



**UNIVERSITAT
JAUME I**



**Institut Universitari
de Plaguicides
i Aigües**

Avanços en la investigació de fàrmacs en aigües residuals: 1) Estudi de la presència d'antibiòtics i possibles resistències antimicrobianes generades, 2) Aplicació de processos avançats de tractament de les aigües residuals per a l'eliminació de fàrmacs

**Projecte d'investigació aplicada als Recursos
Hídrics a la Comunitat Valenciana
Exercici 2022**

**Finançat per la Conselleria d'Agricultura, Desenvolupament
Rural, Emergència Climàtica i Transició Ecològica**

Informe final, novembre de 2022

Elena Pitarch Arquimbau

EQUIP DE TREBALL

Dra. Elena Pitarch Arquimbau

Professora Titular d'Universitat de Química Analítica, IUPA, UJI. Investigadora responsable del projecte

Dr. Félix Hernández Hernández

Catedràtic de Química Analítica, IUPA, UJI

Dr. Lubertus Bijlsma

Investigador contractat doctor, IUPA, UJI

Dra. María Ibáñez Martínez

Professora Titular d'Universitat de Química Analítica, IUPA, UJI

Claudia Simarro Gimeno

Personal investigador predoctoral, IUPA, UJI

Dra. Rosa de Llanos Frutos

Investigadora contractada doctora, Unitat Predepartamental de Medicina, UJI

Dr. Javier Navarro Laboulais

Catedràtic d'Enginyeria Química i Nuclear, ITQ, UPV

Dr. Antonio Chica Lara

Científic Titular, ITQ, UPV

Isabel Vidal Barreiro

Personal investigador predoctoral, ITQ, UPV

Contractades amb càrrec al conveni

Elisa Gracia Marín

María Mata Pesquera

Marina Puerta Rodríguez

ÍNDEX

1. OBJECTIUS I JUSTIFICACIÓ

2. SEGUIMENT DELS NIVELLS DE CONCENTRACIÓ DELS FÀRMACS EN LES AIGÜES RESIDUALS DE LA PROVÍNCIA DE CASTELLÓ

2.1. Presa de mostres

2.2. Determinació quantitativa dels fàrmacs mitjançant LC-MS/MS

2.3. Variació estacional de fàrmacs en les EDARS

2.4. Eficàcia d'eliminació de fàrmacs en les EDARS

3. ESTUDI DE DEGRADACIÓ DELS FÀRMACS EN LES AIGÜES RESIDUALS D'EIXIDA DESPRÉS DE L'APLICACIÓ DE TRACTAMENTS AVANÇATS

3.1. Aplicació d'ozonització catalítica en aigua fortificada

3.2. Seguiment quantitatiu de l'eliminació de fàrmacs en aigua residual

4. ESTUDI DE LES RESISTÈNCIES A ANTIBIÒTICS EN LES AIGÜES RESIDUALS

4.1. Detecció i quantificació dels GRA mitjançant PCR quantitativa

4.2. Caracterització microbiana de les aigües residuals

5. BIBLIOGRAFIA

Annex 1. Metodologia analítica per a fàrmacs. Metodologia de tractaments avançats amb ozonització catalítica. Metodologia de resistència a antibiòtics

1. OBJECTIUS I JUSTIFICACIÓ

La investigació sobre la presència de productes farmacèutics en el medi aquàtic ha anat guanyant interès atès el seu ús ampli i creixent, així com a la seua freqüent detecció en el cicle de l'aigua (Bellver-Domingo et al., 2019). Encara que els fàrmacs poden arribar al medi aquàtic a través de diferents vies, la baixa eficàcia d'eliminació de la majoria de les estacions depuradores d'aigües residuals (EDARS) convencionals és una de les raons principals de la seua presència en les aigües superficials receptores a través dels efluent tractats (Botero-Coy et al., 2018; Fonseca et al., 2020; Bijlsma et al., 2021; López et al., 2022). Diversos treballs han destacat la necessitat de millorar el tractament aplicat en les EDARS, mitjançant l'ús de processos de tractament terciari addicionals (Sousa et al., 2018).

En la majoria dels municipis, les aigües residuals són abocades a rius i llacs amb un tractament deficient, fet que provoca una contaminació important del medi aquàtic (Signh, 2021). Actualment s'exploren diverses tecnologies de tractament per a eliminar de manera eficient els contaminants orgànics i patògens específics dels efluent. Així, s'han aplicat diferents processos d'oxidació avançada (POA) per a l'eliminació d'aquests contaminants en aigües residuals (Giwa et al., 2021). Una tecnologia molt eficaç per a l'eliminació d'un ampli espectre de contaminants emergents és l'oxidació química mitjançant l'ús d'ozó, directament o indirectament (Derco et al., 2021). Des del punt de vista de l'enginyeria de processos, l'ozonització es troba entre els mètodes més competitius per al tractament de grans volums d'aigua d'EDARS (Ferré-Aracil et al., 2016). Des d'un punt de vista químic, l'ozó té l'avantatge de poder reaccionar directament a través de radicals modificant el pH, amb la utilització de reactius com ara H₂O₂ (procés de peroxona) o catalitzadors. L'ozonització catalítica permet una oxidació efectiva amb un ampli nombre d'aplicacions (Wang i Chen, 2020). El principal avantatge d'aquest procés catalític és la completa mineralització de la matèria orgànica que no es pot oxidar directament amb l'ozó.

Dins dels productes farmacèutics, els antibiòtics són sens dubte un dels descobriments de major rellevància en la història de la humanitat. No obstant això, aquesta gran efectivitat ha sigut també l'origen del seu declivi, ja que durant dècades s'ha produït un ús desmesurat i inadequat dels antimicrobians, la qual cosa ha promogut l'evolució de la resistència a antimicrobians en els microorganismes. De fet, els bacteris resistents a antibiòtics representen un dels principals problemes actuals de salut pública i prediccions recents indiquen que prompte es convertiran en la primera causa de mortalitat a tot el món. A causa de la repercussió mundial d'aquests microorganismes en hospitals, així com el seu impacte en medicina veterinària, seguretat alimentària i el medi ambient, es requereixen esforços i accions locals, nacionals i mundials per

a evitar-ne la propagació. Amb tot això, avui dia aquesta problemàtica s'estudia des d'una perspectiva integral sota l'enfocament de l'organització Mundial de la Salut denominat *One Health* (salut única). Dins d'aquest enfocament global, el medi ambient juga un paper fonamental tant en la dispersió dels microorganismes resistents a antimicrobians (MRA) com en la generació d'aquests (Buelow et al., 2020). En aquest sentit, les plantes de tractament d'aigües residuals urbanes es troben entre els receptors i fonts més importants de MRA ambiental. Per tant, s'espera que els afluents de les EDARS reflectisquen, almenys en part, el resistoma de la població humana de cada EDAR, inclosa la presència de MRA, gens de resistència a antibiòtics (GRA) i elements genètics mòbils associats (Pärnänen et al., 2019).

