayo. La primera de ellas se le añadió el fármaco a concentraciones elevadas (experimento control), mientras que la segunda además del fármaco, se le adicionó el inóculo. Los detalles en relación a la procedencia, aislamiento e inoculación de los microorganismos se detallan en los apartados 3.7, 4.7 y 4.8.

Se utilizó la hoja de cálculo teórico de proporciones de residuos desarrollada por Tom Richard (CWMI, 1996), del departamento de Ingeniería Agrícola y Biológica de la Universidad de Cornell para conocer la cantidad de residuos a utilizar en cada ensayo de compostaje según la relación C/N deseada. Así, introduciendo los porcentajes de humedad, carbono y nitrógeno de los residuos que se desean compostar, así como los kg a utilizar, este software proporciona la humedad y la relación C/N que tendrá la mezcla inicial.

Las mezclas iniciales objeto de compostaje se elaboraron en recipientes grandes introduciendo en ellos en primer lugar la paja de arroz. Seguidamente, con ayuda de un pulverizador, se humectó la paja para evitar la dispersión del polvo y facilitar el mezclado con el lodo de depuradora, el cual se fue añadiendo poco a poco y mezclándolo manualmente con la paja (Figura 3.3). Se tardó unas 2-4 horas hasta conseguir una buena homogeneización de las mezclas.

En el caso de tener que adicionar fármacos, estos se disolvieron previamente en agua y se agitaron durante media hora (Figura 3.4). Esta suspensión se pasó a un pulverizador y se fue añadiendo a la mezcla de residuos, rociando el contenido en primer lugar sobre la paja de arroz y seguidamente sobre el lodo y al mismo tiempo mezclándolos.

Los ensayos de compostaje se llevaron a cabo por duplicado y a escala de laboratorio en vasos Dewar de 3, 4 y 8 L de capacidad. En todos

los casos, los vasos Dewar se llenaron por completo con las mezclas, incorporando a cada uno de ellos dos sondas situadas a 25 cm y 50 cm de la base (8 L) y a 10 y 20 cm (3 y 4 L) para el seguimiento de la temperatura (Figura 3.5). A lo largo de cada ensayo, se realizaron sucesivos volteos con la finalidad de asegurar una buena aireación y homogeneización de las mezclas. Además, se muestreó a diferentes tiempos para el seguimiento de los parámetros fisicoquímicos, biológicos, la medida de la concentración de los fármacos y para la realización de los análisis microbiológicos.



Figura 3.3. Muestra fotográfica del proceso de elaboración de la mezcla inicial para su compostaje.



Figura 3.4. Preparación de la suspensión de fármacos para adicionarla con ayuda de un pulverizador a la mezcla inicial a compostar.



Figura 3.5. Vasos Dewar de 8 L con dos sondas de temperatura y la mezcla inicial para la realización del compostaje a escala de laboratorio.

3.4. Ensayos de degradación de fármacos en diferentes condiciones

Los fármacos estudiados se incubaron a 28 °C y 55 °C utilizando diferentes mezclas: i) agua; ii) una suspensión de lodo acuosa; iii) paja de arroz y, iv) mezcla de paja de arroz y lodo de depuradora, tal y como se indica a continuación, con el fin de determinar la degradación de los mismos en diferentes condiciones. La incubación se realizó en oscuridad a las temperaturas indicadas anteriormente, utilizando recipientes de vidrio de 2 L que contenían paja de arroz (0,3 kg de paja de arroz y 0,7 kg agua) y mezcla de paja de arroz y lodo de depuradora con una relación C/N de entre 20 y 30. Los recipientes se llenaron por la mitad y su tapa incluía una abertura para permitir la oxigenación de los materiales (Figura 3.6). El contenido se homogeneizó manualmente en cada uno de los muestreos y se humectó en caso necesario para mantener una humedad de aproximadamente 65% a lo largo de los experimentos.

Por otra parte, se prepararon erlenmeyers de 500 mL con 300 mL de agua destilada y otros con 69 g de lodo de depuradora y 231 mL de agua y se incubaron en una cabina de agitación (140 rpm) Sartorius

CERTOMAT BS-T UH-25 (Madrid, España), manteniendo una buena oxigenación (Figura 3.7). En estos experimentos se adicionaron entre 400 y 1800 mg kg⁻¹ ms de los fármacos, a excepción de los erlenmeyers con agua, cuya concentración fue de 400 a 1800 mg L⁻¹. A lo largo de todos los experimentos de incubación se realizaron muestreos a diferentes tiempos (0, 4, 7, 10 y 14 días) después de los volteos para determinar la humedad y la concentración de los fármacos. Además, se analizaron los parámetros fisicoquímicos más relevantes para el caso de los experimentos con antihipertensivos y antidepresivos. En el caso de los experimentos con la suspensión de lodo acuosa, el extracto se diluyó diez veces con la solución extractante agua/acetonitrilo 25/75 con 1% de ácido fórmico (v/v), se agitó durante 30 min y se filtró por 0,22 µm. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.



Figura 3.6. Ensayos de degradación de fármacos con paja de arroz y mezclada con lodo de depuradora, incubados a 28 °C y 55 °C.



Figura 3.7. Ensayos de degradación de fármacos con agua y una suspensión de lodo acuosa, incubados a 28 °C y 55 °C.

3.5. Adición de compost a un suelo agrícola contaminado con fármacos

El suelo objeto de estudio se muestreó del horizonte Ap de unos 0-30 cm de espesor de un xerofluent procedente de una parcela dedicada al cultivo de lechuga y maíz situada en el término municipal de Picanya (València). Tras su llegada al laboratorio, se le realizó una caracterización fisicoquímica.

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y en recipientes de plástico envueltos para que se mantuvieran en oscuridad, los cuales contenían 300 g de suelo, los fármacos y diferentes dosis de los compost. Los fármacos se añadieron por separado en tres experimentos diferentes como se indica a continuación: azitromicina; irbesartán y telmisartán; fluoxetina, venlafaxina y citalopram. La elaboración de la mezcla de suelo, compost y medicamentos se realizó manualmente, rociando la suspensión de los fármacos sobre el suelo y mezclándolos a su vez con el compost que fue añadiéndose en pequeñas cantidades (Figura 3.8). La humedad se mantuvo entre el 18% y el 26%, correspondiente al $70\% \pm 4\%$ de la capacidad de retención de agua del suelo. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente, controlándola diariamente y esta se mantuvo entre

23 °C y 28 °C. A lo largo de los experimentos se realizaron muestreos a los 0, 4, 7, 14 y 21 días para el seguimiento de los parámetros fisicoquímicos y biológicos, así como la concentración de los fármacos.

El primer experimento que se realizó fue con los antihipertensivos y a dosis de 1%, 2% y 4% de los compost, siendo la dosis agronómica entre el 2% y 4%. Los siguientes experimentos con el resto de fármacos se llevaron a cabo aumentando la diferencia entre las dosis de compost (2% y 20%).

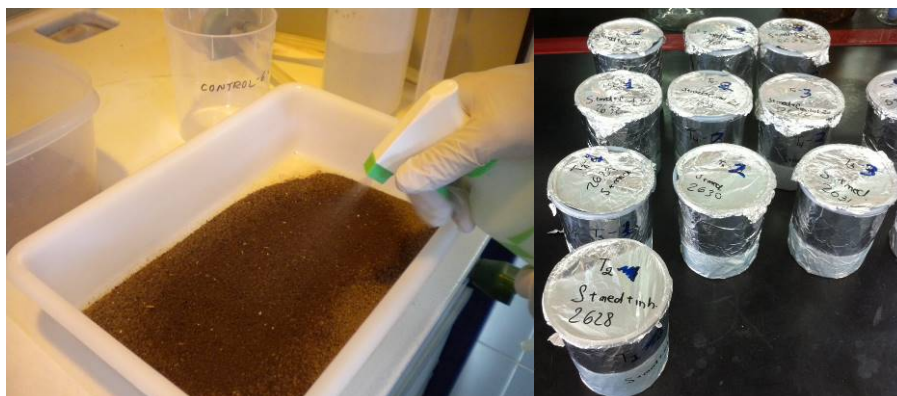


Figura 3.8. Elaboración de la mezcla con suelo, fármacos y compost (izquierda) e inicio de los experimentos en los recipientes (derecha).

3.6. Determinaciones analíticas

3.6.1. Residuos y compost

Parte de las muestras de los residuos y los diferentes compost se secaron al aire y se pulverizaron (< 0,2 mm) para el análisis del pH, la conductividad eléctrica, la materia orgánica total, el carbono orgánico oxidable, el nitrógeno total, el índice de humificación, la relación ácidos

húmicos/ácidos fúlvicos, el carbono soluble y el contenido en nutrientes y metales pesados.

La **humedad** de las muestras se determinó mediante secado en estufa a 105 °C durante 48 h. El **pH** y la **conductividad eléctrica** se analizaron mediante agitación durante 30 min de una solución muestra/agua destilada de 1:5 (p/v) y la **materia orgánica total** mediante la pérdida de peso por calcinación a 550 °C durante 12 h. El **carbono orgánico oxidable** se determinó por el método descrito por Walkley y Black (1934), mientras que el **nitrógeno total** se midió con un analizador elemental CE instruments EA 1110 CNHS. La **relación C/N** se calculó con la siguiente fórmula:

Relación C/N = carbono orgánico oxidable / nitrógeno total

Para la obtención del **índice de humificación y la relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos** se siguió el método Fukushima y col. (2009) modificado. Para ello, 1 g de muestra seca fue extraída con 20 mL de una solución acuosa alcalina (0,1 M NaOH + 0,1 M Na₄P₂O₇). Después de 24 h de agitación, la mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min, y el sobrenadante se filtró con un papel de filtro de nylon con tamaño de poro de 20-25 µm, obteniendo así el extracto húmico total C_{orgO}-1. Se tomó una alícuota de 1 mL y se determinó el carbono orgánico oxidable. Al resto del extracto C_{orgO}-1, se le añadieron algunas gotas de H₂SO₄ para que el valor de pH estuviera entre 1 y 2. Se agitó durante una noche y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min y se filtró el sobrenadante. De esta manera, se obtuvo el extracto C_{orgO}-2 (ácidos fúlvicos y sustancias no húmicas). Se tomó 1 mL del C_{orgO}-2 para la determinación del carbono orgánico oxidable. Se pipetearon 5 mL del resto del extracto C_{orgO}-2 y se pasaron a través de una columna DAX-8 mediante flujo gravitacional. El efluente obtenido

correspondía a las sustancias no húmicas (N-SH), de las cuales se determinó el carbono orgánico oxidable (C_{orgO-3}).

El porcentaje de carbono orgánico oxidable correspondiente a cada una de las fracciones: sustancias húmicas (SH-C), ácidos húmicos (AH-C) y ácidos fúlvicos (AF-C) fue calculado como se indica en las siguientes ecuaciones:

$$SH-C = (C_{orgO-1}) - (C_{orgO-3})$$

$$AH-C = (C_{orgO-1}) - (C_{orgO-2})$$

$$AF-C = (C_{orgO-2}) - (C_{orgO-3})$$

El índice de humificación y la relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos se calcularon a partir de los valores de carbono orgánico oxidable de los distintos extractos húmicos determinados:

$$\text{Índice de humificación} = SH-C / C_{orgO-3}$$

$$\text{Relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos} = AH-C / AF-C$$

Se realizó una digestión ácida (9 mL HNO_3 , 2 mL H_2O_2 y 1 mL HCl) con el microondas Mars CEM corp. Matthews (EPA, 1996) para posteriormente determinar por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) el **Ca, Mg, K, Na, Fe, Mn, Zn, Cu, Cr, Pb, Cd, Ni, Co** de los residuos.

Por lo que respecta a la determinación de la **concentración de los fármacos** durante los ensayos de compostaje, se utilizó el mismo método descrito en el apartado 3.2.3, pero modificando los parámetros del HPLC/MS/MS en el caso de la medida de los fármacos por separado. El

volumen de extractante agua/acetonitrilo para los casos de las muestras de compost fue de 40 mL.

En la mayoría de los casos la degradación de los contaminantes en el medio ambiente sigue una ecuación de primer orden como la que se describe a continuación (Ramaswamy y col., 2010):

$$C_m = C_0 e^{-kt}$$

donde en nuestro caso, C_m es la concentración del fármaco (mg kg^{-1}) al tiempo (t), días, C_0 es la concentración inicial del mismo (mg kg^{-1}) y k es la constante de eliminación de los fármacos (día^{-1}). A partir de este modelo, se calculó el periodo de semirreacción mediante la ecuación:

$$t_{1/2} = \ln(2) / k$$

La medida del **consumo de oxígeno** se llevó a cabo mediante la técnica de la respirometría. Se basa en la medida del consumo de oxígeno y posterior formación de CO_2 debido a la actividad de los microorganismos aeróbicos que van a encargarse de biodegradar los materiales orgánicos de las mezclas de residuos a compostar (Platen y Wirtz, 1999; Roca-Pérez y col., 2005). Se utilizaron sensores de medida OxiTop[®]-C (WTW, Weilheim, RFA) y respirómetros con volúmenes de 0,5 L a temperatura de 20 ± 1 °C. Como agente absorbente del CO_2 se introdujo un recipiente con NaOH.

Para la determinación de la **actividad deshidrogenasa** se pesaron 0,2 g de muestra fresca y se siguió el método de Vonmersi and Schinner (1991) modificado por Camiña y col. (1998). El **carbono soluble** se analizó mediante los métodos de Zhang y col. (2011) y Bastida y col. (2012) modificados. Para ello, la mezcla de compost y agua destilada (1:10 p/v) se agitó durante 2 h y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min y se filtró con papel de filtro libre de cenizas (Filter-Lab 1249). Se tomó

una alícuota y el carbono soluble se determinó por el método de Walkley-Black.

Para determinar las otras actividades enzimáticas se utilizaron las **tiras reactivas API ZYM** (BioMérieux, Lyon, Francia) siguiendo el método de Tiquia y col. (2001), Tiquia (2002) y Boluda y col. (2014).

3.6.2. Suelos

En este caso, la muestra fresca de suelo con su humedad de campo se reservó para la medida del consumo de oxígeno, el análisis de las actividades deshidrogenasa y ureasa y la realización de la extracción de los fármacos. Por otra parte, se llevó a cabo un pretratamiento del suelo en el laboratorio siguiendo la UNE-EN (2013), de manera que se trituró con un rodillo, se tamizó por 2 mm y se secó al aire a 40 °C durante 48 h. Así, se obtuvo la fracción tierra fina a partir de la cual se describió el color y se analizó la textura, la densidad aparente, el pH, la conductividad eléctrica, el carbono total, el carbono orgánico oxidable, el contenido en carbonatos, el carbono orgánico, la materia orgánica, el nitrógeno total, la capacidad de intercambio catiónico y el óxido de fósforo.

El **color** del suelo se obtuvo con ayuda de las tablas Munsell y la densidad aparente siguiendo la UNE-EN (2012). La **textura** se determinó según las directrices de la norma UNE (2001a). Para la medida del **pH** y la **conductividad eléctrica** se aplicaron las UNE-ISO (2012) y UNE (2001b), respectivamente. La **capacidad de intercambio catiónico** se determinó siguiendo la UNE-EN ISO (2011).

El contenido en **carbonatos** se determinó con el método del calcímetro de Bernard (UNE, 1993) y el **carbono total**, el **carbono orgánico** y el **nitrógeno total** se obtuvieron con un analizador elemental CE instruments EA 1110 CNHS, mientras que el **carbono orgánico oxidable** se determinó siguiendo el protocolo de Walkley y Black (1934). A

partir de este, se calculó la **materia orgánica** multiplicando el carbono orgánico oxidable por 1,298.

El **P total** se determinó mediante la utilización del test de fosfatos 1.14848.0001, previa digestión ácida del suelo (EPA, 1996). La determinación de la concentración de los fármacos se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.3.1 para muestras sólidas.

El **consumo de oxígeno** y la **actividad dehidrogenasa** se analizaron siguiendo la misma metodología descrita para residuos y compost, con la diferencia de que en este caso se pesaron 50 g y 1 g de suelo, respectivamente. Para la estimación de la **actividad ureasa** se siguió el método de Kandeler y Gerber (1988) modificado por Kandeler y col. (1999), pero utilizando en la última fase del análisis el test colorimétrico de amonio 1.14752.0001. El suelo se clasificó según la taxonomía de la FAO (WRB, 2015).

3.7. Análisis microbiológicos

3.7.1. Microorganismos utilizados

Los estudios realizados con levaduras se llevaron a cabo con *Saccharomyces cerevisiae* CEN-PK, que se usó como cepa salvaje y las cepas derivadas de *S. cerevisiae* BY4741, L3-BY4741 capaz de expresar la proteína de fusión Pir4-lipasa A de *Bacillus subtilis* y C3-BY4741 que expresa la proteína de fusión Pir4-celulasa A de *Paenibacillus barcinonensis*. En cuanto a bacterias, se utilizó *P. barcinonensis*.

Además, durante la realización de este trabajo se aislaron e identificaron diversas cepas, tanto bacterianas como fúngicas, con las que también se realizaron diferentes estudios, y que se describen en el apartado de Resultados.

3.7.2. Medios de cultivo utilizados

PCA: Agar recomendado para la determinación y recuento de microorganismos:

| | |
|----------------------------|----------------------|
| Peptona | 50 g L ⁻¹ |
| Glucosa | 10 g L ⁻¹ |
| Extracto de levadura | 25 g L ⁻¹ |
| Agar | 15 g L ⁻¹ |

YPD: medio rico empleado rutinariamente para el crecimiento de microorganismos que contiene:

| | |
|----------------------------|----------------------|
| Peptona | 20 g L ⁻¹ |
| Glucosa | 20 g L ⁻¹ |
| Extracto de levadura | 10 g L ⁻¹ |

Medio Sabouraud con cloranfenicol: medio utilizado para el aislamiento, y conservación de hongos. Este tipo de medio ha sido comúnmente utilizado para aislar hongos del compostaje (Marchand y col., 1995; Skowron y col., 2011):

| | |
|---------------------|------------------------|
| Peptona | 5 g L ⁻¹ |
| Triptefina | 5 g L ⁻¹ |
| Glucosa | 40 g L ⁻¹ |
| Cloranfenicol | 0,05 g L ⁻¹ |

SD: medio mínimo sintético que contiene todas las vitaminas y sales minerales necesarias para el crecimiento de levaduras:

| | |
|---------------------------|------------------------|
| Yeast Nitrogen Base | 1,67 g L ⁻¹ |
| Sulfato amónico | 5 g L ⁻¹ |
| Glucosa | 20 g L ⁻¹ |

Caldo nutritivo: medio de cultivo general utilizado para el aislamiento y recuento de bacterias:

| | |
|-------------------------|---------------------|
| Peptona | 5 g L ⁻¹ |
| Cloruro de sodio | 3 g L ⁻¹ |
| Extracto de carne | 8 g L ⁻¹ |

Con el fin de poder aislar y seleccionar diferentes tipos de microorganismos a partir de las muestras de compost y de paja de arroz se utilizaron, además de YPD, descrito anteriormente, otros medios de cultivo:

Medio completo:

| | |
|--|-----------------------|
| Glucosa | 5 g L ⁻¹ |
| Fosfato amónico monobásico | 1 g L ⁻¹ |
| Cloruro sódico | 5 g L ⁻¹ |
| Sulfato magnésico heptahidratado | 0,2 g L ⁻¹ |
| Fosfato potásico dibásico | 1 g L ⁻¹ |

Medio Mínimo (MM):

| | |
|--|-----------------------|
| Cloruro sódico | 5 g L ⁻¹ |
| Sulfato magnésico heptahidratado | 0,2 g L ⁻¹ |
| Fosfato potásico dibásico | 1 g L ⁻¹ |

Medio Mínimo con fuente de carbono (MMC):

| | |
|--|-----------------------|
| Glucosa | 5 g L ⁻¹ |
| Cloruro sódico | 5 g L ⁻¹ |
| Sulfato magnésico heptahidratado | 0,2 g L ⁻¹ |
| Fosfato potásico dibásico | 1 g L ⁻¹ |

Medio Mínimo con fuente de nitrógeno (MMN):

| | |
|--|-----------------------|
| Fosfato amónico monobásico | 1 g L ⁻¹ |
| Cloruro sódico | 5 g L ⁻¹ |
| Sulfato magnésico heptahidratado | 0,2 g L ⁻¹ |
| Fosfato potásico dibásico | 1 g L ⁻¹ |

Los medios fueron adicionados de 2% de agar cuando se necesitaban sólidos. Todos los medios de cultivo se prepararon con agua destilada y se esterizaron en autoclave a 121 °C durante 15 min.

3.7.3. Determinación de microorganismos totales

La determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó resuspendiendo 2,5 g de cada una de las muestras de compost en 25 mL de agua estéril. Se realizaron diluciones seriadas de cada una de ellas, sembrándose posteriormente mediante la técnica de vertido en placa utilizando PCA, y se incubaron a 28 °C durante 48 h. Posteriormente se contaron las colonias de las placas que contenían entre 30 y 300.

3.7.4. Aislamiento de hongos procedentes de la paja del arroz

Para el aislamiento de microorganismos capaces de degradar la paja de arroz a partir de las diferentes muestras de compostaje obtenidas, 2,5 g de muestra se resuspendieron en 25 mL de agua estéril, y mediante agitación se realizó una extracción de los microorganismos que contenía. Los microorganismos se cultivaron en medio YPD líquido, con el fin de asegurar la recuperación de todas las especies microbianas. Posteriormente, estos microorganismos, se sembraron utilizando como medio de cultivo agar Sabouraud con cloranfenicol, con el fin de aislar sólo las especies fúngicas. Posteriormente, y mediante pases sucesivos utilizando el método de los tres giros, se obtuvieron cultivos puros de cada uno de los hongos.

A partir de estos cultivos puros, con el fin de determinar la capacidad de cada uno de estos microorganismos de degradar la paja de arroz, se dispusieron alícuotas de 0,5 g de paja en matraces de 25 mL y se esterilizaron. Posteriormente, estos matraces se adicionaron de un cultivo líquido (1 mL) de cada uno de los hongos aislados y de sulfato amónico (5 g L^{-1}), con el fin de tener una fuente de nitrógeno, y se llevaron a un

volumen total de 25 mL con agua estéril. Los matraces se mantuvieron en agitación constante a 28 °C durante 10 días, visualizándose cada 24 h el grado de degradación de la paja de arroz.

3.7.5. Aislamiento de microorganismos capaces de degradar diferentes fármacos

Con la finalidad de aislar microorganismos capaces de degradar diferentes medicamentos, 1 g de muestra se resuspendió en 20 mL de medio de cultivo completo y se extrajeron los microorganismos que contenía mediante agitación.

Para realizar el aislamiento de microorganismos capaces de degradar diferentes fármacos, alícuotas de 100 µL de la suspensión de microorganismos se inocularon a 3 mL de los diferentes medios de cultivo descritos anteriormente (medio mínimo, medio mínimo con fuente de carbono y medio mínimo con fuente de nitrógeno), a los que se había adicionado 1 g L⁻¹ de patrones puros de cada uno de los fármacos. Además se prepararon controles utilizando medio completo. Los tubos se incubaron a 28 °C hasta observar crecimiento microbiano (normalmente 4-5 días), o hasta 20 días, en el caso de no observarse crecimiento anteriormente.

Los cultivos que presentaron crecimiento, se sembraron en medio sólido completo con el fin de obtener colonias aisladas de las distintas especies de microorganismos presentes en la muestra. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Hasta llegar a obtener cultivos puros de cada una de las especies microbianas aisladas, la siembra en medio sólido mediante el método de los tres giros se realizó tantas veces como fue necesario.

Una vez obtenidos cultivos puros de los diferentes tipos de microorganismos extraídos del compostaje, cada uno de ellos se volvió a inocular en los mismos medios utilizados anteriormente. Esto nos permitió conocer qué microorganismos eran capaces de degradar los distintos fármacos, seleccionándolos para su posterior observación microscópica e identificación.

3.7.6. Identificación de los microorganismos aislados

Las cepas aisladas fueron identificadas en el laboratorio de la Colección Española de Cultivos Tipo, mediante los criterios descritos a continuación:

- Criterios morfológicos: después de un periodo de incubación de 7 días, se estudiaron los datos de crecimiento (tamaño de colonias, textura, color, producción de exudado, producción de pigmento difusible y observación del reverso de la colonia), una observación microscópica detallada y la formación del estado teleomórfico si lo hubiese.
- Criterios moleculares: amplificación directa por PCR del gen del 16S rRNA, secuenciación parcial del mismo (con lecturas en las dos direcciones) y análisis de las secuencias (Arahal y col., 2008).

3.7.7. Determinación de las actividades enzimáticas

La detección de actividad celulasa y xilanasas de los microorganismos identificados se llevó a cabo mediante ensayos de actividad en placa o bien mediante la cuantificación de la glucosa liberada al medio de cultivo.

3.7.7.1. Actividad celulasa

La detección de la actividad celulasa en placa se llevó a cabo mediante el método descrito por Teather y Wood (1982), basado en la capacidad del Rojo Congo de unirse a diferentes polímeros de glucosa, modificando la composición del medio de cultivo tal y como se indica en Strauss y col. (2001). Tras cultivar los microorganismos durante 72 h a 28 °C en medio SD suplementado con carboximetilcelulosa a una concentración final del 0,5%, se cubrieron las placas con una solución de Rojo Congo al 0,1% durante 20 min. A continuación se destañaron con una solución de NaCl 1 M hasta observar la aparición de halos claros alrededor de las colonias productoras de celulasa, como consecuencia de la degradación del sustrato.

La actividad celulasa se determinó mediante la valoración de azúcares reductores liberados por acción de la celulasa sobre sustratos de celulosa siguiendo la metodología de Libmond y Savoie (1993), López y col. (2007) y Jurado y col., (2014b) con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción contenía diferentes proporciones de la muestra enzimática a ensayar y carboximetilcelulosa o celulosa microcristalina al 1,5% como sustrato. Las muestras preparadas en un volumen final de 1 mL en presencia de tampón acetato 50 mM pH 4,4 se incubaron durante 15 min a 45 °C, parándose la reacción mediante frío. En un principio, se intentó la cuantificación de los azúcares reductores mediante el ensayo de Somogyi-Nelson. Sin embargo, la utilización de esta técnica fue imposible, debido a que la propia mezcla de reacción interfiere con la valoración colorimétrica de los azúcares. Por este motivo, y tras intentar poner a punto varios protocolos, se decidió valorar la glucosa liberada al medio por acción de enzimas celulolíticas, mediante tiras reactivas GLUCOCARD™ G sensor para la determinación de la glucosa, mediante un método enzimático,

utilizando la glucosa deshidrogenasa junto a coenzima flavina adenina dinucleótido (GDH-FAD).

3.7.7.2. Actividad xilanasa

Los microorganismos se cultivaron durante 72 h a 28 °C en medio SD suplementado con 0,1% de Remazol Brilliant Blue. La presencia de la actividad xilanasa se detectó mediante la aparición de un halo alrededor de la zona de crecimiento del hongo (Andrés y col., 2005).

La cuantificación de la actividad xilanasa se determinó mediante la valoración de azúcares reductores liberados por acción de la xilanasa sobre sustratos de xilano siguiendo la metodología de He y col., (1993), López y col. (2007) y Jurado y col., (2014b) con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción contenía sobrenadante del medio de cultivo de los microorganismos y 0,5% de xilano de madera de abedul. Las muestras preparadas en un volumen final de 1 mL en presencia de tampón Tris.HCl 50 mM pH 7 se incubaron durante 15 min a 50 °C, parándose la reacción mediante frío. Al igual que en caso de la actividad celulasa, la cuantificación de la glucosa liberada al medio por acción de enzimas con actividad xilanasa, se realizó mediante la utilización de tiras reactivas GLUCOCARD™ G sensor.

3.7.8. Inoculación de microorganismos exógenos al compostaje

Los microorganismos exógenos añadidos al compostaje fueron *S. cerevisiae* CEN-PK, *S. cerevisiae* L3-BY4741 y *S. cerevisiae* C3-BY4741, así como *P. barcinonensis*. Los microorganismos se cultivaron en matraces con medio YPD hasta alcanzar una DO_{600} de entre 7 y 9 cuando se trataba de hongos y de entre 2 y 3 en el caso de la bacteria. Las células se

recogieron por centrifugación y se resuspendieron en agua estéril. Posteriormente estos microorganismos se rociaron sobre el compostaje. En todos los casos, el número de microorganismos adicionados al compost fue de 10^6 UFC por gramo de materia seca.

3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó usando el pack de herramientas de Excel (Microsoft Office 2010). La relación entre las características fisicoquímicas y biológicas y la concentración de los fármacos durante los ensayos de compostaje se estudió con un análisis de regresión y correlación. Se calculó el coeficiente de Pearson (r) aplicando un nivel de confianza del 95% y 99% (o un alfa de 0,05 y 0,01).

Por otra parte, con el objetivo de evaluar el efecto de la inoculación de los microorganismos en el compostaje y de la adición de compost en el suelo contaminado sobre los parámetros fisicoquímicos y biológicos, así como determinar las diferencias entre los tratamientos, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA). Se aplicó el Teorema Central del Límite para asumir la distribución normal de los datos en los experimentos con $n > 21$. En aquellos casos con $n < 21$, se empleó el test de Shapiro-Wilk para la confirmación de la normalidad de los datos. Posteriormente, en los casos en que se observaron diferencias significativas se aplicó el test de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el Software IBM SPSS Statistics 22.0 para realizar este análisis estadístico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio de la presencia de fármacos y micotoxinas en muestras ambientales

La primera fase de este trabajo consistió en el análisis de muestras ambientales de diversos orígenes (lodos, residuos hortícolas, compost, suelos y aguas superficiales) para la detección de la presencia de 50 compuestos seleccionados entre los cuales se encontraban fármacos y micotoxinas.

4.1.1. Validación del método para la determinación de fármacos y micotoxinas

De los cincuenta compuestos estudiados (Tabla 4.1), solo un fungicida (carbendazima, 47%) y un fármaco de uso humano (olanzapina, 24%) mostraron recuperaciones menores del 50%; dieciséis compuestos (catorce antifúngicos y dos fármacos de uso humano) mostraron recuperaciones entre el 65% y el 85%; para todos los demás, las recuperaciones oscilaron entre un 85% y un 110%. La desviación estándar relativa (DER) de las muestras contaminadas fue menor de un 10% para todos los compuestos analizados, a excepción de la olanzapina (20%) y el boscalid (11%). En este sentido Yuan y col. (2013) también obtuvieron recuperaciones menores para la olanzapina (57-70%) en comparación con el resto de fármacos, así como DERs de hasta un 17%. En relación a la carbendazima, otros autores mostraron recuperaciones del 48 al 70% (Ccanccapa y col., 2016). Se mostró una buena linealidad para todos los compuestos situados en el intervalo de concentración entre $1 \mu\text{g L}^{-1}$ y $100 \mu\text{g L}^{-1}$; los valores de R^2 se situaron entre 0,9900 y 1,0000 para el 85% de

los compuestos analizados, lo cual está acorde con los resultados de otros autores (Yi y col., 2015). Los límites de cuantificación (LDC) de los compuestos detectados presentaron pocas variaciones, entre $0,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$; todos los compuestos mostraron un LDC de $0,8 \mu\text{g kg}^{-1}$, a excepción del ibuprofeno ($2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) y la olanzapina ($4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$); los antifúngicos y micotoxinas mostraron un LDC de $4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. Estos resultados son satisfactorios si se comparan con los de Gurke y col. (2015a), los cuales obtuvieron límites de cuantificación de $0,05$ a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para los fármacos citalopram, fluoxetina, irbesartán, telmisartán y venlafaxina. Por el contrario, el porcentaje de detección para el 66% de los compuestos fue muy variable, situándose entre 1% y 73%, siendo el telmisartán, la venlafaxina y el deoxinivalenol los que presentaron mayores porcentajes (Tabla 4.1).

Tabla 4.1

Criterios de validación del método para la determinación de fármacos y micotoxinas: detección (%), límite de cuantificación (LDC), recuperación (%) y desviación estándar relativa (DER).

| Fungicidas de uso agrícola | Detección (%) | LDC ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | Recuperación (%) | DER (%) |
|-----------------------------------|---------------|-------------------------------|------------------|---------|
| Azoxistrobina | 20 | 4,0 | 83 | 3 |
| Boscalid | 40 | 4,0 | 96 | 11 |
| Bromuconazol | nd | 4,0 | 99 | 5 |
| Carbendazima | 19 | 4,0 | 47 | 5 |
| Cimoxanilo | 9 | 4,0 | 78 | 4 |
| Ciproconazol | 15 | 4,0 | 94 | 6 |
| Difenoconazol | 19 | 4,0 | 90 | 7 |
| Dimetomorf | 12 | 4,0 | 80 | 8 |
| Dimoxistrobina | 27 | 4,0 | 81 | 9 |
| Fenamidona | 18 | 4,0 | 91 | 5 |

Tabla 4.1. Criterios de validación del método para la determinación de fármacos y micotoxinas: detección (%), límite de cuantificación (LDC), recuperación (%) y desviación estándar relativa (DER) (continuación).

| Fungicidas de uso agrícola | Detección (%) | LDC ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | Recuperación (%) | DER (%) |
|-----------------------------------|---------------|-------------------------------|------------------|---------|
| Fenbuconazol | nd | 4,0 | 105 | 3 |
| Fenhexamida | 18 | 4,0 | 95 | 6 |
| Fenpropidina | nd | 4,0 | 96 | 7 |
| Fenpropimorf | nd | 4,0 | 98 | 7 |
| Fluopicolida | nd | 4,0 | 104 | 3 |
| Hexaconazol | 22 | 4,0 | 81 | 9 |
| Metconazol | 4 | 4,0 | 77 | 5 |
| Miclobutanil | 11 | 4,0 | 96 | 3 |
| Penconazol | nd | 4,0 | 107 | 7 |
| Picoxistrobina | 9 | 4,0 | 85 | 6 |
| Piraclostrobina | 15 | 4,0 | 80 | 9 |
| Pirimetaniil | nd | 4,0 | 96 | 5 |
| Propamocarb | 15 | 4,0 | 72 | 6 |
| Propiconazol | 30 | 4,0 | 71 | 5 |
| Protioconazol-destio | 9 | 4,0 | 90 | 7 |
| Quinoxifen | nd | 4,0 | 82 | 5 |
| Tebuconazol | 43 | 4,0 | 73 | 5 |
| Tetraconazol | 18 | 4,0 | 65 | 4 |
| Tiofanato-metilo | 9 | 4,0 | 87 | 6 |
| Triciclazol | 28 | 4,0 | 60 | 4 |
| Triticonazol | nd | 4,0 | 78 | 7 |
| Trifloxistrobina | nd | 4,0 | 96 | 5 |
| Triflumizol | nd | 4,0 | 110 | 6 |

Tabla 4.1. Criterios de validación del método para la determinación de fármacos y micotoxinas: detección (%), límite de cuantificación (LDC), recuperación (%) y desviación estándar relativa (DER) (continuación).

| Fármacos de uso humano | Detección (%) | LDC ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | Recuperación (%) | DER (%) |
|-------------------------------|---------------|-------------------------------|------------------|---------|
| Azitromicina | 30 | 0,8 | 86 | 4 |
| Irbesartán | 40 | 0,8 | 87 | 4 |
| Olanzapina | 1 | 4,0 | 24 | 20 |
| Bencilpenicilina | nd | 0,8 | 85 | 8 |
| Fluoxetina | 40 | 0,8 | 78 | 6 |
| Ibuprofeno | 23 | 2,0 | 79 | 8 |
| Telmisartán | 73 | 0,8 | 90 | 2 |
| Venlafaxina | 63 | 0,8 | 88 | 2 |
| Citalopram | 27 | 0,8 | 96 | 3 |
| Micotoxinas | Detección (%) | LDC ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | Recuperación (%) | DER (%) |
| Aflatoxina B1 | nd | 4,0 | 92 | 4 |
| Ocratoxina A | nd | 4,0 | 98 | 4 |
| Fumonisina B1 | 3 | 4,0 | 95 | 4 |
| Fumonisina B2 | 6 | 4,0 | 99 | 5 |
| Toxina HT-2 | nd | 4,0 | 94 | 4 |
| Toxina T-2 | nd | 4,0 | 90 | 2 |
| Zearalenona | nd | 4,0 | 92 | 5 |
| Deoxinivalenol | 63 | 4,0 | 98 | 3 |

4.1.2. Presencia de los diferentes compuestos en las muestras de estudio

Como se puede observar en la Figura 4.1, se detectaron una mayor diversidad de compuestos en las muestras de lodo procedentes de las estaciones de depuración de aguas residuales (EDARs) de Pinedo (L2) y de la Pobla de Farnals (L4). La gran mayoría de los compuestos analizados se detectaron en concentraciones muy superiores a los límites de cuantificación (LDC) en los siete lodos de depuradora (Tabla 4.1), siendo los fungicidas boscalid y tebuconazol, el antibiótico azitromicina, el antihipertensivo telmisartán, el antiinflamatorio ibuprofeno y la micotoxina deoxinivalenol, los que alcanzaron mayores concentraciones (2000-3700 $\mu\text{g kg}^{-1}$). En un segundo orden de magnitud se incluyó el hexaconazol, la azoxistrobina, el tetraconazol, el metconazol, el ciproconazol, el propiconazol, el irbesartán, el citalopram, la fluoxetina y la venlafaxina que llegaron hasta valores de entre 200 y 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. El antipsicótico olanzapina solo se detectó a muy bajas concentraciones, justo en el LDC. Los estudios relacionados con la presencia de fungicidas azólicos en el medio ambiente son escasos y todavía más limitados en muestras sólidas, posiblemente debido a que existen pocos métodos disponibles para su determinación en estas matrices (Huang y col., 2010). Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por García-Valcárcel y Tadeo (2011), Huang y col. (2012), Martín y col. (2012), Yan y col. (2014) y Yuan y col. (2015), los cuales encontraron azitromicina, ibuprofeno, fluoxetina, venlafaxina, citalopram, tebuconazol y hexaconazol en lodos de depuradora procedentes de EDARs de China, Estados Unidos y España. Los autores Verlicchi y Zambello (2015), también detectaron ibuprofeno (40-5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$), azitromicina (100-1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y fluoxetina (100-200 $\mu\text{g kg}^{-1}$) en lodos primarios y secundarios.

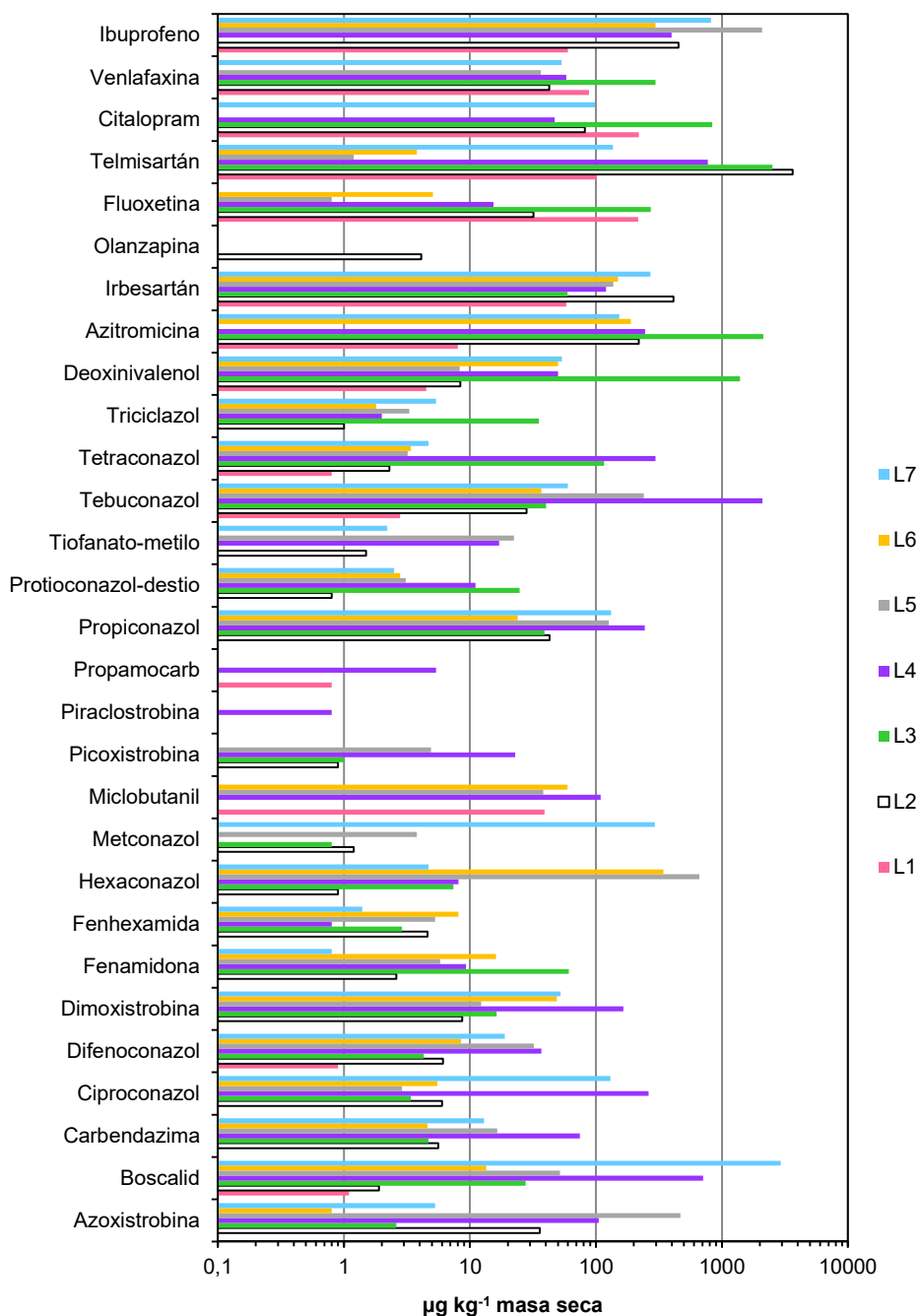


Figura 4.1. Concentración de los compuestos analizados en muestras de lodo procedentes de las depuradoras de Paterna (L1 y L6), Pinedo (L2), Sueca (L3), Pobra de Farnals (L4), Pobra de Carraixet (L5) y Quart de Poblet (L7).

En cuanto a los residuos hortícolas, se puede apreciar como se encontraron un mayor número de compuestos en la planta del arroz (RH1 y RH2) (Figura 4.2). El único que se detectó por encima de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ fue el tebuconazol, seguido del propiconazol y el triciclazol que alcanzaron valores de 232 y $87 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. No se encontró ninguna micotoxina en este grupo de muestras.

En la Figura 4.3 se observan los compuestos detectados en muestras de compost elaboradas a partir de diferentes residuos. Como era de esperar, los compost que presentaron una mayor variedad de estos compuestos fueron los realizados con residuos de paja de arroz y lodo de depuradora (C9-C15). Entre los quince compost, destacó el grupo de los fungicidas, llegando a concentraciones muy por encima de los LDC (Tabla 4.1) para el tebuconazol, el propiconazol, el boscalid y el triciclazol ($1000\text{-}17000 \mu\text{g kg}^{-1}$); en el segundo orden de magnitud, y alcanzando concentraciones por encima de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, se observaron los fungicidas azoxistrobina, dimoxistrobina, hexaconazol, metconazol, miclobutanil, tetraconazol y el antihipertensivo telmisartán; este último encontrado en una muestra de compost maduro elaborado a partir de paja de arroz y lodo procedente de la EDAR de Pinedo (C15). No se detectó ningún fungicida en el compost realizado con paja de trigo y subproductos animales no aptos para el consumo humano (C7 y C8). Hay que destacar que no existen muchos estudios relacionados con la detección de PPCPs y fungicidas de uso agrícola en compost. Vanni y col. (2004), encontraron fungicidas en muestras de compost comercial de residuos de corteza, de poda y lodos urbanos e industriales y se ha detectado ibuprofeno ($50\text{ y }1000 \mu\text{g kg}^{-1}$), azitromicina ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) y fluoxetina ($2\text{-}60 \mu\text{g kg}^{-1}$) en lodo de depuradora compostado (Martín y col., 2015; Verlicchi y Zambello, 2015).

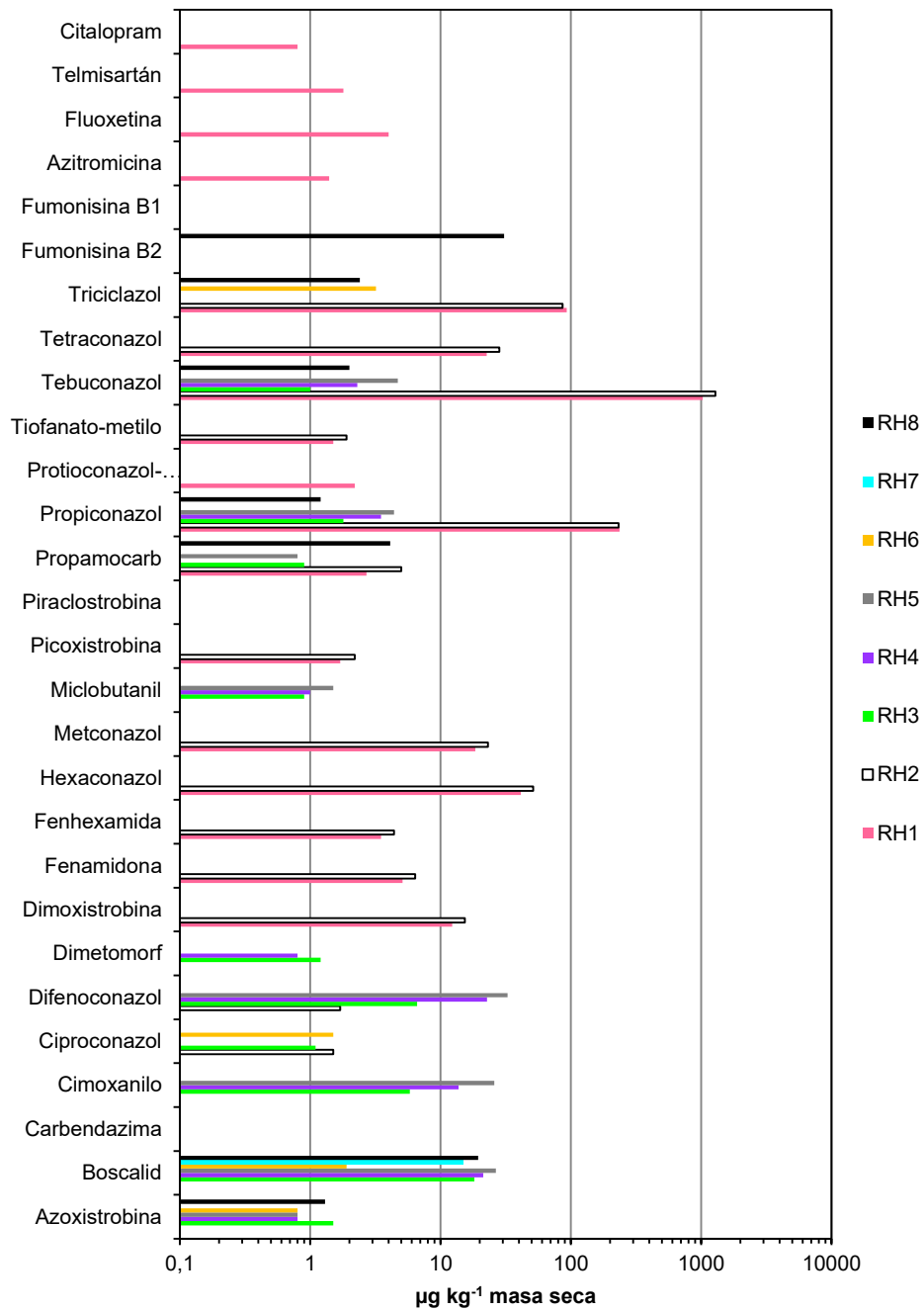


Figura 4.2. Concentración de los compuestos analizados en muestras de residuos hortícolas: paja de arroz (RH1 y RH2), residuo de lechuga (RH3, RH4 y RH5) y residuo de maíz (RH6, RH7 y RH8).