La problemàtica abordada en aquesta investigació (anualitat 2022) pretén ser una continuació del projecte "Investigació d'antibiòtics en aigües residuals de la província de Castelló: detecció, eficiència d'eliminació en les EDARS, impacte ambiental i resistència antimicrobiana" codirigit pel doctor Félix Hernández i la doctora Elena Pitarch el 2021 i emmarcat en el conveni entre la Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural i la Universitat Jaume I. En aquest sentit, l'Institut Universitari de Plaguicides i Aigües (IUPA) té capacitat demostrada, a través de les seues investigacions, publicacions i projectes, per a abordar aquesta problemàtica, tant en el seu vessant purament analític, basat en l'ús d'acoblaments cromatografia/espectrometria de masses, com en els aspectes mediambientals. Així mateix, en els últims anys, el IUPA ha dut a terme projectes d'investigació en els quals s'ha abordat aquesta problemàtica "Estratègies analítiques per al control de contaminants emergents i avaluació de l'eficiència d'eliminació en processos avançats d'oxidació en aigües residuals" (doctor Félix Hernández, 2019-2021, MINECO, RTI2018-097417-B-I00) i "Estratègies analítiques avançades per al control i avaluació de contaminants emergents en aigües de reg" (doctora Elena Pitarch, 2019-2020, UJI-B2018-55). A més, el IUPA ha participat en un projecte internacional Colciencias "Remoció d'antibiòtics i bacteris resistents en aigües residuals hospitalàries emprant tecnologies avançades d'oxidació" (2019-2021) en col·laboració amb la Universitat d'Antioquia (Medellín, Colòmbia) i amb l'Institut de Tecnologia Química (ITQ) de la Universitat Politècnica de València.

Un dels objectius principals d'aquest projecte ha sigut realitzar **un seguiment dels nivells de concentració dels productes farmacèutics en les aigües residuals de la província de Castelló** per a conèixer la situació actual de les EDARS. Per a això, s'han seleccionat tres municipis (Castelló, Borriana i l'Alcora) per a **investigar la presència d'uns 40 fàrmacs** àmpliament utilitzats, entre els quals s'han inclòs **16 antibiòtics**. La determinació analítica s'ha dut a terme mitjançant la utilització de metodologia analítica basada en l'acoblament de cromatografia

líquida espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS) desenvolupada en l'anualitat anterior i que permet determinar amb fiabilitat nivells de concentració extremadament baixos en les aigües. La realització dels mostrejos de les aigües residuals en tres diferents èpoques de l'any ha permès obtenir conclusions sobre **l'existència d'una variació estacional**. Addicionalment, amb les anàlisis realitzades en les aigües d'entrada i eixida de les tres EDARS, s'ha pogut estudiar **l'eficiència d'eliminació de la planta per als fàrmacs estudiats**.

D'altra banda, i com a mostra de la interdisciplinarietat del projecte, s'ha dut a terme un **estudi de degradació i/o eliminació de fàrmacs en les aigües residuals d'eixida de l'EDAR amb l'ús de diferents tractaments avançats amb ozonització catalítica**. Aquesta part de l'estudi s'ha realitzat en col·laboració amb l'ITQ de la UPV. L'aplicació de catalitzadors basats en **zeolites Y juntament amb l'ozó** ha permès el seguiment quantitatiu mitjançant LC-MS/MS de l'eliminació de fàrmacs, tant en aigües fortificades com en aigües residuals d'eixida de l'EDAR de Castelló de la Plana.

Finalment, i una vegada més en col·laboració amb un altre grup d'investigació de l'UJI, la Unitat predepartamental de Medicina, s'ha seguit amb la línia de **resistències a antibiòtics en aigües residuals** que es va començar, de manera preliminar, durant l'anualitat 2021 i que, durant el 2022 s'ha vist ampliada i afermada. S'ha dut a terme una **extracció d'ADN de les aigües residuals**, i una posterior **detecció i quantificació dels GRA** (qnrS, blaTEM, sul1, blaCTX -M-32, blaOXA-58, tet, int1 i 16S rRNA) mitjançant PCR quantitativa (qPCR). Finalment, algunes mostres d'aigües residuals han sigut seleccionades per a la **caracterització microbiana per a avaluar la presència de coliformes i enterococs** totals, així com la població de tots dos grups bacterians, resistents a tetraciclina i ciprofloxacina.

Cal destacar que el projecte realitzat és ampli i complex, que a més de requerir l'aplicació de metodologia analítica sofisticada, ha involucrat diversos investigadors i investigadores de diferents disciplines i centres d'investigació. Com a aspecte rellevant, cal destacar l'element innovador i distintiu, com és l'aplicació de tècniques d'oxidació avançada mitjançant l'ús de l'ozonització catalítica per a l'eliminació de fàrmacs en aigües residuals i que pot ser el punt de partida per a la reutilització d'aquestes aigües en una etapa posterior. A més, el seguiment de dades trobades en les aigües residuals en tres EDARS de la província de Castelló, tant pel que fa a la concentració de fàrmacs com a les resistències antimicrobianes, s'hauria de realitzar al llarg de diversos anys per a poder arribar a conclusions prou suportades i concloents, i implementar sistemes de vigilància capaços de determinar la prevalença de la resistència de la població.

Els resultats més rellevants obtinguts en el marc d'aquest treball s'enviaran per a la publicació en revistes especialitzades i es presentaran en congressos i reunions científiques, en el marc de la **difusió pública** que ha de tindre qualsevol investigació.

Per a la realització de l'estudi s'ha comptat amb la col·laboració inestimable de FACSA, empresa operadora de l'EDAR de Castelló de la Plana, que ha subministrat les mostres d'aigua residual i ha facilitat les dades necessàries per als càlculs de càrregues diàries de fàrmacs en les aigües. A més, la presa de mostres de les aigües residuals ha sigut autoritzada per la Direcció de Serveis Urbans, Infraestructures i Sostenibilitat de l'Ajuntament de Castelló.

2. SEGUIMENT DELS NIVELLS DE CONCENTRACIÓ DELS FÀRMACS EN LES AIGÜES RESIDUALS DE LA PROVÍNCIA DE CASTELLÓ

2.1. Presa de mostres

Aquest estudi s'ha focalitzat en tres EDARS de la província de Castelló (Castelló de la Plana, Borriana i l'Alcora). S'han dut a terme tres mostrejos d'aigua residual (tant d'entrada com d'eixida) d'una setmana en tres estacions diferents (maig, juliol i setembre de 2022). En total, es van prendre 126 mostres compostes de 24 hores, que van correspondre a 63 mostres d'aigua d'entrada (influent) i altres 63 d'aigua d'eixida (efluent). El mostreig va ser realitzat per personal de la planta i refrigerades immediatament en la mateixa planta. Posteriorment, les mostres van ser recollides per personal del IUPA i recepcionades en el laboratori en bon estat. En el cas de no poder realitzar les anàlisis immediatament, es van guardar en les instal·lacions del IUPA en congelador a temperatura inferior a -18 °C fins al moment de les anàlisis.

Finalment, d'entre totes les mostres recollides, es van analitzar quatre mostres (2 d'influent i 2 d'efluent) en cada mostreig i per cada EDAR. En la **Taula 2.1** s'indiquen les diferents mostres analitzades, les dates de mostreig i els seus codis d'identificació, així com el cabal d'entrada i d'eixida del dia del mostreig.

Taula 2.1. Mostreig d'aigua residual d'entrada i d'eixida de les tres EDARS de la província de Castelló.

EDAR	Mostreig	Mostres d'entrada a l'EDAR				Mostres d'eixida de l'EDAR			
		Data	Dia	Codi de mostra	Cabal d'entrada (m ³ /d)	Data	Dia	Codi de mostra	Cabal d'eixida (m ³ /d)
CASTELLÓ	Maig	15/05/2022	Diumenge	CS-I-004	35374	16/05/2022	Dilluns	CS-E-005	36167
		16/05/2022	Dilluns	CS-I-005	36167	17/05/2022	Dimarts	CS-E-006	41564
	Juliol	09/07/2022	Dissabte	CS-I-011	36796	10/07/2022	Diumenge	CS-E-012	35442
		10/07/2022	Diumenge	CS-I-012	35442	11/07/2022	Dilluns	CS-E-013	32846
	Setembre	24/09/2022	Dissabte	CS-I-018	35120	25/09/2022	Diumenge	CS-E-019	33604
		25/09/2022	Diumenge	CS-I-019	33604	26/09/2022	Dilluns	CS-E-020	33602
BORRIANA	Maig	15/05/2022	Diumenge	BU-I-004	9200	16/05/2022	Dilluns	BU-E-005	10320
		16/05/2022	Dilluns	BU-I-005	10320	17/05/2022	Dimarts	BU-E-006	9495
	Juliol	09/07/2022	Dissabte	BU-I-011	13400	10/07/2022	Diumenge	BU-E-012	11828
		10/07/2022	Diumenge	BU-I-012	11612	11/07/2022	Dilluns	BU-E-013	12582
	Setembre	24/09/2022	Dissabte	BU-I-018	11200	25/09/2022	Diumenge	BU-E-019	13362
		25/09/2022	Diumenge	BU-I-019	13257	26/09/2022	Dilluns	BU-E-020	15042
L'ALCORA	Maig	17/05/2022	Dimarts	AL-I-004	1523	18/05/2022	Dimecres	AL-E-005	1457
		18/05/2022	Dimecres	AL-I-005	1530	19/05/2022	Dijous	AL-E-006	1629
	Juliol	09/07/2022	Dissabte	AL-I-011	1124	10/07/2022	Diumenge	AL-E-012	926
		10/07/2022	Diumenge	AL-I-012	971	11/07/2022	Dilluns	AL-E-013	1107
	Setembre	24/09/2022	Dissabte	AL-I-018	1312	25/09/2022	Diumenge	AL-E-019	1206
		25/09/2022	Diumenge	AL-I-019	1269	26/09/2022	Dilluns	AL-E-020	1499

2.2. Determinació quantitativa dels fàrmacs mitjançant LC-MS/MS

Metodologia analítica

Amb la finalitat d'aportar informació d'interès sobre la presència de medicaments de diverses famílies en les aigües residuals, el principal objectiu d'aquest estudi ha sigut la determinació d'uns 40 fàrmacs (vegeu la **taula A1 en l'annex 1**) seleccionats sobre la base de la nostra experiència en anàlisi d'aigües residuals i del projecte Conselleria anualitat 2021. D'entre els compostos seleccionats, existeix un grup de 16 compostos pertanyents a la família dels antibiòtics.

L'anàlisi quantitativa de les mostres s'ha dut a terme mitjançant l'aplicació de metodologia analítica basada en la tècnica de cromatografia líquida d'ultraresolució acoblada a espectrometria de masses en tàndem (UHPLC-MS/MS) amb analitzador de triple quadrupol (QqQ), en manera de treball *Selected Reaction Monitoring* (SRM). En l'**annex 1** d'aquest informe, es descriu el mètode analític aplicat.

En cada seqüència d'anàlisi s'han injectat tant les mostres com els controls de qualitat (QC) entre dues corbes de calibrat, utilitzant les respostes mitjanes dels calibrats per a dur a terme la quantificació dels compostos. Aquesta quantificació s'ha realitzat mitjançant calibratge extern, o mitjançant el mètode de calibrat de patró intern en aquells casos en els quals es disposa de patró intern marcat isotòpicament (ILIS). Per a cada compost, s'ha adquirit una transició de quantificació (Q) i dues transicions de confirmació (q_1 , q_2). S'ha donat com a positiu un compost solament quan s'han complert els criteris de confirmació de la identitat (SANTE/11813/2017), és a dir, quan, a més de coincidir el temps de retenció amb el patró/patró intern, amb una tolerància màxima de ± 0.1 min, almenys una de les relacions d'intensitat (q_1/Q , q_2/Q) es desvia menys del ± 30 % respecte al patró de referència (com a valor mitjà del calibrat).