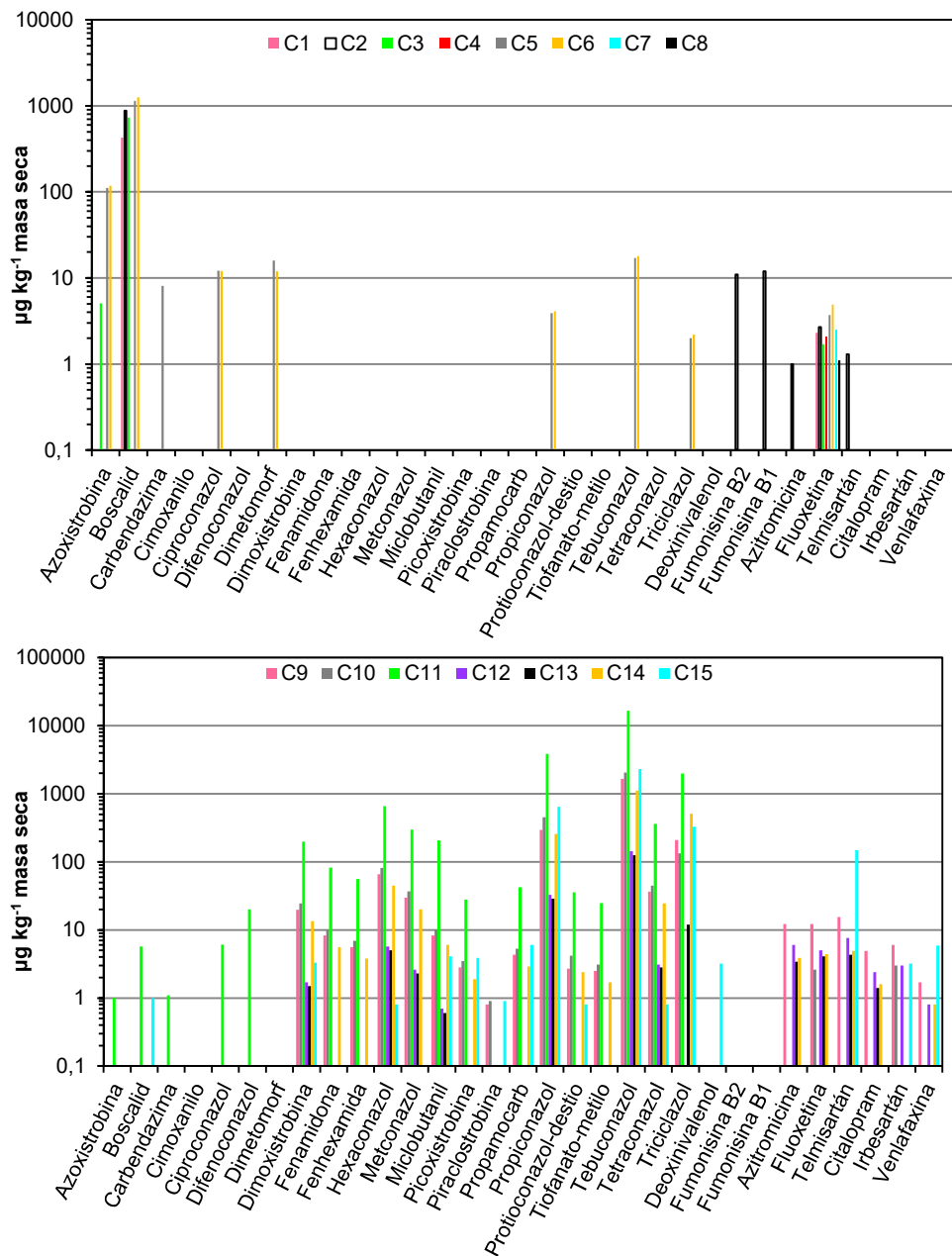


Figura 4.3. Concentración de los compuestos analizados en muestras de compost inmaduro (C1, C2 y C3) y maduro (C4, C5 y C6) de residuos hortícolas; compost maduro de residuos animales (C7 y C8); compost inmaduro (C9, C10 y C11) y maduro (C12, C13, C14 y C15) de paja de arroz y lodo de depuradora.

La Figura 4.4 muestra los niveles de concentración de los compuestos detectados en las muestras de suelo analizadas. Estas procedían de campos de cultivo que son regados con aguas tratadas de las mismas EDARs que se mostraron para la obtención de los lodos. Comparando estos resultados con los de las muestras de lodos, residuos hortícolas y compost, es necesario resaltar que los niveles de concentración fueron diez veces menores en los sistemas edáficos. Al igual que en los casos anteriores, los fungicidas azólicos tebuconazol y triciclazol junto con el boscalid, fueron los compuestos detectados a mayores concentraciones ($100-400 \mu\text{g kg}^{-1}$). En segundo lugar, destacan el propiconazol y la azoxistrobina. Respecto a los fármacos de uso humano y micotoxinas, los que se detectaron a concentraciones más elevadas ($2-60 \mu\text{g kg}^{-1}$) fueron el telmisartán, la fluoxetina, el deoxinivalenol, la venlafaxina, la azitromicina, el irbesartán y el citalopram. La presencia de estos compuestos en los suelos sugiere una persistencia importante, la cual varía en función del uso de dichos suelos; así, los fungicidas tebuconazol, triciclazol y propiconazol se detectaron en concentraciones importantes únicamente en los suelos dedicados al cultivo del arroz. Esto es lógico considerando que en los últimos años se han utilizado frecuentemente para combatir las infecciones causadas por el hongo del género *Pedicularia*.

Estos resultados están acorde con la literatura científica, ya que Smalling y col. (2013) encontraron que el boscalid fue uno de los fungicidas más frecuentemente detectados en suelos dedicados al cultivo de la patata en Estados Unidos y que se trataba de compuestos muy persistentes. Además, estudios recientes han demostrado como la azoxistrobina presenta periodos de semirreacción de hasta 462 días (Edwards y col., 2016) y que después de su aplicación en campos agrícolas, se lixivia durante largos periodos de tiempo (Jorgensen y col., 2012). En cuanto al propiconazol, se ha demostrado que es estable en los

suelos, presentando periodos de semirreacción de hasta un año en suelos arcillo-limosos (Kim y col., 2003).

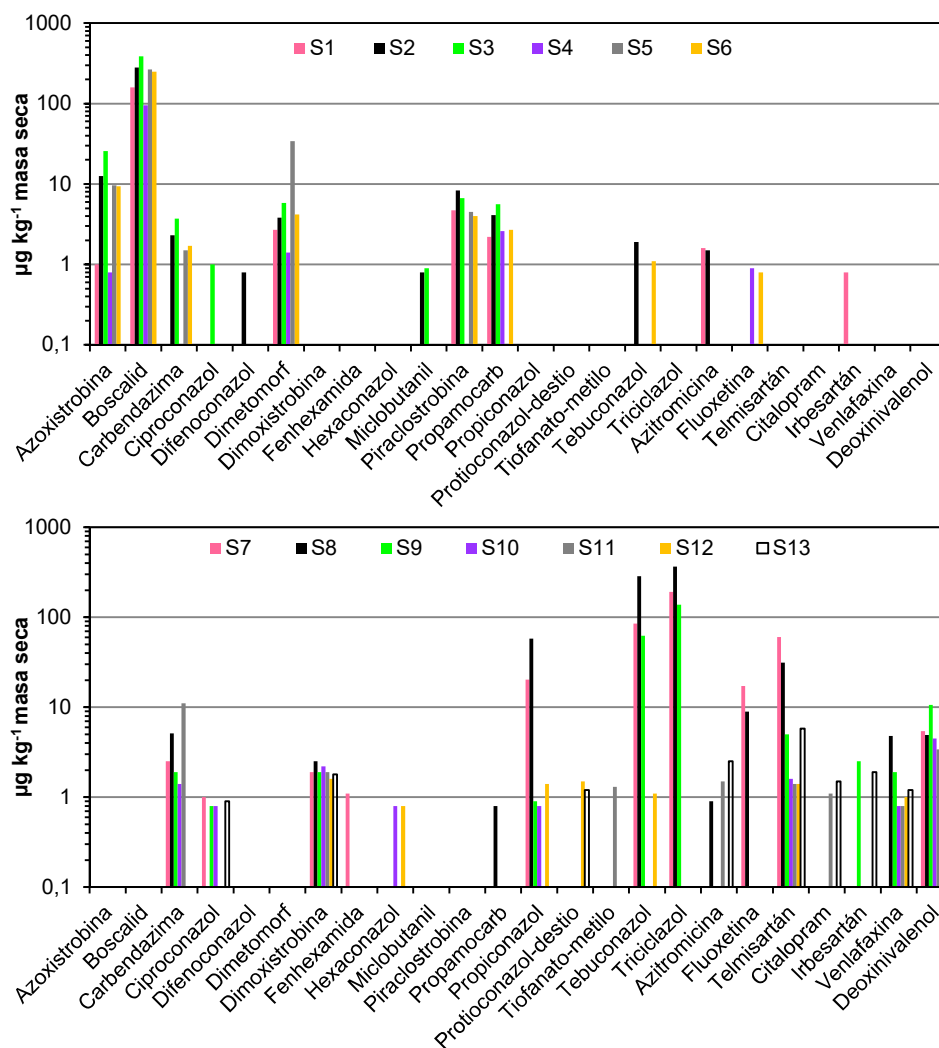


Figura 4.4. Concentración de los compuestos analizados en muestras de suelos: huerta de maíz (S1 y S4) y enmendada con compost de residuos hortícolas (S2, S3, S5 y S6) situada en Picanya; suelos de cultivo del arroz de Pinedo (S7), del canal de l'Albufera (S8) y de Sueca (S9); suelos dedicados al cultivo de cítricos en Guadassuar (S10) y suelos cultivados con hortalizas en la Poble de Farnals (S11), en el Barranc del Carraixet (S12) y en Paterna (S13).

En la Figura 4.5 se muestran los compuestos detectados en las muestras de agua. Solamente se encontraron cuatro medicamentos de uso humano (fluoxetina, venlafaxina, irbesartán y telmisartán) a bajas concentraciones llegando a valores de entre 0,8 y 12 $\mu\text{g L}^{-1}$. Un aspecto interesante fue el hecho de que no se detectaron fungicidas agrícolas por encima del LDC, incluso ni en las muestras de agua que se utilizan para regar los suelos dedicados al cultivo del arroz. La campaña de muestreo se realizó en el mes de abril, es decir, siete meses después de que la campaña del cultivo de arroz finalizara y dos meses antes de que empezara. Por tanto, a lo largo de ese periodo los fungicidas podrían haberse adsorbido a la materia particulada del suelo o a los sedimentos tal y como indican Chen y Ying (2015). Resultados similares también fueron obtenidos por Battaglin y col. (2016), los cuales observaron que algunos fungicidas se detectaron en sedimentos y no en aguas. Por lo que respecta a la fluoxetina, la venlafaxina y el telmisartán, los autores Gurke y col. (2015b) y Schlusener y col. (2015) detectaron estos fármacos en los efluentes de EDARs alemanas.

Se ha observado como el residuo de la planta del arroz es portador de una gran diversidad de contaminantes, mientras que en el lodo de depuradora es donde se detectaron mayores concentraciones. Por tanto, es fundamental una buena gestión de estos residuos antes de su disposición final. Los compuestos que se detectaron a mayores concentraciones en las diferentes muestras ambientales fueron el fungicida de aplicación agrícola tebuconazol y el antihipertensivo telmisartán, lo cual es indicativo del carácter persistente de estos compuestos en el medio ambiente. De hecho, el tebuconazol presenta una afinidad alta por los tejidos grasos y el telmisartán es el compuesto menos soluble de todos los estudiados en este trabajo ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mg L}^{-1}$). Por otra parte, el hecho de que todos estos compuestos sean detectados en aguas tratadas, sugiere que los tratamientos empleados en las EDARs no son lo suficientemente

efectivos para eliminarlos. Estos resultados también ponen de manifiesto que el suelo es el compartimento donde se pueden acumular los compuestos, mientras que el agua procedente de las EDARs o campos de cultivo actúan como medio de transferencia.

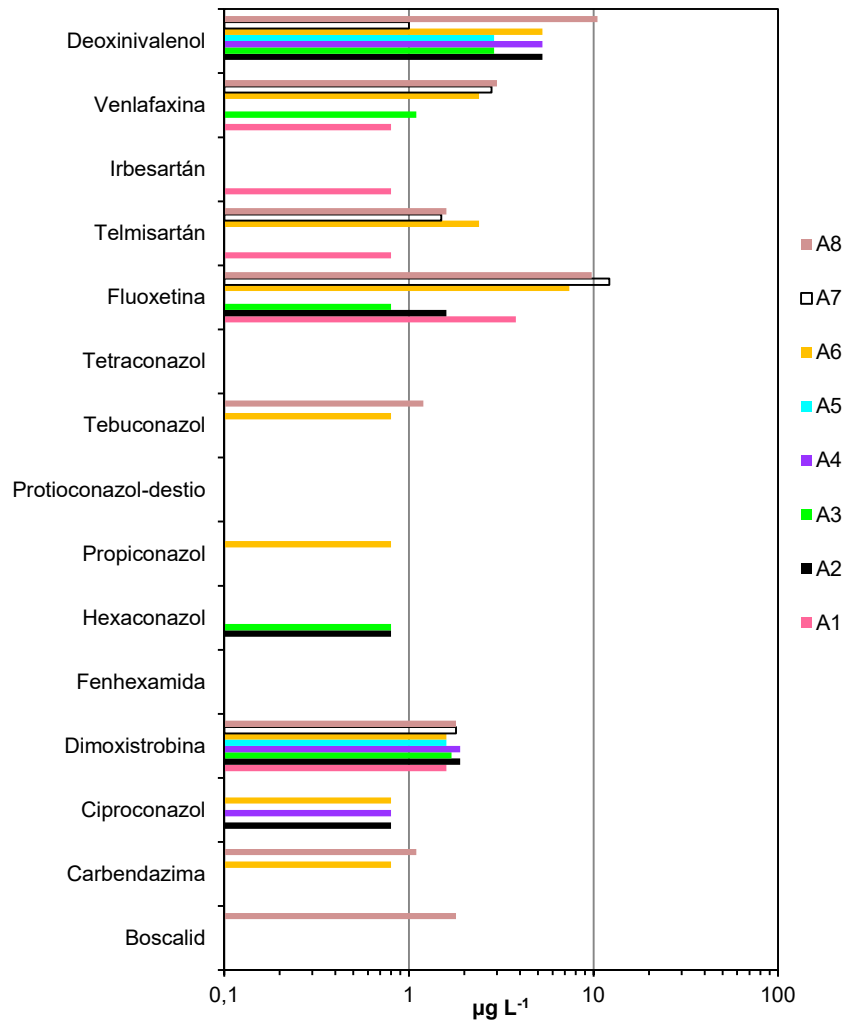


Figura 4.5. Concentración de los compuestos analizados en muestras de aguas procedentes de los canales de riego de los arrozales de Pinedo (A1) y de l'Albufera (A2); del canal de riego de cítricos de Guadassuar (A4) y de la huerta de Pobra de Farnals (A5) y aguas tratadas procedentes de las EDARs de Sueca (A3), Carraixet (A6), Paterna (A7) y Quart de Poblet (A8).

4.1.3. Efecto del tratamiento de las depuradoras de aguas residuales sobre la concentración de fármacos

Tras observar la presencia de una gran diversidad de compuestos en diferentes muestras ambientales, principalmente en los lodos de depuradora e incluso en aguas tratadas, se planteó el estudio de su distribución dentro de las EDARs. Tal y como se describió en la Tabla 3.3, las cuatro EDARs de estudio se caracterizan por presentar un pretratamiento completo, seguido de un tratamiento primario fisicoquímico y con una posterior decantación y como tratamiento secundario, los fangos activados, siendo la única EDAR que no presenta tratamiento terciario ni de desinfección, la de Alcoi. En la Tabla 4.2 se muestra la concentración de los compuestos encontrados en las aguas de entrada y salida de cuatro EDARs, así como en la fracción sólida y en los lodos. Como se puede apreciar, se detectaron seis fármacos de uso humano en las aguas de entrada de las EDARs a concentraciones de hasta $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para el irbesartán y la venlafaxina, de $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para el citalopram, de $2,8 \mu\text{g L}^{-1}$ para el telmisarón y la fluoxetina y de $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para la azitromicina. Existen estudios recientes que han encontrado también estos fármacos en EDARs (Bayer y col., 2014; Wu y col., 2015; Yan y col., 2015). Por el contrario, los fungicidas agrícolas se situaron por debajo del LDC ($0,10 \mu\text{g L}^{-1}$) o no fueron detectados, a excepción del tebuconazol que se detectó en aguas industriales de la EDAR de Paterna ($0,28 \mu\text{g L}^{-1}$). Dentro del grupo de los fármacos de uso humano se observaron diferencias, detectándose mayores concentraciones en los influentes de la EDARs de Paterna y Alcoi. También se observó como en las aguas industriales había una menor concentración de fármacos en comparación con las aguas urbanas, lo cual tiene sentido considerando que el consumo de estas sustancias no está relacionado con las actividades industriales.

Tabla 4.2

Concentración de los compuestos en la fracción líquida ($\mu\text{g L}^{-1}$) y sólida ($\mu\text{g kg}^{-1}$ masa seca) de las aguas y lodos ($\mu\text{g kg}^{-1}$ masa seca) procedentes de diferentes EDARs.

| Compuesto | EDAR | Influyente | Sólidos | Efluente | Lodo |
|--------------|-----------------|------------|---------|----------|-------|
| Azitromicina | U-Paterna* | 2,20 | 1009 | <LDC | 481 |
| | I-Paterna* | 0,37 | Nd | <LDC | 481 |
| | U-Paterna | 2,43 | 17143 | 0,16 | 395 |
| | U-Quart Benager | 0,40 | 551 | 0,12 | 582 |
| | U-Alcoi-1* | 0,39 | 1168 | 0,42 | - |
| | U-Alcoi-2* | 7,52 | 9203 | 0,56 | - |
| | U-Alcoi-3 | 5,17 | 539 | - | 923 |
| | U-Alcoi-4 | 0,55 | 1070 | 1,16 | - |
| | U-Pinedo I | 1,58 | 574 | 0,62 | 588 |
| Irbesartán | U-Paterna* | 0,31 | 41,74 | 0,13 | 52,90 |
| | I-Paterna* | 0,13 | 34,54 | 0,13 | 52,90 |
| | U-Paterna | 0,63 | 454 | 1,14 | 20,30 |
| | U-Quart Benager | <LDC | 42,82 | 0,57 | 14,20 |
| | U-Alcoi-1 * | 0,46 | 95,34 | 1,93 | - |
| | U-Alcoi-2* | 0,46 | 617 | 0,83 | - |
| | U-Alcoi-3 | 0,95 | 84,20 | - | 23,30 |
| | U-Alcoi-4 | 0,35 | 2793 | 1,07 | - |
| | U-Pinedo I | 0,45 | 546 | 0,43 | 108 |
| Telmisartán | U-Paterna* | 2,46 | 165 | 0,48 | 684 |
| | I-Paterna* | 0,38 | Nd | 0,48 | 684 |
| | U-Paterna | 2,49 | 2354 | 2,70 | 676 |
| | U-Quart Benager | 1,76 | 232 | 2,74 | 1052 |

Resultados y discusión

Tabla 4.2. Concentración de los compuestos en la fracción líquida ($\mu\text{g L}^{-1}$) y sólida ($\mu\text{g kg}^{-1}$ masa seca) de las aguas y lodos ($\mu\text{g kg}^{-1}$ masa seca) procedentes de diferentes EDARs (continuación).

| Compuesto | EDAR | Influyente | Sólidos | Efluente | Lodo |
|-------------|-----------------|------------|---------|----------|-------|
| | U-Alcoi-1* | 0,96 | 365 | 2,33 | - |
| | U-Alcoi-2* | 0,85 | 2573 | 2,27 | - |
| | U-Alcoi-3 | 0,26 | 131 | - | 529 |
| | U-Alcoi-4 | 0,56 | 6240 | 1,94 | - |
| | U-Pinedo I | 1,31 | 2527 | 1,93 | 2734 |
| Fluoxetina | U-Paterna* | 0,36 | 251 | <LDC | 192 |
| | I-Paterna* | 0,10 | 57,56 | <LDC | 192 |
| | U-Paterna | 2,20 | 1485 | <LDC | 14,80 |
| | U-Quart Benager | 0,27 | 317 | <LDC | 33,00 |
| | U-Alcoi-1* | <LDC | 2,94 | nd | - |
| | U-Alcoi-2* | <LDC | 183 | nd | - |
| | U-Alcoi-3 | 2,84 | 124 | - | 12,90 |
| | U-Alcoi-4 | nd | 301 | nd | - |
| | U-Pinedo I | <LDC | 120 | <LDC | 39,30 |
| Venlafaxina | U-Paterna* | 0,67 | Nd | 0,27 | 22,00 |
| | I-Paterna* | 0,10 | Nd | 0,27 | 22,00 |
| | U-Paterna | 0,99 | 10,70 | 0,31 | 18,90 |
| | U-Quart Benager | 0,51 | <LDC | 0,27 | 39,10 |
| | U-Alcoi-1* | 0,28 | 4,41 | 0,43 | - |
| | U-Alcoi-2* | 0,25 | 23,73 | 0,30 | - |
| | U-Alcoi-3 | 0,57 | 8,20 | - | 24,50 |
| | U-Alcoi-4 | nd | 301 | nd | - |
| | U-Pinedo I | <LDC | 120 | <LDC | 39,30 |

Resultados y discusión

Tabla 4.2. Concentración de los compuestos en la fracción líquida ($\mu\text{g L}^{-1}$) y sólida ($\mu\text{g kg}^{-1}$ masa seca) de las aguas y lodos ($\mu\text{g kg}^{-1}$ masa seca) procedentes de diferentes EDARs (continuación).

| Compuesto | EDAR | Influyente | Sólidos | Efluente | Lodo |
|---------------|-----------------|------------|---------|----------|-------|
| Citalopram | U-Paterna* | 1,30 | 58,08 | <LDC | 162 |
| | I-Paterna* | <LDC | Nd | <LDC | 162 |
| | U-Paterna | 0,34 | 105 | 0,15 | 53,20 |
| | U-Quart Benager | 0,13 | 8,22 | 0,10 | 91,60 |
| | U-Alcoi-1* | 0,10 | 22,87 | 0,11 | - |
| | U-Alcoi-2* | <LDC | 130 | <LDC | - |
| | U-Alcoi-3 | <LDC | 40,55 | - | 101 |
| | U-Alcoi-4 | <LDC | 306 | <LDC | - |
| | U-Pinedo I | 0,14 | 124 | <LDC | 106 |
| Ciproconazol | U-Paterna* | nd | Nd | nd | nd |
| | I-Paterna* | nd | Nd | nd | nd |
| | U-Paterna | nd | 1,71 | nd | nd |
| | U-Quart Benager | nd | 2,58 | nd | nd |
| | U-Alcoi-1* | nd | 2,38 | nd | - |
| | U-Alcoi-2* | <LDC | 30,70 | nd | - |
| | U-Alcoi-3 | nd | Nd | - | nd |
| | U-Alcoi-4 | nd | 55,81 | nd | - |
| | U-Pinedo I | <LDC | 20,73 | nd | nd |
| Difenoconazol | U-Paterna* | nd | Nd | nd | nd |
| | I-Paterna* | nd | Nd | nd | nd |
| | U-Paterna | <LDC | 12,46 | <LDC | 7,80 |
| | U-Quart Benager | <LDC | 5,31 | nd | 32,90 |
| | U-Alcoi-1* | <LDC | 10,93 | <LDC | - |

Resultados y discusión

Tabla 4.2. Concentración de los compuestos en la fracción líquida ($\mu\text{g L}^{-1}$) y sólida ($\mu\text{g kg}^{-1}$ masa seca) de las aguas y lodos ($\mu\text{g kg}^{-1}$ masa seca) procedentes de diferentes EDARs (continuación).

| Compuesto | EDAR | Influyente | Sólidos | Efluente | Lodo |
|-----------------|-----------------|------------|---------|----------|-------|
| Difenoconazol | U-Alcoi-2* | <LDC | 93,45 | <LDC | - |
| | U-Alcoi-3 | nd | 3,67 | - | 3,20 |
| | U-Alcoi-4 | <LDC | 133 | <LDC | - |
| | U-Pinedo I | <LDC | 33,55 | <LDC | 7,00 |
| Propiconazol | U-Paterna* | <LDC | 10,78 | <LDC | 110 |
| | I-Paterna* | <LDC | 7,02 | <LDC | 110 |
| | U-Paterna | <LDC | 8,34 | <LDC | 23,10 |
| | U-Quart Benager | <LDC | 19,36 | <LDC | 48,90 |
| | U-Alcoi-1* | nd | 9,51 | nd | - |
| | U-Alcoi-2* | nd | 68,96 | nd | - |
| | U-Alcoi-3 | nd | 7,52 | - | 2,80 |
| | U-Alcoi-4 | <LDC | 45,66 | nd | - |
| | U-Pinedo I | <LDC | 46,02 | <LDC | 115 |
| | Tebuconazol | U-Paterna* | <LDC | 16,73 | <LDC |
| I-Paterna* | | 0,28 | 12,69 | <LDC | 39,80 |
| U-Paterna | | <LDC | 21,38 | <LDC | 96,80 |
| U-Quart Benager | | <LDC | 16,53 | 0,10 | 93,70 |
| U-Alcoi-1* | | <LDC | 9,24 | nd | - |
| U-Alcoi-2* | | nd | 115 | nd | - |
| U-Alcoi-3 | | <LDC | 6,41 | - | 3,80 |
| U-Alcoi-4 | | nd | 155 | <LDC | - |
| U-Pinedo I | <LDC | 78,69 | <LDC | 18,60 | |

Resultados y discusión

Tabla 4.2. Concentración de los compuestos en la fracción líquida ($\mu\text{g L}^{-1}$) y sólida ($\mu\text{g kg}^{-1}$ masa seca) de las aguas y lodos ($\mu\text{g kg}^{-1}$ masa seca) procedentes de diferentes EDARs (continuación).

| Compuesto | EDAR | Influyente | Sólidos | Efluente | Lodo |
|--------------|-----------------|------------|---------|----------|------|
| Triciclazol | U-Paterna* | nd | Nd | nd | nd |
| | I-Paterna* | nd | Nd | nd | nd |
| | U-Paterna | <LDC | <LDC | nd | nd |
| | U-Quart Benager | <LDC | Nd | <LDC | nd |
| | U-Alcoi-1* | nd | Nd | nd | - |
| | U-Alcoi-2* | <LDC | 2,25 | nd | - |
| | U-Alcoi-3 | nd | Nd | - | - |
| | U-Alcoi-4 | nd | 4,63 | nd | - |
| | U-Pinedo I | nd | <LDC | nd | nd |
| Triticonazol | U-Paterna* | nd | Nd | nd | nd |
| | I-Paterna* | nd | Nd | nd | nd |
| | U-Paterna | nd | <LDC | nd | 1,90 |
| | U-Quart Benager | <LDC | 5,01 | nd | 1,80 |
| | U-Alcoi-1* | <LDC | 4,97 | <LDC | - |
| | U-Alcoi-2* | nd | 29,39 | nd | - |
| | U-Alcoi-3 | nd | Nd | - | 1,40 |
| | U-Alcoi-4 | nd | 8,37 | <LDC | - |
| | U-Pinedo I | <LDC | Nd | <LDC | 2,00 |

Todas las EDARs se muestrearon en invierno, a excepción de las marcadas con asterisco (verano). Se realizaron cuatro muestreos en la EDAR de Alcoi. U: urbana; I: industrial; nd: no detectado; LDC: límite de cuantificación

Por otra parte, al igual que en los trabajos de Matongo y col. (2015) y Yang y col. (2016), se observó como en la fracción sólida y en los lodos fue donde se concentró la mayor cantidad de los compuestos. De hecho, tal y como ocurrió anteriormente con las muestras ambientales (Figura 4.5), no se detectaron fungicidas en las aguas de entrada pero sí en las fracciones sólidas y en mayor medida en la EDAR de Alcoi.

Un aspecto interesante es que en numerosas ocasiones se detectaron mayores concentraciones en los efluentes que en los influentes, principalmente en el caso del irbesartán, el telmisartán y la venlafaxina. Recientemente también se han encontrado estos dos antihipertensivos en efluentes de EDARs (Gurke y col., 2015b). Además, la literatura científica indica que las EDARs presentan menores eficiencias en la eliminación de estos tres fármacos en comparación con otros como por ejemplo, el ibuprofeno (Boix y col., 2016). Las eficiencias en la eliminación de PPCPs en las EDARs varían en función de las propiedades químicas del compuesto, así como de las condiciones de operación, la tecnología utilizada y la composición de las comunidades microbianas de los lodos activados (Sun y col., 2016). Por una parte, estos resultados ponen de manifiesto la elevada persistencia de estos compuestos; por otra, tal y como se ha comentado anteriormente en el apartado 4.1.2, parece ser que las EDAR no eliminan de forma eficiente los medicamentos, tal y como indican numerosos estudios y más recientemente Papageorgiou y col. (2016) y Eslami y col. (2015). Así, el tiempo de retención de los biosólidos en las EDARs es relativamente elevado, variando de unos pocos días hasta 30 días, debido a su continua recirculación y reciclaje de un reactor a otro. Sin embargo, este tiempo puede llegar a ser incluso más corto que los periodos de semirreacción de algunos PPCPs.

Por lo tanto, al igual que en el apartado anterior, los resultados obtenidos muestran como los lodos son una fuente importante de dispersión de contaminantes. Además, de los compuestos que han sido

detectados, el telmisartán se encuentra entre los fármacos más persistentes. Todos estos resultados muestran la necesidad de mejorar las técnicas de tratamiento de las aguas residuales, así como controlar y buscar alternativas para la disposición final de los lodos generados. Por lo tanto, en este trabajo se propone la evaluación del compostaje de paja de arroz y lodo de depuradora como una solución efectiva y económica para el tratamiento de estos residuos así como la posible eliminación y/o reducción de los fármacos estudiados.

4.2. Caracterización de la paja de arroz y de los lodos de depuradora para su compostaje

Previamente al inicio de los ensayos de compostaje para el estudio de su efecto en la eliminación de los fármacos, era necesario realizar un estudio de las características más importantes de los residuos de partida, con el fin de asegurarse que el proceso se desarrollara adecuadamente. En la Tabla 4.3 se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos de la paja del arroz y los lodos de depuradora a partir de los cuales se han realizado los ensayos de compostaje durante el periodo experimental de este trabajo. Las características fisicoquímicas de los lodos fueron similares, a excepción de la conductividad eléctrica, el nitrógeno total y la concentración de macroelementos y microelementos, los cuales fueron muy variables. En general, los lodos presentaron una elevada humedad y nitrógeno total, en comparación con la paja de arroz. Sin embargo, esta última se caracterizó por mostrar mayores valores de materia orgánica, carbono total, carbono orgánico oxidable y relación C/N. La baja relación C/N del residuo del lodo es indicativo de que se trata de una fuente importante de nitrógeno para los microorganismos aerobios responsables del proceso de compostaje.

En cuanto a los macroelementos, hubo una mayor variación en el Ca y Na, siendo el LD3 el que presentó concentraciones más elevadas, 81207 mg kg⁻¹ y 7792 mg kg⁻¹, respectivamente. Dentro del grupo de los microelementos, se observaron mayores variaciones en el Fe, Ni, Co, Cr y Pb siendo el LD3 el que presentó una mayor concentración de Fe (30440 mg kg⁻¹), Ni (132 mg kg⁻¹) y Pb (774 mg kg⁻¹); el LD6 de Co (11 mg kg⁻¹) y el LD7 de Cr (1731 mg kg⁻¹). Destacar que, según el Real Decreto 1310/1990, los metales pesados de todos los lodos se encontraron dentro de los límites máximos permitidos para que puedan ser utilizados con fines agrícolas.

No obstante, para que el lodo de depuradora pueda ser compostado, es necesaria la adición de un segundo material que actúe como agente estructurante que debe presentar características complementarias, como es el caso de la paja de arroz, el cual proporciona la fuente de carbono para los microorganismos. Todo ello sugiere que las características de ambos residuos son compatibles para llevar a cabo el compostaje, tal y como indicaron previamente Iranzo y col. (2004), Roca-Pérez y col. (2005), López y Boluda (2008) y Roca-Pérez y col. (2009).

Tabla 4.3
Propiedades fisicoquímicas de los residuos.

| Parámetros | RA | LD1 | LD2 | LD3 | LD4 | LD5 | LD6 | LD7 | LD8 |
|---------------------------|----------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| Humedad (%) | 6,78 ± 0,20 | 83,52 ± 0,09 | 81,06 ± 0,09 | 81,98 ± 0,11 | 81,98 ± 0,05 | 79,71 ± 0,03 | 81,27 ± 0,03 | 79,30 ± 0,04 | 84,56 ± 1,08 |
| pH | 6,37 ± 0,04 | 7,39 ± 0,09 | 7,23 ± 0,40 | 7,78 ± 0,04 | 7,68 ± 0,07 | 7,87 ± 0,08 | 7,70 ± 0,02 | 8,09 ± 0,02 | 7,96 ± 0,09 |
| CE (dS m ⁻¹) | 5,78 ± 0,02 | 3,46 ± 0,08 | 7,52 ± 0,01 | 3,79 ± 0,07 | 3,46 ± 0,05 | 2,99 ± 0,10 | 3,61 ± 0,09 | 3,37 ± 0,18 | 3,73 ± 0,13 |
| MOT (%) | 85,26 ± 0,04 | 72,35 ± 0,31 | 65,97 ± 0,20 | 65,35 ± 0,42 | 67,90 ± 0,06 | 64,08 ± 0,10 | 69,11 ± 0,10 | 57,13 ± 1,37 | 62,84 ± 0,21 |
| C _i (%) | 38,68 ± 0,06 | 34,44 ± 0,30 | na | 32,71 ± 0,14 | 32,70 ± 1,18 | 32,43 ± 0,25 | na | 29,29 ± 0,23 | 34,54 ± 0,00 |
| C _{orgo} (%) | 34,82 ± 1,05 | 28,24 ± 1,02 | 25,69 ± 0,34 | 26,64 ± 0,74 | 28,62 ± 1,00 | 26,82 ± 0,74 | 27,51 ± 2,06 | 21,75 ± 0,29 | 26,79 ± 1,30 |
| N _i (%) | 1,06 ± 0,06 | 4,97 ± 0,03 | 3,65 ± 0,02 | 4,95 ± 0,13 | 4,89 ± 0,16 | 5,02 ± 0,04 | 3,50 ± 0,04 | 4,12 ± 0,06 | 5,89 ± 0,21 |
| Relación C/N | 33,22 ± 1,74 | 5,68 ± 0,17 | 7,04 ± 0,02 | 6,75 ± 0,06 | 5,86 ± 0,03 | 6,86 ± 0,01 | 7,86 ± 0,01 | 5,29 ± 0,10 | 4,55 ± 0,29 |
| Cu (mg kg ⁻¹) | 12,75 ± 1,84 | na | 624 ± 15 | 692 ± 6 | 631 ± 15 | 599 ± 8 | 517 ± 28 | na | na |
| Fe (mg kg ⁻¹) | 154,30 ± 63,47 | na | 15840 ± 5683 | 30440 ± 141 | 17062 ± 3512 | 16282 ± 983 | 8257 ± 1947 | na | na |
| Ni (mg kg ⁻¹) | 19,08 ± 0,10 | na | 93,10 ± 0,72 | 132,47 ± 0,28 | 71,92 ± 6,89 | 58,10 ± 11,31 | 48,40 ± 1,34 | na | na |
| Mn (mg kg ⁻¹) | 191,41 ± 14,30 | na | 175,18 ± 1,27 | 220,19 ± 1,49 | 167,42 ± 1,82 | 137,38 ± 0,51 | 133,40 ± 1,69 | na | na |
| Cd (mg kg ⁻¹) | Na | na | 2,08 ± 0,09 | 1,99 ± 0,02 | 2,76 ± 0,07 | 1,95 ± 0,06 | 2,07 ± 0,01 | na | na |
| Co (mg kg ⁻¹) | 0,79 ± 0,46 | na | 6,90 ± 0,05 | 7,49 ± 0,13 | 9,67 ± 0,69 | 4,74 ± 0,32 | 10,50 ± 0,03 | na | na |
| Cr (mg kg ⁻¹) | 21,65 ± 0,94 | na | 267 ± 4 | 263 ± 6 | 147 ± 7 | 233 ± 2 | 419 ± 11 | na | na |
| Pb (mg kg ⁻¹) | 4,26 ± 2,40 | na | 754 ± 12 | 760 ± 20 | 527 ± 12 | 200 ± 4 | 314 ± 10 | na | na |
| Zn (mg kg ⁻¹) | 35,98 ± 12,30 | na | 1123 ± 12 | 1157 ± 8 | 1203 ± 14 | 1327 ± 85 | 1477 ± 8 | na | na |
| Ca (mg kg ⁻¹) | 5702 ± 86 | na | 21264 ± 2627 | 81207 ± 8274 | 34992 ± 2948 | 41607 ± 1441 | 19354 ± 153 | na | na |
| Na (mg kg ⁻¹) | 1462 ± 48 | na | 5019 ± 93 | 7792 ± 56 | 2809 ± 1526 | 3590 ± 355 | 7044 ± 99 | na | na |
| Mg (mg kg ⁻¹) | 2581 ± 176 | na | 4739 ± 715 | 3530 ± 29 | 4198 ± 32 | 4437 ± 28 | 4077 ± 76 | na | na |
| K (mg kg ⁻¹) | 14070 ± 1322 | na | 2922 ± 82 | 2921 ± 11 | 3035 ± 37 | 2342 ± 205 | 2804 ± 65 | na | na |

RA: residuo del arroz; LD: lodo de depuradora; CE: conductividad eléctrica; MOT: materia orgánica total; C_i: carbono total; C_{orgo}: carbono orgánico oxidable; N_i: nitrógeno total; na: no analizado; nd: no detectad

4.3. Análisis del efecto del compostaje sobre los fármacos de estudio

Se realizó un primer ensayo con la finalidad de investigar el efecto del proceso de compostaje con paja de arroz y lodo de depuradora sobre la concentración de los fármacos que se encontraban inicialmente en los residuos a compostar.

El proceso de compostaje con los residuos de paja de arroz y lodo de depuradora a escala de laboratorio en los vasos Dewar funcionó correctamente. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Iranzo y col. (2004), Roca-Pérez y col. (2005) y Roca-Pérez y col. (2009). Así, la humedad de la mezcla se mantuvo entre el 60% y 65% durante el proceso de compostaje y en el periodo final por encima de 45%. Según Iranzo y col. (2004), esta humedad es óptima para el crecimiento de los microorganismos y para asegurar una buena transferencia de oxígeno en el interior de la mezcla.

A lo largo del proceso de compostaje la mezcla inicial sufrió cambios en su aspecto (Figura 4.6). De esta manera, a tiempo cero se puede apreciar la heterogeneidad de ambos residuos, mientras que al final del experimento, el compost adquirió esponjosidad, un color oscuro y un aspecto más homogéneo. Además, en la Figura 4.6 se puede observar la presencia de micelios fúngicos que muestran la elevada actividad biológica de la mezcla a los 7 días de compostaje.

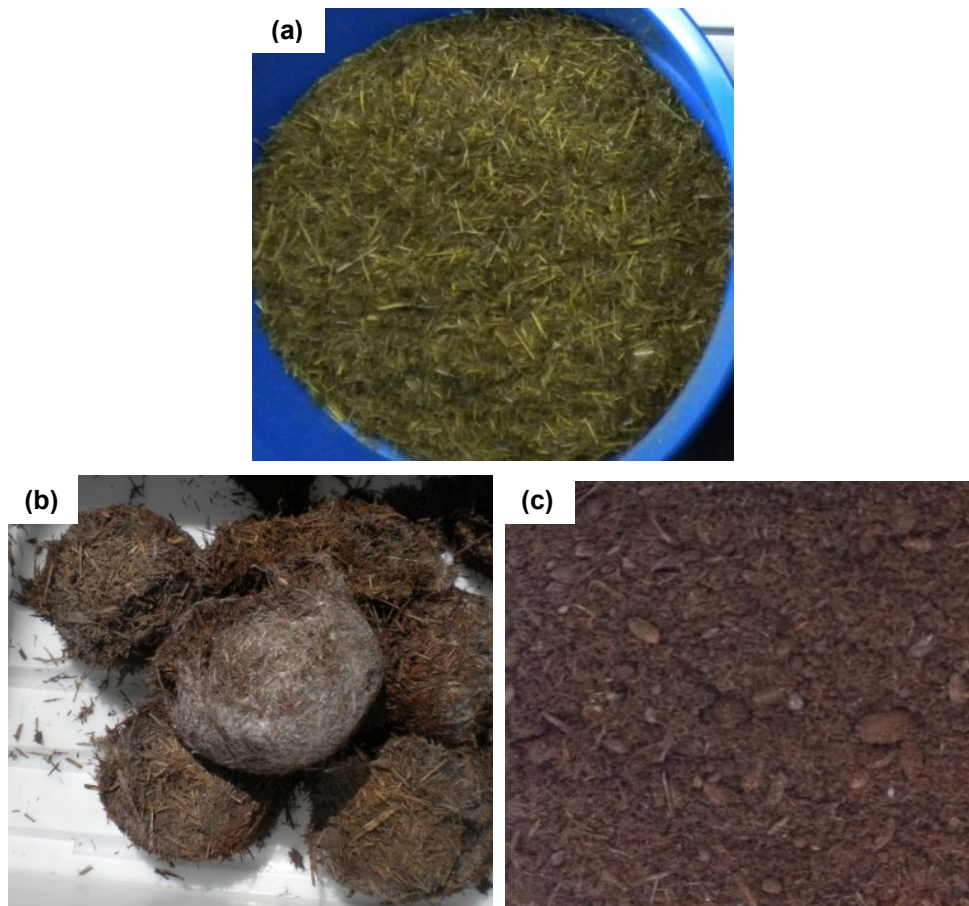


Figura 4.6. Cambios observados en la mezcla con paja de arroz y lodo de depuradora a lo largo del proceso de compostaje: mezcla inicial (a), transcurridos 7 días (b) y compost al final del experimento, 50 días (c).

En la Figura 4.7 se muestra el perfil de las temperaturas a lo largo del proceso de compostaje. Los cambios bruscos de temperatura corresponden a los sucesivos volteos que se realizaron (marcados con una flecha). La fase termófila empezó antes de las 24 h, alcanzándose una temperatura máxima de 72 °C y la fase bio-oxidativa tuvo una duración de unos 25 días. Durante el proceso, la temperatura se mantuvo por encima de 55 °C durante más de 3 días, lo cual es indicativo de que la mezcla

cumplió los requisitos para asegurar la higienización del producto final (Qian y col., 2014).

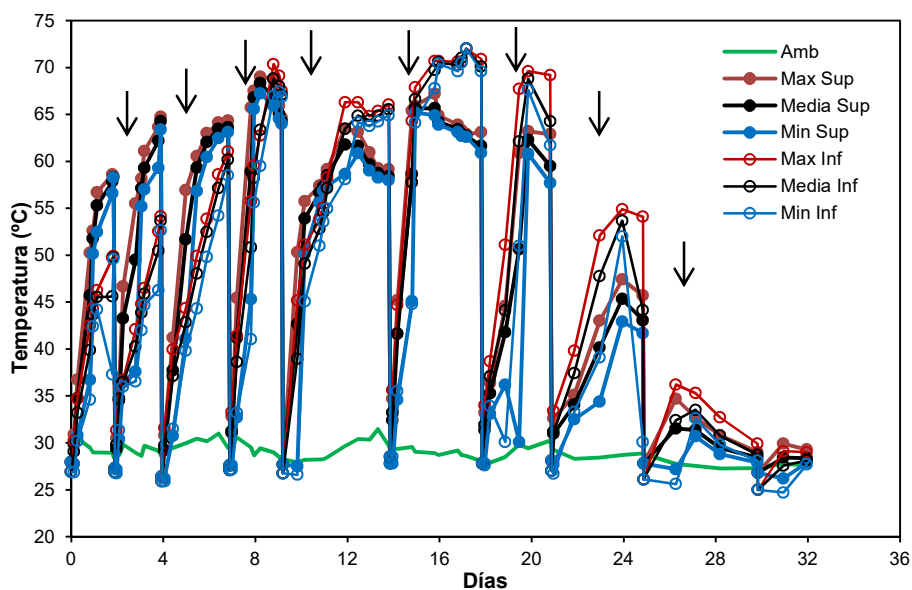


Figura 4.7. Perfil de temperaturas durante el proceso de compostaje. Se muestra la temperatura ambiente (Amb), la máxima (Max), media y la mínima (Min) de la sonda superior (Sup) e inferior (Inf) de los vasos Dewar. Las temperaturas mostradas son las medias de las medidas realizadas y el error estándar (no mostrado para simplificar la figura) fue de $\pm 0,5$ °C. Las flechas indican los volteos realizados durante el experimento.

Los resultados de los análisis fisicoquímicos siguieron el comportamiento típico que se puede observar durante un proceso de compostaje (Figura 4.8). Así, el pH, la conductividad eléctrica y el nitrógeno total experimentaron un aumento, mientras que la materia orgánica total, el carbono orgánico oxidable y la relación C/N disminuyeron.

El pH de la mezcla inicial se situó dentro del intervalo que se recomienda para favorecer la actividad microbiana durante el compostaje (5,5-8,0) (Hu y col., 2015). A lo largo del ensayo el pH alcanzó rangos

alcalinos, lo cual se atribuye al consumo de protones durante la descomposición de ácidos grasos volátiles, a la generación de CO_2 y a la mineralización del nitrógeno orgánico (Oviedo-Ocaña y col., 2015). La conductividad eléctrica se incrementó al final del experimento debido a la concentración de sales que tiene lugar como resultado de la descomposición de la materia orgánica y a la pérdida de masa, hecho que es conocido que ocurre durante el proceso de compostaje (Mohee y col., 2015).

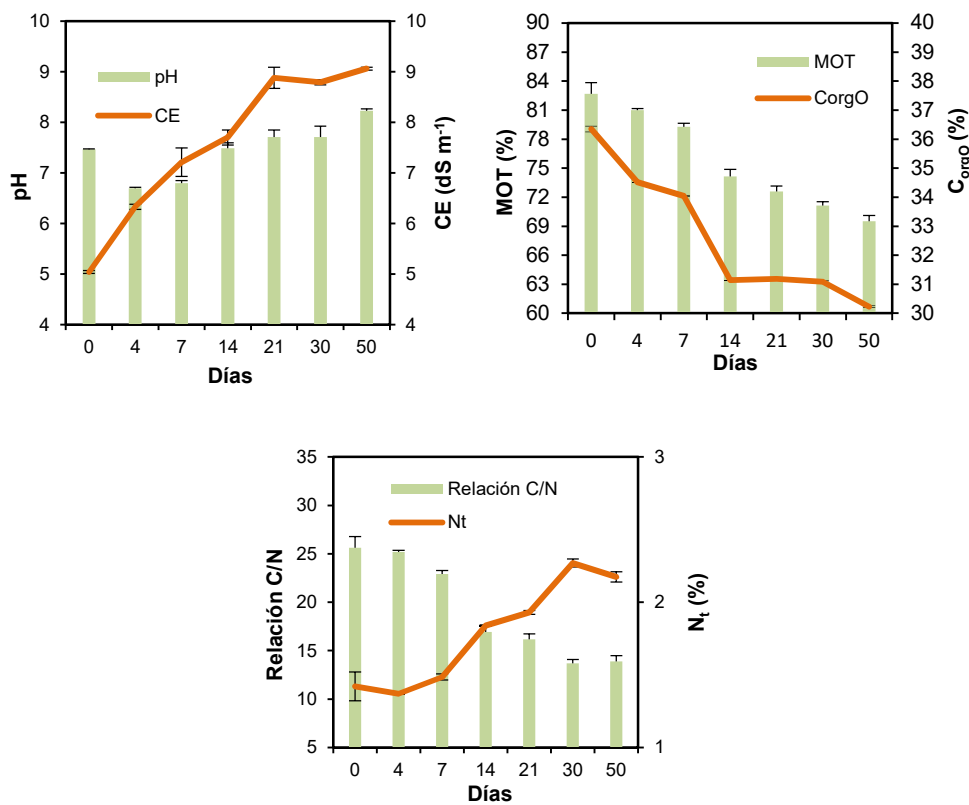


Figura 4.8. Cambios en los parámetros fisicoquímicos observados durante el proceso de compostaje: pH, CE (conductividad eléctrica), MOT (materia orgánica total), C_{orgO} (carbono orgánico oxidable), relación C/N y N_t (nitrógeno total). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias ($n = 3$).

El contenido en materia orgánica y carbono orgánico oxidable disminuyó principalmente en la fase más activa del compostaje (0-20 días), periodo en el cual las temperaturas eran más elevadas (Figura 4.7). Estos hechos indican que tuvo lugar la degradación de la materia orgánica como consecuencia de la actividad de los microorganismos.

El contenido en nitrógeno total aumentó a lo largo del proceso de compostaje, debido a la concentración del nitrógeno por la pérdida de masa (Kulikowska y Gusiatin, 2015) y como consecuencia, la relación C/N disminuyó hasta un valor por debajo de 15, lo cual según Zahra El Ouaquodi y col. (2015) es indicativo de la estabilidad de los residuos tratados.

El seguimiento de las características biológicas durante el proceso de compostaje no ha sido tan estudiado como los parámetros fisicoquímicos. La medida del consumo de oxígeno y de las actividades enzimáticas son los indicadores más frecuentemente utilizados para estudiar la actividad de los microorganismos (Tiquia, 2002; Scoton y col., 2016), mientras que el carbono soluble proporciona una medida indirecta de la actividad biológica, ya que está relacionado con la degradación de la materia orgánica durante el compostaje (Gigliotti y col., 2012).

Como se puede observar en la Figura 4.9, inicialmente el consumo de oxígeno era de 28 mg O₂ g⁻¹ masa seca, mientras que al final del proceso este parámetro disminuyó hasta un valor de 8 mg O₂ g⁻¹ masa seca, lo cual es indicativo de la madurez del compost (Sánchez Arias y col., 2012).

Las deshidrogenasas son enzimas que pertenecen al grupo de las oxidoreductasas que catalizan la oxidación de las sustancias orgánicas (Piotrowska-Cyplik y col., 2013). Se observó un descenso de la actividad deshidrogenasa entre los 4 y 7 días y los 14 y 21 días de compostaje, lo cual podría estar relacionado con la destrucción de las enzimas por efecto de las elevadas temperaturas que se alcanzaron durante estos periodos.

Este parámetro mostró su valor máximo a los 30 días, cuando las temperaturas ya eran próximas a las del ambiente, momento a partir del cual empezó a disminuir probablemente a causa del agotamiento del sustrato que necesitan los microorganismos y provocando una disminución del transporte de electrones (Piotrowska-Cyplik y col., 2013; Nikaeen y col. 2015).

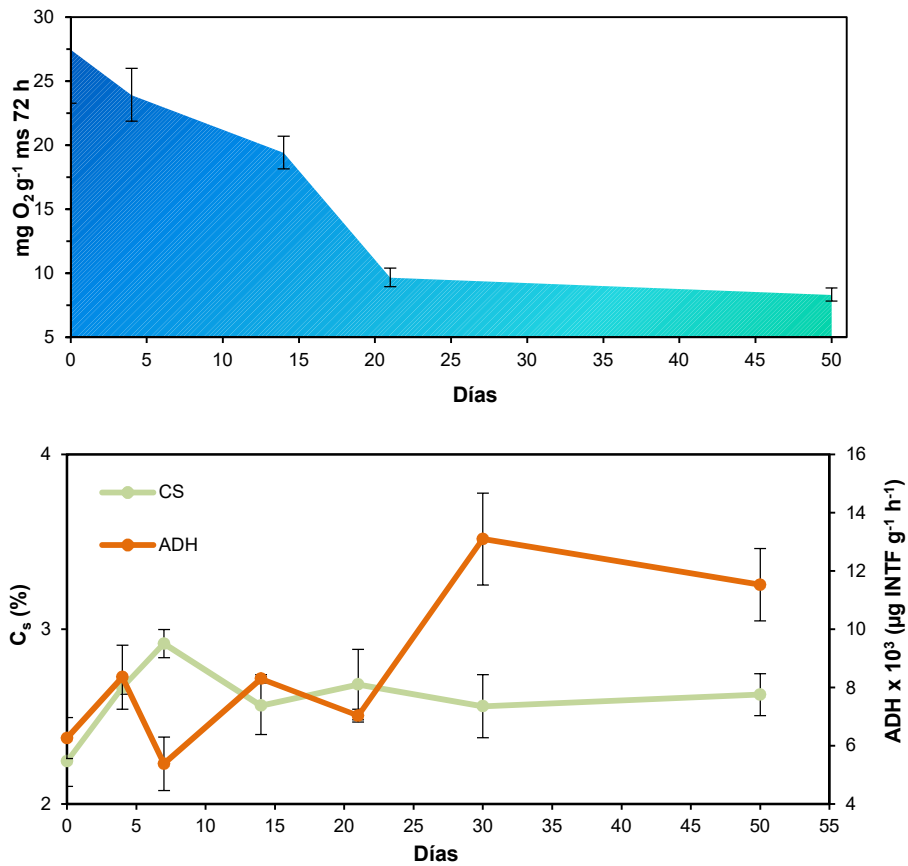


Figura 4.9. Cambios en los parámetros biológicos observados durante el proceso de compostaje: consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1}$ masa seca a las 72 h), C_s (carbono soluble) y ADH (actividad deshidrogenasa). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias ($n = 3$).

Se puede apreciar como el carbono soluble fue decreciendo progresivamente hasta el final del experimento (Figura 4.9), lo cual está relacionado tanto con la mineralización de la materia orgánica como con la repolimerización de más sustancias orgánicas complejas (Chowdhury y col., 2013).

En la Figura 4.10 se muestra la evolución de la concentración de los compuestos encontrados en la mezcla de paja de arroz y lodo de depuradora durante su compostaje. Inicialmente se detectaron azitromicina, ibuprofeno, irbesartán, telmisartán, fluoxetina, venlafaxina, citalopram, y dentro del grupo de los fungicidas de uso agrícola, solamente se encontraron propiconazol, tricyclazol, triticonazol tebuconazol y difenoconazol. Todos estos compuestos se detectaron en concentraciones superiores a los límites de cuantificación (Tabla 4.1), a excepción del triticonazol, que se detectó a nivel de trazas ($0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$). En el caso del ibuprofeno, se detectaron trazas al principio del proceso y al final no se detectó.

Como se puede observar, la azitromicina, el irbesartán, la fluoxetina, el citalopram y el difenoconazol fueron más susceptibles a la degradación que el resto de compuestos. Así, a los 14 días del experimento, la fluoxetina se redujo un 88%, la azitromicina un 47%, el irbesartán y el difenoconazol un 33% y citalopram un 11%. La disminución de la concentración de los fármacos siguió una cinética de primer orden en todos los casos, obteniendo periodos de semirreacción de 4,5 días en la fluoxetina; 17,8 días en la azitromicina, 15,4 días en el irbesartán y 49,5 días en el difenoconazol y citalopram. No existen experiencias sobre la degradación de estos compuestos en concentraciones reales y con el compostaje de este tipo de residuos. Numerosos autores han demostrado que el compostaje con otros residuos de diferente origen pueden reducir la concentración de antibióticos (Zhang y col., 2015b). Los autores Martin y col. (2015) y Vasskog y col. (2009) mostraron como algunos

antihipertensivos, la fluoxetina y el citalopram podían degradarse mediante el compostaje de lodo de depuradora con corteza de abeto y residuos de jardín. En cuanto a los fungicidas azólicos, su persistencia es muy conocida en la literatura científica, debido a que han sido encontrados en diferentes compartimentos ambientales (Peng y col., 2012; Chen y col., 2013).

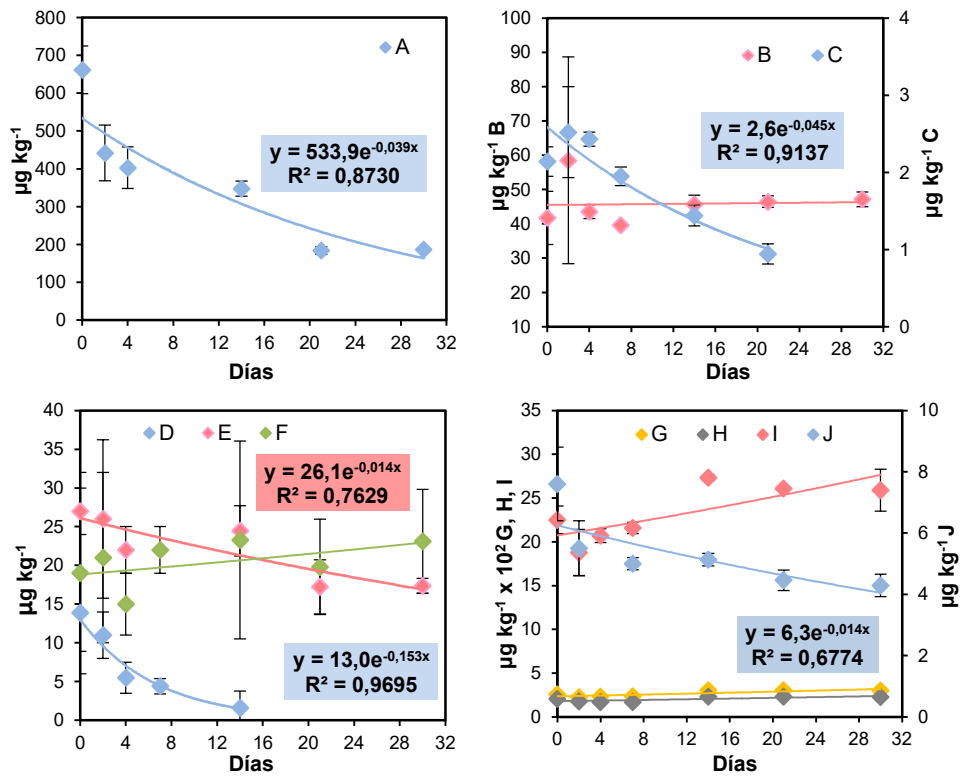


Figura 4.10. Evolución de la concentración de los compuestos detectados en la mezcla de paja de arroz y lodo de depuradora durante el proceso de compostaje: A (azitromicina), B (telmisartán), C (irbesartán), D (fluoxetina), E (citalopram), F (venlafaxina), G (propiconazol), H (triciclazol), I (tebuconazol) y J (difenconazol). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n = 3).

Estos resultados están acorde con los obtenidos en los apartados anteriores de este trabajo. Así, el telmisartán y el tebuconazol que fueron detectados en la mayoría de muestras ambientales, se mostraron resistentes a la degradación. Sin embargo, se ha demostrado por primera vez que el compostaje con paja de arroz y lodo de depuradora es una técnica efectiva para la reducción de la concentración de azitromicina, irbesartán, fluoxetina, citalopram y difenoconazol que se encuentran inicialmente en la mezcla a compostar.

4.4. Influencia de la relación C/N sobre la eliminación de los fármacos durante el compostaje

La relación C/N es uno de los aspectos frecuentemente investigados por representar el balance nutricional durante el proceso de compostaje, ya que la proporción de los residuos influye en el desarrollo del proceso, así como en las propiedades del compost final (Ince y col., 2015; Mdkhudzari y col., 2016; Sevik y col., 2016). Es por ello que, tras observar que el compostaje era capaz de degradar algunos de los compuestos, se propuso estudiar cómo podrían influir diferentes relaciones C/N en la evolución y eliminación de estos contaminantes añadidos a concentraciones elevadas en las mezclas iniciales. Los ensayos se llevaron a cabo mediante la elaboración de cinco mezclas con paja de arroz y lodos de depuradora con relaciones C/N de 37 (M1), 29 (M2), 24 (M3), 20 (M4) y 17 (M5). A partir de esta fase del trabajo, los experimentos se centraron solamente en la adición de compuestos del grupo de los fármacos de uso humano, por tratarse de contaminantes emergentes que necesitan ser investigados.

En las Figuras 4.11 y 4.12 se muestran los perfiles de temperatura de las mezclas a lo largo del proceso de compostaje. La elevada

concentración de fármacos no afectó negativamente al proceso de compostaje de las mezclas. No obstante, se observaron diferencias entre ellas, de manera que las mezclas que se mostraron más activas fueron la que tenían una relación C/N de 20 y 24 (M4 y M3, respectivamente) (Figura 4.12). Así, la fase termófila empezó a las 24 h en M3 y M5 e incluso antes para el caso de M4. Por el contrario, M1 tardó más en alcanzar esta fase (Figura 4.11), lo cual podría ser debido a una mayor pérdida de calor como consecuencia del alto contenido en paja que favorecería la entrada de aire, tal y como describieron Roca-Pérez y col. (2009). Las temperaturas más elevadas se consiguieron en M3 y M4 (71 °C), mientras que en el resto de mezclas las temperaturas máximas fueron de entre 63 °C y 66 °C. Además, la fase bio-oxidativa fue de mayor duración en la mezcla M3 (16 días).

Como se puede observar en la Figura 4.11, el consumo de oxígeno fue variable al inicio del proceso de compostaje, mientras que los valores se situaron entre 9 y 10 mg O₂ g⁻¹ masa seca al final del proceso.

Excepto para el pH, que sufrió un descenso en el caso de M5, en general el comportamiento de los parámetros fisicoquímicos siguió la evolución normal dentro de un proceso de compostaje llevado a cabo adecuadamente y su variación estuvo acorde con las características iniciales de cada mezcla (Figuras 4.13, 4.14 y 4.15). Algunos autores (Getahun y col., 2012) también observaron una continua disminución del pH durante el proceso de compostaje. La variabilidad observada en la relación C/N al final de los experimentos es lógica, y posiblemente fue debido a la gran diferencia en este parámetro entre las cinco mezclas.

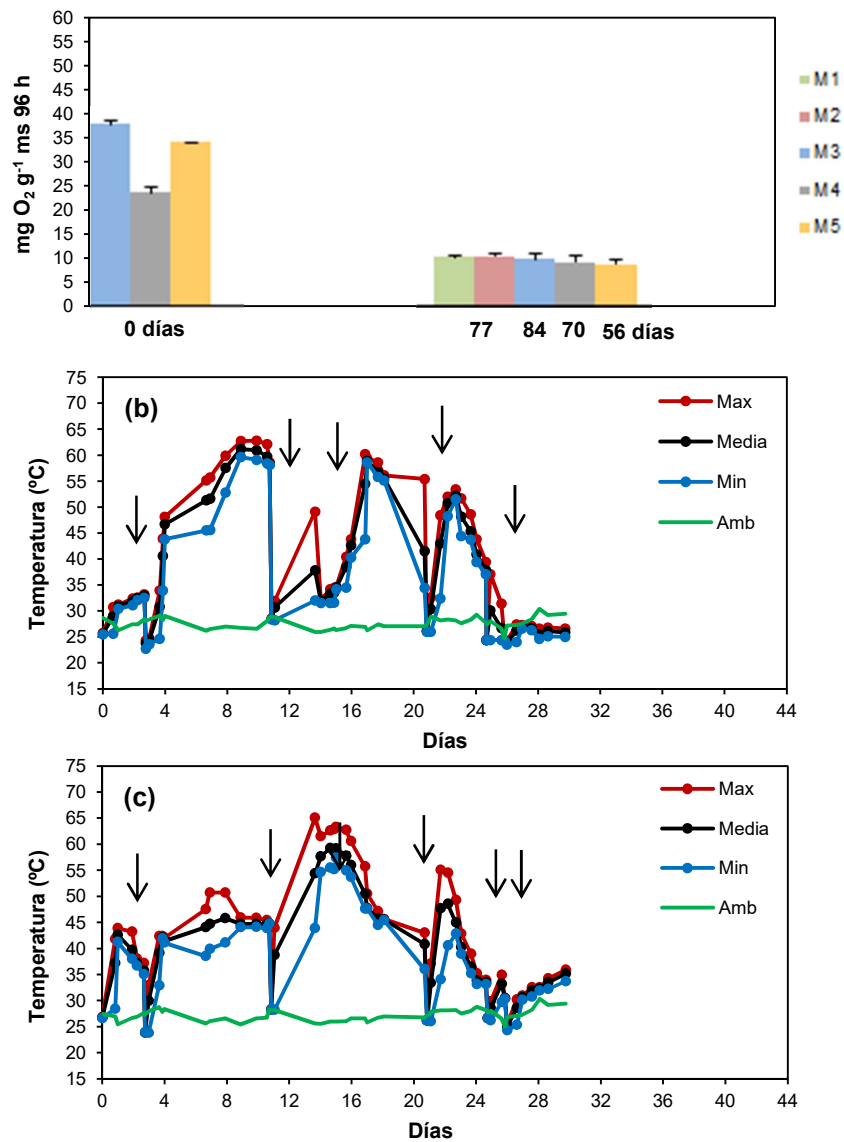


Figura 4.11. Consumo de oxígeno al inicio y final del proceso de compostaje de las mezclas M1, M2, M3, M4 y M5 (a) y perfil de temperaturas de M1 (b) y M2 (c). Se muestra la temperatura ambiente (Amb), la máxima (Max), media y la mínima (Min) de las sondas de los vasos Dewar. Las temperaturas mostradas son las medias de las medidas realizadas y el error estándar (no mostrado para simplificar la figura) fue de $\pm 0,5$ °C. Las flechas indican los volteos realizados durante el experimento.

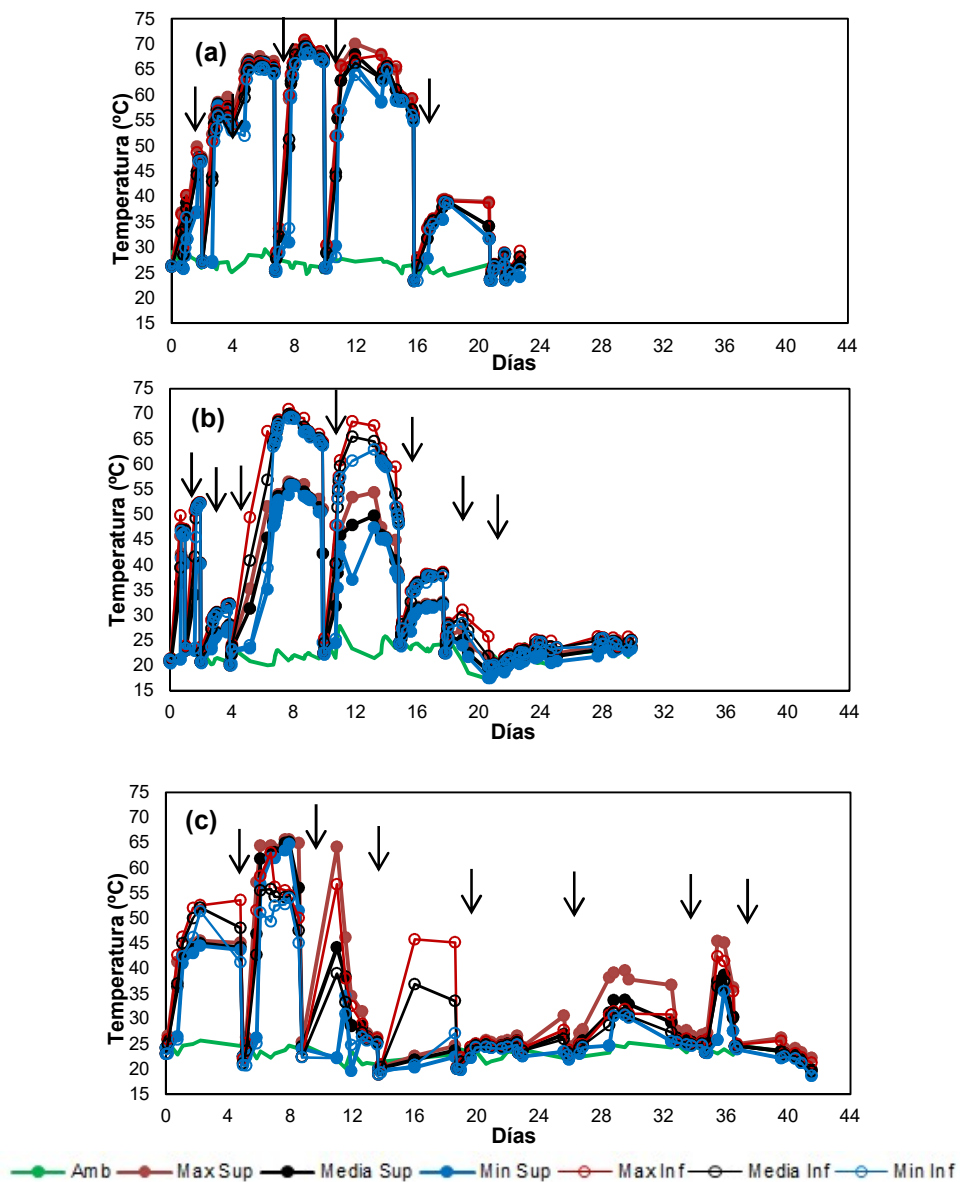


Figura 4.12. Perfil de temperaturas de las mezclas M3 (a), M4 (b) y M5 (c). Se muestra la temperatura ambiente (Amb), la máxima (Max), media y la mínima (Min) de la sonda superior (Sup) e inferior (Inf) de los vasos Dewar. Las temperaturas mostradas son las medias de las medidas realizadas y el error estándar (no mostrado para simplificar la figura) fue de $\pm 0,5$ °C. Las flechas indican los volteos realizados durante el experimento.

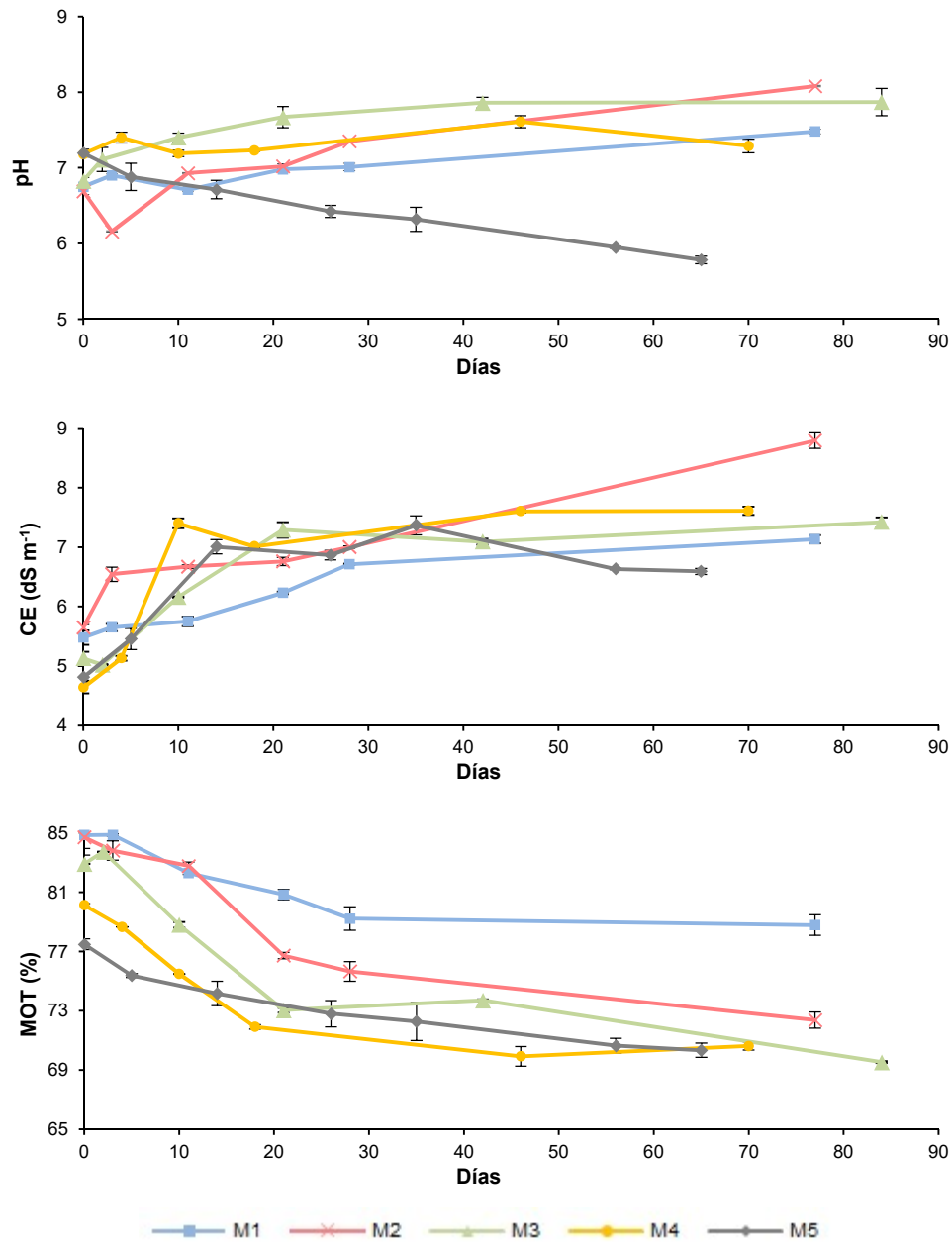


Figura 4.13. Cambios en los parámetros fisicoquímicos observados durante el proceso de compostaje de las mezclas M1, M2, M3, M4 y M5: pH, CE (conductividad eléctrica) y MOT (materia orgánica total). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

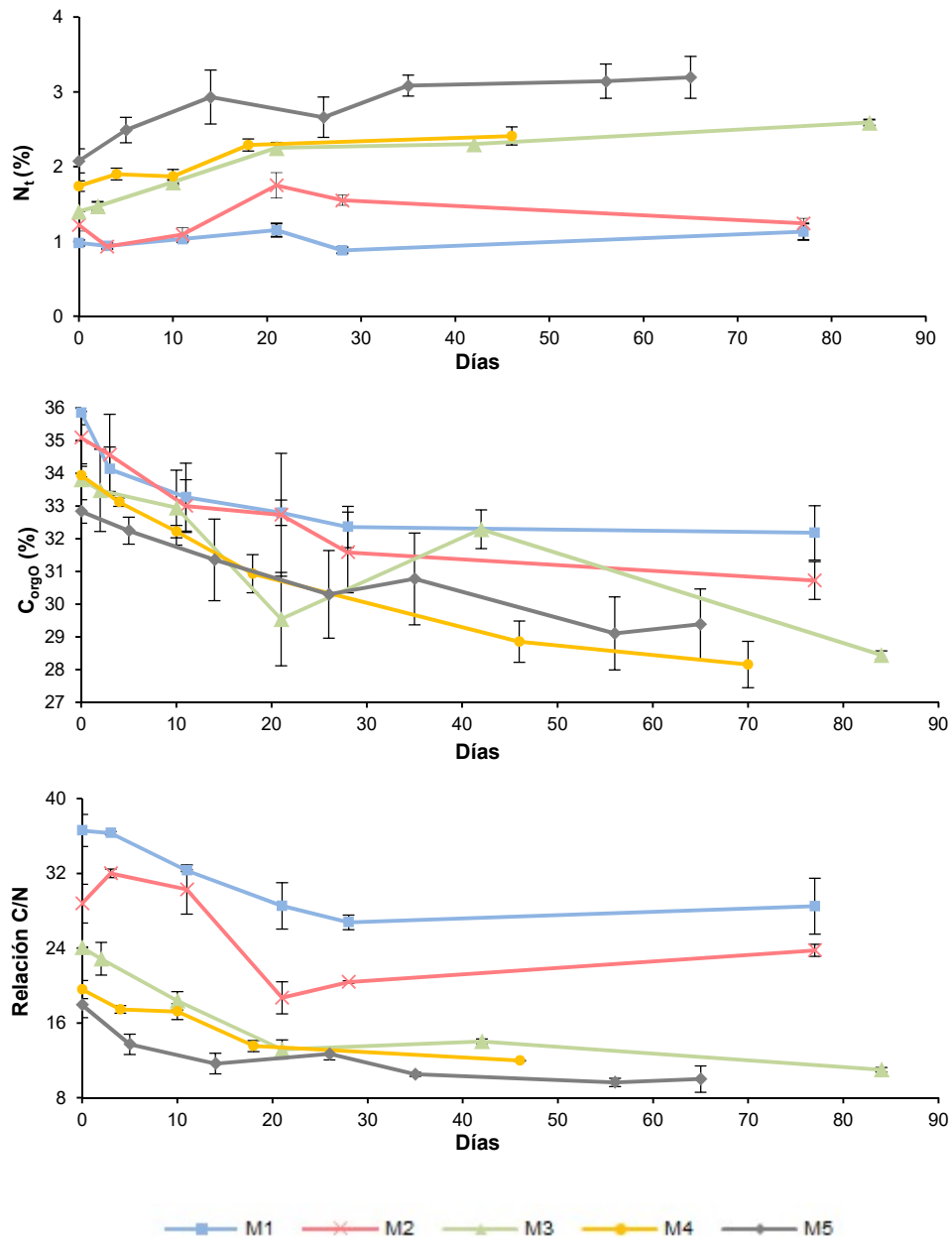


Figura 4.14. Cambios en los parámetros fisicoquímicos observados durante el proceso de compostaje de las mezclas M1, M2, M3, M4 y M5: N_t (nitrógeno total), C_{orgO} (carbono orgánico oxidable) y relación C/N. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias ($n = 3$).

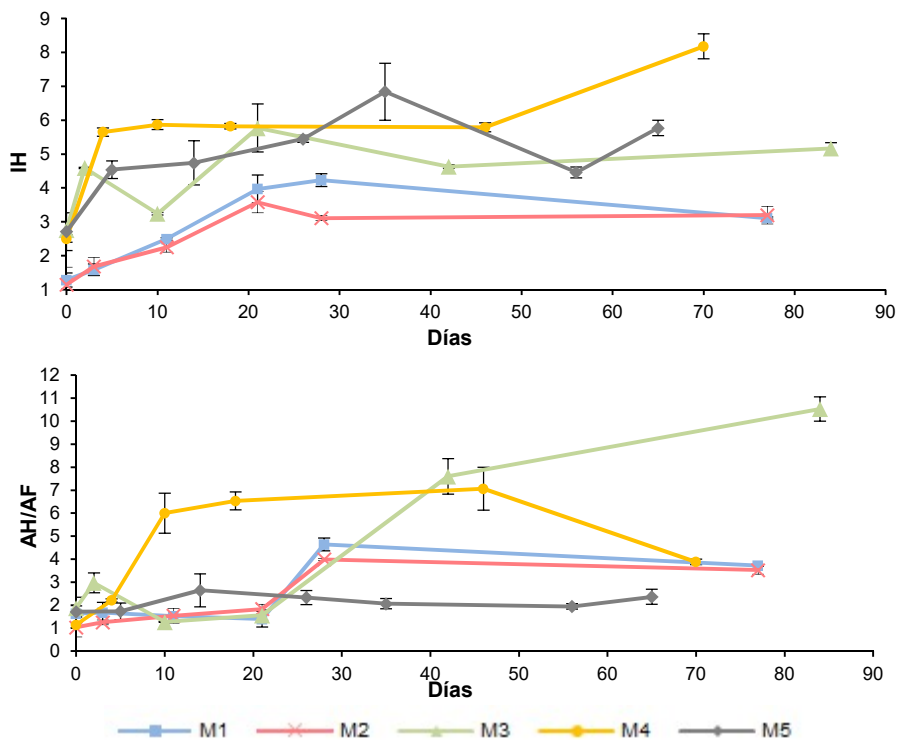


Figura 4.15. Seguimiento de las sustancias húmicas durante el proceso de compostaje de las mezclas M1, M2, M3, M4 y M5: IH (índice de humificación) y AH/AF (relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

El incremento de la estabilidad de la materia orgánica durante el compostaje refleja el correcto progreso del proceso y se ha usado frecuentemente para definir la madurez del compost final (Benlboukht y col., 2016). Así, el índice de humificación y la relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos se incrementaron a lo largo de los experimentos debido a que durante el proceso de compostaje y después de la fase bio-oxidativa, se forman estructuras húmicas poliméricas complejas como consecuencia de las reacciones de polimerización y condensación que tienen lugar a partir de moléculas simples (Wang y col., 2014). Es

importante destacar que en general, la cantidad de sustancias húmicas fue mayor en M3 y M4 al final del proceso del compostaje (Figura 4.15).

La evolución de la concentración de los medicamentos a lo largo del proceso de compostaje de las cinco mezclas se muestra en las Figuras 4.16 y 4.17. Las distintas proporciones de residuos de las mezclas influyeron en la degradación de los fármacos. Así, la azitromicina, la olanzapina, el ibuprofeno, el irbesartán y la bencilpenicilina se degradaron en todas aquellas mezclas que se añadieron inicialmente. Sin embargo, destacar que la concentración de telmisartán solamente se redujo en M5 y la correspondiente a la fluoxetina, la venlafaxina y el citalopram en M2. En el caso de la bencilpenicilina, esta mostró la degradación más rápida, reduciéndose un 99% a los dos días de compostaje. Esto podría estar relacionado con el hecho de que se trata de un fármaco con un valor de K_{ow} (coeficiente de reparto octanol-agua) bajo y una alta solubilidad (Tabla 3.1). En todos los casos en que hubo degradación, esta siguió una cinética de degradación de primer orden, a excepción de la bencilpenicilina (Tabla 4.4). En general, se obtuvieron buenos ajustes, exceptuando en M1 y M2 para la azitromicina (0,7063 y 0,6509) y la fluoxetina (0,7137). Las mezclas M3 y M5 mostraron un menor periodo de semirreacción para el caso de la azitromicina (9,1 y 6,5 días), con un mejor ajuste en M3 ($R^2 = 0,9149$). Las mezclas M1 y M2 en el caso de la olanzapina (2,0 y 2,5 días) con un ajuste muy bueno en M2 (0,9928), en el caso del ibuprofeno (4,3 y 3,9 días) y el irbesartán (9,0 y 10,5 días). Por el contrario, la venlafaxina fue el fármaco que presentó una degradación más lenta, con un periodo de semirreacción de 99,0 días.

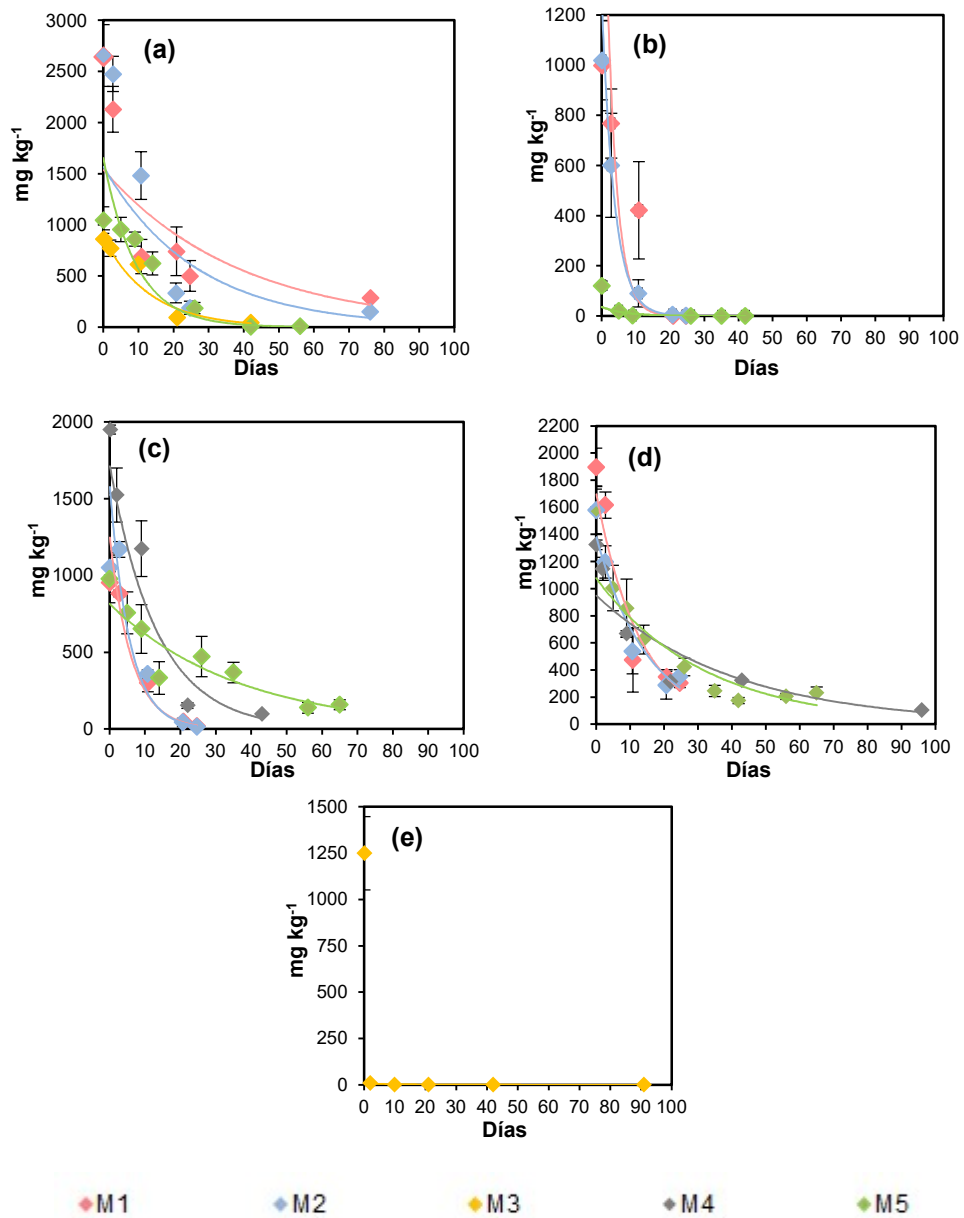


Figura 4.16. Evolución de la concentración de los fármacos durante el proceso de compostaje de M1, M2, M3, M4 y M5: azitromicina (a), olanzapina (b), ibuprofeno (c), irbesartán (d) y bencilpenicilina (e). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

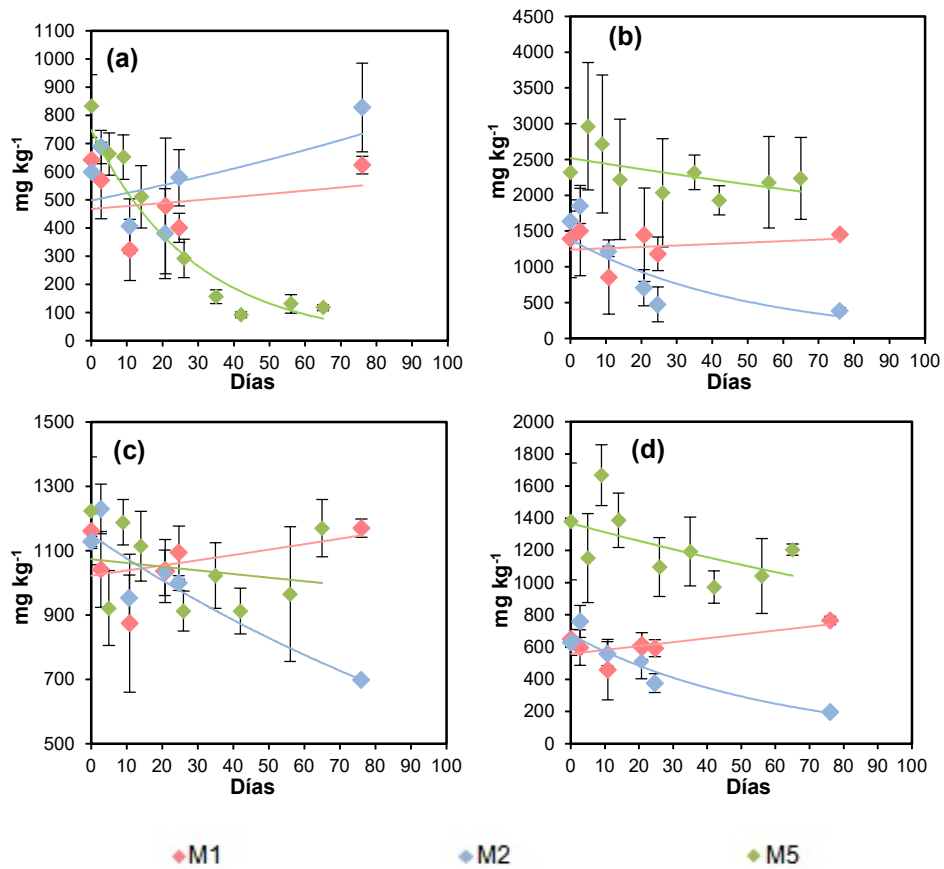


Figura 4.17. Evolución de la concentración de los fármacos durante el proceso de compostaje de M1, M2, M3, M4 y M5: telmisartán (a), fluoxetina (b), venlafaxina (c) y citalopram (d). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias ($n = 3$).

Tabla 4.4

Variables correspondientes a las ecuaciones de las cinéticas de degradación de primer orden para los fármacos durante el compostaje de M1, M2, M3, M4 y M5.

| Fármaco | Mezcla | Variables | | | |
|--------------|--------|-----------|--------|--------|------------------|
| | | C_0 | k | R^2 | $t_{1/2}$ (días) |
| Azitromicina | M1 | 1540,6 | -0,026 | 0,7063 | 26,7 |
| | M2 | 1571,2 | -0,038 | 0,6509 | 18,2 |
| | M3 | 875,3 | -0,076 | 0,9149 | 9,1 |
| | M5 | 1651,1 | -0,106 | 0,8412 | 6,5 |
| Olanzapina | M1 | 2295,5 | -0,339 | 0,9044 | 2,0 |
| | M2 | 1266,4 | -0,273 | 0,9928 | 2,5 |
| | M5 | 35,8 | -0,153 | 0,8616 | 4,5 |
| Ibuprofeno | M1 | 1264,5 | -0,162 | 0,9799 | 4,3 |
| | M2 | 1600,4 | -0,178 | 0,9708 | 3,9 |
| | M4 | 1727,2 | -0,075 | 0,8955 | 9,2 |
| | M5 | 815,2 | -0,027 | 0,8758 | 25,7 |
| Irbesartán | M1 | 1707,4 | -0,077 | 0,9117 | 9,0 |
| | M2 | 1388,4 | -0,066 | 0,9182 | 10,5 |
| | M4 | 951,2 | -0,025 | 0,8868 | 27,7 |
| | M5 | 1091,0 | -0,029 | 0,8663 | 23,9 |
| Telmisartán | M5 | 748,5 | -0,035 | 0,8667 | 19,8 |
| Fluoxetina | M2 | 1381,5 | -0,020 | 0,7137 | 34,7 |
| Venlafaxina | M2 | 1148,8 | -0,007 | 0,8807 | 99,0 |
| Citalopram | M2 | 677,0 | -0,017 | 0,9422 | 40,8 |

Este es el primer estudio realizado sobre la influencia de la relación C/N en la atenuación de fármacos durante el proceso de compostaje de paja de arroz y lodo de depuradora. Estos resultados, junto con los perfiles de temperatura y los parámetros fisicoquímicos, son indicativos de que el proceso de compostaje con paja de arroz y lodo de depuradora con una relación C/N situada entre 20 y 29 se muestra más activo y eficaz para la eliminación de fármacos a concentraciones elevadas.

4.5. Efecto del compostaje sobre la degradación de fármacos adicionados en ensayos independientes

En este apartado se muestran los resultados del estudio sobre la evolución de la concentración de los fármacos durante el proceso de compostaje con una relación C/N dentro del intervalo de 20-29, siendo el más óptimo para la reducción de la mayoría de los contaminantes, tal y como se mostró en el apartado anterior. Los fármacos fueron añadidos artificialmente por separado en cuatro experimentos (azitromicina; ibuprofeno; irbesartán y telmisartán; fluoxetina, venlafaxina y citalopram), preparando además, dos controles sin adicionar los fármacos. Debido a su rápida degradación, la olanzapina y bencilpenicilina (Figura 4.16) no se analizaron a partir de esta fase del trabajo.

Los perfiles de temperatura de las mezclas que fueron contaminadas con los fármacos se muestran en la Figura 18. El ensayo de compostaje con la adición de ibuprofeno no tuvo un funcionamiento correcto debido a que no se alcanzaron temperaturas superiores a 55 °C durante más de tres días, es por ello que no se muestran los resultados. No se observaron diferencias entre las mezclas con la presencia de los fármacos y las mezclas control sin adicionar los compuestos (datos no mostrados). Así, en todas las mezclas se alcanzó la fase termófila en menos de 24h, a excepción del ensayo con azitromicina, que se alcanzó transcurridas 48 h. Este retraso pudo deberse a un efecto del antibiótico sobre la población bacteriana debido a la elevada concentración inicial. Estas diferencias también fueron observadas por Zhang y col. (2015b) y Selvam y col. (2012). En todos los casos se alcanzaron temperaturas máximas de entre 66 °C y 72 °C y la fase termófila tuvo una duración de aproximadamente 27 días.

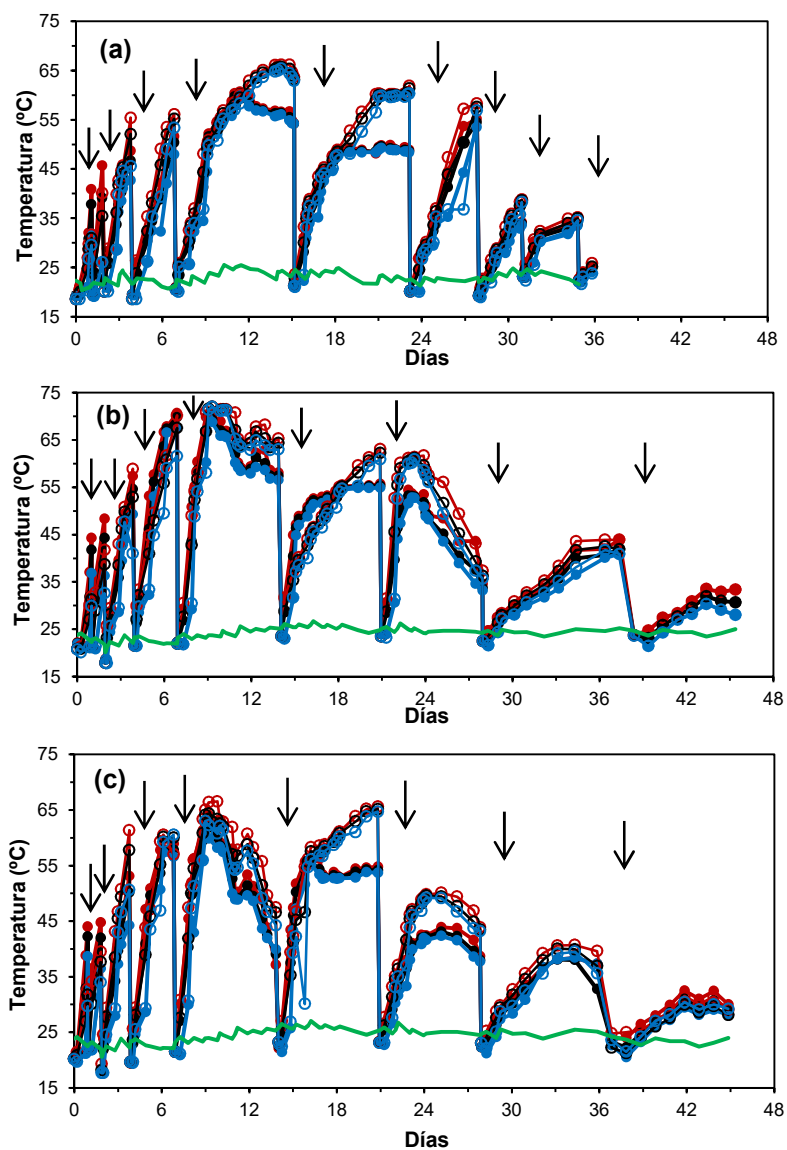


Figura 4.18. Perfil de temperaturas de las mezclas con azitromicina (a), con antihipertensivos (b) y con antidepresivos (c). Se muestra la temperatura ambiente (Amb), la máxima (Max), media y la mínima (Min) de la sonda superior (Sup) e inferior (Inf) de los vasos Dewar. Las temperaturas mostradas son las medias de las medidas realizadas y el error estándar (no mostrado para simplificar la figura) fue de $\pm 0,5$ °C. Las flechas indican los volteos realizados durante los experimentos.

Los parámetros fisicoquímicos y biológicos nos indicaron que el proceso de compostaje de todas las mezclas se desarrolló de forma normal, sin observarse de nuevo, un efecto de la elevada concentración de los fármacos sobre el funcionamiento del proceso (Figura 4.19).

En la Figura 4.20 se muestra evolución de la concentración de la azitromicina y el irbesartán. Ambos fármacos se degradaron a lo largo del proceso de compostaje, mientras que la fluoxetina, el citalopram, el telmisartán y la venlafaxina fueron más persistentes (datos no mostrados). Así, la azitromicina se degradó prácticamente en su totalidad a los 23 días, en concreto un 98%. De hecho, en las primeras 48 h ya se había reducido casi la mitad de la concentración del fármaco (47%) y a los 21 días, el irbesartán se redujo un 96%. En ambos casos la disminución de la concentración de los fármacos siguió una cinética de degradación de primer orden, la cual mostró un periodo de semirreacción de 3,8 días para la azitromicina y 7,6 días en el irbesartán. La concentración de la fluoxetina y el citalopram se redujo ligeramente, mostrando una tasa de degradación muy lenta, de 43,3 días y 115,5 días, respectivamente y la venlafaxina y el telmisartán fueron totalmente resistentes a la degradación (datos no mostrados). Estos resultados están acorde a los obtenidos en apartados anteriores, en los cuales se demostró la persistencia de estos fármacos. Tras observar la eliminación satisfactoria de la azitromina y el irbesartán, se decidió adicionar por segunda vez estos fármacos a concentraciones elevadas a los 23 días y a los 36 días (Figura 4.20), con la finalidad de investigar su posible eliminación en la última fase del compostaje. Así, se observó como la azitromicina también se degradó, mientras que no ocurrió lo mismo con el irbesartán. Al final de los ensayos, la azitromicina se redujo un 67% mostrando un periodo de semirreacción de 9,4 días.