Controls de qualitat de les anàlisis

En aquest treball, s'ha parat especial atenció al control de qualitat de les anàlisis amb la finalitat d'assegurar la fiabilitat dels resultats. Els baixos nivells de concentració dels compostos analitzats i la complexitat de la matriu de les mostres fan que aquest tipus de determinacions siga problemàtic, per la qual cosa el control de qualitat adquireix especial importància. S'ha dut a terme mitjançant l'anàlisi de mostres control (Quality Control, QC), incloses en cada seqüència analítica.

Els QC es van preparar a partir de mostres d'aigua d'influent i d'efluent analitzades i fortificades a tres nivells de concentració (100, 1000 i 5000 ng L⁻¹) amb els fàrmacs objecte d'estudi. En el camp de l'anàlisi de residus es consideren acceptables les recuperacions individuals de QC en el rang entre 60 i 140 % (SANTE, 2019). Quan les recuperacions per als QC es van trobar fora d'aquest rang, les concentracions obtingudes es van corregir en funció de la recuperació mitjana de les mostres QC injectades en la seqüència, sempre que s'observara una certa robustesa en els resultats obtinguts per a aquestes recuperacions fora de rang.

La **Taula 2.2** mostra els valors mitjans de recuperació dels QC obtinguts en l'anàlisi de fàrmacs en les aigües residuals d'entrada i d'eixida de les EDARS. Les recuperacions mitjanes dels QC van ser satisfactòries (entre 60-140 %) per a la majoria dels compostos, a excepció de tetraciclina els valors de la qual van ser majors del 140 % per al QC al nivell baix en les dues mostres. De tota manera, no va necessitar cap correcció en mostra, ja que la tetraciclina no s'hi va detectar. Per a altres casos (acetaminofèn, valsartan i OD venlafaxina), especialment al nivell més baix de concentració, no es van poder calcular les recuperacions a conseqüència de l'elevada concentració d'aquests compostos en les mostres "blanc" utilitzades per a la seua preparació. Això va fer que a penes es notara l'addició d'una xicoteta quantitat de patró i que no poguera, per tant, calcular-se'n la recuperació.

Taula 2.2. Recuperacions mitjanes (%) dels QC dels fàrmacs analitzats en les aigües.

	Aigües d'entrada			Aigües d'eixida		
	QC100	QC1000	QC5000	QC100	QC1000	QC5000
Acetaminofèn*	a	77	91	85	93	88
Alprazolam	70	84	74	82	94	87
Atorvastatina*	93	91	89	90	97	100
Carbamazepina*	135	106	109	100	117	91
Ciprofloxacina*	97	80	90	83	84	96
Claritromicina*	65	79	96	71	87	98
Clindamicina	109	108	91	103	110	108
Diclofenac*	89	106	110	110	108	96
Enalapril*	95	97	98	107	101	97
Eritromicina*	85	70	89	60	82	98
Flumequina*	99	99	96	104	103	94
Furaltadona	112	110	109	140	135	124
Gabapentina*	81	70	108	61	97	96
Iopromida*	105	97	84	94	89	90
Irbesartan*	111	91	78	86	106	67
Levamisole*	84	96	94	83	104	100
Lincomicina	105	103	78	120	105	79
Lorazepam	103	91	84	110	102	94
Losartan*	88	91	91	87	99	92
Metronidazole*	108	101	98	107	103	95
Metroprolol*	81	96	96	85	102	101
Àcid nalidíxic*	110	95	89	102	98	85
Norfloxacina*	60	79	83	67	90	88
Àcid oxolínic *	106	108	104	106	112	97
Pantoprazole*	99	87	78	100	90	80
Fenazona	98	116	120	98	103	114
Primidona*	106	100	98	86	102	99
Roxitromicina*	134	81	79	94	82	95
Salbutamol*	106	98	91	101	102	79
Sulfadiazina*	102	101	94	106	103	93
Sulfametoxazole*	114	99	96	102	113	89
Tetraciclina*	<u>180</u>	113	100	<u>152</u>	108	101
Tramadol*	67	93	89	66	89	82
Trimetoprim*	95	100	93	97	108	95
Valsartan*	a	100	126	61	92	98
Venlafaxina*	75	80	75	89	83	82
OD Venlafaxina	a	131	134	116	136	120

En *cursiva* es mostren les recuperacions fora del rang 60-140 % acceptat.

*Compostos quantificats mitjançant mètode patró intern, en estar disponible l'ILIS corresponent.

a: presència del compost en el "blanc" utilitzat per a preparar el QC a concentracions altes, la qual cosa impedeix obtenir un valor de recuperació satisfactori.

Anàlisi de les aigües residuals

Les 36 mostres d'aigua residual procedents de les tres EDARS (18 mostres d'influent i 18 mostres d'efluent) es van analitzar mitjançant la metodologia descrita en aquest informe per a la determinació dels 38 fàrmacs. Les **Taules 2.3, 2.4 i 2.5** mostren els resultats obtinguts per a la determinació dels productes farmacèutics en cadascuna de les mostres d'entrada (influent) i d'eixida (efluent) recollides en les tres EDARS (Castelló de la Plana, Borriana i l'Alcora), respectivament.

S'han trobat la majoria dels compostos estudiats (31 de 38 fàrmacs); mentre que els fàrmacs no detectats en cap de les mostres analitzades són flumequina, furaltadona, lincomicina, àcid oxolínic, roxitromicina, sulfadiazina i tetraciclina. En les aigües d'influent, cal destacar l'analgèsic acetaminofèn, l'anticonvulsiu gabapentina i l'antihipertensiu valsartan, que van presentar concentracions en mostres superiors a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en les tres EDARS; el valor més alt per a acetaminofèn es troba en la mostra de juliol AL-I-011 ($247 \mu\text{g L}^{-1}$) en l'EDAR de l'Alcora. Aquest fet coincideix amb els resultats trobats durant l'anualitat 2021 en el desenvolupament del projecte "Investigació d'antibiòtics en aigües residuals de la província de Castelló: detecció, eficiència d'eliminació en les EDARS, impacte ambiental i resistència antimicrobiana" emmarcat també en el conveni entre la Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural i la Universitat Jaume I.