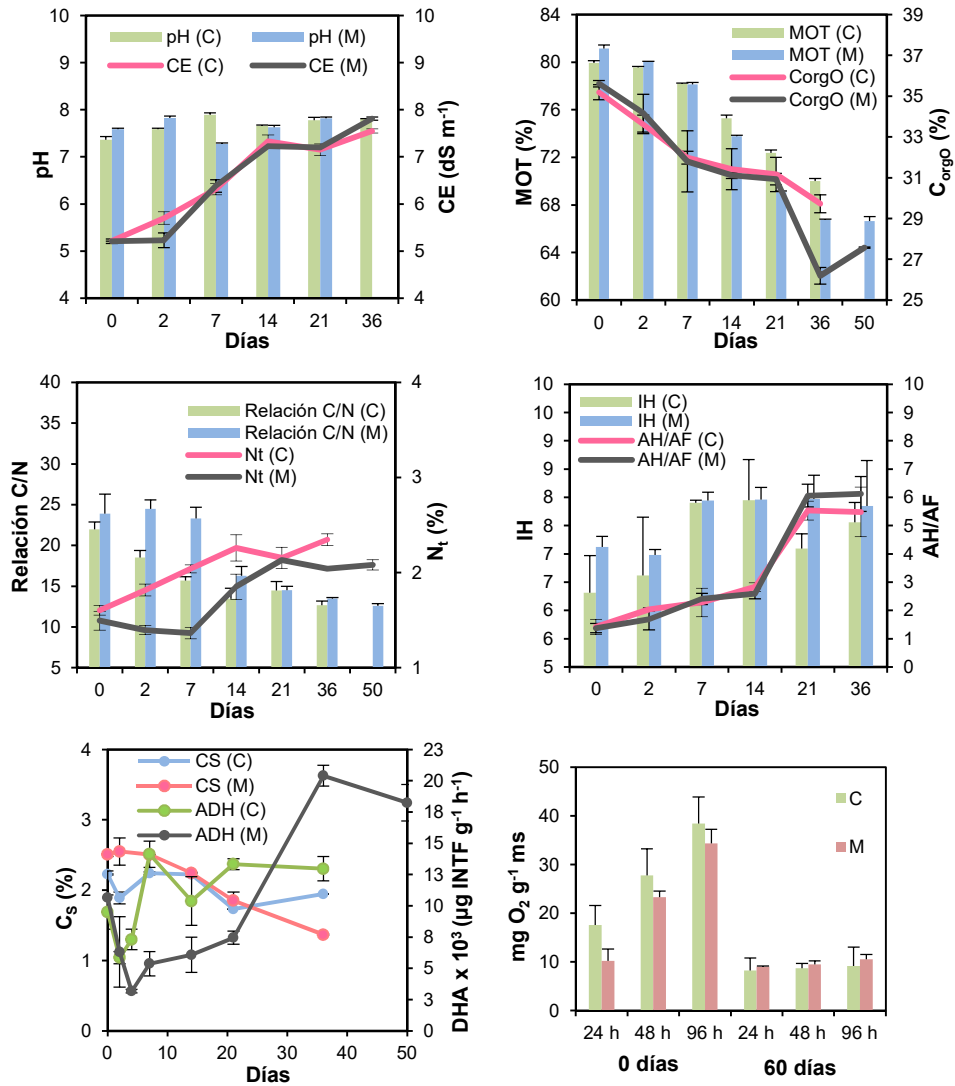


Figura 4.19. Cambios en los parámetros fisicoquímicos y biológicos observados durante el proceso de compostaje de una mezcla control (C) y de una mezcla con presencia de fármacos (M): pH, CE (conductividad eléctrica), MOT (materia orgánica total), C_{orgO} (carbono orgánico oxidable), relación C/N, N_t (nitrógeno total), IH (índice de humificación), AH/AF (relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos), C_s (carbono soluble), ADH (actividad deshidrogenasa) y consumo de oxígeno (mg O₂ g⁻¹ masa seca). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

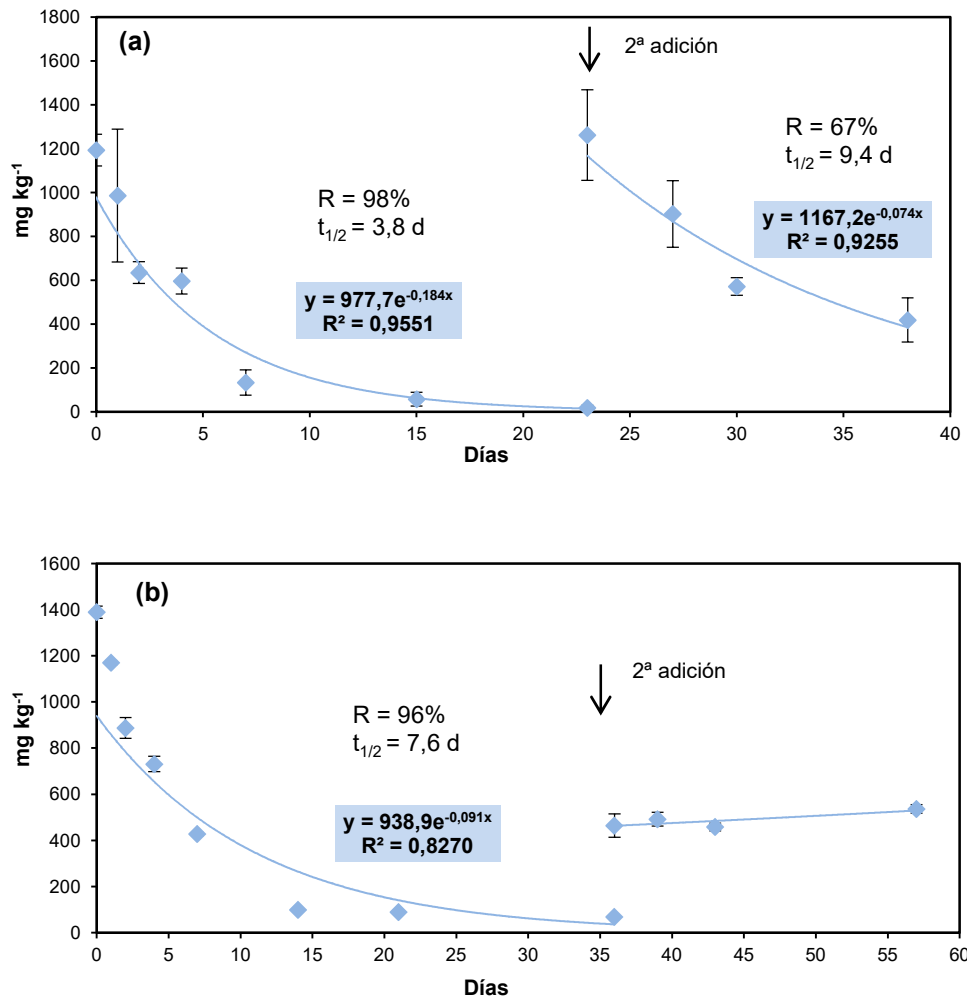


Figura 4.20. Evolución de la concentración de la azitromicina (a) y del irbesartán (b) durante el proceso de compostaje en dos ensayos independientes. Los fármacos se añadieron a los 0 días y a los 23 días se volvió a adicionar azitromicina y a los 36 días, irbesartán. Se muestran las ecuaciones de las cinéticas de degradación de primer orden en las primeras etapas del compostaje (izquierda) y durante la fase de maduración (derecha), así como el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción ($t_{1/2}$) en días (d). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

Aunque no se trate del mismo tipo de quimioterápicos, los resultados que se obtuvieron fueron semejantes a los descritos por Liu y col. (2015a) y Ho y col. (2013), los cuales estudiaron la degradación de las sulfonamidas y nueve antibióticos de uso veterinario diferentes en estiércol, obteniendo periodos de semireacción entre 1,3 y 3,8 días. Mediante el compostaje de paja de arroz y estiércol, Chai y col. (2016) obtuvieron periodos de semirreacción de 2,4 a 5,5 días para tres tetraciclinas. Los autores Selvam y col. (2013) llevaron a cabo el compostaje de estiércol de cerdo y serrín contaminados con tetraciclina en condiciones termófilas manteniendo la temperatura a 55 °C durante seis semanas. Transcurridos 42 días del experimento, continuaron detectando el fármaco en el compost, sugiriendo que los microorganismos mesófilos estaban involucrados en su degradación. Otros autores han demostrado que el compostaje llevado a cabo de forma correcta (a altas temperaturas y buena aireación), así como la incorporación de una fuente de materia orgánica como por ejemplo el serrín, facilita el aumento de la temperatura y proporciona sitios de unión adicionales obteniendo como resultado una reducción de la concentración de los antibióticos a lo largo del proceso de compostaje (Kim y col., 2012; Selvam y col., 2012; Zhang y col., 2015c).

En cuanto a los antihipertensivos, no existen estudios sobre el compostaje con este tipo de fármacos. Las diferencias observadas en la degradación entre el irbesartán y el telmisartán podrían deberse a su estructura química. De hecho, la molécula de irbesartán se caracteriza por presentar un grupo amida funcional que es fácilmente hidrolizable, mientras que el telmisartán tiene una masa molecular y un K_{ow} más elevados, mayor número de anillos aromáticos y mucha menos solubilidad (Tabla 3.1), lo cual le confiere mayor estabilidad haciéndolo difícil de atacar fisicoquímica y biológicamente. Asimismo, algunos autores como Yan y col. (2014), indican que algunos antihipertensivos, como es el caso del metoprolol, son persistentes en los lodos tras su tratamiento en EDARs.

Resultados semejantes, aunque con otros fármacos, han sido obtenidos por Vasskog y col. (2009), los cuales encontraron que los antidepresivos fluoxetina y paroxetina mostraron mayores tasas de reducción que sus homólogos citalopram y sertralina, sin poder dar una explicación a este hecho.

Por lo que respecta a los antidepresivos, el único estudio similar es el de Vasskog y col. (2009) y nuestros resultados están acorde, ya que estos autores indicaron que la fluoxetina se reducía en mayor medida que el citalopram durante el compostaje de lodo de depuradora, corteza de abeto y compost de jardín. Schlusener y col. (2015) también obtuvieron porcentajes de eliminación mayores en la fluoxetina>citalopram>venlafaxina, pero en este caso, entre los influentes y efluentes de EDARs. Lajeunesse y col. (2013) encontraron menores eficiencias en la eliminación de la venlafaxina y el citalopram que en el resto de antidepresivos. No obstante, el porcentaje de reducción de fluoxetina fue bajo, en comparación con los descritos en estudios previos y más recientemente por Suárez y col. (2010) (92% de eliminación), en un reactor aerobio con biomasa procedente de una planta piloto de lodo activado. En este sentido, Fernández-Fontaina y col. (2012) también mostraron porcentajes elevados de reducción de la fluoxetina (75-90%) en un reactor inoculado con bacterias nitrificantes, así como Serrano y col. (2011), obteniendo porcentajes del 82% al 89%. Sin embargo, existen numerosos estudios que indican que la fluoxetina no se elimina eficientemente en las EDARs y que muestra un comportamiento recalcitrante que da como resultado porcentajes bajos de eliminación, como es nuestro caso (Redshaw y col., 2008; Hedgesped y col., 2012; Alvarino y col., 2015; Moreira y col., 2015; Silva y col., 2015). En cuanto a la persistencia de la venlafaxina, Stadler y col. (2015) citaron diversos estudios en EDARs en las cuales encontraron pérdidas moderadas de este fármaco. Sin embargo, Arlos y col. (2015) indicaron que se trataba de un compuesto persistente en su estudio en

EDARs de Canadá. Estas diferencias en la degradación de los tres antidepresivos podrían estar relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas, ya que la fluoxetina y el citalopram tienen un peso molecular similar, además de que ambos presentan dos anillos aromáticos y el elemento flúor, a diferencia de la venlafaxina (Tabla 3.1).

Por lo tanto, la casi completa eliminación de la azitromicina e irbesartán es indicativa de que las condiciones del compostaje con paja de arroz y lodo de depuradora fueron favorables para la biodegradación de estos fármacos. Además, el hecho de que la concentración de azitromicina también se redujera en la última fase del compostaje, pone de manifiesto la importancia de los microorganismos mesófilos en la eliminación de este fármaco.

4.5.1. Correlación entre la concentración de los fármacos y los parámetros analíticos

Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los parámetros fisicoquímicos y biológicos y la concentración de medicamentos, para disponer de un indicador simple que ayudara a interpretar la influencia del proceso de compostaje en la eliminación de los fármacos (Tabla 4.5). Los resultados mostraron fuertes correlaciones (a $p < 0,05$ y $p < 0,01$) en el caso del irbesartán, la fluoxetina y el citalopram. Así, estos fármacos se correlacionaron positivamente con la materia orgánica total, el carbono orgánico oxidable y relación C/N; mientras que se correlacionaron negativamente con la conductividad eléctrica y el nitrógeno total. En cuanto a las sustancias húmicas, fue solamente la fluoxetina la que se correlacionó negativamente con el índice de humificación, mientras que el irbesartán y citalopram con la relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos. Por lo que respecta a los parámetros biológicos,

solamente el citalopram se correlacionó negativamente con la actividad deshidrogenasa y los fármacos fluoxetina y citalopram se correlacionaron positivamente con el carbono soluble. Estos resultados estadísticos confirman que el proceso de compostaje tuvo una influencia en la eliminación de estos medicamentos y que su biodegradación sigue un patrón de comportamiento relacionado con la degradación de la materia orgánica y previa a la mineralización y humificación de la misma.

Tabla 4.5

Coefficiente de correlación de Pearson obtenido entre la concentración de fármacos y los parámetros fisicoquímicos y biológicos de los experimentos de compostaje con fármacos adicionados por separado: CE (conductividad eléctrica); MOT (materia orgánica total); C_{orgO} (carbono orgánico oxidable); N_t (nitrógeno total); IH (índice de humificación); AH/AF (relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos); C_s (carbono soluble); ADH (actividad deshidrogenasa).

| | pH | CE | MOT | C_{orgO} | N_t | C/N | IH | AH/AF | C_s | ADH |
|---|----|----------|---------|------------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| A | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| B | ns | -0,941** | 0,787* | 0,886** | -0,901** | 0,972** | ns | -0,845* | ns | ns |
| C | ns | -0,965** | 0,780** | 0,964** | -0,758* | 0,875** | -0,808* | ns | 0,862* | ns |
| D | ns | -0,910** | 0,843** | 0,931** | -0,825* | 0,900** | ns | -0,774* | 0,962** | -0,795* |

ns: no significativo; * significativo a $p < 0,05$; ** significativo a $p < 0,01$; A: azitromicina; B: irbesartán; C: fluoxetina; D: citalopram.

4.6. Estudio del efecto de la temperatura y los materiales sobre la eliminación de los fármacos

En este apartado se muestran los resultados del estudio del efecto de los factores más importantes de naturaleza abiótica (temperatura) y biótica, teniendo en cuenta las diferentes poblaciones microbianas asociadas a los distintos tipos de residuos, sobre la posible reducción de la concentración de azitromicina, ibuprofeno, irbesartán, telmisartán, fluoxetina, venlafaxina y citalopram. Para ello, se realizaron experimentos de incubación con paja de arroz, una suspensión de lodo acuosa, con la mezcla de ambos residuos y con erlenmeyers que contenían agua solamente, a diferentes temperaturas (28 °C y 55 °C) y en condiciones de oxigenación pasiva, a los cuales se les adicionaron los fármacos por separado a concentraciones elevadas en cuatro experimentos (antibiótico; antiinflamatorio; antihipertensivos; antidepresivos).

Destacar que en todos los casos y al inicio de los experimentos, las suspensiones con lodo contenidas en los erlenmeyers presentaban un color negro y olor desagradable, mientras que al final de los experimentos el color pasó a ser pardo oscuro y se apreciaba un olor que recordaba al que desprende el suelo húmedo, lo cual se debió a la oxigenación y oxidación parcial de la materia orgánica. El seguimiento de los parámetros fisicoquímicos durante los experimentos de incubación con antihipertensivos y antidepresivos se muestra en las Tablas 4.6 y 4.7. De la misma forma que ocurrió durante los ensayos de compostaje anteriores, el carbono orgánico oxidable y la relación C/N disminuyeron, mientras que el nitrógeno total se incrementó. Además, estos cambios fueron más notables en los experimentos a 28 °C que a 55 °C.

Tabla 4.6

Cambios en el carbono orgánico oxidable (C_{orgO}), nitrógeno total (N_t) y relación C/N durante los experimentos de incubación con el residuo del arroz (RA) y mezcla con antihipertensivos (M) a 28 °C y 55 °C. Se muestra el porcentaje (%) de aumento (+) o reducción (-) de los parámetros entre el inicio y el final de los experimentos.

| Parámetros | Tratamientos | Tiempo | | | % |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|
| | | Día 0 | Día 7 | Día 14 | |
| C_{orgO} (%) | RA 28 °C | 37,32 ± 0,87 | 35,95 ± 0,63 | 35,47 ± 1,17 | -4,96 |
| | RA 55 °C | 37,32 ± 0,87 | 36,21 ± 1,27 | 32,91 ± 0,31 | -11,82 |
| | M 28 °C | 36,45 ± 0,45 | 34,03 ± 2,03 | 33,05 ± 2,03 | -9,33 |
| | M 55 °C | 36,45 ± 0,45 | 34,61 ± 0,22 | 33,05 ± 0,73 | -9,33 |
| N_t (%) | RA 28 °C | 1,00 ± 0,09 | 1,36 ± 0,11 | 1,59 ± 0,03 | +37,11 |
| | RA 55 °C | 1,00 ± 0,09 | 1,45 ± 0,04 | 1,54 ± 0,01 | +35,07 |
| | M 28 °C | 1,45 ± 0,02 | 1,79 ± 0,09 | 2,24 ± 0,04 | +35,27 |
| | M 55 °C | 1,45 ± 0,02 | 1,68 ± 0,05 | 1,65 ± 0,08 | +12,12 |
| Relación C/N | RA 28 °C | 37,71 ± 4,36 | 26,43 ± 0,46 | 22,25 ± 0,73 | -41,00 |
| | RA 55 °C | 37,71 ± 4,36 | 24,90 ± 0,87 | 21,35 ± 0,20 | -43,39 |
| | M 28 °C | 25,23 ± 0,06 | 18,96 ± 1,13 | 14,75 ± 0,16 | -41,54 |
| | M 55 °C | 25,23 ± 0,06 | 20,64 ± 0,13 | 20,07 ± 0,45 | -20,45 |

Tabla 4.7

Cambios en el carbono orgánico oxidable (C_{orgO}), nitrógeno total (N_t) y relación C/N durante los experimentos de incubación con el residuo del arroz (RA) y mezcla con antidepresivos (M) a 28 °C y 55 °C. Se muestra el porcentaje (%) de aumento (+) o reducción (-) de los parámetros entre el inicio y el final de los experimentos.

| Parámetros | Tratamientos | Tiempo | | | % |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|
| | | Día 0 | Día 7 | Día 14 | |
| C_{orgO} (%) | RA 28 °C | 36,93 ± 0,14 | 36,38 ± 0,23 | 35,04 ± 0,27 | -5,12 |
| | RA 55 °C | 36,93 ± 0,14 | 36,19 ± 1,53 | 34,57 ± 0,98 | -6,39 |
| | M 28 °C | 36,33 ± 0,21 | 35,33 ± 1,07 | 32,02 ± 0,56 | -11,16 |
| | M 55 °C | 36,33 ± 0,21 | 35,27 ± 1,52 | 33,86 ± 0,41 | -6,80 |
| N_t (%) | RA 28 °C | 0,99 ± 0,09 | 1,43 ± 0,07 | 1,28 ± 0,02 | +22,66 |
| | RA 55 °C | 0,99 ± 0,09 | 1,12 ± 0,01 | 1,15 ± 0,03 | +13,91 |
| | M 28 °C | 1,55 ± 0,17 | 1,72 ± 0,08 | 2,16 ± 0,05 | +28,24 |
| | M 55 °C | 1,55 ± 0,17 | 1,15 ± 0,13 | 1,59 ± 0,09 | +2,52 |
| Relación C/N | RA 28 °C | 37,21 ± 3,35 | 27,56 ± 0,21 | 25,32 ± 0,16 | -31,95 |
| | RA 55 °C | 37,21 ± 3,35 | 32,18 ± 1,36 | 30,17 ± 0,86 | -18,92 |
| | M 28 °C | 23,59 ± 2,68 | 20,53 ± 0,62 | 14,84 ± 0,26 | -37,09 |
| | M 55 °C | 23,12 ± 3,37 | 21,70 ± 1,33 | 21,33 ± 0,26 | -7,74 |

Respecto a la concentración de los fármacos, se observaron claras diferencias en función del material incubado. Así, en todos los experimentos realizados con la solución acuosa de medicamentos, no tuvo lugar la degradación de ninguno de ellos (datos no mostrados); mientras que en los experimentos con los residuos, hubo una disminución de la concentración de los fármacos, siendo la azitromicina, el ibuprofeno, el irbesartán, la fluoxetina y el citalopram más susceptibles a la degradación que el telmisartán y la venlafaxina, tal y como se observó en el apartado 4.5. Además, estos hechos sugieren que los factores fisicoquímicos como son las elevadas temperaturas y las reacciones de hidrólisis y oxidación

que pueden ocurrir en medios acuosos, no tuvieron un efecto en la reducción de los compuestos. Por lo tanto, esto sería indicativo de que la degradación de los fármacos fue de origen biológico debido a la actividad de los microorganismos.

Si se analizan los resultados con más detalle para cada uno de los fármacos, el antibiótico azitromicina no se biodegradó en la suspensión de lodo transcurridos los 14 días, mientras que su concentración disminuyó un 92% y un 95% en la paja de arroz y en la mezcla, respectivamente, al final de los experimentos (Figura 4.21).

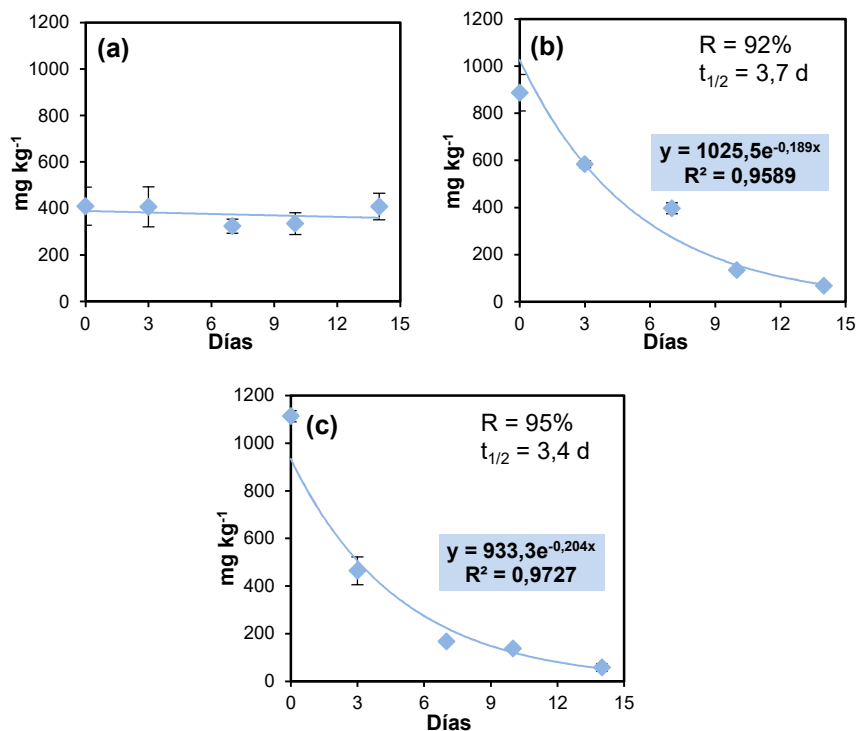


Figura 4.21. Evolución de la concentración de azitromicina durante los experimentos de incubación a 28 °C: suspensión de lodo acuosa (a), paja de arroz (b) y mezcla de paja de arroz y lodo de depuradora (c). Se muestra el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción (t_{1/2}) en días (d). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

Respecto a la concentración de ibuprofeno, esta se redujo un 99% en la suspensión de lodo acuosa, un 75% en la paja de arroz, y un 92% en la mezcla (Figura 4.22).

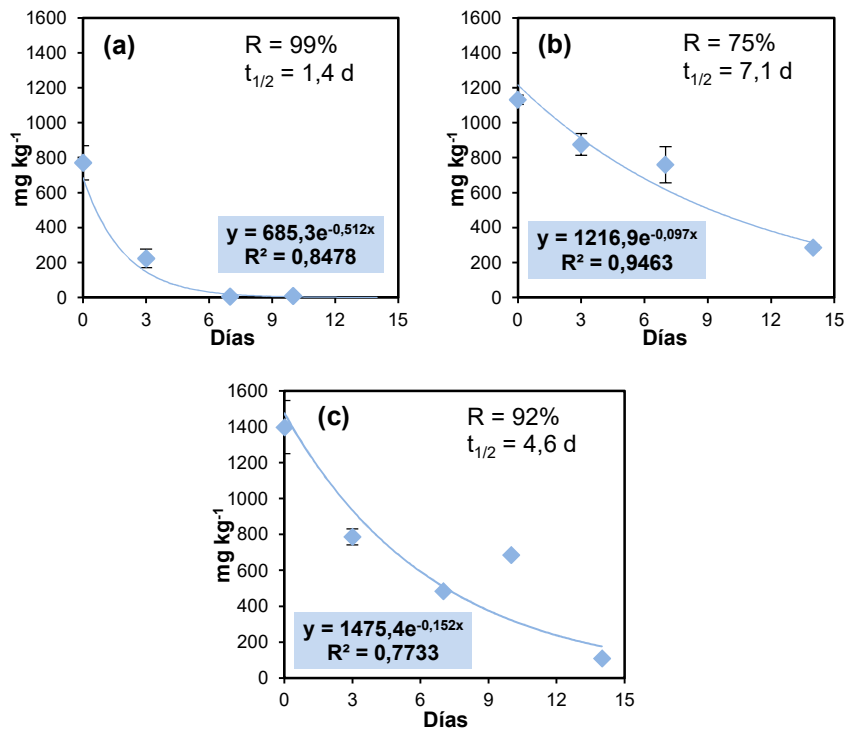


Figura 4.22. Evolución de la concentración de ibuprofeno durante los experimentos de incubación a 28 °C: suspensión de lodo acuosa (a), paja de arroz (b) y mezcla de paja de arroz y lodo de depuradora (c). Se muestra el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción (t_{1/2}) en días (d). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

Durante los experimentos a 28 °C, el irbesartán se eliminó un 43% en la suspensión de lodo acuosa, un 67% en la paja de arroz y un 55% en la mezcla (Figura 4.23). Después de 3 días del inicio de los experimentos a 55 °C, la concentración de irbesartán se redujo un 87% en la suspensión de lodo acuosa, un 77% en la paja de arroz y un 80% en la mezcla (Figura 4.23).

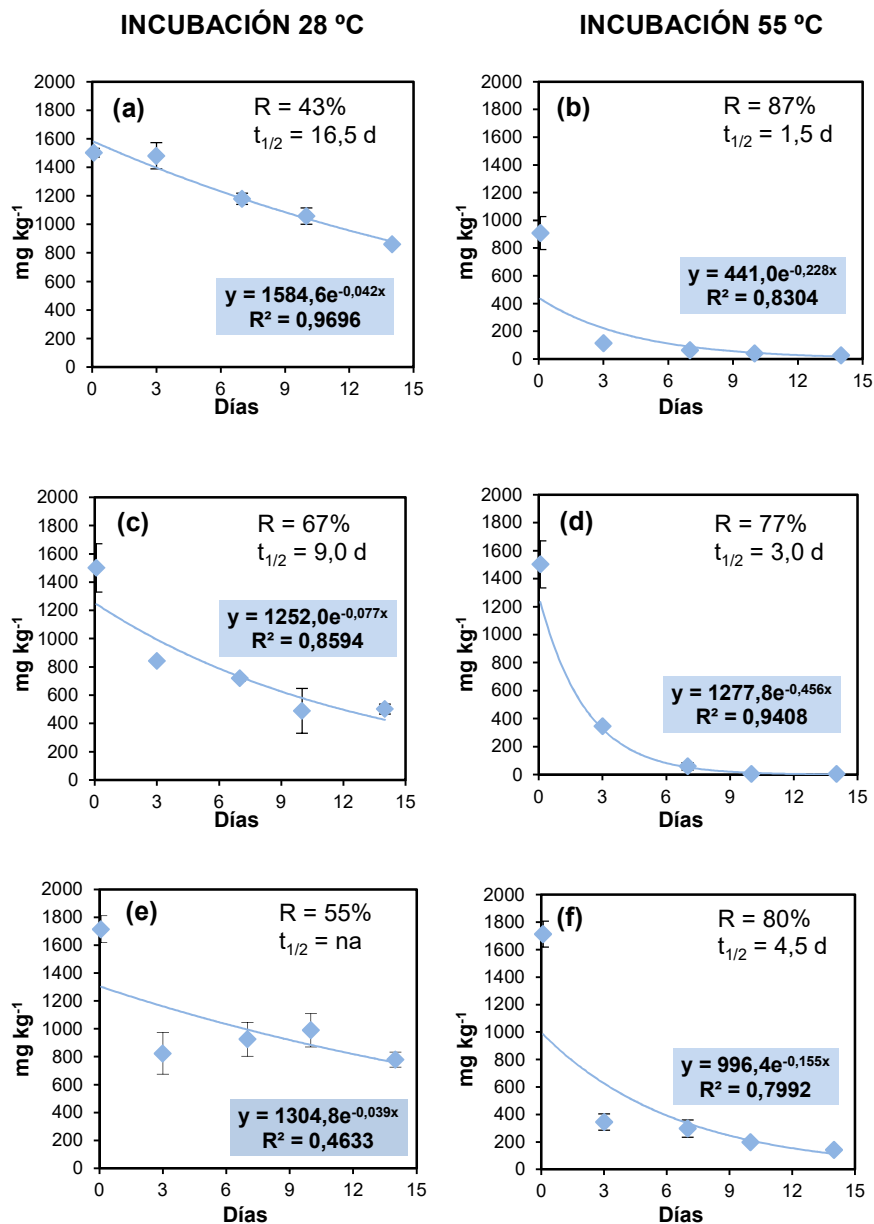


Figura 4.23. Evolución de la concentración de irbesartán durante los experimentos de incubación a 28 °C (izquierda) y 55 °C (derecha): suspensión de lodo acuosa (a) y (b), paja de arroz (c) y (d) y mezcla de paja de arroz y lodo de depuradora (e) y (f). Se muestra el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción ($t_{1/2}$) en días (d). na: no aplicable. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

En cuanto a la concentración de los antidepresivos, la fluoxetina fue más susceptible a biodegradarse, seguida del citalopram y la venlafaxina. Así, en las Figuras 4.24, 4.25 y 4.26 se puede observar como a 28 °C, la concentración de fluoxetina disminuyó un 17% en la suspensión de lodo acuosa, un 57% en la paja de arroz y un 47% en la mezcla y a 55 °C, un 39%, un 36% y un 54%, respectivamente. En el caso del citalopram, se obtuvieron menores porcentajes de reducción, en concreto en los experimentos a 28 °C se degradó un 22% en la suspensión de lodo acuosa, un 26% en la paja de arroz y un 19% en la mezcla, mientras que a 55 °C, solamente se biodegradó en la mezcla, mostrando un 8% de eliminación. Respecto a la venlafaxina, esta solamente se biodegradó un 17% en la paja de arroz y un 18% en la mezcla a 28 °C (Figuras 4.25 y 4.26). En la mayoría de los experimentos, la biodegradación de los medicamentos se ajustó adecuadamente a una cinética de degradación de primer orden, mostrando periodos de semirreacción muy variables en función del material incubado, la temperatura y del fármaco de estudio. Así, se observó que la tasa de biodegradación de la mayoría de los fármacos fue más rápida durante los experimentos de incubación a 28 °C en comparación a los realizados a 55 °C, lo cual está acorde con los resultados de los parámetros fisicoquímicos (Tabla 4.6 y 4.7). No obstante, en el caso del irbesartán ocurrió lo contrario, cuyos resultados están relacionados con los obtenidos durante el ensayo de compostaje del apartado 4.5. Otro aspecto destacable es el hecho de que la paja de arroz tuvo un mayor efecto en la biodegradación de los fármacos cuando fue incubada a 28 °C.

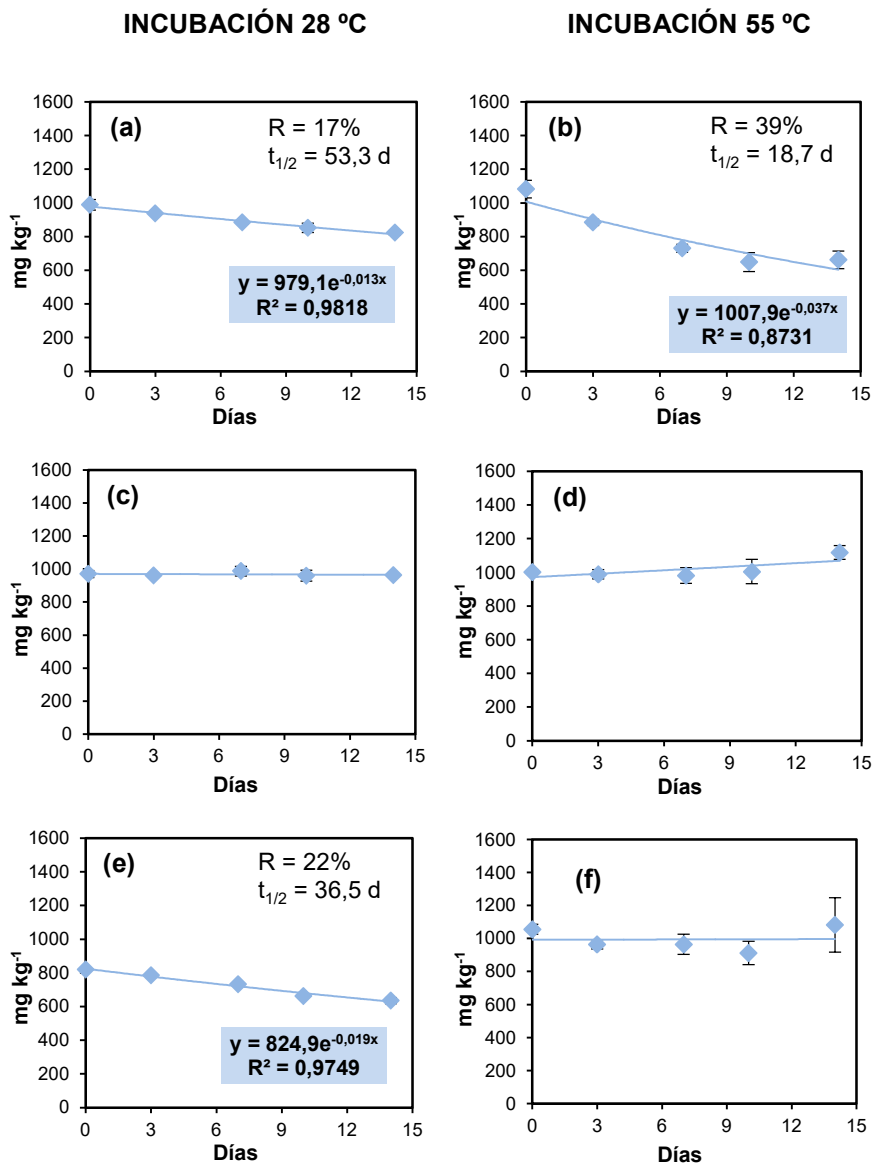


Figura 4.24. Evolución de la concentración de antidepresivos durante los experimentos de incubación con la suspensión de lodo acuosa a 28 °C (izquierda) y 55 °C (derecha): fluoxetina (a) y (b), venlafaxina (c) y (d) y citalopram (e) y (f). Se muestra el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción (t_{1/2}) en días (d). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

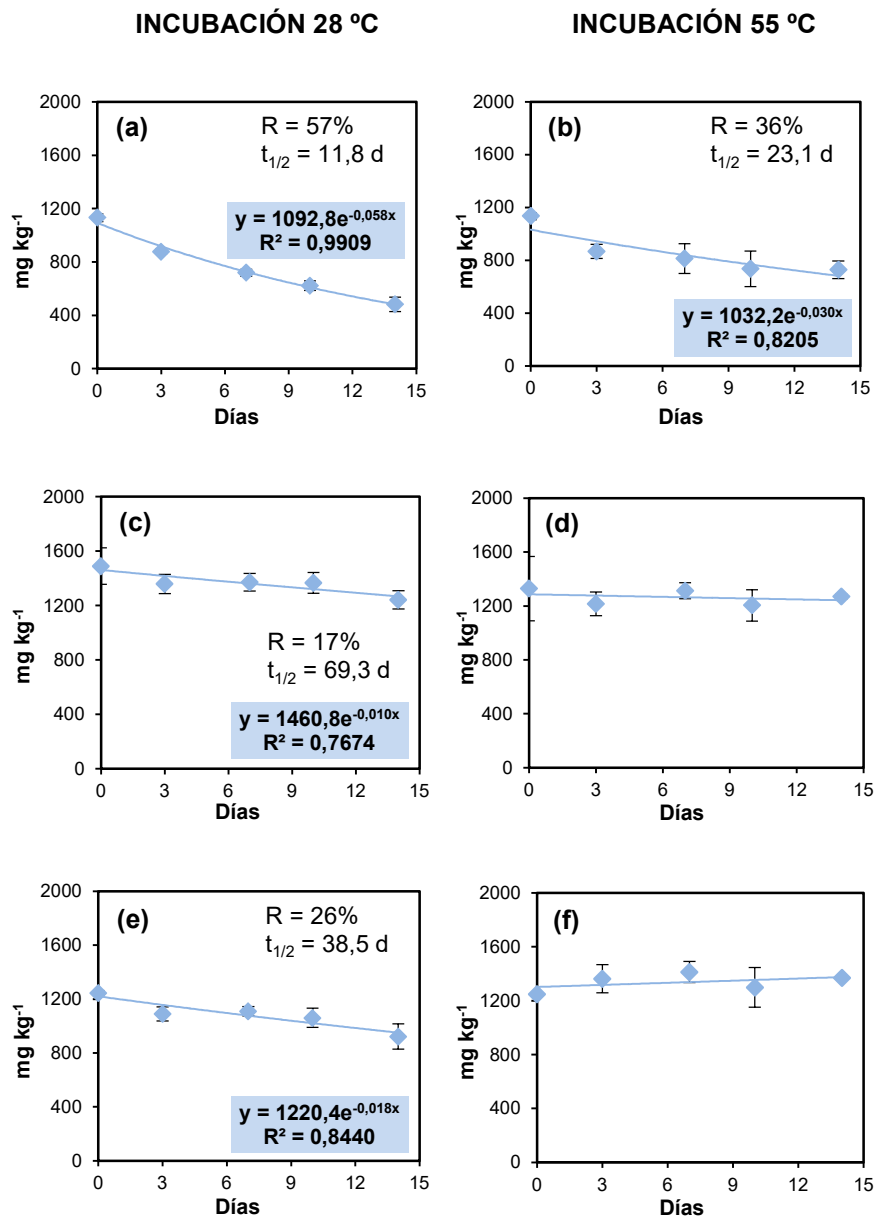


Figura 4.25. Evolución de la concentración de antidepresivos durante los experimentos de incubación con paja de arroz a 28 °C (izquierda) y 55 °C (derecha): fluoxetina (a) y (b), venlafaxina (c) y (d) y citalopram (e) y (f). Se muestra el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción ($t_{1/2}$) en días (d). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

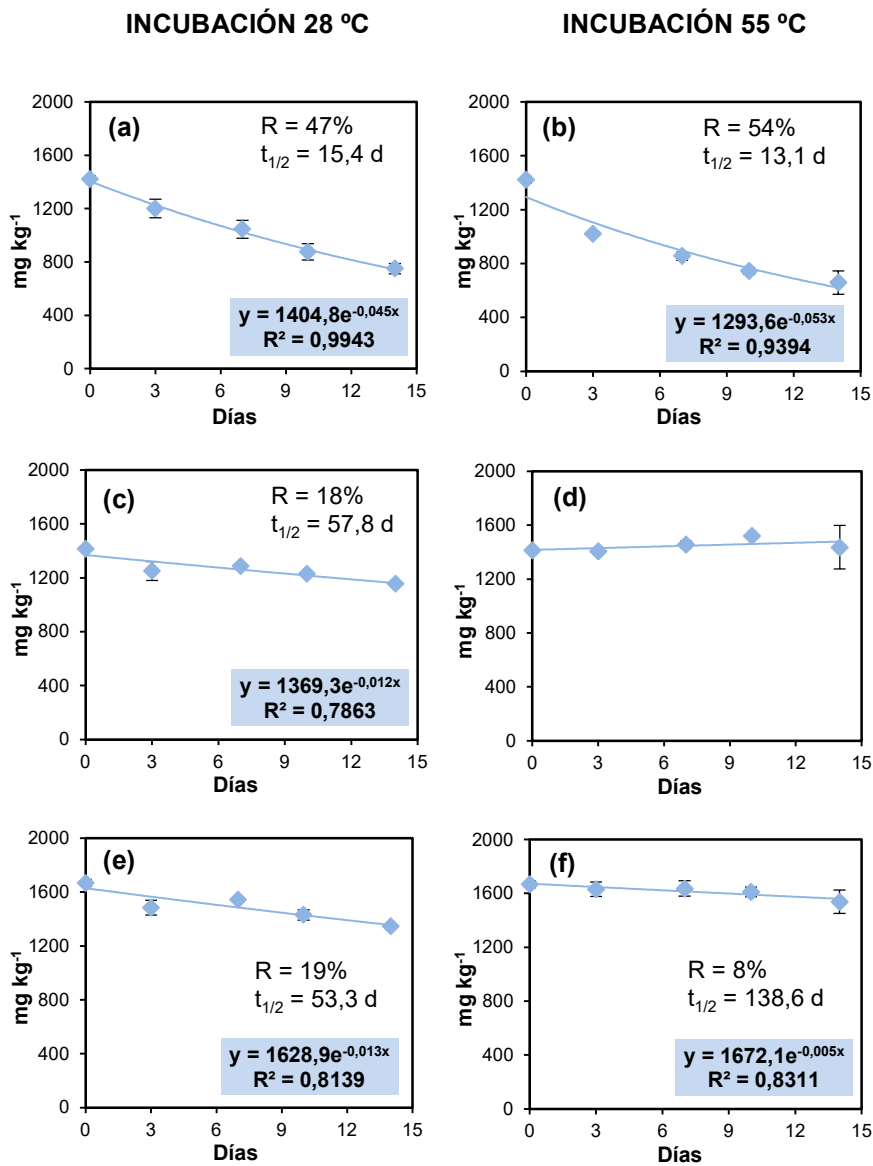


Figura 4.26. Evolución de la concentración de antidepresivos durante los experimentos de incubación de la mezcla con paja de arroz y lodo de depuradora a 28 °C (izquierda) y 55 °C (derecha): fluoxetina (a) y (b), venlafaxina (c) y (d) y citalopram (e) y (f). Se muestra el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción ($t_{1/2}$) en días (d). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

Aunque existan pocos estudios similares a los experimentos de incubación con fármacos realizados en este trabajo, si se contrastan nuestros resultados con los de la literatura científica, Butkovskiy y col. (2016) no observaron diferencias notables en la reducción del antihipertensivo metoprolol en una mezcla de lodo de depuradora y residuos de madera en un reactor a 35 °C en comparación a la incubación de los residuos a 50 °C. En cuanto al ibuprofeno, estos autores observaron un mayor porcentaje de reducción de este fármaco a 35 °C (99%). Arikan y col. (2016) observaron que la monensina y la salinomicina se degradaban más rápidamente en estiércol de vaca y residuos de pollos incubados a 22 °C que a 55 °C y 65 °C, mientras que en el caso del lasalocid, fue al contrario. Por otra parte, Mitchell y col. (2015), encontraron que el florfenicol, la sulfadimetoxina, la sulfametazina y la tilosina no se degradaron en el sobrenadante procedente de residuo del té y que la presencia de las partículas del compost incrementó su degradación. Zorita y col. (2009) y Kwon y col. (2006) indicaron que la fluoxetina era estable hidrolíticamente en soluciones acuosas y en el trabajo de Rúa-Gómez y col. (2013) la hidrólisis de la venlafaxina no ocurrió.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que la degradación de los fármacos fue de naturaleza biótica y que los microorganismos mesófilos tienen un papel muy importante en la eliminación de la mayoría de estos compuestos.

4.7. Cuantificación, aislamiento e identificación de microorganismos presentes en el compostaje

En una primera aproximación microbiológica, el primer paso consistió en cuantificar el número de microorganismos totales, así como el tipo de los mismos involucrados en la fase mesófila del compostaje. Debido al hecho de que las mezclas formadas por los lodos de depuradora y los residuos procedentes del cultivo del arroz, no son homogéneas, y con el fin de poder aislar un gran número de microorganismos capaces de degradar estos residuos, se pusieron en paralelo cuatro vasos Dewar diferentes de compost (numerados del 1 al 4), con diferentes volúmenes de material a compostar, que se procesaron en el tiempo de forma similar.

El contenido de los vasos Dewar se volteó periódicamente para conseguir que todas las zonas adquirieran la misma temperatura, alcanzándose la fase mesófila aproximadamente a las 24 h, que se mantuvo hasta alrededor de las 40 h en que se llegó a la fase termófila. Hay que destacar, que si comparamos los datos de la evolución de la temperatura de los cuatro compostajes, los cuatro vasos Dewar siguieron una evolución similar (datos no mostrados).

Con el fin de determinar el número de microorganismos totales, así como el tipo de los mismos involucrados en la fase mesófila, y capaces de degradar la paja de arroz, se tomaron muestras homogéneas de cada mezcla a las 12, 20 y 40 h del proceso, haciendo coincidir esta toma de muestras con los volteos realizados.

Estas muestras se procesaron tal y como se indica en el apartado Materiales y Métodos, con la finalidad de determinar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada una de ellas. Como se observa en la Tabla 4.8, el número de microorganismos aumentó con el tiempo durante la fase mesófila, alcanzándose la etapa final de esta y

principio de la termófila una concentración de UFC de alrededor de 10^9 en todas las mezclas, independientemente del número de partida. Se trata de una fase extremadamente dinámica, en la que inicialmente los sustratos están a temperatura ambiente, y el rápido crecimiento de las bacterias, y principalmente de hongos mesófilos y termotolerantes capaces de degradar diferentes polímeros, hace que la temperatura aumente rápidamente.

Tabla 4.8

Número de Unidades Formadoras de Colonias obtenido en los diferentes compostajes a diferentes tiempos.

| | Unidades Formadoras de Colonias (UFC) | | |
|-----------|---------------------------------------|-----------------|-----------------|
| | 12 h | 20 h | 40 h |
| Compost 1 | 8×10^5 | 6×10^7 | 8×10^8 |
| Compost 2 | 3×10^5 | 8×10^7 | 10^9 |
| Compost 3 | 10^6 | 2×10^8 | 10^9 |
| Compost 4 | 3×10^7 | 10^8 | 10^9 |

4.7.1. Aislamiento de hongos con capacidad de degradar la paja de arroz

Hay que tener en cuenta, que los hongos filamentosos producen gran cantidad de xilanasas y que han sido estudiados muchos géneros de hongos por sus enzimas celulolíticas (Chutani y Sharma, 2016; Leite y col., 2016). Este trabajo se centró en una primera aproximación en el aislamiento de hongos capaces de actuar el xilano y la celulosa, los constituyentes de la paja de arroz (Pan y col., 2016; Xie y col., 2017). Se

ha descrito que se puede llegar contabilizar hasta 155 especies diferentes de bacterias y 408 especies de hongos incluidos en 160 géneros diferentes (Moreno y col., 2014). Por este motivo, dado que era imposible trabajar con ambos tipos de microorganismos, la investigación se centró en las especies fúngicas.

De cada uno de los compostajes se aislaron los hongos que presentaron un mayor crecimiento, tal y como se describe en el apartado 3.7.4, enumerados en la Tabla 4.9, que se resembraron de nuevo en agar Sabouraud con cloranfenicol, con el fin de obtener cultivos puros y su posterior identificación.

Tabla 4.9

Hongos aislados de cada uno de los compostajes.

| | |
|--------------|--------------------|
| Compostaje 1 | Hongos 1, 2 y 3 |
| Compostaje 2 | Hongos 4 y 5 |
| Compostaje 3 | Hongos 6, 7, 8 y 9 |
| Compostaje 4 | Hongos 10, 11 y 12 |

En las Figuras 4.27, 4.28, 4.29 y 4.30 se muestran las morfologías coloniales de los hongos mayoritarios aislados de la mezcla con paja de arroz y lodo de depuradora a lo largo del proceso de compostaje.

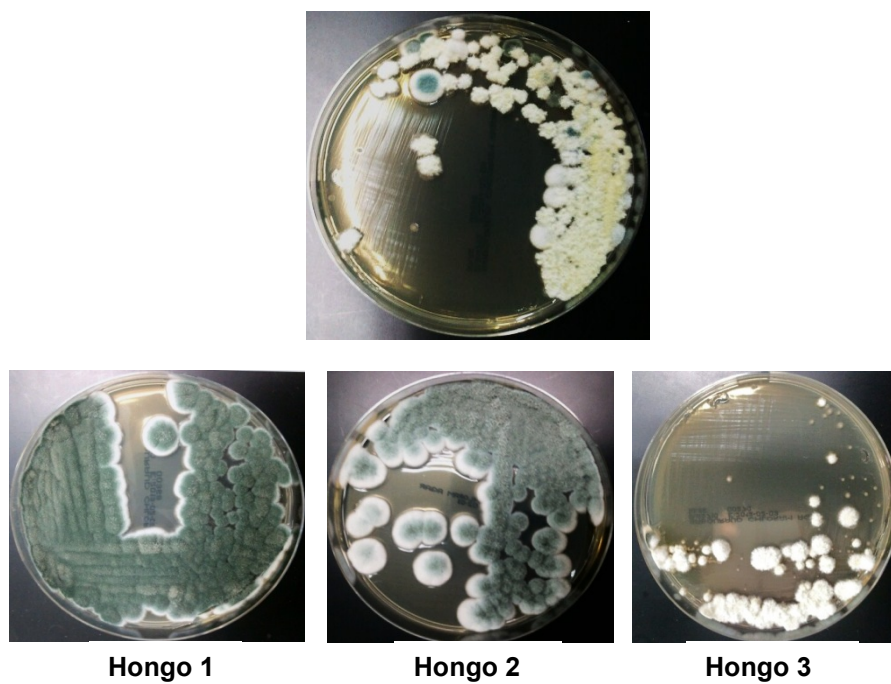


Figura 4.27. Morfología colonial de los hongos aislados en el compostaje 1.

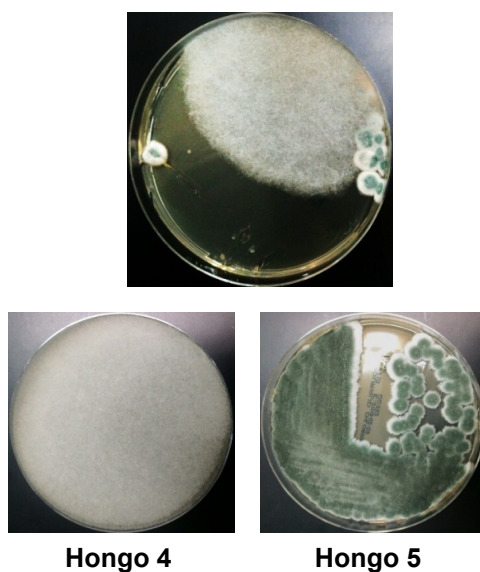


Figura 4.28. Morfología colonial de los hongos aislados en el compostaje 2.

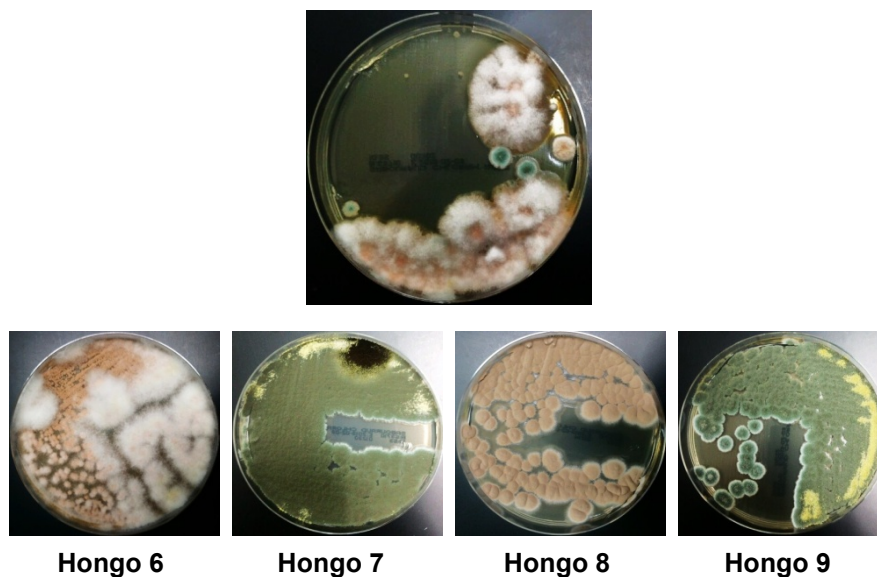


Figura 4.29. Morfología colonial de los hongos aislados en el compostaje 3.

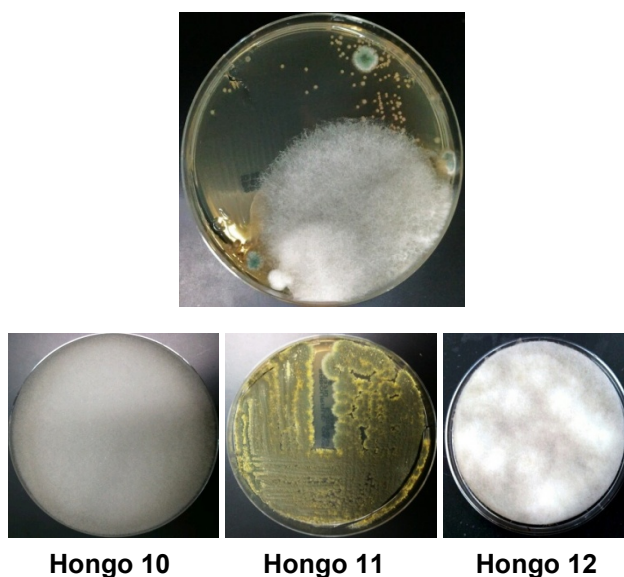


Figura 4.30. Morfología colonial de los hongos aislados en el compostaje 4.

Estos hongos se inocularon en matraces con paja de arroz estéril, tal y como se ha indicado en el apartado 3.7.4, con el fin de poder determinar su capacidad para eliminar este material, y por consiguiente ver cuál era su capacidad de degradación del xilano y de la celulosa. Tras 10 días de incubación en las condiciones indicadas, se vio que la paja incubada con los hongos 2, 4, 5, 6 y 9 había sido degradada en mayor o menor medida (Figura 4.31), mientras que los hongos 1, 3, 7, 10, 11 y 12 no habían tenido prácticamente ningún efecto sobre el sustrato, como se observa en la Figura 4.32. El aspecto de los matraces mostraba claramente que en aquellos en los que se habían inoculado los hongos 2, 4, 5, 6 y 9, el sustrato prácticamente había sido degradado por acción de los microorganismos, ya que los fragmentos de paja que eran perfectamente visibles al principio, prácticamente habían desaparecido, o bien presentaban un tamaño mucho menor. Sin embargo, en aquellos matraces inoculados con el resto de hongos (Figura 4.32), los trozos de paja no diferían visiblemente de su aspecto inicial, hecho que claramente indica que esos microorganismos no son capaces de degradarla.

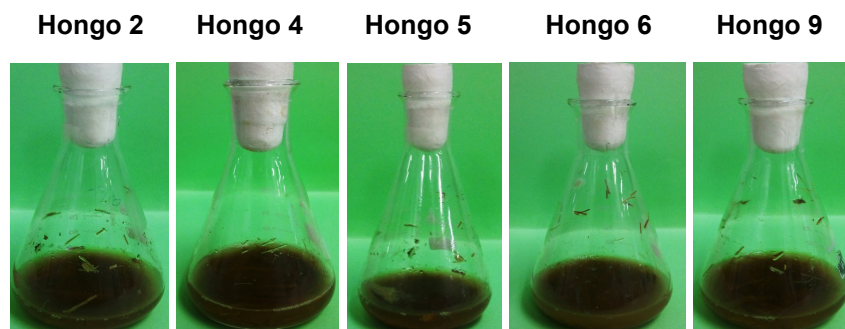


Figura 4.31. Efecto de los hongos 2, 4, 5, 6 y 9 sobre paja estéril.

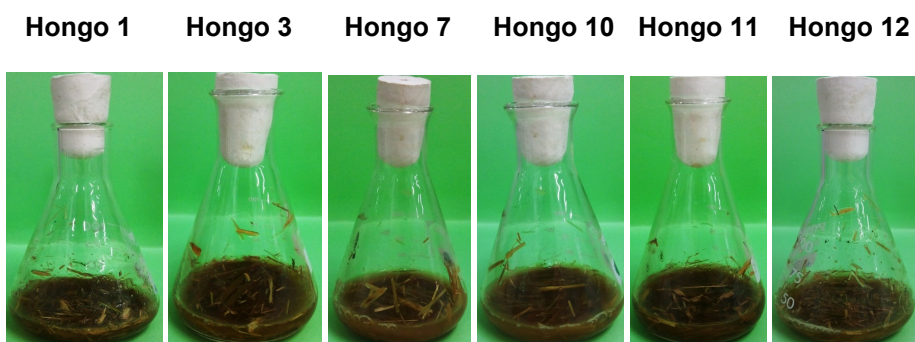


Figura 4.32. Efecto de los hongos 1, 3, 7, 10, 11 y 12 sobre paja estéril.

Los microorganismos aislados fueron identificados por el laboratorio de la Colección Española de Cultivos Tipo, siguiendo las pautas indicadas en el apartado 3.7.6. Los microorganismos aislados correspondían a las siguientes especies fúngicas (Tabla 4.10).

Tabla 4.10

Identificación de los microorganismos aislados del compostaje capaces de degradar el residuo de la paja.

| | Especie |
|-------------|--|
| Cepas 2 y 5 | <i>Aspergillus sydowii</i> |
| Cepa 4 | <i>Lichtheimia (Absidida) corymbifera</i> |
| Cepa 6 | Complejo <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> |
| Cepa 9 | <i>Eurotium amstelodami</i> |

4.7.1.1. Determinación de actividades enzimáticas

Los hongos aislados capaces de degradar la paja de arroz se sometieron a ensayos de actividad celulasa y xilanasa en placa, tal y como se describe en el apartado 3.7.7.

Con el fin de determinar la actividad celulasa, las cepas se cultivaron durante 72 h a 28 °C en medio YPD suplementados con carboximetilcelulosa al 0,5%, y a continuación las placas fueron teñidas con Rojo Congo, quedando el colorante unido al polímero de glucosa, de forma que tras desteñir con NaCl se pudieron distinguir las zonas del sustrato degradadas por la enzima, apareciendo halos de otro color alrededor de las colonias productoras de celulasa.

Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 4.33, y el hecho de encontrar halos de hidrólisis alrededor de las zonas de crecimiento, nos indica de forma cualitativa que los microorganismos ensayados poseen actividad celulasa.

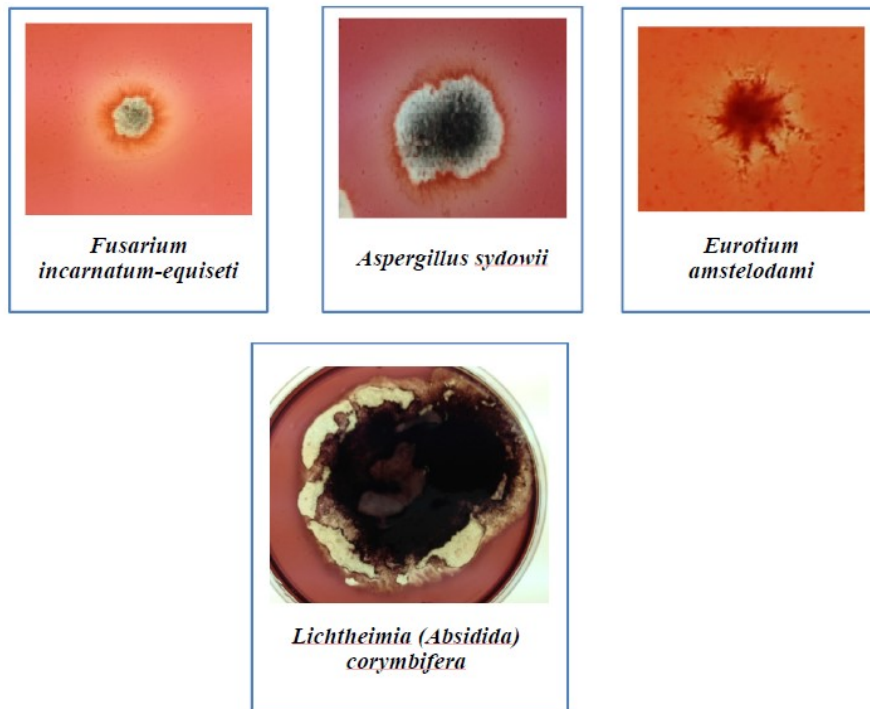


Figura 4.33. Ensayo de la actividad celulasa en placa.

La determinación de la actividad xilanasa se realizó de forma similar a la celulasa, pero en este caso se utilizaron placas suplementadas con 0,1% de Remazol Brilliant Blue, como se ha indicado en el apartado 3.7.7.2. La presencia de la actividad xilanasa se detectó mediante la aparición de un halo transparente alrededor de la zona de crecimiento del hongo. Como se puede observar en la Figura 4.34 nos muestra la capacidad de algunos de estos microorganismos para degradar el xilano.

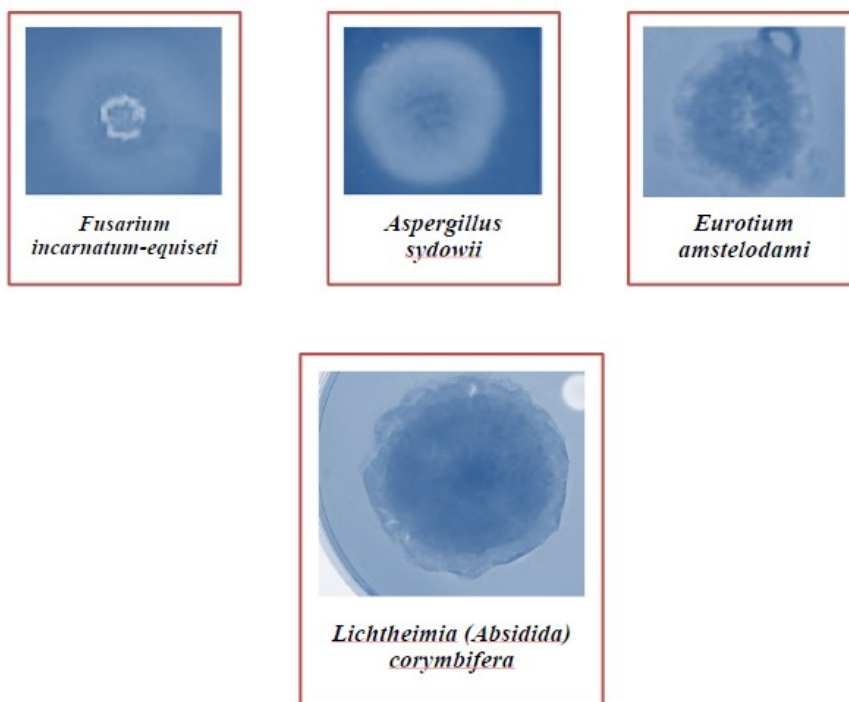


Figura 4.34. Ensayo de la actividad xilanasa en placa.

La cuantificación de la actividad celulasa y xilanasa asociada a las diferentes cepas se determinó mediante la valoración de azúcares reductores liberados por acción de la enzima sobre carboximetilcelulosa o sobre xilano, realizándose los ensayos sobre sobrenadantes de los medios

de cultivo, tras crecer las cepas en medio YNB hasta la fase estacionaria, y se definió una unidad de actividad enzimática (UIA) como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μmol de azúcar reductor (medido en μmoles de glucosa) por minuto en las condiciones de ensayo descritas.

Como se observa en la Tabla 4.11, de los cuatro hongos aislados, todos ellos presentaron actividad celulasa en mayor o menor medida, mientras que la actividad xilanasa se detectó en todas las cepas y en menor cantidad en *E. amstelodami*.

Tabla 4.11

Cuantificación de las actividades enzimáticas de los distintos hongos.

| Especie | Actividad celulasa (UIA mL ⁻¹) | Actividad xilanasa (UIA mL ⁻¹) |
|----------------------------------|---|---|
| Control | 0 | 0 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,39 | 0,48 |
| <i>A. sydowii</i> | 4,95 | 6,30 |
| <i>L. (Absidida) corymbifera</i> | 3,63 | 8,72 |
| <i>F. incarnatum-equiseti</i> | 3,44 | 6,38 |
| <i>E. amstelodami</i> | 1,41 | 0,69 |

Estos resultados están acorde con la literatura científica, ya que se ha demostrado la capacidad de estos hongos para producir enzimas capaces de degradar el xilano y la celulosa. Así, una investigación reciente ha aislado un hongo del género *Aspergillus* de la paja de arroz que produce xilanasas (Zahari y col., 2016), mientras que Carvalho y col. (2016) estudiaron la producción y caracterización de enzimas celulolíticos de este mismo género. Además, Ghosh y col. (1993) y Matkar y col. (2013)

encontraron que en concreto, *A. sydowii* producían xilanasas y celulasas, respectivamente. El hecho de que *A. sydowii* sea el hongo aislado con mayor actividad celulolítica se encuentra de acuerdo con lo descrito en la literatura científica, ya que los microorganismos de este género se encuentran entre los mayores productores de esta enzima (Santos y col., 2015). Hay que tener en cuenta, además, que en general los hongos son los microorganismos más estudiados con respecto a la degradación de celulosa y producción de celulasas. Se ha descrito que los hongos son los responsables de la mayor parte de la celulolisis de la naturaleza, y su primacía no es solo el resultado de la eficiencia y diversidad de sus sistemas enzimáticos, sino que también tienen ventajas adaptativas como es la rápida colonización de los sustratos, lo que confirma su importancia durante el proceso de compostaje (Lynd y col., 2002; Busk y Lange, 2013).

En relación *L. (Absidida) corymbifera*, se trata del microorganismo aislado con una mayor actividad xilanasas. Se ha descrito que este género de hongos es un productor importante de xilanasas (Neves y col., 2011; Silva y col., 2013; García y col., 2015), al igual que ocurre con *A. sydowii* y con *F. incarnatum-equiseti* (Nair y col., 2008; Xiros y col., 2009). Así, también se ha demostrado que el género *Fusarium* puede producir estas dos enzimas (Robles-Barrios y col., 2015) y en concreto El-Metwally y col. (2014) mostraron como *F. incarnatum* que fue aislado de la paja de arroz producía celulasas.

Por lo que respecta a *E. amstelodami*, este es el primer trabajo en el que se describe la capacidad de este microorganismo para producir celulasas.

4.8. Aislamiento de microorganismos capaces de degradar medicamentos

De los diferentes materiales donde hubo degradación importante se procedió a intentar el aislamiento de microorganismos capaces de degradar los fármacos fundamentalmente en las muestras incubadas a 28 °C (apartado 3.4).

Todas las muestras se procesaron tal y como se indica en el apartado 3.7.5. Los microorganismos aislados a partir de cada una de las muestras se inocularon en medios de cultivo que carecían de fuente de carbono, de fuente de nitrógeno o de ambas a la vez (medio mínimo con fuente de carbono, medio mínimo con fuente de nitrógeno y medio mínimo) adicionados de los diferentes medicamentos, y en medio completo que se utilizó como control.

La aparición de turbidez en estos medios de cultivo líquidos se consideró un indicador de crecimiento, por lo que estos microorganismos seleccionados se llevaron a un medio sólido con el fin de aislar colonias y por consiguiente, de obtener cultivos puros de las distintas especies que potencialmente eran capaces de utilizar los distintos fármacos como nutrientes. Posteriormente, cada una de las cepas aisladas se volvió a incubar en las condiciones indicadas anteriormente, con el fin de confirmar la capacidad de metabolizar los fármacos correspondientes.

Distintos microorganismos fueron capaces de crecer en medio mínimo con fuente de nitrógeno adicionado de azitromicina o de ibuprofeno, lo que nos indicó que eran capaces de utilizar esos compuestos como fuente de carbono, y por consiguiente deberían ser capaces de degradar el fármaco. Cuando el compuesto objeto de estudio fue el irbesartán, se aislaron microorganismos capaces de crecer en medio mínimo con fuente de carbono y en medio mínimo. Por lo que respecta a la

fluoxetina, fue el único fármaco del cual no se consiguió aislar ningún microorganismo que lo utilizase.

Cabe destacar, que algunos de los microorganismos crecidos en medio líquido tras la primera incubación, no fueron capaces de crecer en las mismas condiciones cuando se inocularon como cultivo puro, lo que sugiere la posibilidad de que estos microorganismos se habían servido de la capacidad de otros de los microorganismos de la suspensión inicial de degradar los distintos compuestos, para utilizarlos como nutrientes.

A continuación, se señala el resultado de la identificación de los microorganismos obtenidos mediante el análisis BLAST (Zhang y col., 2000) de las secuencias frente a las bases de datos del NCBI, recogiendo la extensión del fragmento solapado, el porcentaje de semejanza y el nombre del microorganismo con un mayor grado de identidad de secuencia (Tabla 4.12).

Tabla 4.12

Identificación de los microorganismos capaces de degradar la azitromicina, ibuprofeno e irbesartán.

| | | |
|---|--------------------|---|
| Azitromicina cepa 9-3-1 | | |
| <u>Especie</u> | <u>Semejanza</u> | <u>Secuencia (cepa tipo)</u> |
| <i>Brevundimonas naejangsanensis</i> | 927/932 pb (99,5%) | FJ544245 (ATCC BIO-TAS2-2 ^T) |
| Azitromicina cepa 9-3-2 | | |
| <u>Especie</u> | <u>Semejanza</u> | <u>Secuencia (cepa tipo)</u> |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> | 901/903 pb (99,8%) | AB680368 (NBRC 13111 ^T) |
| Azitromicina cepa 13-2 | | |
| <u>Especie</u> | <u>Semejanza</u> | <u>Secuencia (cepa tipo)</u> |
| <i>Bacillus cereus</i> | 990/991 pb (99,9%) | AE016877 (ATCC 14579 ^T) |

Resultados y discusión

Tabla 4.12. Identificación de los microorganismos capaces de degradar la azitromicina, ibuprofeno e irbesartán (continuación).

| | | |
|---|-------------------|---|
| Ibuprofeno cepa 7-4 | | |
| <u>Especie</u> | <u>Semejanza</u> | <u>Secuencia (cepa tipo)</u> |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 945/945 pb (100%) | AB004754 (JCM 1665 ^T) |
| Irbesartán cepa 3/2 | | |
| <u>Especie</u> | <u>Semejanza</u> | <u>Secuencia (cepa tipo)</u> |
| <i>Papiliotrema terrestris</i> | 508/515 pb (99%) | NR_073350 (CBS 10810) |
| Irbesartán cepa 12/2/1 ABM | | |
| <u>Especie</u> | <u>Semejanza</u> | <u>Secuencia (cepa tipo)</u> |
| <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaneae</i> | 957/957 pb (100%) | Y17654 (ATCC 11296 ^T) |
| Irbesartán cepa 12/2/2 ABP | | |
| <u>Especie</u> | <u>Semejanza</u> | <u>Secuencia (cepa tipo)</u> |
| <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> | 944/944 pb (100%) | AJJI01000018 (DSM 30104 ^T) |
| Irbesartán cepa 12/2/2 ABP | | |
| <u>Especie</u> | <u>Semejanza</u> | <u>Secuencia (cepa tipo)</u> |
| <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> | 944/944 pb (100%) | CBZR010000040 (07A044 ^T) |
| Irbesartán cepa 14/2 | | |
| <u>Especie</u> | <u>Semejanza</u> | <u>Secuencia (cepa tipo)</u> |
| <i>Klebsiella michiganensis</i> | 941/941 pb (100%) | JQ070300 (W14 ^T) |
| Irbesartán cepa 12-2-2 FA | | |
| <u>Especie</u> | <u>Semejanza</u> | <u>Secuencia (cepa tipo)</u> |
| <i>Alternaria alternata</i> | 570/570 pb (100%) | KP 701250 (HLJ-DX-TH-P1) |
| Irbesartán cepas 12-2-1 FB y 12-2-2 BBM | | |
| <u>Especie</u> | <u>Semejanza</u> | <u>Secuencia (cepa tipo)</u> |
| <i>Aspergillus terreus</i> | 608/608 pb (100%) | NR_131276 (ATCC 1012) |

Como se observa en la Tabla 4.12, en este trabajo se han identificado microorganismos capaces de degradar fármacos, siendo *B. naejangsanensis*, *A. faecalis* subsp. *faecalis* y *B. cereus* para el caso de la azitromicina; *K. oxytoca* para ibuprofeno y *P. terrestris*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaneae*, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. michiganensis*, *A. alternata* y *A. terreus* capaces de degradar irbesartán.

No existen estudios previos que describan la capacidad de estos microorganismos para degradar estos tres fármacos. Sin embargo, se pueden encontrar trabajos que indican la capacidad de *A. faecalis* para degradar otro tipo de quimioterápicos como son el sulfametoxazol (Zhang y col., 2016) y sulfametazina (Islas-Espinoza y col., 2012) y que *B. cereus* mejora la tasa de degradación de la oxitetraciclina en estiércol de cerdo (Wang y col., 2015).

4.9. Efecto de la bioaumentación sobre el proceso de compostaje y la eliminación de fármacos.

Los microorganismos son los principales responsables de la biodegradación y humificación de los residuos orgánicos y de la producción de un compost de alta calidad (Alwaneen, 2015). Por este motivo, uno de los principales objetivos de este trabajo fue investigar la influencia de la inoculación de microorganismos de orígenes diversos en el proceso de compostaje. Se pueden encontrar experiencias relacionadas con la aplicación de la técnica de bioaumentación para mejorar el proceso de compostaje, tal y como se describió en la Tabla 1.3. Así, la inoculación de microorganismos específicos dentro de la población bacteriana de la mezcla a compostar, puede incrementar la degradación de la materia

orgánica y obtener un compost de mejor calidad (Rautenstrauch y col., 2014).

Sin embargo, tal y como se indicó en la Tabla 1.3, existen pocos estudios que hayan investigado la eliminación de contaminantes mediante la bioaumentación durante el proceso de compostaje. De hecho, Semblante y col. (2015) también indicaron que solo unos pocos estudios han investigado la eliminación de contaminantes orgánicos en lodos mediante la bioaumentación con diferentes organismos como bacterias, levaduras y hongos. Los resultados en la literatura científica han mostrado que la bioaumentación llevada a cabo con microorganismos nativos podría ser efectiva en el tratamiento de aguas residuales (Rindland y Gómez, 2015). Es por ello, que otro de los aspectos de este trabajo fue evaluar la efectividad de la bioaumentación para la degradación de fármacos durante el proceso compostaje mediante la inoculación de microorganismos que han sido aislados del compostaje llevado a cabo con estos fármacos.

4.9.1. Influencia de la bioaumentación en el compostaje con una cepa aislada de campos de cultivo del arroz

Se seleccionó la cepa de *Paenibacillus barcinonensis* para realizar el primer ensayo de bioaumentación del compostaje con la finalidad de evaluar su efecto sobre la eficacia del proceso, contrastando los resultados con un ensayo control sin la presencia del inóculo. El microorganismo fue aislado de un suelo procedente de un campo dedicado al cultivo del arroz en el delta del río Ebro (Sánchez y col., 2005). *P. barcinonensis* es un buen productor de xilanasas y celulasas con aplicaciones biotecnológicas en la eliminación de la lignina y ácidos hexenurónicos presentes en las fibras agrícolas (Cerdá y col., 2016).

Como se puede observar en la Figura 4.35, tanto la mezcla con la presencia de *P. barcinonensis* como la mezcla sin inóculo iniciaron la fase termófila a las 17 h. Sin embargo, la mezcla bioaumentada con *P. barcinonensis* se mostró más activa, en la cual se mantuvieron las temperaturas más elevadas durante la fase termófila, llegando a una máxima de 71 °C, en comparación con el control (68 °C). Esta mayor actividad observada en la mezcla con el inóculo también quedó reflejada en el consumo de oxígeno, el cual fue más elevado al inicio del proceso de compostaje (Figura 4.36). Además, la bioaumentación del compostaje con *P. barcinonensis* tuvo como resultado la obtención de un compost más estable y con un mayor grado de madurez. Así, al final del proceso, el consumo de oxígeno, el carbono soluble y la actividad deshidrogenasa mostraron valores más bajos, mientras que el índice de humificación fue más elevado, en comparación a la mezcla sin inocular. En este sentido, se ha descrito que la disminución del carbono soluble a lo largo del proceso de compostaje está relacionado con la humificación de la materia orgánica (Zhao y col., 2016). Además, numerosos autores y más recientemente Nikaeen y col. (2015), han sugerido la actividad deshidrogenasa como un indicador de la estabilización de la materia orgánica, observando una disminución de este parámetro al final del proceso de compostaje debido al agotamiento de las fuentes de carbono y energía fácilmente degradables para los microorganismos, hecho que es indicativo de la madurez del compost. En relación al resto de parámetros fisicoquímicos, no se observaron diferencias en el pH, la conductividad eléctrica, el carbono orgánico oxidable, la materia orgánica total, el nitrógeno total y la relación C/N entre ambas mezclas a lo largo del proceso (datos no mostrados).

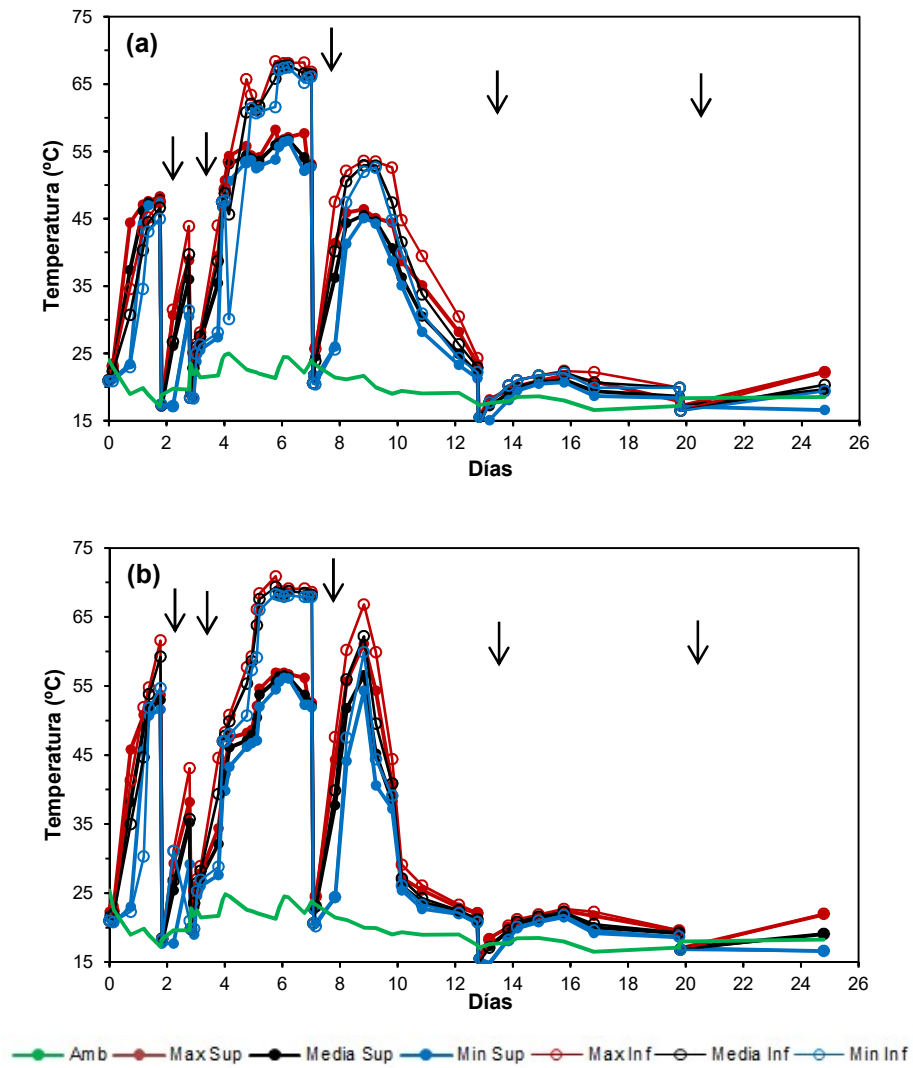


Figura 4.35. Perfil de temperaturas de la mezcla control sin microorganismos (a) y de la mezcla con *P. barcinonensis* (b). Se muestra la temperatura ambiente (Amb), la máxima (Max), media y la mínima (Min) de la sonda superior (Sup) e inferior (Inf) de los vasos Dewar. Las temperaturas mostradas son las medias de las medidas realizadas y el error estándar (no mostrado para simplificar la figura) fue de $\pm 0,5$ °C. Las flechas indican los volteos realizados durante los experimentos.

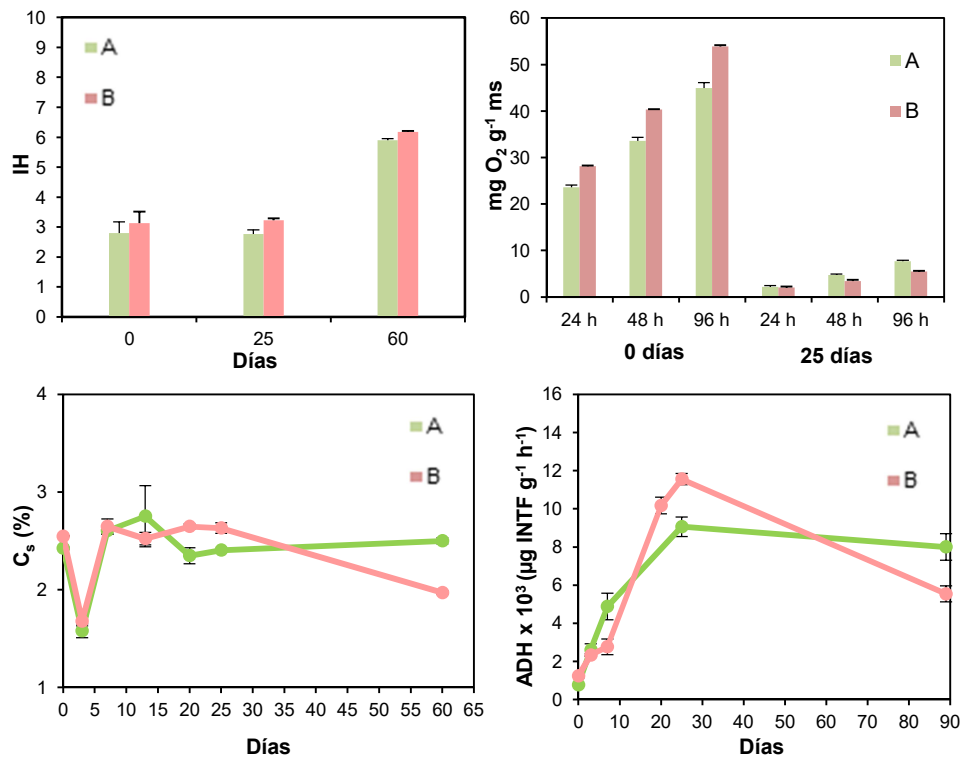


Figura 4.36. Cambios en los parámetros fisicoquímicos y biológicos observados durante el proceso de compostaje de las mezclas sin microorganismos (A) y con *P. barcinonensis* (B): IH (índice de humificación), consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{g}^{-1}$ masas seca), C_s (carbono soluble) y ADH (actividad deshidrogenasa). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias ($n = 3$).

Los autores Eida y col. (2012) describieron que las especies de *Paenibacillus* contribuyen eficientemente en los procesos hemicelulíticos y celulolíticos durante el compostaje de serrín y residuos de café. Otros autores observaron una reducción en el periodo de duración del compostaje con lodo anaerobio procedente del aceite de palma, el cual entre los microorganismos indígenas que contenía se encontraban los del género *Paenibacillus* (Zainudin y col., 2013). Los autores Zhao y col. (2012) describieron *P. polymyxa* como una de las especies microbianas

dominantes durante el compostaje de diversos residuos orgánicos y observaron un incremento de las sustancias húmicas después de 30 días.

Los resultados obtenidos muestran como la bioaumentación del compostaje con *P. barcinonensis* tuvo un efecto positivo en el proceso, remarcando, de nuevo, la importancia del papel que juegan los microorganismos mesófilos en la obtención de un producto final con una mayor estabilidad y madurez. Sería interesante realizar futuras investigaciones mediante la bioaumentación del compostaje con este microorganismo para estudiar sus posibilidades en la eliminación de contaminantes emergentes.

4.9.2. Influencia de microorganismos modificados genéticamente sobre el compostaje

En los siguientes experimentos de bioaumentación del compostaje se propuso la utilización de *Saccharomyces cerevisiae* por ser un microorganismo seguro (GRAS) en un proceso cerrado y controlado como el compostaje, que está considerado como un método seguro para el estudio del impacto medioambiental de la liberación de microorganismos modificados por técnicas de ingeniería genética (Shing y col., 2006). En concreto, se emplearon las cepas procedentes de *S. cerevisiae* BY4741 capaces de expresar la proteína de fusión Pir4-lipasa A de *Bacillus subtilis* (L3-BY4741) y la cepa que expresa la proteína de fusión Pir4-celulasa A de *P. barcinonensis* (C3-BY4741) (Mormeneo y col., 2008). Se ha estudiado el efecto de estas cepas en el proceso de compostaje, con la preparación de un control sin inocular microorganismos. Además, se ha realizado un seguimiento de la presencia de las cepas transgénicas a lo largo de las distintas fases del compostaje mediante anticuerpos específicos e identificación bioquímica y microbiológica.

Los perfiles de temperatura y el consumo de oxígeno de las cuatro mezclas se muestran en las Figuras 4.37 y 4.38. Así, la fase termófila se inició 7 horas antes en la mezcla control sin microorganismos (A) y en la mezcla con la cepa C3-BY4741 (D), siendo esta última la que alcanzó una mayor temperatura (71 °C), aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas en los perfiles de temperatura. Los autores Nakasaki y col. (2013) indicaron que la inoculación de *Pichia kudriavzevii* RB1 durante el compostaje de residuos alimentarios de conejo aceleró el inicio de la fase termófila, destacando que el inóculo influyó positivamente en la primera etapa del compostaje, a pesar de que la levadura muriera posteriormente con el incremento de la temperatura.

En cuanto al consumo de oxígeno, se aprecia como al final de los ensayos fue en la mezcla con la cepa C3-BY4741 (D) en la que se obtuvo un compost más estable (7,65 mg O₂ g⁻¹ masa seca) ($p < 0,05$). En el resto de parámetros, se observaron diferencias significativas en el caso de la materia orgánica total en las cepas L3-BY4741 y C3-BY4741 y una menor relación C/N en la cepa expresora de la celulasa ($p < 0,05$) (Figura 4.39). No se encontraron diferencias significativas en el pH, la conductividad eléctrica, el carbono orgánico oxidable y el nitrógeno total (datos no mostrados), ni en los índices de maduración del compost (Figura 4.40).

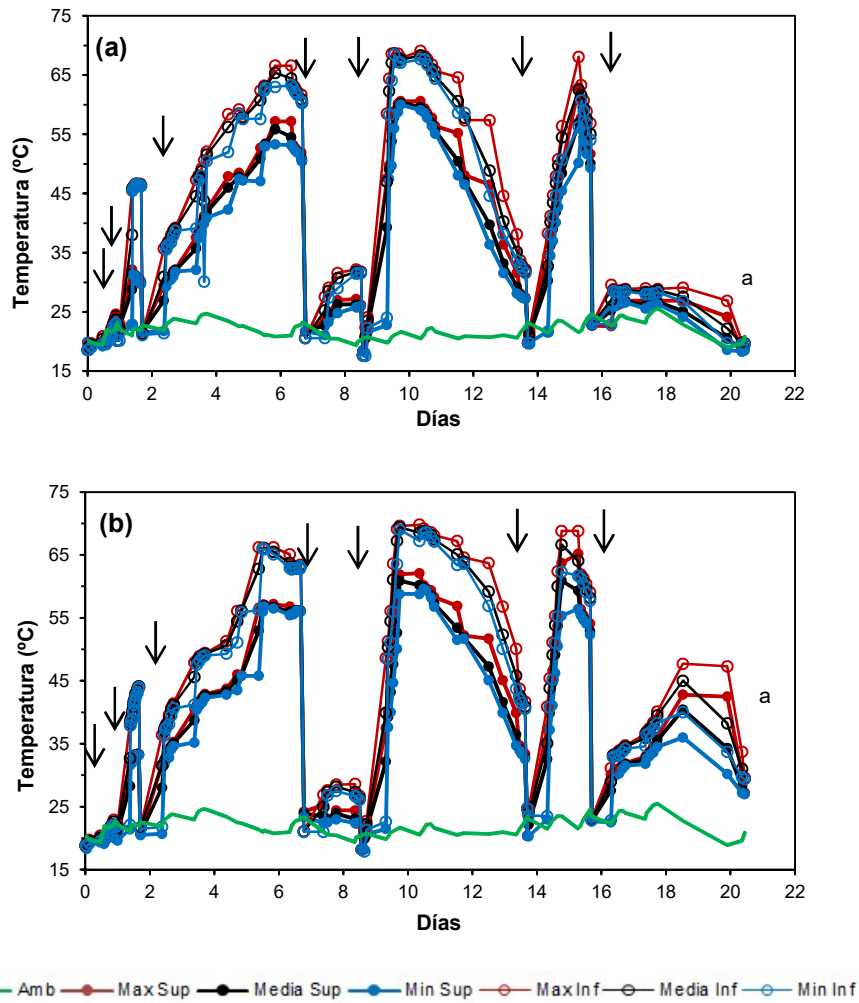


Figura 4.37. Perfil de temperaturas de la mezcla control sin microorganismos (a) y de la mezcla con *S. cerevisiae* BY4741 (b). Se muestra la temperatura ambiente (Amb), la máxima (Max), media y la mínima (Min) de la sonda superior (Sup) e inferior (Inf) de los vasos Dewar. Las temperaturas mostradas son las medias de las medidas realizadas y el error estándar (no mostrado para simplificar la figura) fue de $\pm 0,5$ °C. Las flechas indican los volteos realizados durante los experimentos. Los valores de la temperatura Max Inf con la misma letra no difieren significativamente a un nivel del 5%.

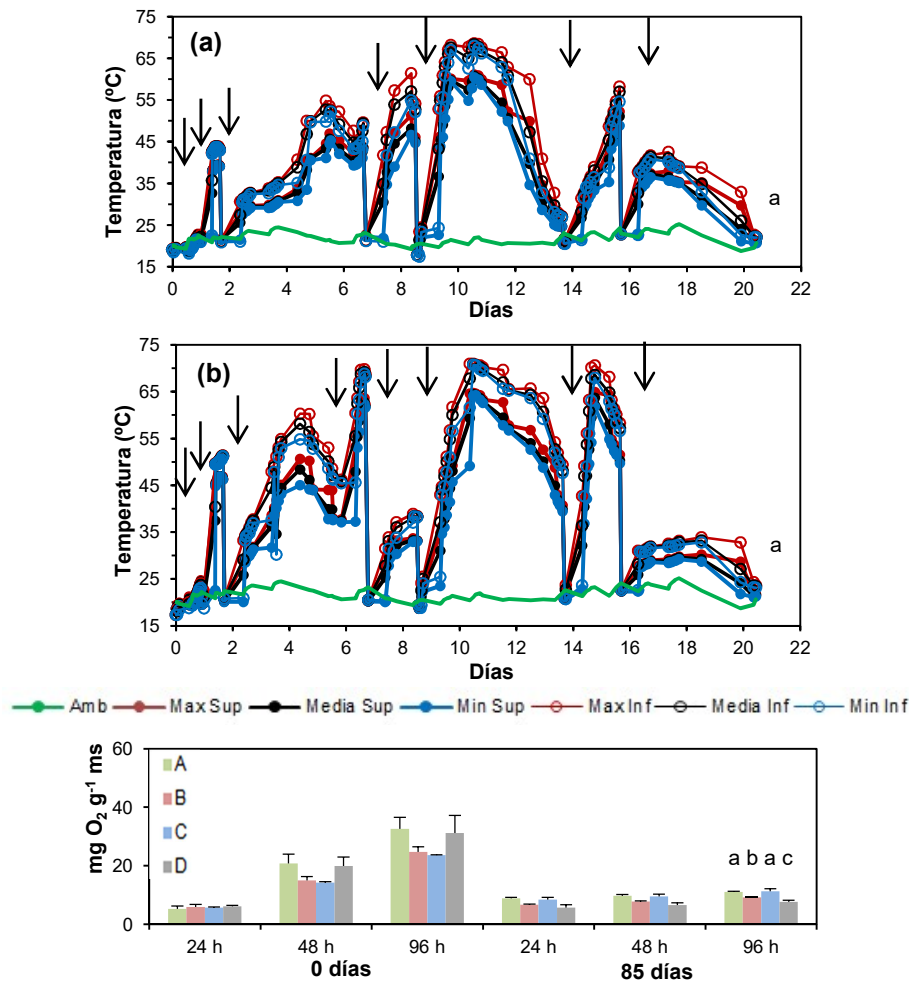


Figura 4.38. Perfil de temperaturas de la mezcla con la cepa L3-BY4741 (a) y de la mezcla con la cepa C3-BY4741 (b) de *S. cerevisiae*. Se muestra la temperatura ambiente (Amb), la máxima (Max), media y la mínima (Min) de la sonda superior (Sup) e inferior (Inf) de los vasos Dewar. Las temperaturas mostradas son las medias de las medidas realizadas y el error estándar (no mostrado para simplificar la figura) fue de $\pm 0,5$ °C. Las flechas indican los volteos realizados durante los experimentos. Se muestra el consumo de oxígeno de las mezclas sin microorganismos (A), con la cepa BY4741 (B), L3-BY4741 (C) y C3-BY4741 (D) de *S. cerevisiae*. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias ($n = 3$). Los valores de la temperatura Max Inf y del consumo de oxígeno con la misma letra no difieren significativamente a un nivel del 5%.

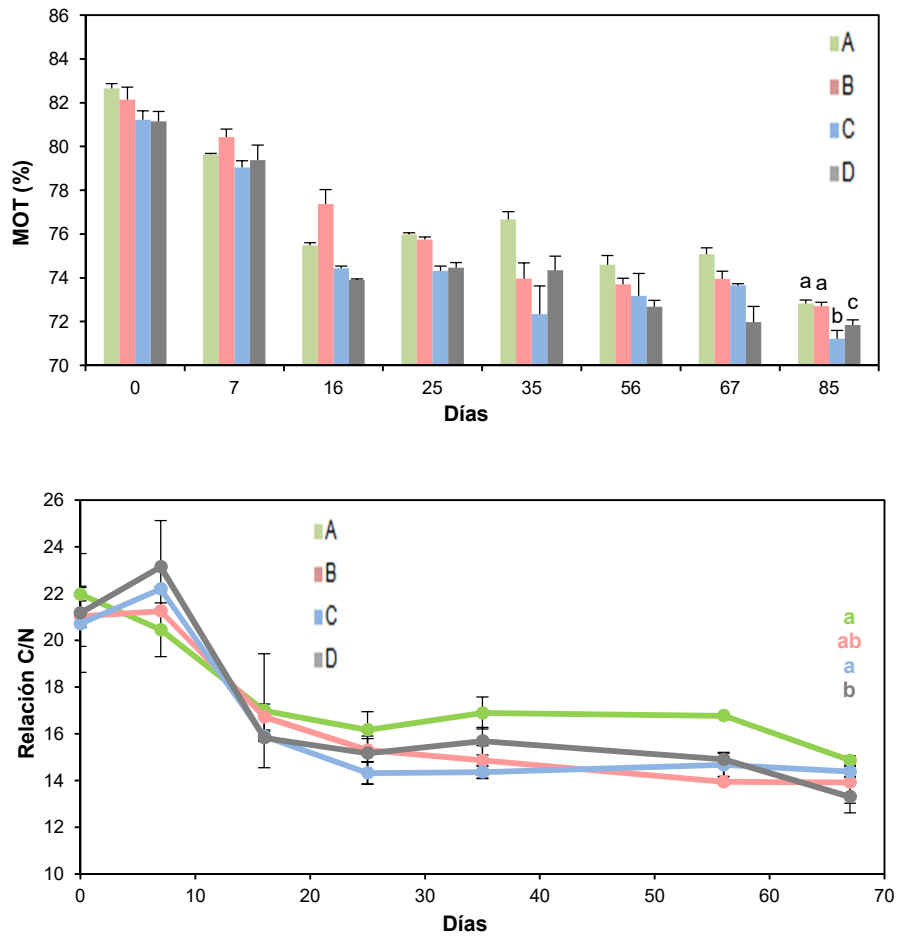


Figura 4.39. Cambios en la materia orgánica total (MOT) y relación C/N observados durante el proceso de compostaje de la mezcla control sin microorganismos (A), con la cepa BY4741 (B), la cepa L3-BY4741 (C) y la cepa C3-BY4741 (D) de *S. cerevisiae*. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3). Los valores con la misma letra no difieren significativamente a un nivel del 5%.

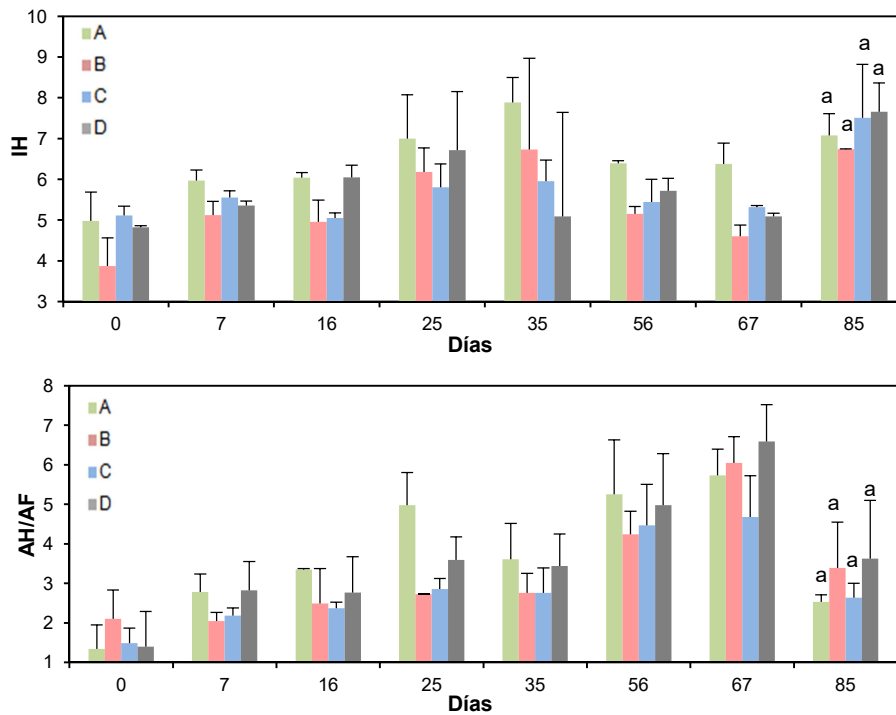


Figura 4.40. Cambios en el índice de humificación (IH) y relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos (AH/AF) observados durante el proceso de compostaje de la mezcla control sin microorganismos (A), con la cepa BY4741 (B), la cepa L3-BY4741 (C) y la cepa C3-BY4741 (D) de *S. cerevisiae*. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias ($n = 3$). Los valores con la misma letra no difieren significativamente a un nivel del 5%.

Si se contrastan los resultados obtenidos con la literatura científica, los autores Tomaszewska-Ciosk y col. (2013) obtuvieron una tasa de biodegradación más rápida en muestras de almidón extruido que contenían *S. cerevisiae*. Otros trabajos con otras especies microbianas, como el de Jurado y col. (2014a), mostraron como la bioaumentación de la mezcla inicial a compostar con microorganismos nativos influyó en la mejora de la efectividad y acortamiento del proceso, obteniendo un producto final de mejor calidad. Chaturvedi y col. (2010) observaron una descomposición

más rápida y mejores resultados en los parámetros de madurez del compost en aquellas mezclas inoculadas con diferentes especies de hongos y bacterias.