Pel que respecta a les aigües d'eixida, en general els nivells de concentració han sigut més baixos que els d'aigua d'entrada, encara que es van detectar diversos fàrmacs a concentracions superiors a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (acetaminofèn, diclofenac, gabapentina, iopromida, fenazona, tramadol, valsartan, venlafaxina i el seu metabòlit OD venlafaxina). Entre els tres compostos que van presentar les concentracions més altes en les mostres d'influent, cal assenyalar el cas d'acetaminofèn i de gabapentina, ja que les seues concentracions es van rebaixar dràsticament en les mostres d'efluent.

Cal destacar que en els efluentes analitzats s'han detectat cinc fàrmacs (clindamicina, sulfametoxazole, trimetoprim i venlafaxina juntament amb el seu metabòlit OD venlafaxina) que estan inclosos en la llista d'observació (Watch List) de la UE (Decisió d'execució 2022/1307) els nivells de la qual han de ser controlats en aigües superficials.

Taula 2.3. Concentracions (ng L⁻¹) de fàrmacs en mostres aigües residuals de l'EDAR de Castelló de la Plana.

	Maig 2022				Juliol 2022				Setembre 2022			
	CS-I-003	CS-I-004	CS-E-004	CS-E-005	CS-I-011	CS-I-012	CS-E-012	CS-E-013	CS-I-018	CS-I-019	CS-E-019	CS-E-020
Acetaminofèn	34181	30074	-	-	5774	24921	-	-	111962	101642	-	1572
Alprazolam	-	-	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Atorvastatina	208	208	35	35	503	446	39	110	390	379	83	40
Carbamazepina	d	d	36	34	72	60	66	60	69	91	95	157
Ciprofloxacina	1082	1086	442	410	445	514	-	362	1173	1248	541	489
Claritromicina	83	81	d	d	400	444	105	95	555	375	56	52
Clindamicina	-	-	d	d	d	d	d	67	-	-	78	82
Diclofenac	422	601	379	427	1373	1262	431	1052	1456	1613	1353	1377
Enalapril	194	227	-	-	541	386	-	-	397	374	-	-
Eritromicina	d	d	40	38	417	491	348	250	108	281	184	157
Flumequina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Furaltadona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gabapentina	6883	8100	100	d	21638	18613	684	686	15192	14074	1245	914
Iopromida	-	-	-	-	517	d	84	362	373	198	281	931
Irbesartan	404	538	373	521	1085	1074	909	680	1027	1007	906	870
Levamisole	-	d	20	d	-	-	71	45	93	90	78	78
Lincomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	-	-	-	-	-	d	98	89	145	141	96	87
Losartan	209	271	161	174	739	586	440	373	689	705	394	373
Metronidazole	-	-	d	d	-	-	84	88	-	-	106	87
Metroprolol	d	d	d	d	132	112	66	69	352	355	167	184
Àcid nalidíxic	d	d	d	-	-	-	-	-	d	d	d	d
Norfloxacina	d	d	d	d	178	201	d	91	452	457	141	137
Àcid oxolínic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	-	-	d	d	-	-	d	d	d	d	d	d

Fenazona	-	d	509	417	73	96	71	437	206	236	698	2199
Primidona	-	d	29	24	85	79	85	74	139	148	98	139
Roxitromicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	-	d	d	d	d	d	d	d	50	50	27	29
Sulfadiazina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfametoxazole	262	429	58	44	836	699	463	504	1109	1165	344	213
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tramadol	500	579	388	359	3288	3517	2410	2295	3630	3680	2614	2440
Trimetoprim	86	93	29	29	184	221	118	124	438	449	93	93
Valsartan	3325	4808	2044	1632	20090	17446	4169	2827	13897	12954	5213	4147
Venlafaxina	189	236	156	131	1790	1824	1077	1096	3822	2404	1413	1287
OD Venlafaxina	649	915	554	501	847	847	541	2043	2818	2732	2236	1802

d: detectat, no quantificat, concentració inferior al valor límit per a la quantificació.

Taula 2.4. Concentracions (ng L⁻¹) de fàrmacs en mostres aigües residuals de l'EDAR de Borriana.

	Maig 2022				Juliol 2022				Setembre 2022			
	BU-I-003	BU-I-004	BU-E-004	BU-E-005	BU-I-011	BU-I-012	BU-E-012	BU-E-013	BU-I-018	BU-I-019	BU-E-019	BU-E-020
Acetaminofèn	15322	19071	-	-	11267	2448	-	-	13960	35253	-	-
Alprazolam	-	-	d	d	d	d	d	d	-	-	-	d
Atorvastatina	130	240	d	106	194	191	149	163	158	295	115	140
Carbamazepina	d	d	22	23	69	77	70	78	56	121	96	117
Ciprofloxacina	1034	1244	777	739	552	504	478	163	516	998	746	747
Claritromicina	d	51	d	d	355	327	189	126	525	675	245	205
Clindamicina	-	-	-	d	50	50	37	32	-	-	37	35
Diclofenac	d	412	294	292	406	501	471	533	300	697	413	463
Enalapril	125	144	-	-	141	137	-	-	120	226	-	-
Eritromicina	-	d	20	20	189	326	251	292	-	-	60	57
Flumequina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Furaltadona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gabapentina	3275	5559	763	587	7251	7617	2056	1746	4440	8725	2188	2507
Iopromida	1131	542	821	275	3628	1028	2107	823	3937	4432	4614	3419
Irbesartan	291	379	309	284	328	400	322	368	305	466	347	397
Levamisole	d	d	52	59	-	-	40	44	73	87	44	53
Lincomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	-	-	-	-	-	-	-	-	39	86	36	54
Losartan	176	275	176	208	287	293	281	344	235	426	299	353
Metronidazole	-	-	d	d	-	-	50	40	-	-	144	142
Metroprolol	d	d	d	d	63	56	37	37	309	322	136	141
Àcid nalidíxic	-	d	d	d	-	-	-	-	d	d	d	d
Norfloxacina	d	d	d	d	116	117	99	43	197	200	122	127
Àcid oxolínic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	-	-	d	d	-	-	d	d	32	36	22	21

Fenazona	-	d	291	330	58	52	56	156	173	194	731	938
Primidona	d	d	40	53	d	d	54	66	81	70	97	84
Roxitromicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Sulfadiazina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfametoxazole	118	174	25	21	180	237	231	235	222	578	47	40
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tramadol	500	627	482	459	1468	1357	1386	1622	1413	2649	1818	2067
Trimetoprim	d	52	37	40	109	103	92	90	160	239	155	170
Valsartan	1685	2744	1910	1988	4890	4600	1743	5367	3086	6071	3780	3919
Venlafaxina	97	153	131	129	392	399	406	458	608	798	463	515
OD Venlafaxina	361	578	478	517	282	292	916	1192	806	1337	1094	1189

d: detectat, no quantificat, concentració inferior al valor límit per a la quantificació.