Por otra parte, el impacto que causa el incremento de las temperaturas durante el proceso de compostaje sobre los microorganismos modificados genéticamente tiene el potencial de desnaturalizar los constituyentes de sus células y como consecuencia, el calor es probablemente un parámetro clave para la manipulación, el control y la disposición segura de estos microorganismos (Singh y col., 2006). Así, como se esperaba, a lo largo de los ensayos de compostaje no se detectó la presencia de *S. cerevisiae* tras la fase termófila. En este sentido, existen estudios que demuestran que el compostaje puede ser utilizado para reducir los microorganismos modificados genéticamente. Así, Guan y col. (2010) inocularon estiércol de gallina con *Escherichia coli* que transportaba transgenes en plásmidos recombinantes y observaron que tras 10 días de compostaje con temperaturas de hasta 61,5 °C, el microorganismo se había inactivado y los plásmidos perdieron su capacidad para ser transformados o movilizados. En otro estudio, se demostró como después de 29 días de compostaje con estiércol de gallina y turba bioaumentados con la cepa modificada genéticamente de *Pseudomonas chlororaphis* RN-L11, no se detectaron transgenes de este microorganismo cuando las temperaturas superaron los 45 °C (Guan y col., 2004).

Los resultados obtenidos en este apartado junto a los descritos en la literatura científica son indicativos de que el compostaje es una técnica segura para estudiar el comportamiento de microorganismos modificados genéticamente, ya que son eliminados durante el proceso. En una siguiente fase de investigación queda pendiente la determinación de la eliminación de los genes clonados por PCR.

4.9.3. Influencia de la bioaumentación con *Brevundimonas naejangsanensis* y *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* en la eliminación de azitromicina durante el compostaje

Se llevaron a cabo ensayos de bioaumentación del compostaje con los microorganismos aislados previamente de la mezcla de paja de arroz y lodo de depuradora con la presencia de azitromicina, con la finalidad de investigar el efecto de estos inóculos en la eliminación del antibiótico. Las dos cepas utilizadas capaces de degradar la azitromicina fueron las identificadas como *B. naejangsanensis* y *A. faecalis* (Tabla 4.12). Ambas cepas se inocularon en dos ensayos diferentes, a los cuales se les adicionó azitromicina a concentraciones elevadas. Para comparar la tasa de degradación del fármaco a lo largo de estos experimentos, se prepararon dos controles sin la presencia de inóculos, pero a los que también se les añadió el anitibiótico.

Ambos experimentos con los inóculos mostraron un perfil similar y no difirieron en gran medida del control, con una duración de la fase termófila de 22-26 días y una temperatura máxima de 72 °C (Figuras 4.41 y 4.42). Por lo que respecta a la evolución de los parámetros fisicoquímicos y biológicos, no se observaron diferencias entre los controles y las mezclas con inóculos (datos no mostrados).

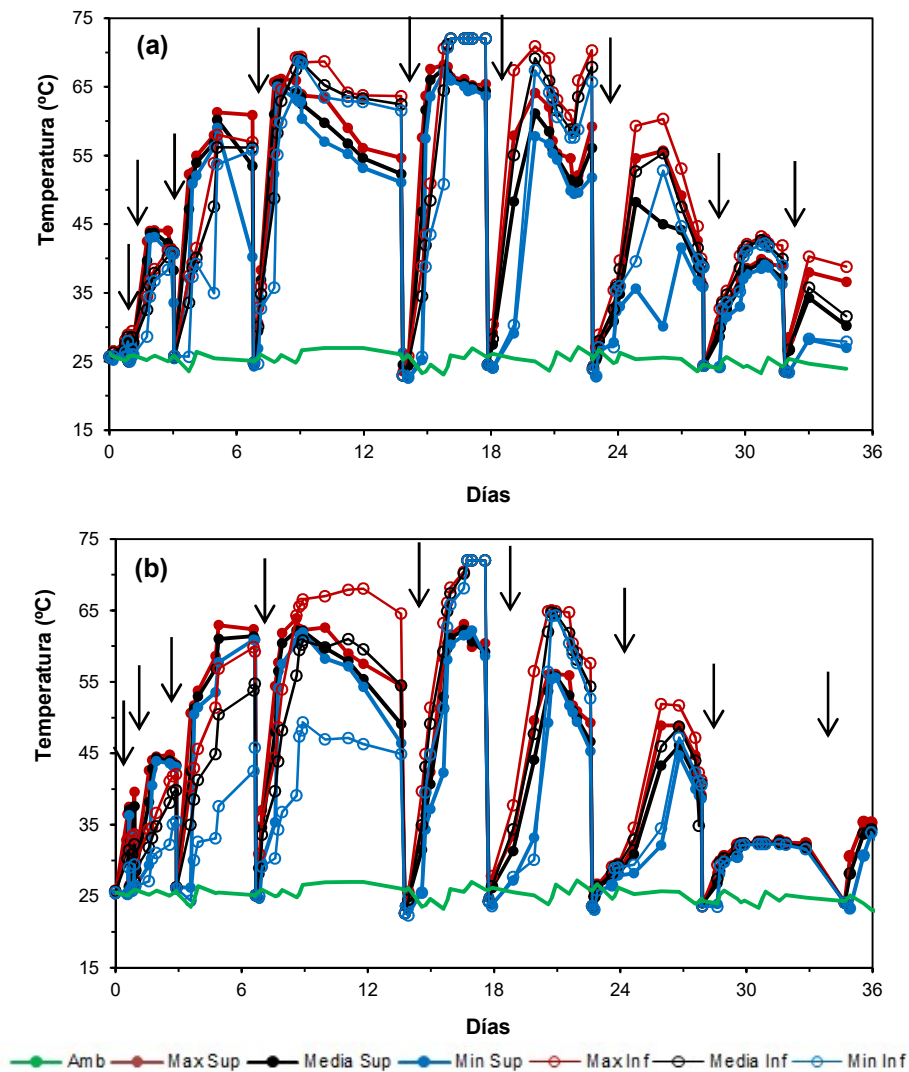


Figura 4.41. Perfil de temperaturas de la mezcla con azitromicina (a) y de la misma mezcla adicionada con *B. naejangsensis* (b). Se muestra la temperatura ambiente (Amb), la máxima (Max), media y la mínima (Min) de la sonda superior (Sup) e inferior (Inf) de los vasos Dewar. Las temperaturas mostradas son las medias de las medidas realizadas y el error estándar (no mostrado para simplificar la figura) fue de $\pm 0,5$ °C. Las flechas indican los volteos realizados durante los experimentos.

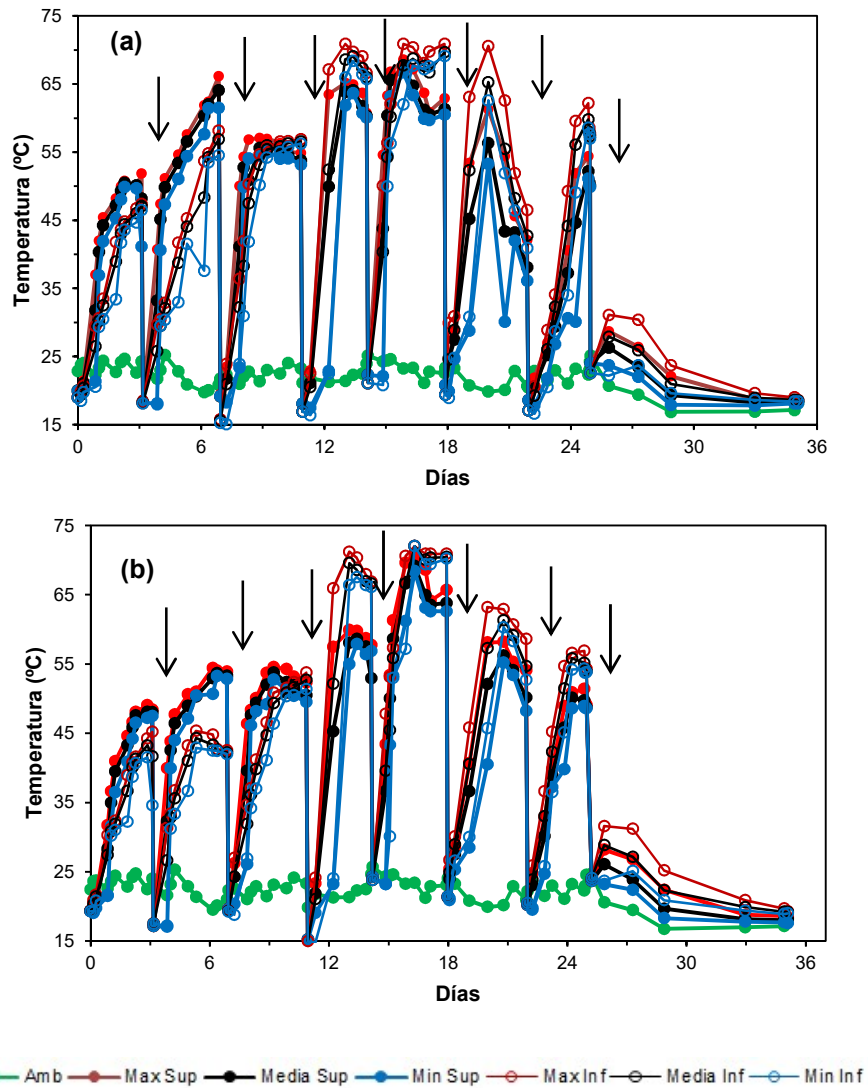


Figura 4.42. Perfil de temperaturas de la mezcla con azitromicina (a) y de la misma mezcla adicionada con *A. faecalis* (b). Se muestra la temperatura ambiente (Amb), la máxima (Max), media y la mínima (Min) de la sonda superior (Sup) e inferior (Inf) de los vasos Dewar. Las temperaturas mostradas son las medias de las medidas realizadas y el error estándar (no mostrado para simplificar la figura) fue de $\pm 0,5$ °C. Las flechas indican los volteos realizados durante los experimentos.

La evolución de la concentración de la azitromicina a lo largo de los ensayos de compostaje se muestra en las Figuras 4.43 y 4.44. El experimento inoculado con la cepa *B. naejangsanensis* mostró un 81% de reducción del fármaco, mientras que en su respectivo control se redujo un 92% a los 23 días de compostaje. La eliminación se ajustó a una cinética de degradación de primer orden, con periodos de semirreacción de 10,8 días y 6,3 días, respectivamente. En este contexto, algunos autores indican que en ocasiones la actividad microbiana tiende a disminuir durante la bioaumentación de residuos debido a la competencia existente entre ellos, y que por lo tanto, se hace necesaria la re-inoculación para mantener una eliminación eficiente de los contaminantes orgánicos (Semblante y col., 2015). No existen estudios del proceso de compostaje con inoculación de *B. naejangsanensis*. Rodríguez-Rodríguez y col. (2014) mostraron que una segunda inoculación del organismo *Trametes versicolor* en la biopila con lodo y paja de trigo a los 42 días de tratamiento provocó una mayor reducción de los fármacos que con la primera adición. Por otra parte, algunos autores han descrito que la inoculación de bacterias no estimuló significativamente la degradación de hidrocarburos (Rein y col., 2016) y Madrigal-Zúñiga y col. (2016) solamente observaron un efecto positivo de la bioaumentación en la degradación de carbofurano en una de las dos mezclas ensayadas, remarcando la importancia de realizar un estudio exhaustivo previo de las mezclas bioaumentadas antes de su aplicación a mayor escala.

En cuanto a la evolución de la concentración de azitromicina durante el proceso de compostaje con *A. faecalis* subsp. *faecalis*, esta se eliminó un 91% en la mezcla control y un 94% en la mezcla con la presencia del inóculo (Figura 4.44). Además, esta reducción se ajustó a una cinética de degradación de primer orden, siendo la mezcla inoculada la cual presentó una tasa de degradación de un 16% más rápida que la mezcla control. Entre los estudios más recientes se pueden encontrar el de

Zhang y col. (2015a), en el cual obtuvieron un 11% más de degradación de la oxitetraciclina en la mezcla con *Staphylococcus* sp. que en el control durante el compostaje de estiércol de cerdo. La adición de diversas bacterias durante el compostaje de diferentes residuos tuvo como resultado mayores porcentajes de degradación de hidrocarburos y diésel (Taccari y col., 2012; García-Díaz y col., 2013).

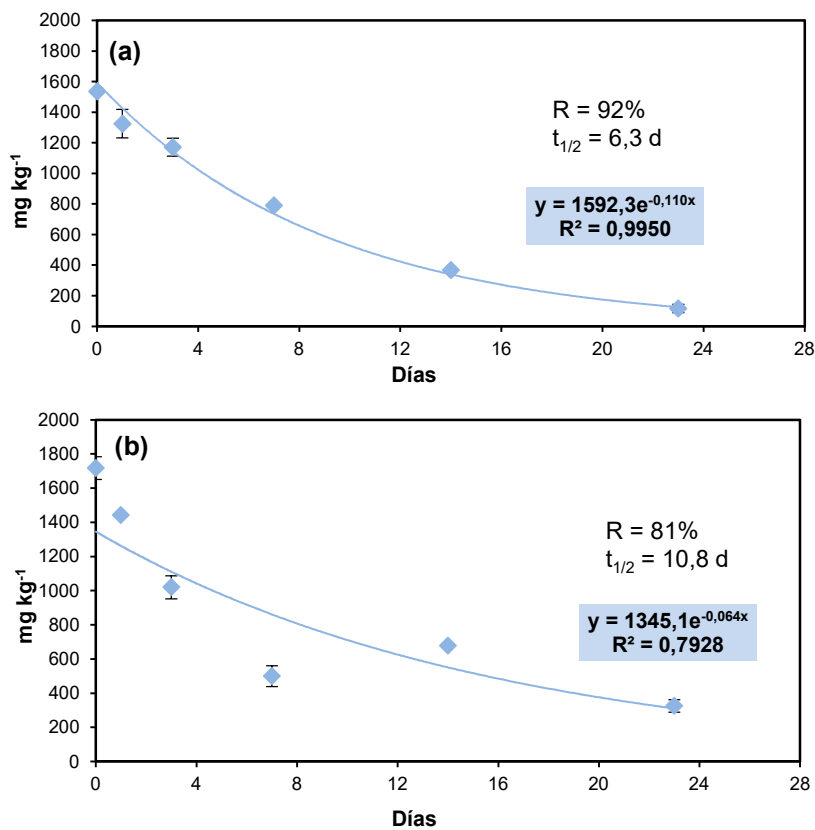


Figura 4.43. Evolución de la concentración de azitromicina en la mezcla control (a) y en la misma mezcla adicionada con *B. naejangsanensis* (b). Se muestran las ecuaciones de las cinéticas de degradación de primer orden, así como el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción ($t_{1/2}$) en días (d). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

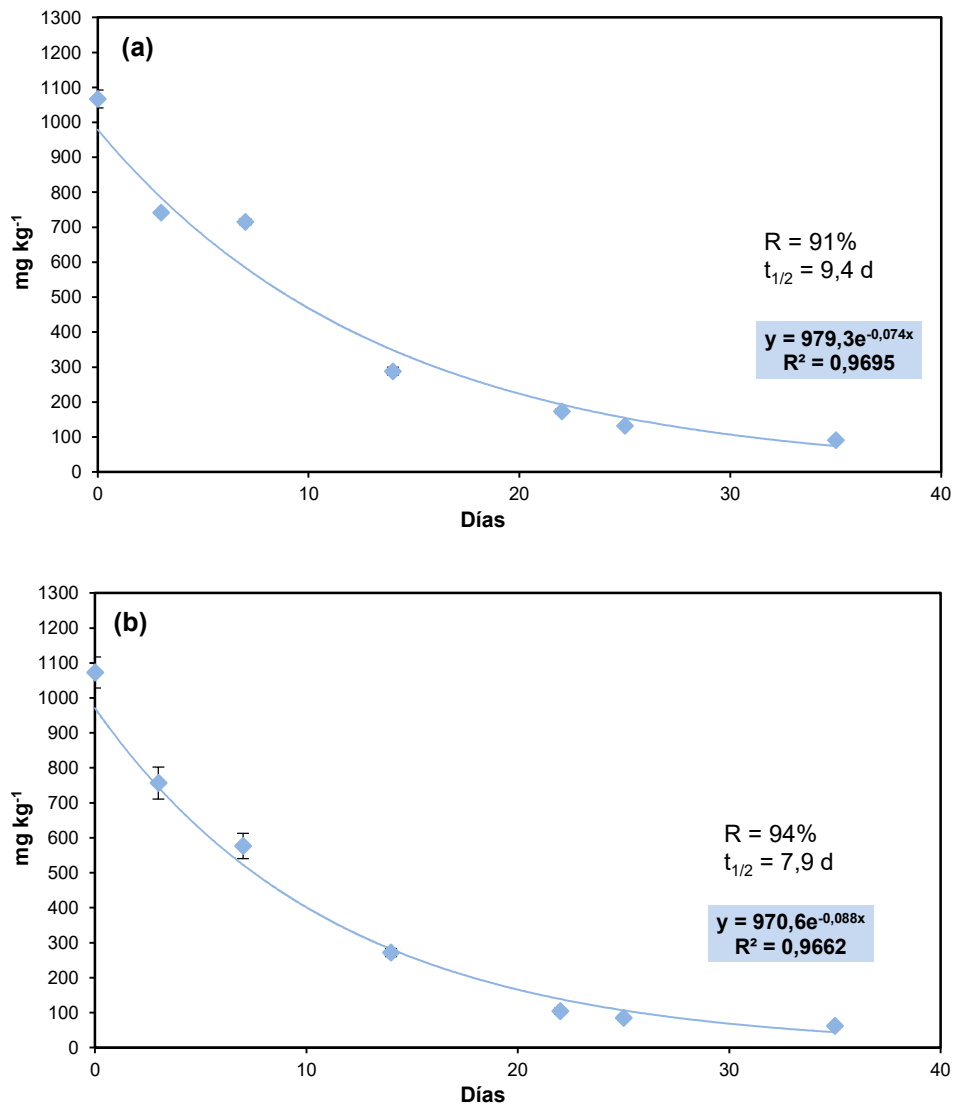


Figura 4.44. Evolución de la concentración de azitromicina en la mezcla control (a) y en la misma mezcla adicionada con *A. faecalis* (b). Se muestra el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción ($t_{1/2}$) en días (d). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

4.9.4. Influencia de la bioaumentación con *Klebsiella oxytoca* en la eliminación de ibuprofeno durante el compostaje

En este apartado, el objetivo fue el estudio el efecto de *K. oxytoca* sobre la eliminación de ibuprofeno añadido a concentraciones elevadas durante el proceso de compostaje. Este microorganismo fue aislado e identificado a partir de la mezcla de paja de arroz y lodo de depuradora con este fármaco (Tabla 4.12). Para comparar la tasa de degradación del fármaco a lo largo del experimento, se preparó un control sin la presencia del inóculo, pero al cual también se le añadió el fármaco.

Las únicas diferencias encontradas en los parámetros fisicoquímicos y biológicos entre ambas mezclas, fueron la obtención de una relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos más elevada en la mezcla inoculada con *K. oxytoca* (14,37) en comparación con la mezcla control (10,58), así como una mayor rapidez en el inicio de la fase termófila, la cual empezó 10 h antes en la mezcla inoculada y el mantenimiento de temperaturas por encima de 55 °C durante un periodo más largo (Figura 4.45). Las actividades enzimáticas determinadas utilizando las tiras API, siguieron el mismo comportamiento descrito por Tiquia y col. (2001) aunque en este caso se observó una menor reactividad en general, en comparación con los ensayos del apartado anterior y tampoco se observaron diferencias notables entre el control y la mezcla con el inóculo (datos no mostrados).

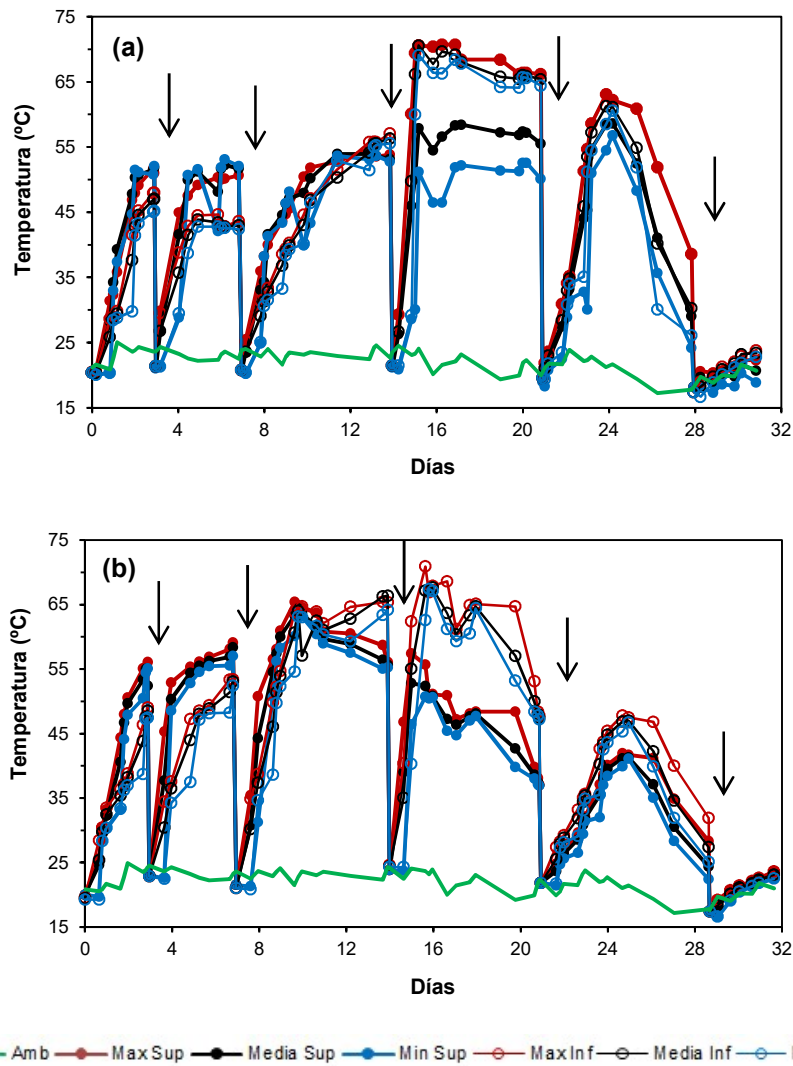


Figura 4.45. Perfil de temperaturas de la mezcla con ibuprofeno (a) y de la misma mezcla adicionada con *K. oxytoca* (b). Se muestra la temperatura ambiente (Amb), la máxima (Max), media y la mínima (Min) de la sonda superior (Sup) e inferior (Inf) de los Dewar. Las temperaturas mostradas son las medias de las medidas realizadas y el error estándar (no mostrado para simplificar la figura) fue de $\pm 0,5$ °C. Las flechas indican los volteos realizados durante los experimentos.

La evolución de la concentración de ibuprofeno a lo largo de los ensayos se muestra en la Figura 4.46. Hubo una mayor reducción de la concentración del antiinflamatorio en la mezcla inoculada con *K. oxytoca* (95%) en comparación con el control (83%). En ambos casos, la eliminación del fármaco se ajustó a una cinética de degradación de primer orden, mostrando un tiempo de semirreacción de 17,3 días en la mezcla control y 9,8 días en la mezcla con el inóculo.

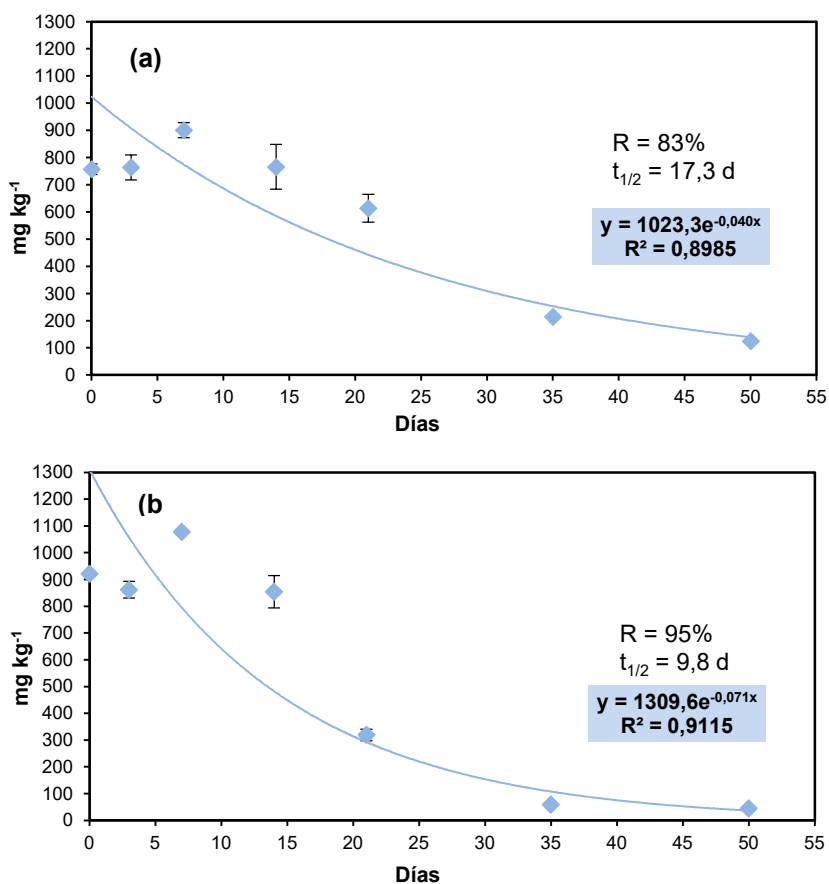


Figura 4.46. Evolución de la concentración de ibuprofeno en la mezcla control (a) y en la misma mezcla adicionada con *K. oxytoca* (b). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

Los resultados obtenidos en los tres ensayos de bioaumentación del compostaje con microorganismos capaces de utilizar los fármacos como fuente de carbono y/o nitrógeno para su crecimiento, muestran una mejora en la eficiencia de la degradación de azitromicina e ibuprofeno durante el proceso de compostaje. Así, las mezclas que se mostraron más activas en la reducción de los medicamentos fueron las inoculadas con *A. faecalis* subsp. *faecalis* y *K. oxytoca*. No obstante, en ocasiones es necesaria la reinoculación de microorganismos a lo largo del proceso para obtener tasas de degradación de los fármacos más rápidas (Semblante y col., 2015).

4.9.5. Correlación entre la concentración de los fármacos y los parámetros analíticos.

Con la finalidad de estudiar la influencia de las características fisicoquímicas y biológicas en la eliminación de azitromicina e ibuprofeno durante la bioaumentación del compostaje, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre estos parámetros (Tabla 4.13). Los resultados mostraron fuertes correlaciones (a $p < 0,05$ y $p < 0,01$) entre los medicamentos y los parámetros fisicoquímicos (Tabla 4.13). Sin embargo, en el experimento de bioaumentación con *B. naejangsanensis*, la azitromicina solamente se correlacionó negativamente con la conductividad eléctrica. Únicamente se observó una correlación con los parámetros biológicos en el caso del ibuprofeno y la actividad deshidrogenasa. Por lo que respecta al experimento con *A. faecalis* subsp. *faecalis*, se encontraron fuertes correlaciones tanto en el control como en la mezcla con microorganismos. El experimento inoculado con *K. oxytoca* fue el que mostró mayores correlaciones entre la concentración de ibuprofeno y las características fisicoquímicas. El análisis de correlación muestra como el

proceso de compostaje con la inoculación *A. faecalis* y *K. oxytoca*, tuvieron una mayor influencia en la eliminación de azitromicina e ibuprofeno, respectivamente.

Tabla 4.13

Coefficiente de correlación de Pearson obtenido entre la concentración de fármacos y los parámetros fisicoquímicos y biológicos de los experimentos de bioaumentación del compostaje con *B. naejangsanensis*, *A. faecalis* subsp. *faecalis* y *K. oxytoca*: CE (conductividad eléctrica); MOT (materia orgánica total); C_{orgO} (carbono orgánico oxidable); N_t (nitrógeno total); IH (índice de humificación); AH/AF (relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos); C_s (carbono soluble); ADH (actividad deshidrogenasa).

| | pH | CE | MOT | C _{orgO} | N _t | C/N | IH | AH/AF | C _s | ADH |
|---|---------|----------|---------|-------------------|----------------|---------|---------|-------|----------------|----------|
| A | ns | -0,984** | 0,958** | 0,951* | -0,978** | 0,997** | -0,988* | ns | ns | ns |
| B | ns | -0,884* | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| C | ns | -0,935** | 0,969** | 0,918* | -0,944** | 0,961** | - | - | ns | ns |
| D | ns | -0,986** | 0,960** | ns | -0,964* | 0,915* | - | - | ns | ns |
| E | ns | ns | ns | 0,776* | -0,840* | ns | ns | ns | ns | -0,919** |
| F | -0,900* | -0,821* | 0,885* | 0,834* | -0,825** | 0,817* | -0,940* | ns | ns | ns |

ns: no significativo; * significativo a $p < 0,05$; ** significativo a $p < 0,01$.

A: control+azitromicina; B: *B. naejangsanensis*+azitromicina; C: control+azitromicina; D: *A. faecalis*+azitromicina; E: control+ibuprofeno; F: *K. oxytoca*+ibuprofeno.

4.10. Efecto de la aplicación de diferentes compost sobre la eliminación de fármacos en un suelo agrícola contaminado en condiciones de laboratorio

En la última fase de este trabajo se estudiaron las posibilidades de biorremediación de un suelo agrícola contaminado con fármacos en el laboratorio mediante la adición de diversos compost a diferentes dosis. Además, se investigaron los efectos que podían tener las enmiendas orgánicas en las propiedades del suelo y en la eliminación de los compuestos, así como el origen de su degradación, todo ello mediante la preparación de diferentes tratamientos del suelo dentro de recipientes en oscuridad. En todos ellos se adicionaron los fármacos a concentraciones elevadas en tres experimentos diferentes (azitromicina; irbesartán y telmisartán; fluoxetina, venlafaxina y citalopram), a excepción del primer tratamiento que solo contenía el suelo sin contaminar, el cual funcionó como control. El segundo tratamiento se preparó mediante la adición de un inhibidor de la actividad biológica del suelo (HgCl_2) para investigar la naturaleza de la degradación del contaminante (biótica o abiótica). El tercer tratamiento consistió en tiestos sin enmendar con el objetivo de estudiar la atenuación natural del contaminante, es decir, la habilidad intrínseca del suelo para eliminarlo. Los tratamientos restantes se elaboraron con la finalidad de estudiar el efecto conjunto de la bioaumentación, bioestimulación y aclimatación sobre la eliminación de los fármacos mediante la adición de compost de diversos orígenes a diferentes dosis en el suelo contaminado. Además, para entender y explicar la evolución de los fármacos en cada uno de los tratamientos, se realizó un seguimiento de los parámetros fisicoquímicos y biológicos.

4.10.1. Caracterización del suelo agrícola

El suelo utilizado para llevar a cabo los experimentos procedía de una parcela dedicada al cultivo de lechuga y maíz localizada en el término municipal de Picanya (València, l'Horta). Como se puede observar en la Tabla 4.14, se trata de un suelo con un horizonte Ap de una profundidad de unos 20 cm, con textura franco-arcillosa. Presenta un pH ligeramente básico, es fuertemente calcáreo y una fertilidad química adecuada para el cultivo (capacidad de intercambio catiónico, materia orgánica y nitrógeno total). Este suelo corresponde al grupo de los Fluvisoles calcáreos (WRB, 2015).

Tabla 4.14

Características fisicoquímicas del suelo agrícola: carbonato cálcico equivalente (CaCO_3), materia orgánica (MO), conductividad eléctrica (CE), nitrógeno total (N_t), capacidad de intercambio catiónico (CIC). ms: masa seca.

| Propiedades | |
|---|---|
| Color | Pardo claro en seco (7.5 YR 6/4) |
| Textura | Franco-arcillosa |
| Morfología | Estructura en bloques subangulares medianos a gruesos, firme, pocos elementos de tamaño grava y piedra de naturaleza calcárea, con pocas raíces finas y medianas. Moderadamente poroso. |
| Densidad aparente (g cm^{-3}) | $1,42 \pm 0,11$ |
| pH (CaCl_2) | $7,69 \pm 0,01$ |
| CaCO_3 (%) | $25,08 \pm 1,40$ |
| MO (%) | $2,48 \pm 0,05$ |
| CE (dS m^{-1}) | $0,25 \pm 0,30$ |
| N_t (%) | $0,23 \pm 0,03$ |
| CIC ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1} \text{ ms}$) | $22,3 \pm 0,30$ |
| P_2O_5 ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ ms}$) | $15 \pm 0,90$ |

4.10.2. Evolución de la concentración de los fármacos y de los parámetros fisicoquímicos y biológicos en el suelo enmendado y sin enmendar

Destacar que en el caso de los parámetros biológicos medidos en este apartado, el HgCl_2 tuvo un efecto de inhibición de la actividad biológica en todos los experimentos tal y como se esperaba. Es por ello que, el hecho de que la concentración de los fármacos no se redujera en los tratamientos con HgCl_2 , pone de manifiesto que la degradación de los compuestos fue de naturaleza biótica, como ya se podía deducir del apartado 4.6.

El primer experimento se llevó a cabo con el suelo contaminado con irbesartán y telmisartán y a dosis de compost al 1%, 2% y 4%, siendo la dosis agronómica entre el 2% y 4%. Se utilizaron diversos compost entre los cuales se encontraban un compost de residuos hortícolas y turba agotada de invernadero (RHT), un compost maduro de paja de arroz y lodo de depuradora elaborado previamente (PAL), uno de los compost control elaborados con paja de arroz y lodo de depuradora con relación C/N de 24 obtenidos en el apartado 4.5 (PAL24), un compost con estos mismos residuos procedente del ensayo de bioaumentación con las cepas transgénicas de *Saccharomyces cerevisiae* (BIO) (apartado 4.9.2) y el compost que fue obtenido en el ensayo del apartado 4.4 con relación C/N de 17 y con medicamentos (PAL17).

Como se puede observar, la concentración de irbesartán disminuyó en todos los tratamientos y se ajustó a una cinética de degradación de primer orden, a excepción del suelo con una dosis de 4% de PAL17, en el cual no se ajustó adecuadamente (Figuras 4.47, 4.48 y 4.49).

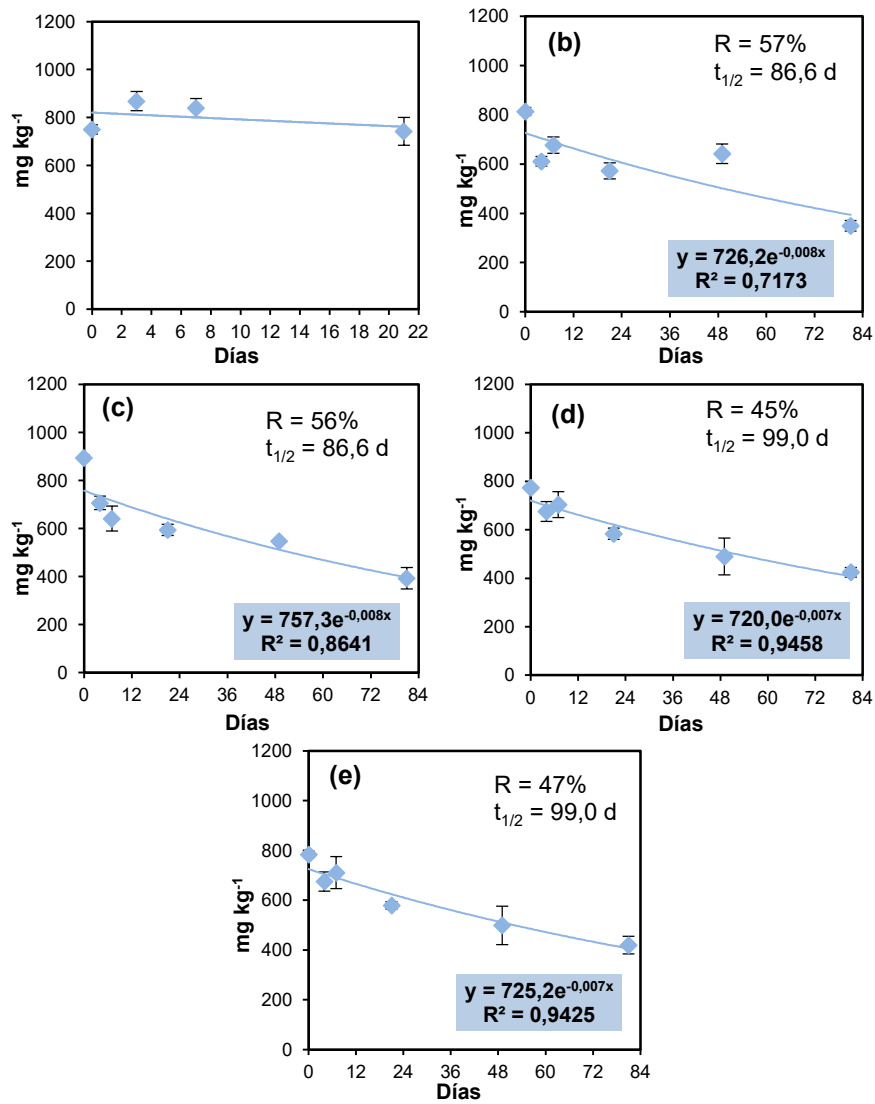


Figura 4.47. Evolución de la concentración de irbesartán en el suelo agrícola contaminado con antihipertensivos sin enmendar y enmendado con diversos compost: suelo con HgCl₂ (a); suelo (b); suelo con 1% de compost de residuos hortícolas y turba agotada de invernadero (RHT) (c); suelo con 2% RHT (d); suelo con 4% RHT (e). Se muestra el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción (t_{1/2}) en días (d) para cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

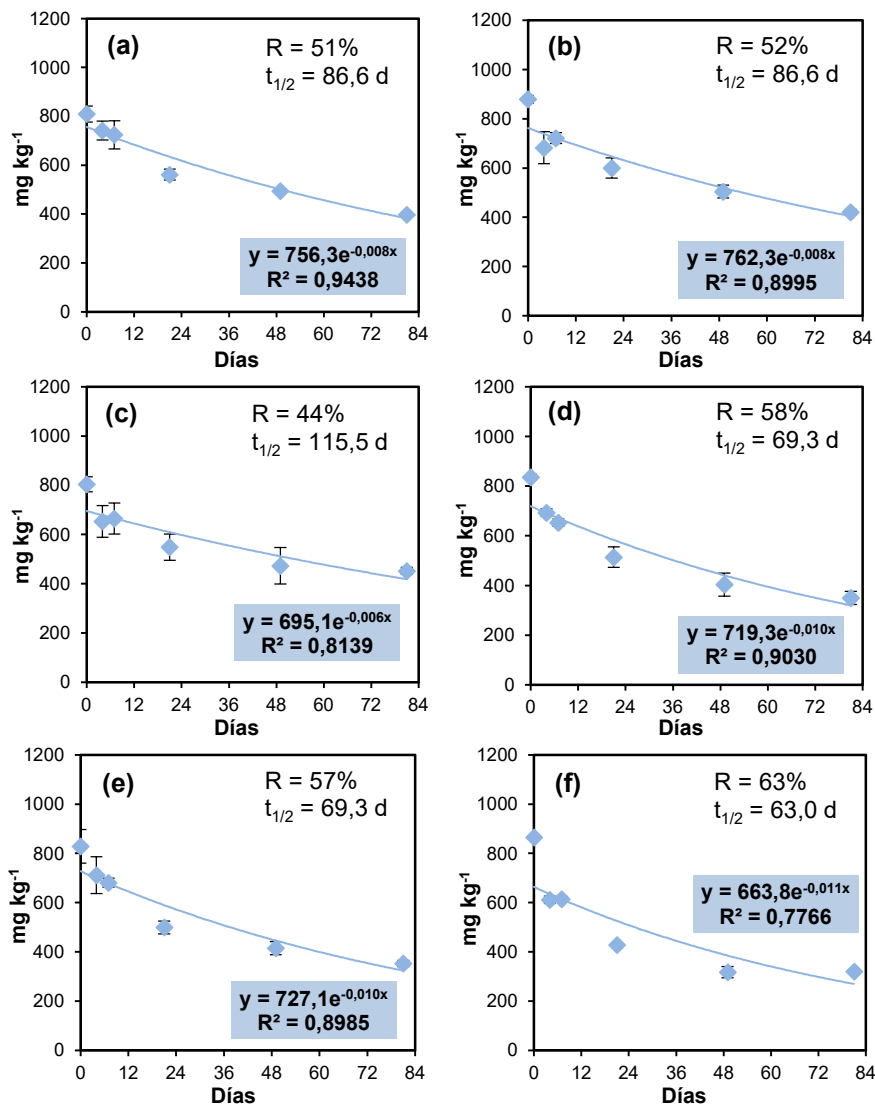


Figura 4.48. Evolución de la concentración de irbesartán en el suelo agrícola contaminado con antihipertensivos sin enmendar y enmendado con diversos compost: suelo con 1% compost de paja de arroz y lodo de depuradora maduro (PAL) (a); suelo con 2% PAL (b); suelo con 4% PAL (c); suelo con 1% compost de paja de arroz y lodo de depuradora con relación C/N de 24 (apartado 4.5) (PAL24) (d); suelo con 2% PAL24 (e); suelo con 4% PAL24. Se muestra el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción (t_{1/2}) en días (d) para cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

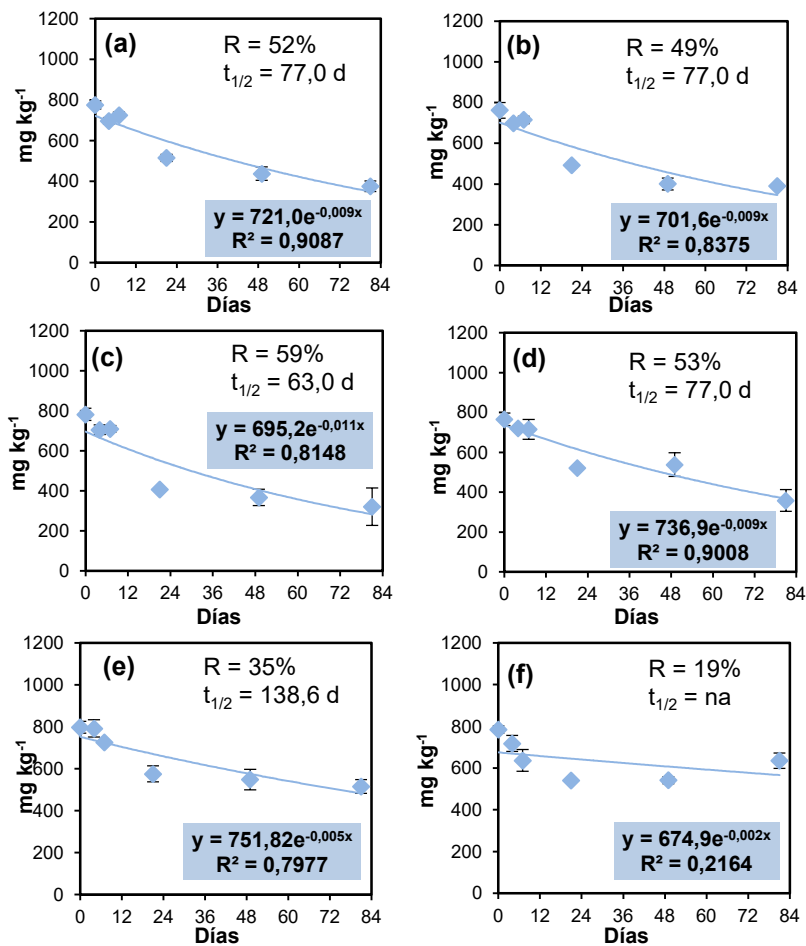


Figura 4.49. Evolución de la concentración de irbesartán en el suelo agrícola contaminado con antihipertensivos sin enmendar y enmendado con diversos compost: suelo con 1% compost de paja de arroz y lodo de depuradora procedente de los ensayos de bioaumentación con las cepas transgénicas de *S. cerevisiae* (apartado 4.9.2) (BIO) (a); suelo con 2% BIO (b); suelo con 4% BIO (c); suelo con 1% compost de paja de arroz y lodo de depuradora procedente del ensayo con relación C/N de 17 y con fármacos (apartado 4.4) (PAL17) (d); suelo con 2% PAL17 (e); suelo con 4% PAL17 (e). Se muestra el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción ($t_{1/2}$) en días (d) para cada tratamiento. na: no aplicable. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

Los periodos de semirreacción obtenidos fueron de 86,6 días en el suelo con los fármacos y fueron iguales o superiores en el caso de los compost RHT, PAL y PAL17 a dosis del 4% (99,0 días, 115,5 días y 138,6 días, respectivamente). Sin embargo, en el caso de los tratamientos con PAL24 y BIO, la tasa de degradación fue más rápida en la dosis de 4% siendo de 63,0 días (Figuras 4.48 y 4.49). Estos hechos están relacionados con el comportamiento de los parámetros biológicos, ya que no se encontraron diferencias en los parámetros fisicoquímicos entre los diferentes tratamientos (datos no mostrados). Así, en general se puede observar como en los tratamientos con los compost RHT, PAL y PAL17, el consumo de oxígeno y la actividad deshidrogenasa fueron iguales e incluso inferiores que en el suelo sin enmendar ($p < 0,05$) (Tabla 4.15). Estos resultados sugieren que las características de estos compost no favorecieron la actividad de los microorganismos, posiblemente debido a su salinidad y a que se trata de compost más antiguos y maduros en los cuales los microorganismos se encuentran inactivos a causa de su bajo contenido en humedad. De hecho, RHT y PAL tienen aproximadamente unos 4 años, mientras que PAL17 fue uno de los primeros compost que se obtuvieron en la realización de la parte experimental de este trabajo, siendo más antiguo que PAL24 y BIO. Por lo tanto, en estos casos, los microorganismos que están involucrados en la degradación del fármaco proceden posiblemente del suelo, los cuales no están adaptados a las condiciones de salinidad de estos compost. En este sentido, la actividad biológica medida en consumo de oxígeno se trata de un parámetro que se ha utilizado extensamente como un indicador ecofisiológico que puede utilizarse para evaluar el estrés de la población microbiana (Álvarez-Martín y col., 2016). Además, la actividad deshidrogenasa también se considera otro indicador general de la actividad microbiana del suelo, ya que se produce dentro de las células vivas de todos los microorganismos (Kaczynski y col., 2016). Por otra parte, se ha demostrado que los suelos

experimentan un aumento de la salinidad después de la aplicación de enmiendas orgánicas debido a la solubilización directa de los iones y a la mineralización del compost que libera nutrientes minerales solubles, lo cual puede tener efectos negativos en la actividad biológica de los suelos (Sivaprakasam y col., 2011; Scotti y col., 2016).

Tabla 4.15

Consumo de oxígeno y actividad deshidrogenasa del suelo agrícola contaminado con antihipertensivos sin enmendar y enmendado con diversos compost. Se muestra la desviación estándar de las medias ($n = 3$). Los valores con la misma letra no difieren significativamente a un nivel del 5%.

| Tratamientos | Consumo oxígeno 72 horas (mg O ₂ g ⁻¹ masa seca) | | Actividad deshidrogenasa (µg INTF g ⁻¹ h ⁻¹ masa seca) | | |
|-----------------------|---|---------------|---|----------|------------|
| | Inicial | Final | 0 días | 7 días | 50 días |
| control* | 0,71 ± 0,08 | 0,66 ± 0,07cd | 64 ± 17 | 63 ± 26 | 263 ± 42a |
| s + HgCl ₂ | 0,20 ± 0,24 | 0,07 ± 0,04g | 17 ± 6 | 4 ± 1 | 13 ± 1b |
| s + fármacos | - | - | 81 ± 19 | 90 ± 12 | 143 ± 29cd |
| s + 1% RHT | 0,53 ± 0,03 | 0,42 ± 0,19ab | 48 ± 15 | 72 ± 10 | 141 ± 29cd |
| s + 2% RHT | 0,54 ± 0,02 | 0,38 ± 0,04a | 74 ± 9 | 59 ± 13 | 120 ± 28ce |
| s + 4% RHT | 0,48 ± 0,09 | 0,51 ± 0,07b | 107 ± 13 | 75 ± 23 | 111 ± 4f |
| s + 1% PAL | 0,62 ± 0,05 | 0,83 ± 0,13e | 71 ± 7 | 39 ± 14 | 171 ± 23gh |
| s + 2% PAL | 0,95 ± 0,17 | 0,64 ± 0,15cd | 87 ± 19 | 80 ± 20 | 134 ± 28ce |
| s + 4% PAL | 0,46 ± 0,08 | 0,52 ± 0,07b | 77 ± 3 | 119 ± 15 | 142 ± 21cd |
| s + 1% PAL24 | 0,81 ± 0,09 | 0,56 ± 0,06c | 102 ± 22 | 132 ± 8 | 215 ± 26i |
| s + 2% PAL24 | 0,84 ± 0,12 | 0,53 ± 0,18bc | 158 ± 20 | 159 ± 27 | 166 ± 31dg |
| s + 4% PAL24 | 0,94 ± 0,09 | 0,70 ± 0,10de | 139 ± 37 | 227 ± 48 | 435 ± 6j |
| s + 1% BIO | 0,60 ± 0,15 | 0,19 ± 0,02f | 85 ± 13 | 117 ± 25 | 117 ± 23ef |
| s + 2% BIO | 0,82 ± 0,07 | 0,38 ± 0,07a | 114 ± 8 | 158 ± 32 | 143 ± 20cd |
| s + 4% BIO | 0,88 ± 0,11 | 0,47 ± 0,04b | 182 ± 9 | 198 ± 47 | 143 ± 44d |
| s + 1% PAL17 | 0,52 ± 0,06 | 0,61 ± 0,08c | 63 ± 15 | 120 ± 22 | 201 ± 55i |
| s + 2% PAL17 | 0,79 ± 0,34 | 0,46 ± 0,12b | 118 ± 20 | 159 ± 21 | 198 ± 39hi |
| s + 4% PAL17 | 0,92 ± 0,08 | 0,42 ± 0,03a | 182 ± 11 | 203 ± 44 | 201 ± 32i |

*Todos los tratamientos se contaminaron con antihipertensivos a excepción del control (suelo sin contaminar y sin enmendar); s: suelo; RHT: compost de residuos hortícolas y turba agotada de invernadero; PAL: compost de paja de arroz y lodo de depuradora maduro; PAL24: compost de paja de arroz y lodo de depuradora con relación C/N de 24 (apartado 4.5); BIO: compost de paja de arroz y lodo de depuradora procedente de los ensayos de bioaumentación con las cepas L3-BY4741 y C3-BY4741 de *S. cerevisiae* (apartado 4.9.2); PAL17: compost de paja de arroz y lodo de depuradora procedente del ensayo con relación C/N de 17 y con fármacos (apartado 4.4).

Sin embargo, en los tratamientos con un 4% de PAL24 y BIO ocurrió lo contrario, mostrando una degradación más rápida del irbesartán y una mayor actividad deshidrogenasa en el caso de PAL24 ($p < 0,05$). Este hecho podría estar relacionado con un efecto de bioestimulación y bioaumentación, mediante el cual estos compost aportan nutrientes y microorganismos al suelo que favorecen la actividad biológica y la eliminación del contaminante. Las investigaciones sobre el efecto de las enmiendas orgánicas en suelos contaminados con antihipertensivos son muy escasas. Así, Kodesova y col. (2016) estudiaron la degradación del metoprolol y el atenolol en 13 suelos de orígenes diferentes. Estos autores observaron periodos de semirreacción más bajos en suelos de mayor calidad (con una mejor estructura y mayor contenido en nutrientes) y probablemente con unas mejores condiciones microbianas derivadas del alto contenido en materia orgánica. Se pueden encontrar otros trabajos en los cuales realizaron experimentos con suelo en columnas con la finalidad de estudiar el efecto de la incorporación de una capa de compost y de un sustrato primario compuesto por ácidos húmicos en la reducción de la concentración del atenolol y el metoprolol introducidos con aguas residuales. Los resultados mostraron un efecto positivo en la eliminación de estos compuestos, así como una influencia en las comunidades microbianas y en su diversidad (Alidina y col., 2014; Schaffer y col., 2015).

Es interesante destacar que, aunque la tendencia de la actividad deshidrogenasa fuera a aumentar a lo largo de los experimentos, el suelo con la presencia de antihipertensivos mostró una menor actividad enzimática que el suelo sin contaminar ($p < 0,05$) (Tabla 4.15). Este comportamiento es consecuencia de un posible estrés en las comunidades microbianas del suelo provocado por los antihipertensivos. Existen pocos estudios relacionados con los efectos ecotoxicológicos de los contaminantes emergentes sobre la biota del suelo. En este sentido, Onesios y Bouwer (2012) investigaron la eliminación de 14 PPCPs en

aguas residuales utilizando el sistema suelo-acuífero, el cual se basa en las capacidades del suelo para el reciclaje de estas aguas mediante los procesos físicos, químicos y biológicos tras ser infiltradas a través de el mismo. Estos autores observaron una supresión de las comunidades microbianas debida a la toxicidad de los PPCPs, mediante un análisis de proteínas. Caracciolo y col. (2011) mostraron como un suelo procedente de una cantera que fue utilizada durante diez años para la recepción residuos (lodos y restos de micelios) procedentes de una industria farmacéutica, era pobre en términos de diversidad microbiana, viabilidad bacteriana y actividad biológica. Sin embargo, existe un estudio el cual indica que seis antihipertensivos (propranolol, atenolol, acebutolol, metoprolol, timolol y nadolol) provocaron una baja toxicidad en el organismo *Eisenia fetida* en un suelo artificial compuesto por arena fina, turbera de *Sphagnum* y caolín (Pino y col., 2015).

Los dos siguientes experimentos se realizaron contaminando el suelo con azitromicina y con fluoxetina, venlafaxina y citalopram, pero en estos casos se aplicó una dosis de compost del 2% y el 20%, con la finalidad de poder observar un mayor efecto del compost sobre las características fisicoquímicas, biológicas y la degradación de los fármacos en el suelo. Entre los compost utilizados destacan uno de los controles elaborados con paja de arroz y lodo de depuradora con relación C/N de 24 (PAL24) y los compost obtenidos en los ensayos con azitromicina (CAZ) y antidepresivos (CAD), los tres obtenidos en el apartado 4.5.

En general, no se observó una tendencia clara en la evolución de los parámetros fisicoquímicos (Tablas 4.16 y 4.17), de manera que el pH fue el único que experimentó un incremento significativamente diferente en el tratamiento con un 20% de PAL24 a los 21 días ($p < 0,05$); mientras que el carbono orgánico solamente disminuyó significativamente en el caso de la azitromicina y de forma más acusada en los tratamientos con un 20% de compost ($p < 0,05$).

Tabla 4.16

Variaciones en el pH, conductividad eléctrica (CE), carbonatos (CaCO_3), carbono orgánico (C_{org}) y nitrógeno total (N_t) del suelo agrícola contaminado con azitromicina sin enmendar y enmendado con compost. En el caso de los carbonatos, las medias se han realizado conjuntamente para los tratamientos control, s + HgCl_2 y suelo; s + 2% PAL24 y s + 20% PAL24; s + 2% CAZ y s + 20% CAZ. Se muestra la desviación estándar de las medias ($n = 3$). Los valores con la misma letra no difieren significativamente a un nivel del 5%.

| Parámetros | Días | Tratamientos | | | | | | | |
|-----------------------------|------|---------------|---------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--|
| | | control* | s + HgCl_2 | s + fármacos | s + 2% PAL24 | s + 20% PAL24 | s + 2% CAZ | s + 20% CAZ | |
| pH | 0 | 7,98 ± 0,04 | 7,37 ± 0,06 | 7,74 ± 0,16 | 6,93 ± 0,53 | 5,98 ± 0,21 | 7,58 ± 0,20 | 7,48 ± 0,17 | |
| | 21 | 8,03 ± 0,10a | 7,69 ± 0,01b | 8,13 ± 0,03a | 7,91 ± 0,03c | 7,42 ± 0,01d | 8,10 ± 0,01a | 7,90 ± 0,01c | |
| CE (dS m^{-1}) | 0 | 0,20 ± 0,04 | 0,80 ± 0,04 | 0,34 ± 0,04 | 0,92 ± 0,04 | 1,62 ± 0,04 | 0,50 ± 0,04 | 1,80 ± 0,04 | |
| | 21 | 0,24 ± 0,04ab | 0,53 ± 0,04c | 0,19 ± 0,04a | 0,61 ± 0,04c | 1,61 ± 0,04d | 0,39 ± 0,04b | 1,87 ± 0,04e | |
| CaCO_3 (%) | 0 | 24,90 ± 0,33 | 24,90 ± 0,33 | 24,90 ± 0,33 | 24,25 ± 0,50 | 24,25 ± 0,50 | 22,82 ± 1,90 | 22,82 ± 1,90 | |
| | 21 | | | | | | | | |
| C_{org} (%) | 0 | 1,91 ± 0,01 | 2,28 ± 0,01 | 2,12 ± 0,01 | 2,51 ± 0,01 | 4,74 ± 0,03 | 2,90 ± 0,01 | 5,30 ± 0,02 | |
| | 7 | - | 2,33 ± 0,04 | 2,09 ± 0,01 | 2,54 ± 0,01 | 4,80 ± 0,01 | 2,37 ± 0,06 | 4,47 ± 0,01 | |
| N_t (%) | 21 | 1,81 ± 0,01a | 2,18 ± 0,03b | 2,06 ± 0,01c | 2,27 ± 0,01d | 4,61 ± 0,01e | 2,60 ± 0,01f | 3,93 ± 0,02g | |
| | 0 | 0,14 ± 0,01 | 0,15 ± 0,00 | 0,16 ± 0,01 | 0,20 ± 0,00 | 0,68 ± 0,02 | 0,22 ± 0,01 | 0,35 ± 0,05 | |
| | 7 | - | 0,16 ± 0,00 | 0,17 ± 0,00 | 0,20 ± 0,01 | 0,68 ± 0,02 | 0,17 ± 0,01 | 0,30 ± 0,01 | |
| | 21 | 0,16 ± 0,02a | 0,16 ± 0,02a | 0,16 ± 0,00a | 0,20 ± 0,00a | 0,64 ± 0,06b | 0,20 ± 0,01a | 0,28 ± 0,01c | |

*Todos los tratamientos se contaminaron con azitromicina a excepción del control (suelo sin contaminar y sin enmendar); s: suelo; PAL24: compost de paja de arroz y lodo de depuradora con relación C/N de 24 (apartado 4.5); CAZ: compost de paja de arroz y lodo de depuradora procedente del ensayo con azitromicina (apartado 4.5).

Tabla 4.17

Variaciones en el carbono orgánico oxidable (C_{orgO}), carbono orgánico (C_{org}), carbono total (C_t) y nitrógeno total (N_t) del suelo agrícola contaminado con antidepresivos sin enmendar y enmendado con compost. Se muestra la desviación estándar de las medias ($n = 3$). Los valores con la misma letra no difieren significativamente a un nivel del 5%.

| Parámetros | Días | Tratamientos | | | | | | |
|----------------|------|-----------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|-------------|
| | | s + HgCl ₂ | s + fármacos | s + 2% PAL24 | s + 20% PAL24 | s + 2% CAD | s + 20% CAD | s + 20% CAD |
| C_{orgO} (%) | 0 | 1,03 ± 0,01 | 1,02 ± 0,01 | 1,50 ± 0,03 | 4,12 ± 0,03 | 1,42 ± 0,07 | 3,46 ± 0,30 | |
| | 4 | - | 1,25 ± 0,08 | 1,48 ± 0,04 | 3,89 ± 0,21 | 1,39 ± 0,14 | 3,74 ± 0,21 | |
| | 7 | - | 1,24 ± 0,04 | 1,47 ± 0,01 | 3,73 ± 0,05 | 1,39 ± 0,01 | 3,05 ± 0,02 | |
| | 21 | 1,28 ± 0,07a | 1,20 ± 0,01b | 1,40 ± 0,02c | 4,00 ± 0,27d | 1,28 ± 0,01a | 3,76 ± 0,10e | |
| C_{org} (%) | 0 | 1,50 ± 0,09 | 1,54 ± 0,08 | 1,80 ± 0,02 | 5,06 ± 0,06 | 1,64 ± 0,04 | 3,13 ± 0,28 | |
| | 4 | - | 1,55 ± 0,11 | 1,78 ± 0,07 | 4,11 ± 0,01 | 1,70 ± 0,00 | 3,62 ± 0,36 | |
| | 7 | - | 1,49 ± 0,00 | 1,87 ± 0,02 | 4,75 ± 0,07 | 1,75 ± 0,04 | 3,69 ± 0,30 | |
| | 21 | 1,70 ± 0,11a | 1,54 ± 0,05b | 1,88 ± 0,07c | 4,37 ± 0,03d | 1,72 ± 0,01a | 3,55 ± 0,22e | |
| C_t (%) | 0 | 5,28 ± 0,10 | 5,21 ± 0,08 | 5,58 ± 0,04 | 8,41 ± 0,12 | 5,46 ± 0,28 | 7,16 ± 0,64 | |
| | 4 | - | 5,11 ± 0,11 | 5,54 ± 0,03 | 8,18 ± 0,42 | 5,37 ± 0,03 | 7,26 ± 0,08 | |
| | 7 | - | 5,27 ± 0,04 | 5,53 ± 0,05 | 8,54 ± 0,17 | 5,43 ± 0,03 | 7,26 ± 0,47 | |
| | 21 | 5,55 ± 0,10a | 5,22 ± 0,01b | 5,44 ± 0,04c | 8,69 ± 0,26d | 5,34 ± 0,01e | 7,32 ± 0,39f | |
| N_t (%) | 0 | 0,17 ± 0,03 | 0,17 ± 0,02 | 0,22 ± 0,01 | 0,60 ± 0,05 | 0,24 ± 0,02 | 0,43 ± 0,04 | |
| | 4 | - | 0,17 ± 0,03 | 0,22 ± 0,00 | 0,56 ± 0,05 | 0,20 ± 0,03 | 0,45 ± 0,05 | |
| | 7 | - | 0,17 ± 0,02 | 0,20 ± 0,00 | 0,62 ± 0,00 | 0,20 ± 0,02 | 0,51 ± 0,03 | |
| | 21 | 0,17 ± 0,01ab | 0,14 ± 0,00a | 0,21 ± 0,01b | 0,69 ± 0,03c | 0,19 ± 0,01b | 0,56 ± 0,02d | |

Todos los tratamientos se contaminaron con antidepresivos; s: suelo; PAL24: compost de paja de arroz y lodo de depuradora con relación C/N de 24 (apartado 4.5); CAD: compost de paja de arroz y lodo de depuradora procedente del ensayo con antidepresivos (apartado 4.5).

Existen pocos estudios relacionados con la biorremediación de suelos en los cuales realicen un seguimiento de los parámetros fisicoquímicos. Marín-Benito y col. (2014) estudiaron la degradación de diversos pesticidas en suelos enmendados con diferentes compost al 5% durante 12 meses. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por estos autores, los cuales observaron que el carbono orgánico oxidable disminuyó en los tratamientos enmendados con compost, pero en el tratamiento con suelo sin enmendar, no ocurrió lo mismo. Sin embargo, se observó un efecto de las enmiendas orgánicas sobre los parámetros fisicoquímicos, de manera que los experimentos realizados con mayores dosis de compost (20%), presentaron valores significativamente más elevados de todos los parámetros fisicoquímicos a los 21 días ($p < 0,05$).

En cuanto a la actividad deshidrogenasa (Figuras 4.50 y 4.51), los resultados estadísticos mostraron una mayor diferenciación entre los tratamientos al final de los experimentos ($p < 0,05$) (Tablas 4.18 y 4.19). Así, la actividad enzimática fue estimulada por la adición de los compost, alcanzándose valores significativamente mayores ($p < 0,05$) en las dosis con un 20% de los compost previamente expuestos a la presencia de los fármacos (CAZ y CAD). Esto podría explicarse de forma que el compost proporcionara una fuente lábil de carbono y enzimas intra y extracelulares para la comunidad microbiana del suelo o que fuese resultado de cambios en la actividad de los microorganismos inducidos por modificaciones en las propiedades fisicoquímicas del suelo, mejorando su porosidad y aireación (Gao y col., 2015), tal y como ocurrió anteriormente en el experimento con antihipertensivos.

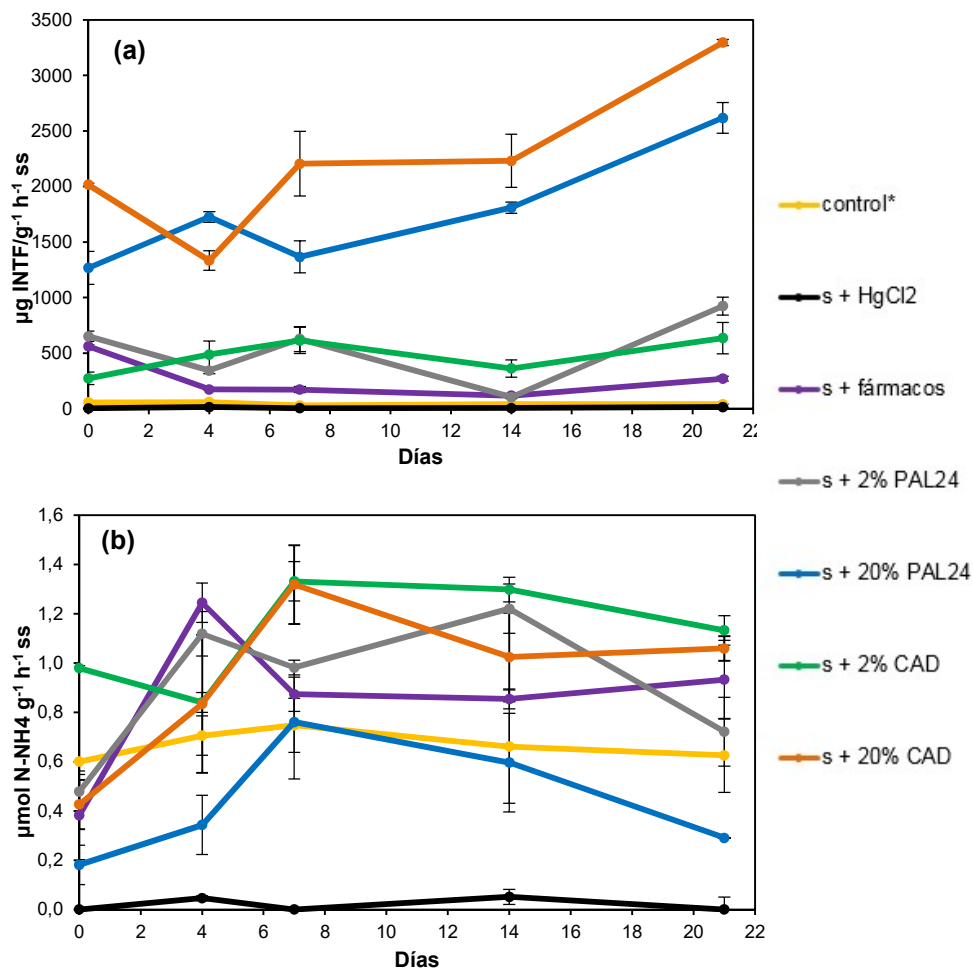


Figura 4.50. Seguimiento de las actividades deshidrogenasa (a) y ureasa (b) del suelo agrícola contaminado con azitromicina sin enmendar y enmendado con compost. Los resultados se expresan en suelo seco (ss). *Todos los tratamientos se contaminaron con azitromicina a excepción del control (suelo sin contaminar y sin enmendar); s: suelo; PAL24: compost de paja de arroz y lodo de depuradora con relación C/N de 24 (apartado 4.5); CAZ: compost de paja de arroz y lodo de depuradora procedente del ensayo con azitromicina (apartado 4.5). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3). Las diferencias significativas se muestran en la Tabla 4.20.

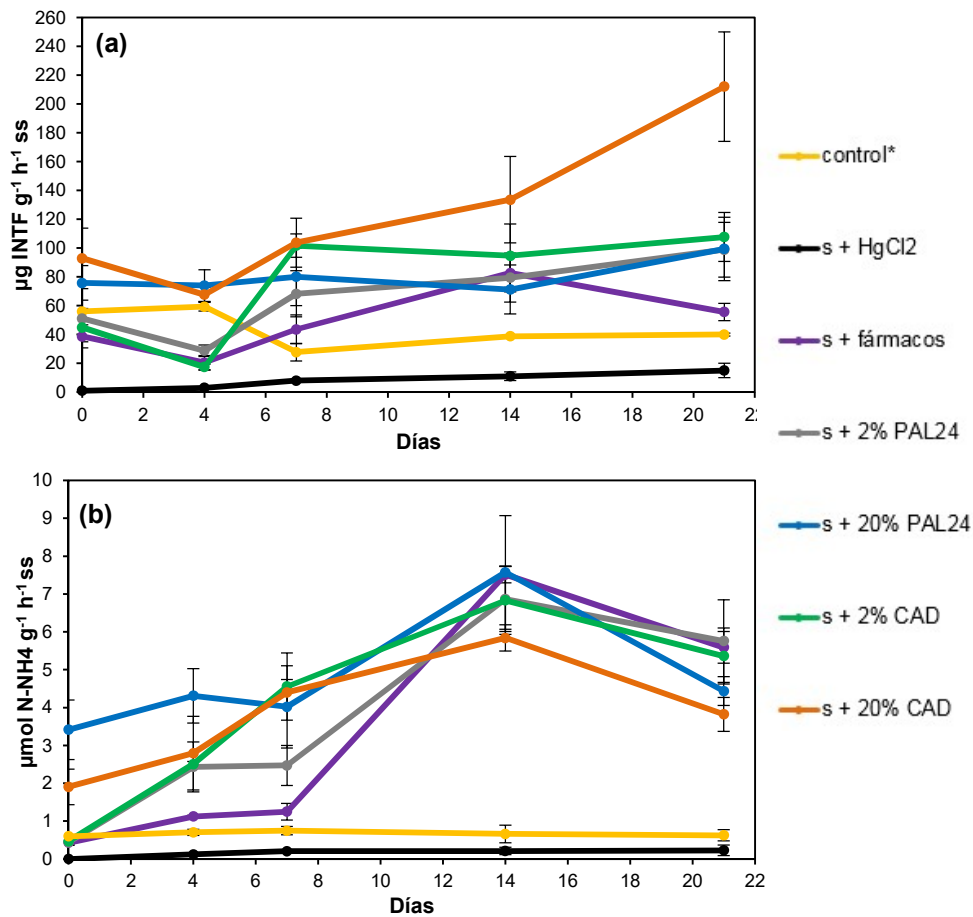


Figura 4.51. Seguimiento de las actividades deshidrogenasa (a) y ureasa (b) del suelo agrícola contaminado con antidepresivos sin enmendar y enmendado con compost. Los resultados se expresan en suelo seco (ss). *Todos los tratamientos se contaminaron con antidepresivos a excepción del control (suelo sin contaminar y sin enmendar); s: suelo; PAL24: compost de paja de arroz y lodo de depuradora con relación C/N de 24 (apartado 4.5); CAD: compost de paja de arroz y lodo de depuradora procedente del ensayo con antidepresivos (apartado 4.5). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3). Las diferencias significativas se muestran en la Tabla 4.20.

Tabla 4.18.

Tratamiento estadístico de la actividad deshidrogenasa (ADH) ($\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ ss}$) y ureasa ($\mu\text{mol N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ ss}$) del suelo agrícola contaminado con azitromicina sin enmendar y enmendado con diversos compost. Se muestra la desviación estándar de las medias ($n = 3$). Los valores con la misma letra no difieren significativamente a un nivel del 5%.

| Tratamiento | ADH | | | ACTIVIDAD UREASA | | |
|---------------------|--------|--------|---------|------------------|---------|---------|
| | 4 días | 7 días | 21 días | 4 días | 7 días | 21 días |
| control* | 59a | 28a | 40a | 0,705a | 0,747a | 0,627a |
| s + HgCl_2 | 14b | 4b | 14b | 0,046b | 0,000b | 0,002b |
| s + fármacos | 172c | 171c | 269c | 1,244ac | 0,873ac | 0,932ce |
| s + 2% PAL24 | 342d | 626d | 923d | 1,118c | 0,981c | 0,721ac |
| s + 20% PAL24 | 1726e | 1366e | 2617e | 0,343d | 0,760a | 0,290d |
| s + 2% CAZ | 487d | 613d | 635f | 0,840a | 1,331d | 1,132e |
| s + 20% CAZ | 3130f | 2205f | 3296g | 0,834a | 1,318d | 1,059ce |

*Todos los tratamientos se contaminaron con azitromicina a excepción del control (suelo sin contaminar y sin enmendar); s: suelo; PAL24: compost de paja de arroz y lodo de depuradora con relación C/N de 24 (apartado 4.5); CAZ: compost de paja de arroz y lodo de depuradora procedente del ensayo con azitromicina (apartado 4.5). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias ($n = 3$).

Tabla 4.19.

Tratamiento estadístico de la actividad deshidrogenasa (ADH) ($\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ ss}$) y ureasa ($\mu\text{mol N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ ss}$) del suelo agrícola contaminado con antidepresivos sin enmendar y enmendado con diversos compost. Se muestra la desviación estándar de las medias ($n = 3$). Los valores con la misma letra no difieren significativamente a un nivel del 5%.

| Tratamiento | ADH | | | ACTIVIDAD UREASA | | |
|---------------------|--------|--------|---------|------------------|---------|---------|
| | 4 días | 7 días | 21 días | 4 días | 7 días | 21 días |
| control* | 59a | 28a | 40a | 0,705a | 0,747a | 0,627a |
| s + HgCl_2 | 3b | 8b | 15b | 0,123b | 0,205a | 0,227b |
| S + fármacos | 20c | 44c | 56a | 1,125c | 1,252a | 5,589c |
| s + 2% PAL24 | 29c | 68c | 99c | 2,436cd | 2,472b | 5,758c |
| s + 20% PAL24 | 74a | 75cd | 97c | 4,311e | 4,038bc | 4,503cd |
| s + 2% CAD | 16c | 102d | 108c | 2,508d | 4,557c | 5,359e |
| s + 20% CAD | 68a | 104d | 212d | 2,796d | 4,402bc | 3,822de |

*Todos los tratamientos se contaminaron con antidepresivos a excepción del control (suelo sin contaminar y sin enmendar); s: suelo; PAL24: compost de paja de arroz y lodo de depuradora con relación C/N de 24 (apartado 4.5); CAD: compost de paja de arroz y lodo de depuradora procedente del ensayo con antidepresivos (apartado 4.5). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias ($n = 3$).

No existen estudios relacionados con el efecto de la azitromicina y los antidepresivos sobre las actividades enzimáticas de los suelos, pero sí con otros antibióticos y pesticidas. En este sentido, Nordenholt y col. (2016) observaron una estimulación de la actividad deshidrogenasa en suelos contaminados con sulfametazina y oxitetraciclina y enmendados con un 5% de estiércol de cerdo. Estos resultados también fueron obtenidos por otros autores con suelos enmendados con compost y contaminados con biocidas (Marín-Benito y col., 2014; Bosso y col., 2015; Pose-Juan y col., 2015; Álvarez-Martín y col., 2016).

Destacar que, en el caso de los experimentos con antidepresivos, la actividad deshidrogenasa fue del orden de más de diez veces menor que en el caso de los experimentos con azitromicina. Otro hecho importante fue que esta actividad enzimática fue más elevada en el tratamiento con el suelo contaminado con azitromicina en comparación al control (suelo sin contaminar) ($p < 0,05$) (Tabla 4.18); mientras que los antidepresivos no tuvieron ningún efecto ($p < 0,05$) (Tabla 4.19). Resultados similares a los nuestros fueron descritos por Srimivasan y Sarmah (2014), los cuales observaron un incremento de la actividad deshidrogenasa en suelos contaminados con sulfametoxazol y por Fang y col. (2014) en suelos con sulfadiazina y clortetraciclina. Sin embargo, existen estudios que muestran como la aplicación de otros quimioterápicos inhibieron esta actividad enzimática, incluso afectando a la diversidad estructural de las comunidades microbianas de los suelos (Liu y col., 2015b; Gutiérrez y col., 2010; Wei y col., 2009). Otros autores no observaron un efecto de la sulfametazina, oxitetraciclina y sulfapiridina sobre este parámetro en los suelos (Nordenholt y col., 2016; Yang y col., 2009; Thiele-Bruhn y Beck, 2005). Esta controversia existente en el efecto de los quimioterápicos sobre la actividad enzimática de los microorganismos del suelo, es indicativa de la necesidad de llevar a cabo más estudios para clarificar los resultados. De hecho, Liu y col. (2009) también observaron estas

discrepancias, indicando que los parámetros microbiológicos, como es el caso de la actividad deshidrogenasa, podrían estar influidos por otros factores que no estuviesen relacionados con los efectos de los fármacos.

Por lo que respecta a la actividad ureasa, se trata de una enzima extracelular inducida que está involucrada en el ciclo del nitrógeno (Fang y col., 2014). Al inicio de los experimentos, esta actividad enzimática fue estimulada por la adición de los compost (Figuras 4.50 y 4.51), mientras que a los 21 días, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p < 0,05$) (Tablas 4.18 y 4.19). Existen estudios que también han descrito un incremento de la actividad ureasa en suelos enmendados con compost (Mengual y col., 2014; Lu y col., 2015; Madejón y col., 2016). Sin embargo, algunos autores indican que en ocasiones no se observa un efecto claro de las enmiendas orgánicas sobre la actividad ureasa. En este sentido, Vargas-García y Suárez-Estrella (2008) indican que la hidrólisis de la urea no muestra una clara dependencia con respecto a los tratamientos del suelo con compost, explicando que la presencia de una elevada concentración de NH_4NO_3 en el compost probablemente sea el factor causante, ya que hacen innecesaria este tipo de actividad. Estos autores también indican que los niveles de metales pesados aportados por ciertos compost pueden contribuir además, a ese efecto. Otro aspecto observado fue la obtención de una mayor actividad ureasa en el suelo con la presencia de los fármacos en comparación con el control ($p < 0,05$) (Tablas 4.18 y 4.19). Así, algunos autores experimentaron un incremento de esta actividad enzimática con la adición de oxitetraciclina (Cao y col., 2016) y carbendazima (Yan y col., 2011) al suelo; mientras que Liu y col. (2015b) y Gutiérrez y col. (2010), observaron la inhibición de la actividad ureasa del suelo contaminado con clortetraciclina y sulfonamidas, respectivamente.

La evolución de la concentración de azitromicina se muestra en la Figura 4.52. Se observó una biodegradación del antibiótico de un 22% en

el suelo, un 24% en el tratamiento con un 2% de PAL24, un 58% con un 20% de PAL24, un 46% con un 2% de CAZ y un 59% con un 20% de CAZ.

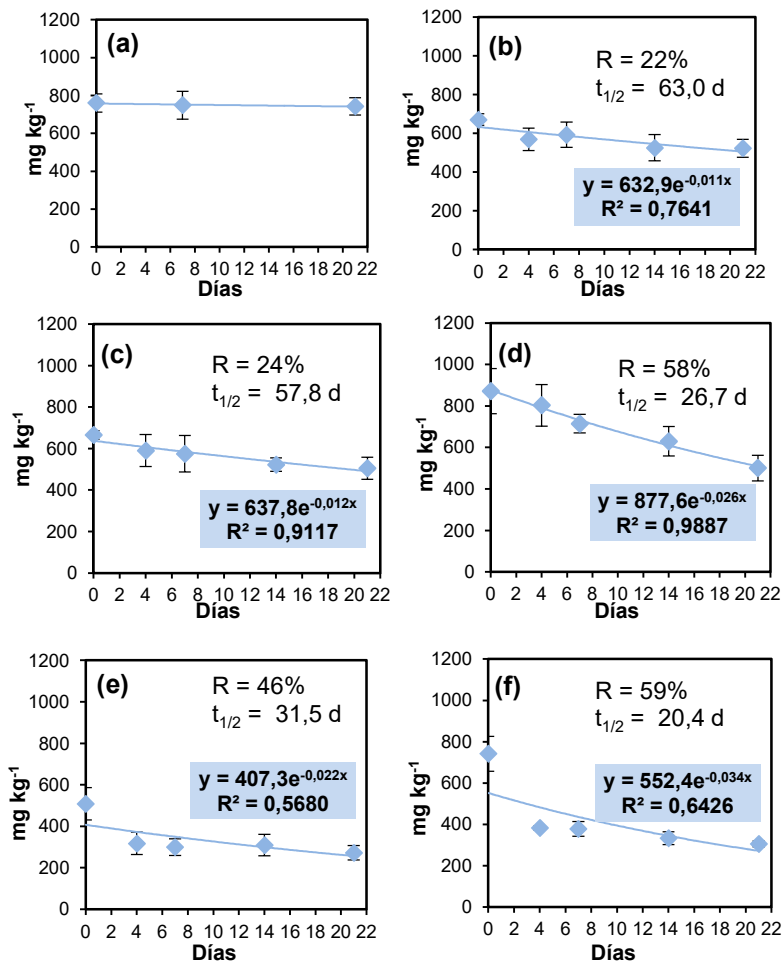


Figura 4.52. Evolución de la concentración de azitromicina en el suelo agrícola contaminado con el antibiótico sin enmendar y enmendado con compost: suelo con HgCl₂ (a); suelo (b); suelo con 2% de compost de paja de arroz y lodo de depuradora con relación C/N de 24 (apartado 4.5) (PAL24) (c); suelo con 20% PAL24 (d); suelo con 2% de compost de paja de arroz y lodo de depuradora procedente del ensayo con azitromicina (apartado 4.5) (CAZ) (e); suelo con 20% CAZ (f). Se muestra el porcentaje de reducción (R) y el periodo de semirreacción (t_{1/2}) en días (d) para cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n = 3).

Sin embargo, los antidepresivos se mostraron más persistentes, ya que la concentración de la fluoxetina, la venlafaxina y el citalopram solamente disminuyeron un 19%, un 7% y un 9% en el tratamiento con un 20% de PAL24, respectivamente (datos no mostrados). Estos resultados están acorde con los obtenidos en los ensayos de compostaje, en los cuales la fluoxetina y el citalopram se biodegradaron ligeramente y la venlafaxina se mostró más persistente (apartado 4.5). Estos hechos, conjuntamente con la menor actividad deshidrogenasa medida en los experimentos con antidepresivos, indican una importante toxicidad de estos fármacos. En los tratamientos en los cuales tuvo lugar la eliminación de los fármacos, esta se ajustó a una cinética de degradación de primer orden, aunque se obtuvieron R^2 bajos en el caso de la azitromicina en los tratamientos con un 2% y un 20% con CAZ, y en el caso de la fluoxetina con un 20% de PAL24. Los periodos de semirreacción calculados para la azitromicina se muestran en la Figura 4.52. Así, la dosis más alta de compost tuvo un mayor efecto en la eliminación del fármaco, mostrando periodos de semirreacción de 26,7 días en PAL24 y 20,4 días en CAZ, siendo este último el que mostró una tasa de degradación más rápida del antibiótico. Por el contrario, el tratamiento control con el suelo sin contaminar fue el que presentó una tasa de degradación de la azitromicina más lenta (63,0 días). Las dosis de compost con un 2% mostraron periodos de semirreacción de 57,8 días en PAL24 y de 31,5 días en CAZ.

En relación a la persistencia de los antidepresivos, las únicas investigaciones disponibles se han centrado en la fluoxetina. Así, Walters y col. (2010) indicaron que este antidepresivo se encontraba entre los fármacos que no disminuyeron su concentración en un suelo agrícola enmendado con biosólidos dentro de contenedores expuestos a las condiciones ambientales a lo largo de tres años. Estos resultados también fueron descritos por Monteiro y Boxall (2009) tanto en suelos como en biosólidos y la mezcla de ambos y por Redshaw y col. (2008) en un suelo

enmendado durante 270 días de experimento. Ninguno de los autores dieron explicación a estos hechos, siendo Wu y col. (2010) los únicos que indicaron que probablemente sería debido a la inherente baja biodegradabilidad de la fluoxetina en el medio ambiente.

Estos resultados muestran un efecto de bioestimulación en el suelo contaminado con azitromicina y antihipertensivos debido a la adición de la enmienda orgánica, el cual quedó reflejado en la elevada actividad deshidrogenasa medida en estos tratamientos. Además, en el caso concreto del suelo contaminado con azitromicina, existe un claro efecto de aclimatación, lo cual sugiere que la microbiota presente en el compost previamente expuesto al contaminante ha sido capaz de regular su metabolismo utilizando el fármaco como fuente de carbono (Semrany y col., 2012). Otro aspecto interesante es el hecho de que la adición de cualquier compost podría ser considerado como una técnica de bioaumentación. Así, la enmienda orgánica ofrece al suelo contaminado una mezcla natural y compleja de microorganismos capaces de biodegradar compuestos con un elevado potencial metabólico muy diverso, con una alta redundancia funcional y un amplio rango de cooperación en las reacciones metabólicas. Se ha demostrado como la incorporación de compost al suelo tiene un potente efecto sobre las comunidades microbianas, llegando a modificar las relaciones entre los microorganismos, tanto competitivas y/o antagonistas (Zaccardelli y col., 2013). Además, la técnica de la bioaumentación combinada con la bioestimulación aporta nutrientes y una diversidad de sustratos orgánicos presentes en el compost así como un efecto positivo en las propiedades fisicoquímicas del suelo (Kastner y Miltner, 2016).

Por lo tanto, estos resultados muestran un efecto positivo de algunas enmiendas orgánicas en la tasa de degradación de los antihipertensivos en un suelo contaminado con estos fármacos. Además, la eficiencia de la técnica de biorremediación en un suelo contaminado con

azitromicina, se puede mejorar mediante la adición de compost previamente expuesto a las mismas condiciones de contaminación. No obstante, se requieren más estudios para poder explicar la resistencia a la biodegradación mostrada por los antidepresivos, mediante experimentos con otros tipos de suelos, enmiendas orgánicas, así como tratamientos con otras dosis de compost y de fármacos. También sería interesante investigar la interacción de los quimioterápicos a lo largo del proceso de biorremediación del suelo, así como los cambios en las comunidades microbianas inducidos por las enmiendas orgánicas. Experimentos adicionales in situ con la adición de fármacos serían útiles para un estudio más real del comportamiento de los contaminantes en el suelo.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1) Se ha optimizado un método basado en extracción líquida, purificación y cuantificación por HPLC/MS/MS para la detección conjunta de fármacos, fungicidas agrícolas y micotoxinas en diversas muestras ambientales.

2) Los principales contaminantes detectados en las muestras ambientales han sido los fungicidas tebuconazol, boscalid, propiconazol y triciclazol y los fármacos de uso humano azitromicina, ibuprofeno, irbesartán, telmisartán, fluoxetina, venlafaxina y citalopram.

3) Se detectaron azitromicina, irbesartán, telmisartán, fluoxetina, venlafaxina y citalopram en los influentes de las estaciones de depuración de aguas residuales (EDARs), siendo en la fracción sólida de las aguas y en los lodos donde se observaron mayores concentraciones, así como la presencia de fungicidas de uso agrícola en estas matrices. Se detectó una mayor concentración de irbesartán, telmisartán y venlafaxina en los efluentes que en los influentes, lo cual es indicativo de que las EDARs no eliminan de forma eficiente los fármacos.

4) El compostaje de paja de arroz y lodo de depuradora es una técnica efectiva para la eliminación de azitromicina, ibuprofeno, irbesartán, fluoxetina, citalopram, olanzapina, bencilpenicilina y difenoconazol. La relación C/N más óptima para la reducción de la concentración de los fármacos se sitúa entre 20 y 29.

5) La degradación de los fármacos es de naturaleza biótica, debida a la actividad de los microorganismos que se encuentran en los residuos, siendo los microorganismos mesófilos los que influyen en mayor medida en la reducción de la concentración de los fármacos. Son necesarias

futuras investigaciones para estudiar la eficiencia de la incubación de los residuos a temperatura constante en la eliminación de estos compuestos.

6) El número de microorganismos aumentó hasta 10^9 UFC a lo largo de la fase mesófila del compostaje con paja de arroz y lodo de depuradora. Se aislaron hongos mesófilos capaces de degradar el residuo de la paja y se identificaron como *Aspergillus sydowii*, *Lichtheimia (Absidia) corymbifera*, el complejo *Fusarium incarnatum-equiseti* y *Eurotium amstelodami*. Se ha demostrado la secreción de actividad xilanasa y celulasa en estos microorganismos.

7) Se han aislado e identificado *Brevundimonas naejangsanensis*, *Alcaligenes* subsp. *faecalis* y *Bacillus cereus* capaces de degradar la azitromicina; *Klebsiella oxytoca* para el ibuprofeno y *Papiliotrema terrestris*, *K. pneumoniae* subsp. *ozanae*, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subps. *similipneumoniae*, *K. michiganensis*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus terreus* capaces de degradar irbesartán.

8) La bioaumentación del compostaje con *Paenibacillus barcinonensis*, una bacteria aislada de campos de cultivo del arroz en el Delta del Ebro, permitió la obtención de un compost más estable. La inoculación de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que expresa la proteína de fusión Pir4-celulasa A de *P. barcinonensis* (C3-BY4741) favoreció la degradación de la materia orgánica durante el compostaje. Las dos cepas de *S. cerevisiae* modificadas genéticamente expresoras de las proteínas de fusión Pir4-lipasa A de *Bacillus subtilis* (L3-BY4741) y de la proteína de fusión Pir4-celulasa A de *P. barcinonensis* (C3-BY4741) se fueron eliminando a lo largo del proceso, lo cual es indicativo de que el compostaje es una técnica segura para estudiar su comportamiento y así evitar que los microorganismos modificados genéticamente sean transferidos al medio ambiente.

9) Se ha mejorado la tasa de degradación de la azitromicina mediante la bioaumentación del compostaje con la adición de *Alcaligenes* subsp. *faecalis* y la del ibuprofeno mediante la inoculación con *Klebsiella oxytoca*.

10) La efectividad de la biorremediación de un suelo agrícola contaminado con azitromicina y antihipertensivos se puede mejorar mediante la aplicación de algunos compost elaborados con paja de arroz y lodo de depuradora. Además, es posible obtener mayores tasas de degradación de la azitromicina si el compost adicionado ha estado previamente expuesto al antibiótico.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren importantes posibilidades para mitigar el problema de los contaminantes emergentes que se encuentran en los residuos mediante el compostaje, así como obtener mejoras en este proceso mediante la inoculación de microorganismos. Además, es posible recuperar suelos contaminados con estos compuestos aplicando el compost como técnica de biorremediación. No obstante, son necesarios futuros estudios del compostaje con otros tipos de residuos e inóculos de microorganismos, así como la investigación de las posibilidades de biorremediación con suelos de diversos orígenes y con diferentes dosis de enmiendas orgánicas. También sería interesante estudiar la interacción de los quimioterápicos, la sucesión de las comunidades microbianas a lo largo de los procesos, así como la formación de metabolitos.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- AEMPS, 2009, 2014 y 2015. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Disponible en:
<http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio>
- Alidina, M., Li, D., Ouf, M., Drewes, J.E., 2014. Role of primary substrate composition and concentration on attenuation of trace organic chemicals in managed aquifer recharge systems. *J. Environ. Manag.* 144, 58-66.
- Alvarenga, P., Mourinha, C., Farto, M., Santos, T., Palma, P., Sengo, J., Morais, M.C., Cunha-Queda, C., 2015. Sewage sludge, compost and other representative organic wastes as agricultural soil amendments: Benefits versus limiting factors. *Waste Manag.* 40, 44-52.
- Álvarez-Martín, A., Hilton, S.L., Bending, G.D., Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martín, M.J., 2016. Changes in activity and structure of the soil microbial community after application of azoxystrobin or pirimicarb and an organic amendment to an agricultural soil. *App. Soil Microbiol. Ecol.* 106, 47-57.
- Alvarino, T., Suárez, S., Katsou, E., Vázquez-Padin, J., Lema, J. M., Omil, F., 2015. Removal of PPCPs from the sludge supernatant in a one stage nitrification/anammox process. *Water Res.* 68, 701-709.
- Alwaneen, W.S., 2015. Cow manure composting by microbial treatment for using as potting material: an overview. *Pak. J. Biol. Sci.* 19, 1-10.
- Andrés, I., Gallardo, O., Parascandola, P., Pastor, F.I.J., Zueco, J., 2005. Use of the cell wall protein Pir4 as a fusion partner for the expression of *Bacillus* sp. BP-7 xylanase A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 690-697.

- Arahal, D.R., Sánchez, E., Macián, M.C., Garay, E., 2008. Value of recN sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family "*Leuconostocaceae*". *Int. Microbiol.* 11, 33-39.
- Arikan, O., Mulbry, W., Rice, C., 2016. The effect of composting on the persistence of four ionophores in dairy manure and poultry litter. *Waste Manag.* 54, 110-117.
- Arlos, M. J., Bragg, L.M., Parker, W.J., Servos, M.R., 2015. Distribution of selected antiandrogens and pharmaceuticals in a highly impacted watershed. *Water. Res.* 72, 40-50.
- Aznar, R., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Rodriguez, J. A., Tadeo, J. L., 2014. Occurrence and analysis of selected pharmaceutical compounds in soil from Spanish agricultural fields. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 4772-4782.
- Bao, Y., Zhou, Q., Guan, L., Wang, Y., 2009. Depletion of chlortetracycline during composting of aged spiked manures. *Waste Manag.* 29, 1416-1423.
- Barceló, D., Petrovic, M., 2011. Waste water treatment and reuse in the mediterranean region. Ed. Springer. 3-4.
- Bastida, F., Jindo, K., Moreno, J.L., Hernández, T., García, C., 2012. Effects of organic amendments on soil carbon fractions, enzyme activity and humus-enzyme complexes under semi-arid conditions. *Eur. J. Soil Biol.* 53, 94-102.
- Battaglin, W.A., Smalling, K.L., Anderson, C., Calhoun, D., Chesnut, T., Muths, E., 2016. Potential interactions among disease, pesticides, water quality and adjacent land cover in amphibian habitats in the United States. *Sci. Total Environ.* 566-567, 320-332.
- Bayer, A., Asner, R., Schussler, W., Kopf, W., Weib, K., Sengl, M., Letzel, M., 2014. Behavior of sartans (antihypertensive drugs) in wastewater treatment plants, their occurrence and risk for the aquatic environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 10830-10839.

- Benlboukht, F., Lemee, L., Amir, S., Ambles, A., Hafidi, M., 2016. Biotransformation of organic matter during composting of solid wastes from traditional tanneries by thermochemolysis coupled with gas chromatography and mass spectrometry. *Ecol. Eng.* 90, 87-95.
- Bhat, R., Reddy, K.R.N., 2017. Challenges and issues concerning mycotoxins contamination in oil seeds and their edible oils: updates from last decade. *Food Chem.* 15, 425-437.
- Boix, C., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Parsons, J.R., De Voogt, P., Hernández, F., 2016. Biotransformation of pharmaceuticals in surface water and during waste water treatment: Identification and occurrence of transformation products. *J. Hazard. Mater.* 302, 175-187.
- Boluda, R., Roca-Pérez, L., Iranzo, M., Gil, C., Mormeneo, S., 2014. Determination of enzymatic activities using a miniaturized system as a rapid method to assess soil quality. *Eur. J. Soil. Sci.* 65, 286-294.
- Bondarczuk, K., Markowicz, A., Piotrowska-Seget, Z., 2016. The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. *Environ. Int.* 87, 49-55.
- Bosso, L., Scelza, R., Testa, A., Cristinzio, G., Rao, M.A., 2015. Depletion of pentachlorophenol contamination in an agricultural soil treated with *Byssochlamys nivea*, *Scopulariopsis brumptii* and urban waste compost: a laboratory microcosm study. *Water Air Soil Pollut.* 226, 1-19.
- Bueno, P., Díaz, M.J., 2008. Factores que afectan al proceso de compostaje, en: Moreno, J., Moral, R. (Ed), *Compostaje*, Mundi-Prensa, pp. 93-109.
- Busk, P.K., Lange, L., 2013. Cellulolytic potential of thermophilic species from four fungal orders. *Amb. Expr.* 3, 47-57.
- Butkovskiy, A., Ni, G., Hernandez Leal, L., Rijnaarts, H.H.M., Zeeman, G., 2016. Mitigation of micropollutants for black water application in

- agriculture via composting of anaerobic sludge. *J. Hazard. Mater.* 303, 41-47.
- Cao, J., Wang, C., Dou, Z.X., Ji, D.G., 2016. Independent and combined effects of oxytetracycline and antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157:H7 on soil microbial activity and partial nitrification processes. *Soil Biol. Biochem.* 98, 138-147.
- Caracciolo, A., Grenni, P., Falconi, F., Caputo, M.C., Ancona, V., Uricchio, V.F., 2011. Pharmaceutical waste disposal: assessment of its effects on bacterial communities in soil and groundwater. *Chem. Ecol.* 27, 43-51.
- Camiña, F., Trasar-Cepeda, C., Gil-Sostres, F., Leirós, C., 1998. Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1005-1011.
- Carvalho, T., Abreu, G., Riany, A., Vieira, A.J., Ferreira, R.C., Franco, M., 2016. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. *Revista Caatinga* 29, 222-223.
- Castillo, M., González, C., Miralles, A., 2011. An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1315-1328.
- Ccancapa, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., Barceló, D., 2016. Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. *Environ. Pollut.* 211, 414-424.
- Cerdá, L.A., Valenzuela, S.V., Díaz, P., Pastor, F.I.J., 2016. New GH16 beta-glucanase from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 releases a complex pattern of mixed-linkage oligomers from barley glucan. *Int. Union Biochem. Mol. Biol.* 63, 51-56.

- Chai, R., Huang, L., Li, L., Gielen, G., Wang, H., Zhang, Y., 2016. Degradation of tetracyclines in pig manure by composting with rice straw. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 1-9.
- Chaturvedi, S., Singh, B., Nain, L., Khare, S.K., Pandey, A.K., Satya, S., 2010. Evaluation of hydrolytic enzymes in bioaugmented compost of *Jatropha* cake under aerobic and partial anaerobic conditions. *Ann. Microbiol.* 60, 685-691.
- Chen, Z-F., Ying, G-G., Ma, Y-B., Lau, H-J., Chen, F., Pan, C-G., 2013. Occurrence and dissipation of three azole biocides climbazole, clotrimazole and miconazole in biosolid-amended soils. *Sci. Total Environ.* 452-453, 377-383.
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., Zhang, J., 2015. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnol. Adv.* 33, 745-755.
- Chen, Z.F., Ying, G.G., 2015. Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: a review. *Environ. Int.* 84, 142-153.
- Chiu, S.W., Gao, T., Chan, C.S., Ho, C.K., 2009. Removal of spilled petroleum in industrial soils by spent compost of mushroom *Pleurotus pulmonarius*. *Chemosphere* 75, 837-842.
- Chowdhury, A.M.M.B., Akrotos, C.S., Vayenas, D.V., Pavlou, S., 2013. Olive mill waste composting: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85, 108-119.
- Chutani, P., Sharma, K.K., 2016. Concomitant production of xylanases and cellulases from *Trichoderma longibrachiatum* MDU-6 selected for the deinking of paper waste. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39, 747-758.