Taula 2.5. Concentracions (ng L⁻¹) de fàrmacs en mostres aigües residuals de l'EDAR de l'Alcora.

	Maig 2022				Juliol 2022				Setembre 2022			
	AL-I-001	AL-I-002	AL-E-002	AL-E-003	AL-I-011	AL-I-012	AL-E-012	AL-E-013	AL-I-018	AL-I-019	AL-E-019	AL-E-020
Acetaminofèn	88250	127213	-	-	246823	115799	-	-	106030	112215	-	-
Alprazolam	-	-	d	d	24	25	21	21	-	d	d	d
Atorvastatina	506	376	-	-	867	848	d	23	1004	730	d	d
Carbamazepina	d	d	36	24	76	62	85	83	123	124	169	145
Ciprofloxacina	972	1302	200	214	1926	1560	180	129	1181	1635	159	126
Claritromicina	d	d	d	d	158	158	68	67	268	133	46	36
Clindamicina	-	245	d	d	-	-	46	45	-	-	68	60
Diclofenac	212	422	694	686	2437	2572	2196	2054	2572	2494	2444	1981
Enalapril	184	190	-	-	496	478	-	-	664	446	-	-
Eritromicina	-	-	34	27	495	204	127	125	57	-	87	60
Flumequina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Furaltadona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gabapentina	9480	8909	246	211	36094	31882	1073	1078	76435	35827	296	264
Iopromida	-	-	-	-	-	-	-	-	d	d	-	-
Irbesartan	613	571	561	470	1055	1493	967	952	2260	1162	1152	951
Levamisole	319	156	39	51	534	256	236	214	99	156	276	176
Lincomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	-	-	d	d	-	117	121	98	141	151	125	119
Losartan	275	322	111	97	813	729	175	197	1048	1010	223	187
Metronidazole	-	-	-	-	-	-	40	30	-	-	-	-
Metroprolol	d	d	d	d	-	-	-	-	336	304	136	130
Àcid nalidíxic	d	-	d	d	-	-	-	-	d	d	d	d
Norfloxacina	175	163	d	d	307	418	104	77	360	398	120	104
Àcid oxolínic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	-	d	27	25	33	30	50	44	31	32	33	32

Fenazona	d	d	408	402	72	59	2288	2311	227	208	5682	5050
Primidona	99	258	98	90	313	188	255	255	346	147	361	302
Roxitromicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	-	-	d	d	26	34	d	d	64	43	33	29
Sulfadiazina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfametoxazole	661	2096	188	135	1629	1386	552	428	1433	683	300	295
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tramadol	555	953	493	475	3636	3013	2896	3026	3407	2854	3760	3294
Trimetoprim	222	1217	100	89	615	499	108	129	651	359	186	162
Valsartan	6983	11028	1225	747	47505	41221	1845	1660	32647	29691	4063	3396
Venlafaxina	447	478	86	96	1515	5286	557	498	1570	1807	1032	596
OD Venlafaxina	1041	1130	694	645	1158	822	1652	1787	3392	3411	2359	2150

d: detectat, no quantificat, concentració inferior al valor límit per a la quantificació.

Les concentracions mitjanes mensuals (maig, juliol i setembre) trobades en cada mostreig es mostren en les **Taules 2.6, 2.7 i 2.8** per a cadascuna de les tres EDARS, respectivament.

Com s'ha indicat anteriorment, les concentracions en l'efluent són, en general, menors que en les mostres d'influent, la qual cosa denota una certa eficiència de l'EDAR pel que fa a l'eliminació de fàrmacs, encara que queda lluny de ser completa perquè encara es troben molts fàrmacs i a nivells relativament importants en les aigües tractades. No obstant això, s'observen alguns fàrmacs (diclofenac, levamisole, lorazepam, losartan, fenazona, primidona i tramadol) amb concentracions mitjanes mensuals del mateix ordre, i fins i tot majors, en les mostres d'efluent.

Comparant els resultats de les tres EDARS, es pot apreciar que la situació és similar, encara que crida l'atenció el mitjà de contrast iopromida ja que és el compost que té un comportament més diferent. Aquest fàrmac a Castelló de la Plana es va detectar en alguns mostrejos en concentracions inferiors a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (606 ng L^{-1} com a concentració màxima), a Borriana es va detectar en tots els mostrejos en concentracions més altes ($> 1 \mu\text{g L}^{-1}$) i finalment a l'Alcora només es troba en un mostreig en concentració de 26 ng L^{-1} .

Taula 2.6. Concentracions mitjanes (ng L⁻¹) mensuals de fàrmacs en l'EDAR de **Castelló de la Plana**.

	Maig-I	Maig-E	Juliol-I	Juliol-E	Setembre-I	Setembre-E
Acetaminofèn	32128	-	15347	-	106802	786
Alprazolam	-	d	d	d	d	d
Atorvastatina	208	35	474	74	385	61
Carbamazepina	d	35	66	63	80	126
Ciprofloxacina	1084	426	480	181	1211	515
Claritromicina	82	d	422	100	465	54
Clindamicina	-	d	51	43	-	80
Diclofenac	511	403	1318	742	1534	1365
Enalapril	210	-	463	-	385	-
Eritromicina	d	39	454	299	194	170
Flumequina	-	-	-	-	-	-
Furaltadona	-	-	-	-	-	-
Gabapentina	7491	100	20126	685	14633	1079
Iopromida	-	-	279	223	285	606
Irbesartan	471	447	1080	795	1017	888
Levamisole	d	20	-	58	91	78
Lincomicina	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	-	-	43	94	143	92
Losartan	240	168	663	406	697	383
Metronidazole	-	d	-	86	-	96
Metoprolol	d	d	122	67	353	175
Àcid nalidíxic	d	d	-	-	d	d
Norfloxacina	d	d	190	58	454	139
Àcid oxolínic	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	-	d	-	19	30	20
Fenazona	d	463	84	254	221	1449
Primidona	d	26	82	79	143	119
Roxitromicina	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	d	d	33	13	45	28
Sulfadiazina	-	-	-	-	-	-
Sulfametoxazole	345	51	768	483	1137	278
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-
Tramadol	540	373	3403	2352	3655	2527
Trimetoprim	89	29	203	121	443	93
Valsartan	4066	1838	18768	3498	13425	4680
Venlafaxina	213	144	1807	1087	3113	1350
OD Venlafaxina	782	528	847	1292	2775	2019

d: detectat, no quantificat, concentració inferior al valor límit per a la quantificació.

Taula 2.7. Concentracions mitjanes (ng L⁻¹) mensuals de fàrmacs en l'EDAR de **Borriana**.

	Maig-I	Maig-E	Juliol-I	Juliol-E	Setembre-I	Setembre-E
Acetaminofèn	17197	-	6857	-	24607	-
Alprazolam	-	d	d	d	-	d
Atorvastatina	185	106	193	156	226	127
Carbamazepina	d	23	73	74	89	106
Ciprofloxacina	1139	758	528	320	757	747
Claritromicina	51	d	341	157	600	225
Clindamicina	-	d	50	34	-	36
Diclofenac	412	293	454	502	498	438
Enalapril	134	-	139	-	173	-
Eritromicina	d	20	257	271	-	59
Flumequina	-	-	-	-	-	-
Furaltadona	-	-	-	-	-	-
Gabapentina	4417	675	7434	1901	6583	2347
Iopromida	836	548	2328	1465	4185	4016
Irbesartan	335	296	364	345	386	372
Levamisole	d	55	-	42	80	48
Lincomicina	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	-	-	-	-	63	45
Losartan	226	192	290	313	331	326
Metronidazole	-	d	-	45	-	143
Metoprolol	d	d	59	37	316	138
Àcid nalidíxic	d	d	-	-	d	d
Norfloxacina	d	d	116	71	199	124
Àcid oxolínic	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	-	d	-	d	34	21
Fenazona	d	310	55	106	183	835
Primidona	d	46	25	60	76	91
Roxitromicina	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	d	d	d	d	d	d
Sulfadiazina	-	-	-	-	-	-
Sulfametoxazole	146	23	208	233	400	44
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-
Tramadol	563	471	1413	1504	2031	1943
Trimetoprim	52	38	106	91	199	162
Valsartan	2215	1949	4745	3555	4578	3850
Venlafaxina	125	130	396	432	703	489
OD Venlafaxina	469	497	287	1054	1072	1141

d: detectat, no quantificat, concentració inferior al valor límit per a la quantificació.

Taula 2.8. Concentracions mitjanes (ng L⁻¹) mensuals de fàrmacs en l'EDAR de l'Alcora.

	Maig-I	Maig-E	Juliol-I	Juliol-E	Setembre-I	Setembre-E
Acetaminofèn	107732	-	181311	-	109122	-
Alprazolam	-	d	25	21	d	d
Atorvastatina	441	-	857	21	867	d
Carbamazepina	d	30	69	84	123	157
Ciprofloxacina	1137	207	1743	155	1408	143
Claritromicina	d	d	158	67	200	41
Clindamicina	123	d	-	45	-	64
Diclofenac	317	690	2504	2125	2533	2212
Enalapril	187	-	487	-	555	-
Eritromicina	-	30	350	126	28	73
Flumequina	-	-	-	-	-	-
Furaltadona	-	-	-	-	-	-
Gabapentina	9195	228	33988	1076	56131	280
Iopromida	-	-	-	-	26	-
Irbesartan	592	516	1274	960	1711	1051
Levamisole	237	45	395	225	128	226
Lincomicina	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	-	d	58	110	146	122
Losartan	299	104	771	186	1029	205
Metronidazole	-	-	-	35	-	-
Metoprolol	d	d	-	-	320	133
Àcid nalidíxic	d	d	-	-	d	d
Norfloxacina	169	d	362	91	379	112
Àcid oxolínic	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	d	26	32	47	32	32
Fenazona	d	405	65	2300	217	5366
Primidona	179	94	250	255	247	331
Roxitromicina	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	-	d	30	17	53	31
Sulfadiazina	-	-	-	-	-	-
Sulfametoxazole	1379	162	1507	490	1058	297
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-
Tramadol	754	484	3325	2961	3131	3527
Trimetoprim	720	94	557	119	505	174
Valsartan	9006	986	44363	1753	31169	3729
Venlafaxina	463	91	3401	528	1689	814
OD Venlafaxina	1086	669	990	1719	3401	2255

d: detectat, no quantificat, concentració inferior al valor límit per a la quantificació.

2.3. Variació estacional de fàrmacs en les EDARS

La variació estacional dels fàrmacs en les tres EDARS objecte d'estudi s'ha dut a terme seleccionant la concentració total de cinc famílies terapèutiques: antibiòtics, antiepilèptics, antihipertensius, analgèsics i antidepressius. Les **Figures 2.1, 2.2 i 2.3** mostren els resultats obtinguts en l'EDAR de Castelló de la Plana, Borriana i l'Alcora, respectivament.