- Cizmas, L., Sharma, V., Gray, C.M., McDonald, T.J., 2015. Pharmaceuticals and personal care products in waters: occurrence, toxicity, and risk. *Environ. Chem. Lett.* 13, 381-394.
- Correia, A., Marcano, L., 2015. Presencia y eliminación de compuestos farmacéuticos en plantas de tratamientos de aguas residuales. Revisión a nivel mundial y perspectiva nacional. *Bol. Mal. Salud Amb.* 55, 1-18.
- CWMI, 1996. Cornell Waste Management Institute. Disponible en: <http://compost.css.cornell.edu/calc/2.html>
- Dados, A., Omirou, M., Demetriou, K., Papastephanou, C., Ioannides, I. M., 2014. Rapid remediation of soil heavily contaminated with hydrocarbons: a comparison of different approaches. *Ann. Microbiol.* 65, 241-251.
- Ding, N., Li, W., Liu, C., Fu, Q., Guo, B., Li, H., Li, N., Lin, Y., 2014. Decline in extractable kitasamycin during the composting of kitasamycin manufacturing waste with dairy manure and sawdust. *J. Environ. Manag.* 134, 39-46.
- Dolliver, H., Gupta, S., Noll, S., 2008. Antibiotic degradation during manure composting. *J. Environ. Qual.* 37, 1245-1253.
- Doménech, J., 2003. Depuración y potabilización del agua. *Offarm* 22, 110-116.
- Dorival-García, N., Labajo-Recio, C., Zafra-Gómez, A., Juárez-Jiménez, B., Vílchez, J. L., 2015. Improved sample treatment for the determination of 17 strong sorbed quinolone antibiotics from compost by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 138, 247-257.
- Du, L., Liu, W., 2012. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 309-327.

- Edwards, P.G., Murphy, T.M., Lydy, M.J., 2016. Fate and transport of agriculturally applied fungicidal compounds, azoxystrobin and propiconazole. *Chemosphere* 146, 450-457.
- Eida, M.F., Nagaoka, T., Wasaki, Y., Kouno, K., 2012. Isolation and characterization of cellulose-decomposing bacteria inhabiting sawdust and coffee residue composts. *Microbes Environ.* 27, 226-233.
- El Fantroussi, S., Agathos, S.N., 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 268-275.
- Eljarrat, E., Díaz-Cruz, M.S., Farré, M., López de Alda, M.J., Petrovic, M., Barceló, D., 2013. Analysis of emerging contaminants in sewage sludge, en: Vicent, T., Caminal, G., Eljarrat, E., Barceló, D. (Ed), *Emerging organic contaminants in sludges*, Springer, pp. 31-70.
- El-Metwally, M.M., Ghoneem, K.M., Saber, W.E.I.A., 2014. Mycobiota variation in stored rice straw and its cellulolytic profile. *Pak. J. Biol. Sci.* 17, 1037-1045.
- EPA (Environmental Protection Agency), 1996. Method 3052. Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices.
- EPA (Environmental Protection Agency), 2012. Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCP). Available at: <http://www.epa.gov/ppcp/>. Last access 21-07-15.
- EPSAR (Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales de la Comunidad Valenciana), 2015. Disponible en: <http://www.epsar.gva.es/>
- Eslami, A., Amini, M.M., Yazdanbakhsh, A.R., Rastkari, N., Mohseni-Bandpei, A., Nasser, S., Piroti, E., Asadi, A., 2015. Occurrence of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Tehran source water,

- municipal and hospital wastewaters, and their ecotoxicological risk assessment. *Environ. Monit. Assess.* 187, 1-15.
- Fabro, L., Varca, L.M., 2012. Pesticide usage by farmers in Pagsanjan-Lumban catchment of Laguna de Bay, Philippines. *Agr. Water Manage.* 106, 27-34.
- Fang, H., Han, Y.L., Yin, Y.M., Pan, X., Yu, Y.L., 2014. Variations in dissipation rate, microbial function and antibiotic resistance due to repeated introductions of manure containing sulfadiazine and chlortetracycline to soil. *Chemosphere* 96, 51-56.
- Fernández-Fontaina, E., Omil, F., Lema, J. M., Carballa, M., 2012. Influence of nitrifying conditions on the biodegradation and sorption of emerging micropollutants. *Water Res.* 46, 5434-5444.
- Festa, S., Coppotelli, B.M., Morelli, I.S., 2016. Comparative bioaugmentation with a consortium and a single strain in a phenanthrene-contaminated soil: impact on the bacterial community and biodegradation. *Appl. Soil Ecol.* 98, 8-19.
- Fukushima, M., Yamamoto, K., Ootsuka, K., Komai, T., Aramaki, T., Ueda, S., Horiya, S., 2009. Effects of the maturity of wood waste compost on the structural features of humic acids. *Bioresour. Technol.* 100, 791-797.
- Gabarrón, S., Gernjak, W., Valero, F., Barceló, A., Petrovic, M., Rodríguez-Roda, I., 2016. Evaluation of emerging contaminants in a drinking water treatment plant using electro dialysis reversal technology. *J. Hazard. Mater.* 309, 192-201.
- Gallego, J.R., González-Rojas, E., Peláez, A.I., Sánchez, J., García-Martínez, M.J., Llamas, J.F., 2006. Effectiveness of bioremediation for the Prestige fuel spill: a summary of case studies, en: Ubertini, L. (Ed), *Advanced technology in the environmental field*. ACTA Press. 68-73.

- Gao, W., Liang, J., Pizzul, L., Feng, X.M., Zhang, K., Castillo, M.P., 2015. Evaluation of spent mushroom substrate as substitute of peat in Chinese biobeds. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 98, 107-112.
- García, N.F.L., Santos, F.R.D., Goncalves, F.A., Da Paz, M.F., Fonseca, G.G., Leite, R.S.R., 2015. Production of beta-glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electron. J. Biotechnol.* 18, 314-319.
- García-Delgado, C., D'Annibale, A., Pesciaroli, L., Yunta, F., Crognale, S., Petruccioli, M., Eymar, E., 2015. Implications of polluted soil biostimulation and bioaugmentation with spent mushroom substrate (*Agaricus bisporus*) on the microbial community and polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Sci. Total Environ.* 508, 20-28.
- García-Díaz, C., Ponce-Noyola, M.T., Esparza-García, F., Rivera-Orduña, F., Barrera-Cortés, J., 2013. PAH removal of high molecular weight by characterized bacterial strains from different organic sources. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85, 311-322.
- García-Galán, M.J., Petrovic, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2016. Multiresidue trace analysis of pharmaceuticals, their human metabolites and transformation products by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 158, 330-341.
- García-Valcárcel, A.I., Tadeo, J.L., 2011. Determination of azoles in sewage sludge from Spanish wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 34, 1228-1235.
- Getahun, T., Nigusie, A., Entele, T., Gerven, T.V., Bruggen, B.V., 2012. Effect of turning frequencies on composting biodegradable municipal solid waste quality. *Resour. Conserv. Recycl.* 65, 79-84.

- Gigliotti, G., Proietti, P., Said-Pullicino, D., Nasini, L., Pezzolla, D., Rosati, L., Porceddu, P.R., 2012. Co-composting of olive husks with high moisture contents: Organic matter dynamics and compost quality. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 67, 8-14.
- Ghosh, M., Das, A., Mishra, A.K., Nanda, G., 1993. *Aspergillus sydowii* MG-49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 703-709.
- Grenni, P., Falconi, F., Caracciolo, A.B., 2012. Microcosm experiments for evaluating natural bioremediation of contaminated ecosystems. *Chem. Eng. Trans.* 28, 7-12.
- Guan, J., Spencer, J.L., Sampath, M., Devenish, J., 2004. The fate of genetically modified *Pseudomonas* strain and its transgene during the composting of poultry manure. *Can. J. Microbiol.* 50, 415-421.
- Guan, J.W., Chan, M., Spencer, J.L., 2010. The fate of recombinant plasmids during composting of organic wastes. *J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 45, 279-284.
- Guerin, T.F., 2001. Co-composting of pharmaceutical wastes in soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 256-263.
- Gurke, R., Rossmann, J., Schubert, S., Sandmann, T., Robler, M., Oertel, R., Fauler, J., 2015a. Development of a SPE-HPLC-MS/MS method for the determination of most prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 990, 23-30.
- Gurke, R., Rossler, M., Marx, C., Diamond, S., Schubert, S., Oertel, R., Fauler, J., 2015b. Occurrence and removal of frequently prescribed pharmaceuticals and corresponding metabolites in wastewater of a sewage treatment plant. *Sci. Total Environ.* 532, 762-770.
- Gutiérrez, I.R., Watanabe, N., Harter, T., Glaser, B., Radke, M., 2010. Effect of sulfonamide antibiotics on microbial diversity and activity in a Californian Mollic Haploxera. *J. Soils Sedim.* 10, 537-544.

- Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadžianas, L., Aoyama, I., Jedidi, N., 2007. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1926-1935.
- He, L., Bickerstaff, G.F., Paterson, A., Buswell, J.A., 1993. Purification and partial characterization of 2 xylanases that differ in hydrolysis of soluble and insoluble xylan fractions. *Enzym. Microb. Technol.* 15, 13-18.
- Hedgespeth, M. L., Sapozhnikova, Y., Pennington, P., Clum, A., Fairey, A., Wirth, E., 2012. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in treated wastewater discharges into Charleston Harbor, South Carolina. *Sci. Total Environ.* 437, 1-9.
- Ho, Y.B., Zakaria, M.P., Latif, P.A., Saari, N., 2013. Degradation of veterinary antibiotics and hormone during broiler manure composting. *Bioresour. Technol.* 131, 476-484.
- Hu, W., Zheng, G., Fang, D., Cui, C., Liang, J., Zhou, L. 2015. Bioleached sludge composting drastically reducing ammonia volatilization as well as decreasing bulking agent dosage and improving compost quality: a case study. *Waste Manag.* 44, 55-62.
- Hua, X., Wang, J., Wu, Z., Zhang, H., Li, H., Xing, X., Liu, Z., 2010. A salt tolerant *Enterobacter cloacae* mutant for bioaugmentation of petroleum-and salt-contaminated soil. *Biochem. Eng. J.*, 49, 201-206.
- Huang, Q., Yu, Y., Tang, C., Peng, X., 2010. Determination of commonly used azole antifungals in various waters and sewage sludge using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 3481-3488.
- Huang, Q., Zhang, K., Wang, Z., 2012. Enantiomeric determination of azole antifungals in wastewater and sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1751-1760.

- IAEST, 2015. Instituto Aragonés de Estadística. Disponible en:
http://www.aragon.es/DepartamentosOrganismosPublicos/Institutos/InstitutoAragonesEstadistica/AreasTematicas/14_Medio_Ambiente_Y_Energia/01_SectoresProductivos?channelSelected=0
- Ince, O., Ozbayram, E.G., Akyol, C., Ince, O., Ince, B., 2015. Composting practice for sustainable waste management: a case study in Istanbul. *Desalination Water Treat.* 57, 14473-14477.
- Iranzo, M., Sainz-Pardo, I., Boluda, R., Sánchez, J., Mormeneo, S., 2001. The use of microorganisms in environmental remediation. *Ann. Microbiol.* 51, 135-143.
- Iranzo, M., Cañizares, J.V., Roca-Perez, L., Sainz-Pardo, I., Mormeneo, S., Boluda, R., 2004. Characteristics of rice straw and sewage sludge as composting materials in Valencia (Spain). *Bioresour. Technol.* 95, 107-112.
- Islas-Espinoza, M., Reid, B.J., Wexler, M., Bond P.L., 2012. Soil bacterial consortia and previous exposure enhance the biodegradation of sulfonamides from pig manure. *Microb. Ecol.* 64, 140-151.
- Joo, S. H., Dello Monaco, F., Antmann, E., Chorath, P., 2015. Sustainable approaches for minimizing biosolids production and maximizing reuse options in sludge management: A review. *J. Environ. Manage.* 158, 133-145.
- Jorgensen, L.F., Kaer, J., Olsen, P., Rosenbom, A.E., 2012. Leaching of azoxystrobin and its degradation product R234886 from Danish agricultural field sites. *Chemosphere* 88, 554-562.
- Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J., 2014a. Increasing native microbiota in lignocellulosic waste composting: Effects on process efficiency and final product maturity. *Process Biochem.* 49, 1958-1969.

- Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J., 2014b. Evolution of enzymatic activities and carbon fractions throughout composting of plant waste. *J. Environ. Manag.* 133, 355-364.
- Kaczynski, P., Lozowicka, B., Hrynko, I., Wolejko, E., 2016. Behaviour of mesotrione in maize and soil system and its influence on soil dehydrogenase activity. *Sci. Total. Environ.* 571, 1079-1088.
- Kakimoto, T., Funamizu, N., 2007. Factors affecting the degradation of amoxicillin in composting toilet. *Chemosphere* 66, 2219-2224.
- Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68-72.
- Kandeler, R., Stemmer, M., Klimanek, E.M., 1999. Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fraction to long-term soil management. *Soil Biol. Biochem.* 2, 137-139.
- Kastner, M., Miltner, A., 2016. Application of compost for effective bioremediation of organic contaminants and pollutants in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3433-3449.
- Khamfroush, M., Bijan-Manesh, M. J., Hatami, T., 2013. Application of the Haug model for process design of petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation by composting process. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 10, 533-544.
- Kim, I.S., Shim, J.H., Suh, Y.T., 2003. Laboratory studies on formation of bound residues and degradation of propiconazole in soils. *Pest. Manag. Sci.* 59, 324-330.
- Kim, K.R., Owens, G., Ok, Y.S., Park, W.K., Lee, D.B., Kwon, S.I., 2012. Decline of extractable antibiotics in manure-based composts during composting. *Waste Manag.* 32, 110-116.
- Kodesova, R., Kocarek, M., Klement, A., Golovko, O., Koba, O., Fer, M., Nikodem, A., Vondrackova, L., Jaksik, O., Grabic, R., 2016. An

- analysis of the dissipation of pharmaceuticals under thirteen different soil conditions. *Sci. Total Environ.* 544, 369-381.
- Kulikowska, D., Gusiatin, Z.M., 2015. Sewage sludge composting in a two-stage system: carbon and nitrogen transformations and potential ecological risk assessment. *Waste Manag.* 38, 312-320.
- Kupper, T., Bucheli, T. D., Brandli, R. C., Ortelli, D., Edder, P., 2008. Dissipation of pesticides during composting and anaerobic digestion of source-separated organic waste at full-scale plants. *Bioresour. Technol.* 99, 7988-7994.
- Kwon, J.W., Armbrust, K.K., 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2561-2568.
- Lajeunesse, A., Blais, M., Barbeau, B., Sauvé, S., Gagnon, C., 2013. Ozone oxidation of antidepressants in wastewater-Treatment evaluation and characterization of new by-products by LC-QToFMS. *Chem. Cent. J.* 7, 1-11.
- Lee, K. I., Yeom, D., 2015. Experimental research on the indoor environment control of natural insulation materials: carbonized rice hull and straw bales. *Indoor Built Environ.* 24, 729-739.
- Leite, P., Salgado, J.M., Venancio, A., Domínguez, J.M., Belo, I., 2016. Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 214, 737-746.
- Libmond, S., Savoie, J.M., 1993. Degradation of wheat-straw by a microbial community-stimulation by a polysaccharidase complex. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 567-574.
- Liu, F., Ying, G.G., Tao, R., Jian-Liang, Z., Yang, J.F., Zhao, L.F., 2009. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environ. Pollut.* 157, 1636-1642.

- Liu, B., Li, Y., Zhang, X., Feng, C., Gao, M., Shen, Q., 2015a. Effects of composting process on the dissipation of extractable sulfonamides in swine manure. *Bioresour. Technol.* 175, 284-290.
- Liu, B., Li, Y.X., Zhang, X.L., Wang, J., Gao, M., 2015b. Effects of chlortetracycline on soil microbial communities: Comparisons of enzyme activities to the functional diversity via Biolog EcoPlates (TM). *Eur. J. Soil Biol.* 68, 69-76.
- Liu, Y., Li, S., Ni, Z., Qu, M., Zhong, D., Ye, C., Tang, F., 2016. Pesticides in persimmons, jujubes and soil from China: Residue levels, risk assessment and relationship between fruits and soils. *Sci. Total Environ.* 542, 620-628.
- Lin, T., Yu, S., Chen, W., 2016. Occurrence, removal and risk assessment of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in an advanced drinking water treatment plant (ADWTP) around Taihu Lake in China. *Chemosphere* 152, 1-9.
- López, M.J., Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., Nichols, N.N., Dien, B.S., Moreno, J., 2007. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. *J. Environ. Manag.* 133, 355-364.
- López, M.J y Boluda, R. 2008. Residuos agrícolas, en: Moreno, J. y Moral, R. (Ed), *Compostaje*, Mundi-Prensa. 489-520.
- López, M.J., Masaguer, A., Paredes, C., Roca, L., Ros, M., Salas M. Boluda, R., 2015. De Residuo a recurso. El camino hacia la sostenibilidad. III. 1. Residuos orgánicos y agricultura intensiva. Ed. Mundi-Prensa. 41-67.
- Lu, H., Lashari, M.S., Liu, X., Ji, H., Li, L., Zheng, J., Kibue, G.W., Joseph, S., Pan, G., 2015. Changes in soil microbial community structure and enzyme activity with amendment of biochar-manure compost and

- pyroligneous solution in a saline soil from Central China. *Eur. J. Soil Biol.* 70, 67-76.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506-577.
- Lynn, C.J., Dhir, R.K., Ghataora, G.S., West, R.P., 2015. Sewage sludge ash characteristics and potential for use in concrete. *Construction Building Mater.* 98, 767-779.
- Madejón, P., Alaejos, J., García-Álbala, J., Fernández, M., Madejón, E., 2016. Three-year study of fast-growing trees in degraded soils amended with composts: effects on soil fertility and productivity. *J. Environ. Manag.* 169, 18-26.
- Madrigal-Zúñiga, K., Ruiz-Hidalgo, K., Chin-Pampillo, J.S., Masís-Mora, S., Castro-Gutiérrez, V., Rodríguez-Rodríguez, C.E., 2016. Fungal bioaugmentation of two rice husk-based biomixtures for the removal of carbofuran in on-farm biopurification systems. *Biol. Fertil. Soils.* 52, 243-250.
- MAGRAMA, 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en:
<http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/lodos-depuradora/>. Actualizado en 2014.
- Maranho, L. A., André, C., DeIvalls, T.A., Gagné, F., Martín-Díaz, M.L., 2015. Toxicological evaluation of sediment samples spiked with human pharmaceutical products: energy status and neuroendocrine effects in marine polychaetes *Hediste diversicolor*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 27-36.
- Marchand, G., Lavoie, J., Lazure, L., 1995. Evaluation of bioaerosols in a municipal solid waste recycling and composting plant. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 45, 778-781.

- Marín-Benito, Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2014. Effect of different organic amendments on the dissipation of linuron, diazinon and myclobutanil in an agricultural soil incubated for different time periods. *Sci. Total Environ.* 476-477, 611-621.
- Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *J. Hazard. Mater.* 239-340, 40-47.
- Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2015. Pharmaceutically active compounds in sludge stabilization treatments: anaerobic and aerobic digestion, wastewater stabilization ponds and composting. *Sci. Total Environ.* 503-504, 97-104.
- Masciandaro, G., Macci, C., Peruzzi, E., Ceccanti, B., Doni, S., 2013. Organic matter-microorganism-plant in soil bioremediation: a synergic approach. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12, 399-419.
- Matkar, K., Chapla, D., Divecha, J., Ninghojkar, A., Madamwar, D., 2013. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 78, 24-33.
- Matongo, S., Birungi, G., Moodley, B., Ndungu, P., 2015. Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi River, KwaZulu-Natal, South Africa. *Chemosphere* 134, 133-140.
- Mdkhudzari, J., Tartakovsky, B., Raghavan, G.S.V., 2016. Effect of C/N ratio and salinity on power generation in compost microbial fuel cells. *Waste Manag.* 48, 135-142.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R., 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environ. Int.* 37, 1362-1375.

- Mengual, C., Schoebitz, M., Azcón, R., Roldán, A., 2014. Microbial inoculants and organic amendment improves plant establishment and soil rehabilitation under semiarid conditions. *J. Environ. Manag.* 134, 1-7.
- Mitchell, S.M., Ullman, J.L., Bary, A., Cogger, C.G., Teel, A.L., Watts, R.J., 2015. Antibiotic degradation during thermophilic composting. *water Air Soil Pollut.* 226, 1-12.
- Mohee, R., Boojhawon, A., Sewhoo, B., Rungasamy, S., Somaroo, G. D., Mudhoo, A. 2015. Assessing the potential of coal ash and bagasse ash as inorganic amendments during composting of municipal solid wastes. *J. Environ. Manage.* 159, 209-217.
- Monteiro, S.C., Boxall, A.B.A., 2009. Factors affecting the degradation of pharmaceuticals in agricultural soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2546-2554.
- Moreira, I. S., Amorim, C. L., Ribeiro, A. R., Mesquita, R. B., Rangel, A. O., Van Loosdrecht, M. C., Tiritan, M. E., Castro, P. M. L., 2015. Removal of fluoxetine and its effects in the performance of an aerobic granular sludge sequential batch reactor. *J. Hazard. Mater.* 287, 93-101.
- Moreno, J., Mormeneo, S., 2008. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje, en: Moreno, J., Moral, R. (Ed), *Compostaje*, Mundi-Prensa. 113-140.
- Moreno, J., Moral, R., García, J.L., Pascual, J.A., Bernal, M.P., 2014. De Residuo a recurso. El camino hacia la sostenibilidad. III. 6. Compost y control biológico de las enfermedades de las plantas. Ed. Mundi-Prensa. 16-20.
- Mormeneo, M., Andrés, I., Bofill, C., Díaz, P., Zueco, J., 2008. Efficient secretion of *Bacillus subtilis* lipase A in *Saccharomyces cerevisiae* by translational fusion to the Pir4 cell wall protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 437-445.

- Moschet, C., Wittmer, I., Simovic, J., Junghans, M., Piazzoli, A., Singer, H., Stamm, C., Leu, C., Hollender, J., 2014. How a complete pesticide screening changes the assessment of surface water quality. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5423-5432.
- Nair, S.G., Sindhu, R., Shashidhar, S., 2008. Purification and biochemical characterization of two xylanases from *Aspergillus sydowii* SBS 45. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 149, 229-243.
- Nakasaki, K., Araya, S., Mimoto, H., 2013. Inoculation of *Pichia kudriavzevii* RB1 degrades the organic acids present in raw compost material and accelerates composting. *Bioresour. Technol.* 144, 521-528.
- Navarro, E.A., 2006. El problema de la paja en el Parque Natural de la Albufera de Valencia y su solución como sumidero de CO₂ en el proyecto AFTEC. *Ambienta*, 68-72.
- Neves, M.L., Da Silva, M.F., Souza-Motta, C.M., Spier, M.R., Soccol, C.R., Porto, T.S., Moreira, K.A., Porto, A.L., 2011. *Lichtheimia blakesleeana* as a new potencial producer of phytase and xylanase. *Molecules* 16, 4807-4817.
- Nikaeen, M., Nafez, A. H., Bina, B., Nabavi, B. F., Hassanzadeh, A., 2015. Respiration and enzymatic activities as indicators of stabilization of sewage sludge composting. *Waste Manag.* 39, 104-110.
- Nordenholt, R.M., Goynes, K.W., Kremer, R.J., Lin, C.H., Lerch, R.N., Veum, K.S., 2016. Veterinary antibiotic effects on atrazine degradation and soil microorganisms. *J. Environ. Qual.* 45, 565-575.
- Norgaard, K.B., Cedergreen, N., 2010. Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 957-967.
- O'Callaghan, K., 2016. Technologies for the utilisation of biogenic waste in the bioeconomy. *Food Chem.* 198, 2-11.
- Onesios, K., Bouwer, E., 2012. Biological removal of pharmaceuticals and personal care products during laboratory soil aquifer treatment

- simulation with different primary substrate concentrations. *Water Res.* 2365-2375.
- Osorio, F., Torres, J.C., Sánchez, M., 2010. Tratamiento de aguas para la eliminación de microorganismos y agentes contaminantes. Díaz de Santos (Ed), Madrid. 187 p.
- Osorio, V., Larrañaga, A., Aceña, J., Pérez, S., Barceló, D., 2016. Concentration and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density and the livestock units in Iberian Rivers. *Sci. Total Environ.* 540, 267-277.
- Oviedo-Ocaña, E. R., Torres-Lozada, P., Marmolejo-Rebellon, L. F., Hoyos, L. V., Gonzales, S., Barrena, R., Komilis, D., Sanchez, A., 2015. Stability and maturity of biowaste composts derived by small municipalities: correlation among physical, chemical and biological indices. *Waste Manag.* 44, 63-71.
- Pan, M., Du, J., Gan, X., Lu, X., 2016. Distribution and ultrastructure of silica on rice straw surface. *Trans. Chin. Soc. Agric. Eng.* 32, 309-314.
- Papageorgiou, M., Kosma, C., Lambropoulou, D., 2016. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci. Total Environ.* 543, 547-569.
- Peng, X., Huang, Q., Zhang, K., Yu, Y., Wang, Z., Wang, C., 2012. Distribution, behavior and fate of azole antifungals during mechanical, biological, and chemical treatments in sewage treatment plants in China. *Sci. Total Environ.* 426, 311-317.
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72, 3-27.

- Pino, M. R., Val, J., Mainar, A.M., Zuriaga, E., Español, C., Langa, E., 2015. Acute toxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* of 18 common pharmaceuticals in artificial soil. *Sci. Total Environ.* 518-519, 225-237.
- Piotrowska-Cyplik, A., Chrzanowski, L., Cyplik, P., Dach, J., Olejnik, A., Staninska, J., Czarny, J., Lewicki, A., Marecik, R., Powierska-Czarny, J., 2013. Composting of oiled bleaching earth: Fatty acids degradation, phytotoxicity and mutagenicity changes. *International Biodeterior. Biodegrad.* 78, 49-57.
- Platen, H., Wirtz, A., 1999. Measurement of the respiration activity of soils using the OxiTop Control measuring system. Basic principles and process characteristic quantities. *Fachhochsch. Giess. Friedberg* 3, 1-5.
- Popa, C., Favier, L., Dinica, R., Semrany, S., Djelal, H., Amrane, A., Bahrim, G., 2014. Potential of newly isolated wild *Streptomyces* strains as agents for the biodegradation of a recalcitrant pharmaceutical, carbamazepine. *Environ. Technol.* 35, 3082-3091.
- Pose-Juan, E., Sánchez-Martín, M.J., Herrero-Hernández, E., Rodríguez-Cruz, M.S., 2015. Application of mesotrione at different doses in an amended soil: dissipation and effect on the soil microbial biomass and activity. *Sci. Total Environ.* 536, 31-38.
- PubChem Open Chemistry Database, 2016. Disponible en:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- Qian, X., Shen, G., Wang, Z., Guo, C., Liu, Y., Lei, Z., Zhang, Z., 2014. Co-composting of livestock manure with rice straw: characterization and establishment of maturity evaluation system. *Waste Manag.* 34, 530-535.
- Ramaswamy, J., Prasher, S.O., Patel, R.M., Hussain, S.A., Barrington, S.F., 2010. The effect of composting on the degradation of a veterinary pharmaceutical. *Bioresour. Technol.* 101, 2294-2299.

- Randhawa, G. K., Kullar, J. S., 2011. Bioremediation of pharmaceuticals, pesticides, and petrochemicals with gomeya/cow dung. *ISRN Pharmacol.* 2011, 1-7.
- Rautenstrauch, J.C., Aguerre, R.N., Méndez, HF., 2014. Agronomic and economic benefits of the application of olive pomace and harvest residues composted with bioaugmentation on olive orchards. *Acta Hort.* 1057, 301-307.
- Redshaw, C. H., Cooke, M. P., Talbot, H. M., McGrath, S., Rowland, S. J., 2008. Low biodegradability of fluoxetine HCl, diazepam and their human metabolites in sewage sludge-amended soil. *J. Soils Sediments* 8, 217-230.
- Rein, A., Adam, I.K., Miltner, A., Brumme, K., Kästner, M., Trapp, S., 2016. Impact of bacterial activity on turnover of insoluble hydrophobic substrates (phenanthrene and pyrene)-Model simulations for prediction of bioremediation success. *J. Hazard. Mater.* 306, 105-114.
- Rindland, M.E., Gómez, M.A., 2015. Isolation and characterization of onion degrading bacteria from onion waste produced in South Buenos Aires province, Argentina. *World J. Microbiol. Technol.* 31, 487-497.
- Robles-Barrios, K.F., Medina-Canales, M.G., Rodríguez-Tovar, A.V., Pérez, N.O., 2015. Morphological and molecular characterization, enzyme production and pathogenesis of *Fusarium temperatum* on corn in Mexico. *Canadian J. Plant Pathol.* 37, 495-505.
- Roca-Pérez, L., Arévalo, J., Boluda, R., 2005. The influence of C/N ratio, moisture and pH on the aerobic microbial activity of rice straw and sewage sludge blends, en: *Sustainable organic waste management for environmental protection and food safety*. Bernal, P.; Moral, R.; Clemente, R.; Paredes, C. (Ed). *FAO & CSIC. Murcia.* 247-249.

- Roca-Pérez, L., Martínez, C., Marcilla, P., Boluda, R., 2009. Composting rice straw with sewage sludge and compost effects on the soil-plant system. *Chemosphere* 75, 781-787.
- Rodríguez-Rodríguez., C.E., Lucas, D., Barón, E., Gago-Ferrero, D., Molins.Delgado, D., Rodríguez-Mozaz, S., Eljarrat, E., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., Caminal, G., Vicent, T., 2014. Re-inoculation strategies enhance the degradation of emerging pollutants in fungal bioaugmentation of sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 168, 180-189.
- Ros, M., Rodríguez, I., García, C., Hernández, T.M., 2010. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresour. Technol.* 101, 6916-6923.
- Rosenfeld, P.E., Feng, L.G.H., 2011. Definition of hazardous waste. *Risk Hazard. Wastes.* 1, 1-10.
- Rúa-Gómez, P. C., Puttmann, W., 2013. Degradation of lidocaine, tramadol, venlafaxine and the metabolites O-desmethyltramadol and O-desmethylvenlafaxine in surface waters. *Chemosphere* 90, 1952-1959.
- Ruiz-Hidalgo, K., Chin-Pampillo, J.S., Masís-Mora, M., Carazo-Rojas, E., Rodríguez-Rodríguez, E.E., 2016. Optimization of a fungally bioaugmented biomixture for carbofuran removal in on-farm biopurification systems. *Water Air Soil Pollut.* 227, 1-14.
- Russo, L., Rizzo, L., Belgiorno, V., 2012. Ozone oxidation and aerobic biodegradation with spent mushroom compost for detoxification and benzo(a)pyrene removal from contaminated soil. *Chemosphere* 87, 595-601.
- Sánchez Arias, V., Fernández, F.J., Rodríguez, L., Villasenor, J., 2012. Respiration indices and stability measurements of compost through electrolytic respirometry. *J. Environ. Manag.* 95, 134-138.

- Sánchez, M., Fritze, D., Blanco, A., Spröer, C., Tinall, B.J., Schumman, P., Kroppenstedt, R.M., Diaz, P., Pastor, F.I.J., 2005. *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanaseproducing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 935-939.
- Sánchez, J., Gallego, J.R., 2005. Biorremediación: conceptos esenciales y ámbitos de aplicación, en: Marín, I., Sanz, J.L., (Ed), *Biología y Medioambiente Vol 1 (2)*, Ephemera. 61-75.
- Sánchez, J., Rodríguez, J.L., 2003. Biorremediación: fundamentos y aspectos microbiológicos. *Ind. Min.* 351, 12-16.
- Santos, B.S., Gomes, A.F., Francison, E.G., Oliveira, J.M., Baffi, M.A., 2015. Thermotolerant and mesophylic fungi from sugarcane bagasse and their prospection for biomass-degrading enzyme production. *Braz. J. Microbiol.* 46, 903-910.
- Sayara, T., Borràs, E., Caminal, G., Sarrà, M., Sánchez, A., 2011. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 859-865.
- Schaffer, M., Kroger, K.F., Nodler, K., Ayora, C., Carrera, J., Hernández, M., Licha, T., 2015. Influence of a compost layer on the attenuation of 28 selected organic micropollutants under realistic soil aquifer treatment conditions: Insights from a large scale column experiment. *Water Res.* 74, 110-121.
- Schlusener, M.P., Hardenbicker, P., Nilson, E., Schulz, M., Viergutz, C., Ternes, T.A., 2015. Occurrence of venlafaxine, other antidepressants and selected metabolites in the Rhine catchment in the face of climate change. *Environ. Pollut.* 196, 247-256.
- Scoton, E.J., Gomes, R.A., Stolte, B., Akutsu, J., 2016. A sewage sludge co-composting process using respirometric monitoring method in hermetic rotary reactor. *J. Clean. Prod.* 121, 169-175.

- Scotti, R., Pane, C., Spaccini, R., Palese, A.M., Piccolo, A., Celano, G., Zaccardelli, M., 2016. On-farm compost: a useful tool to improve soil quality under intensive farming systems. *Appl. Soil Ecol.* 107, 13-23.
- Selvam, A., Zhao, Z., Wong, J.W., 2012. Composting of swine manure spiked with sulfadiazine, chlortetracycline and ciprofloxacin. *Bioresour. Technol.* 126, 412-417.
- Selvam, A., Zhao, Z., Li, Y., Chen, Y., Leung, K., Wong, J., 2013. Degradation of tetracycline and sulfadiazine during continuous thermophilic composting of pig manure and sawdust. *Environ. Technol.* 34, 2433-2441.
- Semblante, G.U., Hai, F.I., Huang, X., Ball, A.S., Price, W.E., Nghiem, L.D., 2015. Trace organic contaminants in biosolids: Impact of conventional wastewater and sludge processing technologies and emerging alternatives. *J. Hazard. Mater.* 300, 1-17.
- Semrany, S., Favier, L., Djelal, H., Taha, S., Amrane, A., 2012. Bioaugmentation: possible solution in the treatment of bio-refractory organic compounds (Bio-ROCs). *Biochem. Eng. J.* 69,75-86.
- Serrano, D., Suárez, S., Lema, J. M., Omil, F., 2011. Removal of persistent pharmaceutical micropollutants from sewage by addition of PAC in a sequential membrane bioreactor. *Water Res.* 45, 5323-5333.
- Sevik, F., Tosun, I., Ekinçi, K., 2016. Composting of olive processing wastes and tomato stalks together with sewage sludge or dairy manure. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13, 1207-1218.
- Shing, A., Billingsley, K., Ward, O., 2006. Composting: a potentially safe process for disposal of genetically modified microorganisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 26, 1-16.
- Silva, C.A.D., Lacerda, M.P.F., Leite, R.S.R., Fonseca, G.G., 2013. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian

- savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. *Electron. J. Biotechnol.* 16, 1-9.
- Silva, L. J., Pereira, A. M., Meisel, L. M., Lino, C. M., Pena, A., 2015. Reviewing the serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: uptake, bioaccumulation and ecotoxicology. *Environ. Pollut.* 197, 127-143.
- Singh, A., Billingsley, K., Ward, O., 2006. Composting: a potentially safe process for disposal of genetically modified organisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 26, 1-16.
- Singh, R., Chaudhary, K., Biswas, B., Balagurumurthy, B., Bhaskar, T., 2015. Hydrothermal liquefaction of rice straw: effect of reaction environment. *J. Supercrit. Fluid.* 104, 70-75.
- Sivaprakasam, S., Dhandapani, B., Mahadevan, S., 2011. Optimization studies on production of a salt-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain BC1 and its application on tannery saline wastewater treatment. *Braz. J. Microbiol.* 42, 1506-1515.
- Skowron, K., Olszewska, H., Pawlowska, A., 2011. The effect of composting process on changes in quantity of yeast and mould fungi population. *Rocz. Ochr. Srod.* 13, 1485-1506.
- Smalling, K.L., Reilly, T.J., Sandstrom, M.W., Kuivila, K.M., 2013. Occurrence and persistence of fungicides in bed sediments and suspended solids from three targeted use areas in the United States. *Sci. Total Environ.* 447, 179-185.
- Smital, T., 2008. Acute and chronic effects of emerging contaminants, en: Hutzinger, O., Barceló, D., Kostianoy, A. (Ed), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer, pp.105-142.
- Soliva, M., López, M., Huerta, O., 2008. Antecedentes y fundamentos del proceso de compostaje, en: Moreno, J., Moral, R. (Ed), *Compostaje*, Mundi-Prensa, pp. 75-92.

- Srimivasan, P., Sarmah, A.K., 2014. Dissipation of sulfamethoxazole in pasture soils as affected by soil and environmental factors. *Sci. Total Environ.* 479, 284-291.
- Stadler, L. B., Su, L., Moline, C. J., Ernstoff, A. S., Aga, D. S., Love, N. G., 2015. Effect of redox conditions on pharmaceutical loss during biological wastewater treatment using sequencing batch reactors. *J. Hazard. Mater.* 282, 106-115.
- Strauss, M.L., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., Van Rensburg, P., 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 91, 182-190.
- Suárez, S., Lema, J. M., Omil, F., 2010. Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Res.* 44, 3214-3224.
- Subedi, B., Kannan, K., 2015. Occurrence and fate of select psychoactive pharmaceuticals and antihypertensives in two wastewater treatment plants in New York State, USA. *Sci. Total. Environ.* 514, 273-280.
- Sun, Q., Li, M., Ma, C., Chen, X., Xie, X., Yu, C., 2016. Seasonal and spatial variations of PPCP occurrence, removal and mass loading in three wastewater treatment plants located in different urbanization areas in Xiamen, China. *Environ. Pollut.* 208, 371-381.
- Szulc, A., Ambro-zewicz, D., Sydow, M., Lawniczak, L., Piotrowska-Cyplik, A., Marecik, R., Chrzanowski, L., 2014. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field studies. *J. Environ. Manag.* 132, 121-128.
- Taccari, M., Milanovic, V., Comitini, F., Casucci, C., Ciani, M., 2012. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 66, 39-46.
- Taiwo, A. M., Gbadebo, A. M., Oyedepo, J. A., Ojekunle, Z. O., Alo, O. M., Oyeniran, A. A., Onalaja, O.J., Ogunjimi, D., Taiwo, O. T., 2016.

- Bioremediation of industrially contaminated soil using compost and plant technology. *J. Hazard Mater.* 304, 166-172.
- Teather, R.M., Wood, P.J., 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 777-780.
- Tejada M., Gonzalez, J.L., Hernandez M.T., Garcia, C., 2008. Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: effect on soil microbial properties. *Bioresour.Technol.* 99, 2872-2880.
- Thiele-Bruhn, S., Beck, I.C., 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59, 457-465.
- Tiquia, S.M., Wan, J.H.C., Tam, N.F.Y., 2001. Extracellular enzyme profiles during co-composting of poultry manure and yard trimmings. *Process Biochem.* 36, 813-820.
- Tiquia, S.M., 2002. Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *J. Appl. Microbiol.* 92, 764-775.
- Tomaszewska-Ciosk, E., Golachowski, A., Zdybel, E., 2013. Determination of biodegradation rate of carrier for microorganism immobilization fabricated based on starch. *Pol. J.Chem. Technol.* 15, 110-114.
- Topp, E., Renaud, J., Sumarah, M., Sabourin, L., 2016. Reduced persistence of the macrolide antibiotics erythromycin, clarithromycin and azithromycin in agricultural soil following several years of exposure in the field. *Sci. Total Environ.* 562, 136-144.
- UNE, 1993. Determinación del contenido de carbonatos en suelos. Madrid, España.
- UNE, 2001a. Calidad del suelo. Determinación de la distribución granulométrica de la materia mineral de los suelos. Método por tamizado y sedimentación. Madrid, España.

- UNE, 2001b. Calidad del suelo. Determinación de la conductividad eléctrica específica. Madrid. España.
- UNE-EN ISO, 2011. Calidad del suelo. Determinación de la capacidad de intercambio catiónico efectiva y del nivel de saturación de bases utilizando una solución de cloruro de bario. Madrid, España.
- UNE-ISO, 2012. Calidad del suelo. Determinación del pH. Madrid. España.
- UNE-EN, 2012. Mejoradores de suelo y sustratos de cultivo. Determinación de las propiedades físicas. Densidad aparente seca, volumen de aire, volumen de agua, valor de contracción y porosidad total. Madrid, España.
- UNE-EN, 2013. Lodos, residuos biológicos tratados y suelos. Orientaciones para el pretratamiento de las muestras. Madrid, España.
- Vanni, A., Gamberini, R., Calabria, A., Nappi, P., 2000. Determination and identification of metabolites of the fungicides iprodione and procymidone in compost. *Chemosphere* 41, 1431-1439.
- Vanni, A., Fontana, F., Gamberini, R., Calabria, A., 2004. Occurrence of dicarboximidic fungicides and their metabolites' residues in commercial compost. *Agron.* 24, 7-12.
- Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., 2008. Efecto de la aplicación del compost sobre las propiedades biológicas del suelo, en: Moreno, J., Moral, R. (Eds), *Compostaje*, Mundi-Prensa, pp. 329-350.
- Varma, V.S., Ramu, K., Kalamdhad, A.S., 2015. Effects of waste lime sludge on nitrogen dynamics and stability of mixed organic waste using rotary drum composter. *Int. J. Environ. Res.* 9, 395-404.
- Verlicchi, P., Zambello, E., 2015. Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil - A critical review. *Sci. Total Environ.* 538, 750-767.

- Vasskog, T., Bergersen, O., Anderssen, T., Jensen, E., Eggen, T., 2009. Depletion of selective serotonin reuptake inhibitors during sewage sludge composting. *Waste Manag.* 29, 2808-2815.
- Villar, I., Alves, D., Perez-Diaz, D., Mato, S., 2016. Changes in microbial dynamics during vermicomposting of fresh and composted sewage sludge. *Waste Manag.* 48, 409-417.
- Vonmersi, W., Schinner, F., 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase-activity of soils with iodinitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils* 11, 216-220.
- Walkley, A., Black, O.A., 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37, 29-38.
- Walters, E., McClellan, K., Halden, R.U., 2010. Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in outdoor mesocosms. *Water Res.* 44, 6011-6020.
- Wang, C., Tu, Q., Dong, D., Strong, P.J., Wang, H., Sun, B., Wu, W., 2014. Spectroscopic evidence for biochar amendment promoting humic acid synthesis and intensifying humification during composting. *J. Hazard. Mater.* 280, 409-416.
- Wang, Y., Chen, G.X., Liang, J.B., Zoy, Y.D., Wen, X., Liao, X.D., Wu, Y.B., 2015. Comparison of oxytetracycline degradation behavior in pig manure with different antibiotic addition methods. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 18469-18476.
- Watanabe, K., 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 237-241.
- Wei, X., Wu, S.C., Nie, X.P., Yediler, A., Wong, M.H., 2009. The effects of residual tetracycline on soil enzymatic activities and plant growth. *J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Food Contam. Agric. Wastes.* 44, 461-471.

- WRB, 2015. IUSS Working Group WRB. World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No. 106. FAO, Rome.
- Wu, C.X., Spongberg, A.L., Witter, J.D., Fang, M., Czajkowski, K.P., Ames, A., 2010. Dissipation and leaching potential of selected pharmaceutically active compounds in soils amended with biosolids. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 343-351.
- Wu, M., Xiang, J., Que, C., Chen, F., Xu, G., 2015. Occurrence and fate of psychiatric pharmaceuticals in the urban water system of Shanghai, China. *Chemosphere* 138, 486-493.
- Xenofontos, E., Tanase, A.M., Stoica, I., Vyrides, I., 2016. Newly isolated alkalophilic *Advenella* species bioaugmented in activated sludge for high p-cresol removal. *New Biotechnol.* 33, 305-310.
- Xie, F., Yuan, S.Z., Pan, H.X., Wang, R., Cao, J.K. Jiang, W.B., 2017. Effect of yeast mannan treatments on ripening progress and modification of cell wall polysaccharides in tomato fruit. *Food Chem.* 218, 509-517.
- Xiros, C., Katapodis, P., Christakopoulos, P., 2009. Evaluation of *Fusarium oxysporum* cellulolytic system for an efficient hydrolysis of hydrothermally treated wheat straw. *Bioresour. Technol.* 100, 5362-5365.
- Yan, H., Wang, D.D., Dong, B., Tang, F.F., Wang, B.C., Fang, H., Yu, Y.L., 2011. Dissipation of carbendazim and chloramphenicol alone and in combination and their effects on soil fungal:bacterial ratios and soil enzyme activities. *Chemosphere* 84, 634-641.
- Yan, Q., Gao, X., Huang, L., Gan, X., Zhang, Y.X., Chen, Y.P., Peng, X.Y., Guo, J.S., 2014. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the largest municipal wastewater treatment plant in

- Southwest China: mass balance analysis and consumption back-calculated model. *Chemosphere* 99, 160-170.
- Yan, Q., Zhang, Y.X., Kang, J., Gan, X.M., Peng, X.Y., Guo, J.S., Gao, X., 2015. A preliminary study on the occurrence of pharmaceutically active compounds in the river basins and their removal in two conventional drinking water treatment plants in Chongqing, China. *Clean Soil W.* 43, 794-803.
- Yang, Q.X., Zhang, J., Zhu, K.F., Zhang, H., 2009. Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil. *J. Environ. Sci.* 21, 954-959.
- Yang, S.F., Hai, F.I., Price, W.E., McDonald, J., Khan, S.J., Nghiem, L.D., 2016. Occurrence of trace organic contaminants in wastewater sludge and their removals by anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 210, 153-159.
- Yi, X., Bayen, S., Kelly, B. C., Li, X., Zhou, Z., 2015. Improved detection of multiple environmental antibiotics through an optimized sample extraction strategy in liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 9071-9083.
- You, L., Nguyen, V. T., Pal, A., Chen, H., He, Y., Reinhard, M., Gin, K. Y., 2015. Investigation of pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals in a tropical urban catchment and the influence of environmental factors. *Sci. Total Environ.* 536, 955-963.
- Yuan, S., Jiang, X., Xia, X., Zhang, H., Zheng, S., 2013. Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere* 90, 2520-2525.
- Yuan, X., Qiang, Z., Ben, W., Zhu, B., Qu, J., 2015. Distribution, mass load and environmental impact of multiple-class pharmaceuticals in

- conventional and upgraded municipal wastewater treatment plants in East China. *Environ. Sci. Process Impacts* 17, 596-605.
- Zaccardelli, M., De Nicola, F., Villecco, D., Scotti, R., 2013. The development and suppressive activity of soil microbial communities under compost amendment. *J. Soil. Sci. Plant. Nutr.* 13, 730-742.
- Zahari, N.I., Md Shah, U.K., Asa'ari, A.Z.M., Mohamad, R., 2016. Selection of potential fungi for production of cellulase-poor xylanase from rice straw. *Bioresour.* 11, 1162-1175.
- Zahra El Ouaquodi, F., El Fels, L., Lemée, L., Amblès, A., Hafidi, M., 2015. Evaluation of lignocelulose compost stability and maturity using spectroscopic (FTIR) and thermal (TGA/TDA) analysis. *Ecol. Eng.* 75, 217-222.
- Zainudin, M.H.M., Hassan, M.A., Tokura, M., Shirai, Y., 2013. Indigenous cellulolytic and hemicellulolytic bacteria enhanced rapid co-composting of lignocelulose oil palm empty fruit bunch with palm oil mill effluent anaerobic sludge. *Bioresour. Technol.* 147, 632-635.
- Zeng, Y., Dabert, P., Le Roux, S., Mognol, J., De Macedo, F.J., De Guardia, A., 2014. Impact of the addition of a nitrifying activated sludge on ammonia oxidation during composting of residual household wastes. *J. Appl. Microbiol.* 117: 1674-1688.
- Zeng, Y., De Guardia, A., Dabert, P., 2016. Improving composting as a post-treatment of anaerobic digestate. *Bioresour. Technol.* 201, 293-303.
- Zhang, Z., Schwarts, S., Wagner, L., Miller, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7, 203-214.
- Zhang, J., Zeng, G., Chen, Y., Yu, M., Yu, Z., Li, H., Yu, Y., Huang, H., 2011. Effects of physic-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. *Bioresour. Technol.* 102, 2950-2956.

- Zhang, K., Guo, M., Zheng, X., Shen, D., Shentu, J., Wang, M., 2015a. Isolation, identification, and bioaugmentation of an oxytetracycline-degrading bacterium *Staphylococcus* sp. TJ-1 in composting of swine manure. Proc. Int. Conf. Ind. Electron. Appl. 2, 690-694.
- Zhang, Z., Zhao, J., Yu, C., Dong, S., Zhang, D., Yu, R., Wang, C., Liu, Y., 2015b. Evaluation of aerobic co-composting of penicillin fermentation fungi residue with pig manure on penicillin degradation, microbial population dynamics and composting maturity. Bioresour. Technol. 198, 403-409.
- Zhang, H., Luo, Y., Wu, L., Huang, Y., Christie, P., 2015c. Residues and potential ecological risks of veterinary antibiotics in manures and composts associated with protected vegetable farming. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 5908-1598.
- Zhang, Y.B., Zhou, J., Xu, Q.M., Cheng, J.S., Luo, Y.L., Yuan, Y.J., 2016. Exogenous cofactors for the improvement of bioremoval and biotransformation of sulfamethoxazole by *Alcaligenes faecalis*. Sci. Total Environ. 565, 547-556.
- Zhao, F.W., Liang, J.P., Wang, G.R., Li, X.M., 2012. Disposal of mixed-organic wastes by continuous high-temperature composting. Adv. Chem. Eng. 396, 1984-1988.
- Zhao, X.Y., He, X.S., Xi, B.D., Gao, R.T., Tan, W.B., Zhang, H., Li, D., 2016. The evolution of water extractable organic matter and its association with microbial community dynamics during municipal solid waste composting. Waste Manag. 56, 79-87.
- Zorita, S., Martensson, L., Mathiasson, L., 2009. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. Sci. Total Environ. 407, 2760-2770.
- Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M., Prieto, A., 2012. Overview of extraction, clean-up and

detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: a review. *Anal. Chim. Acta* 736, 7-29