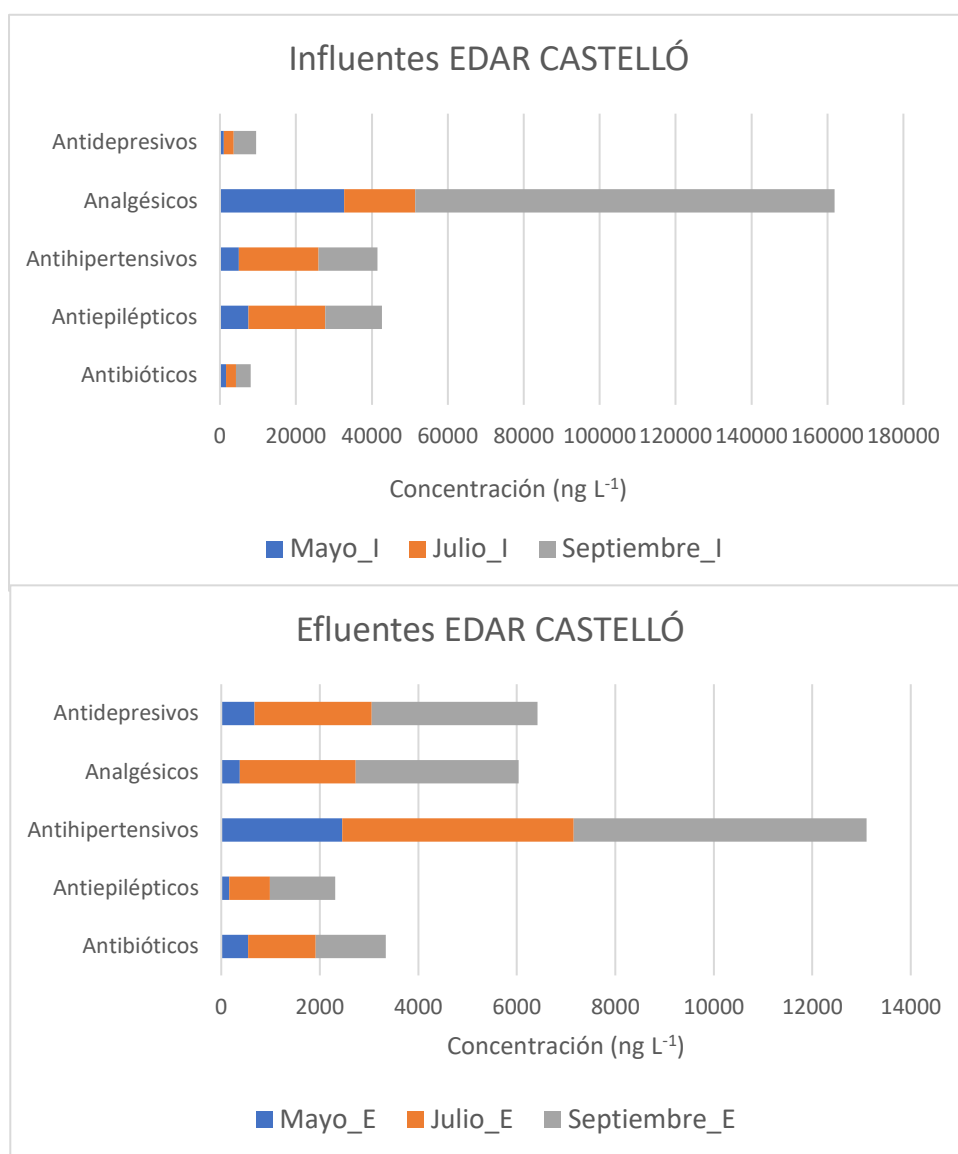


Figura 2.1. Concentracions totals per famílies terapèutiques trobades en aigües d'eixida i d'entrada de l'EDAR de Castelló de la Plana en cadascun dels tres mostrejos.

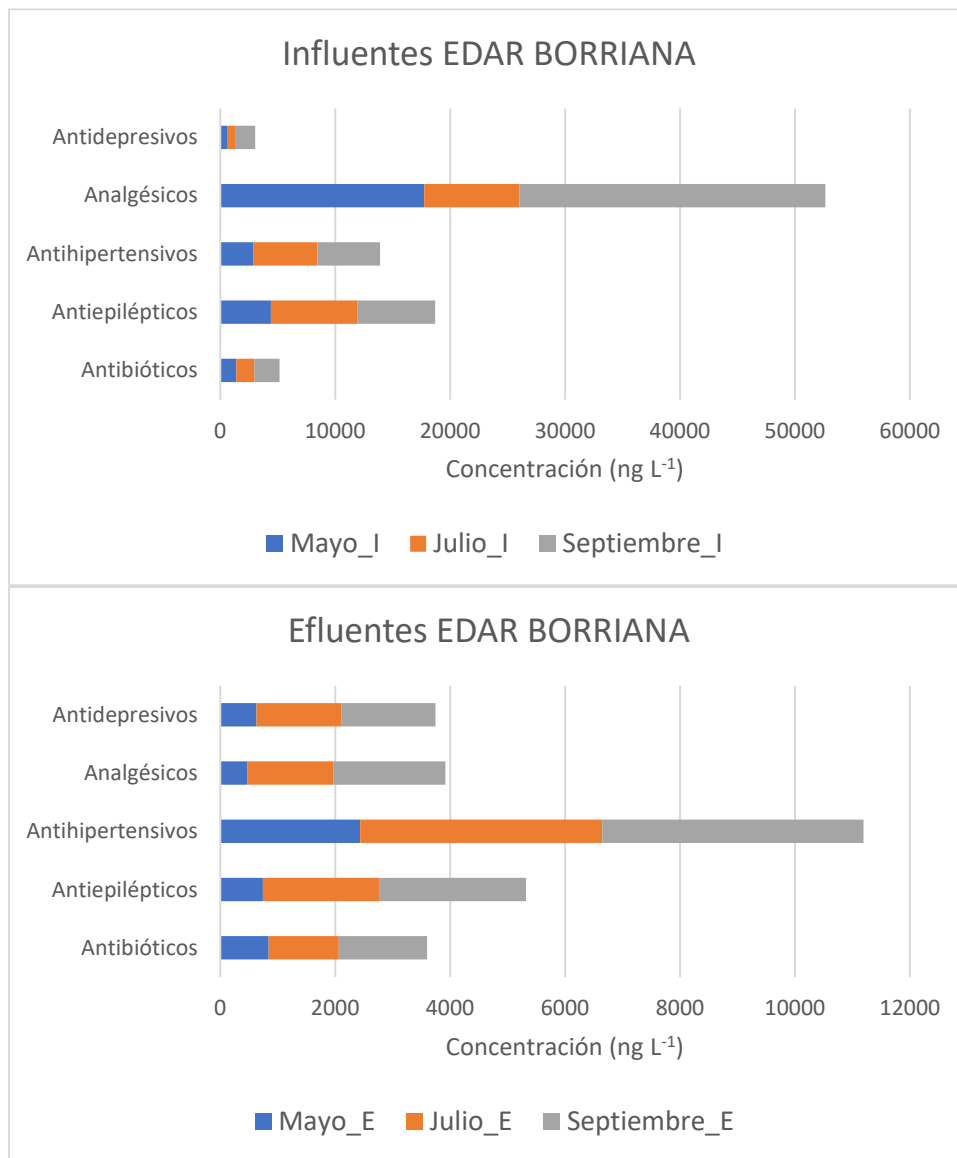


Figura 2.2. Concentracions totals per famílies terapèutiques trobades en aigües d'eixida i d'entrada de l'EDAR de Borriana en cadascun dels tres mostrejos.

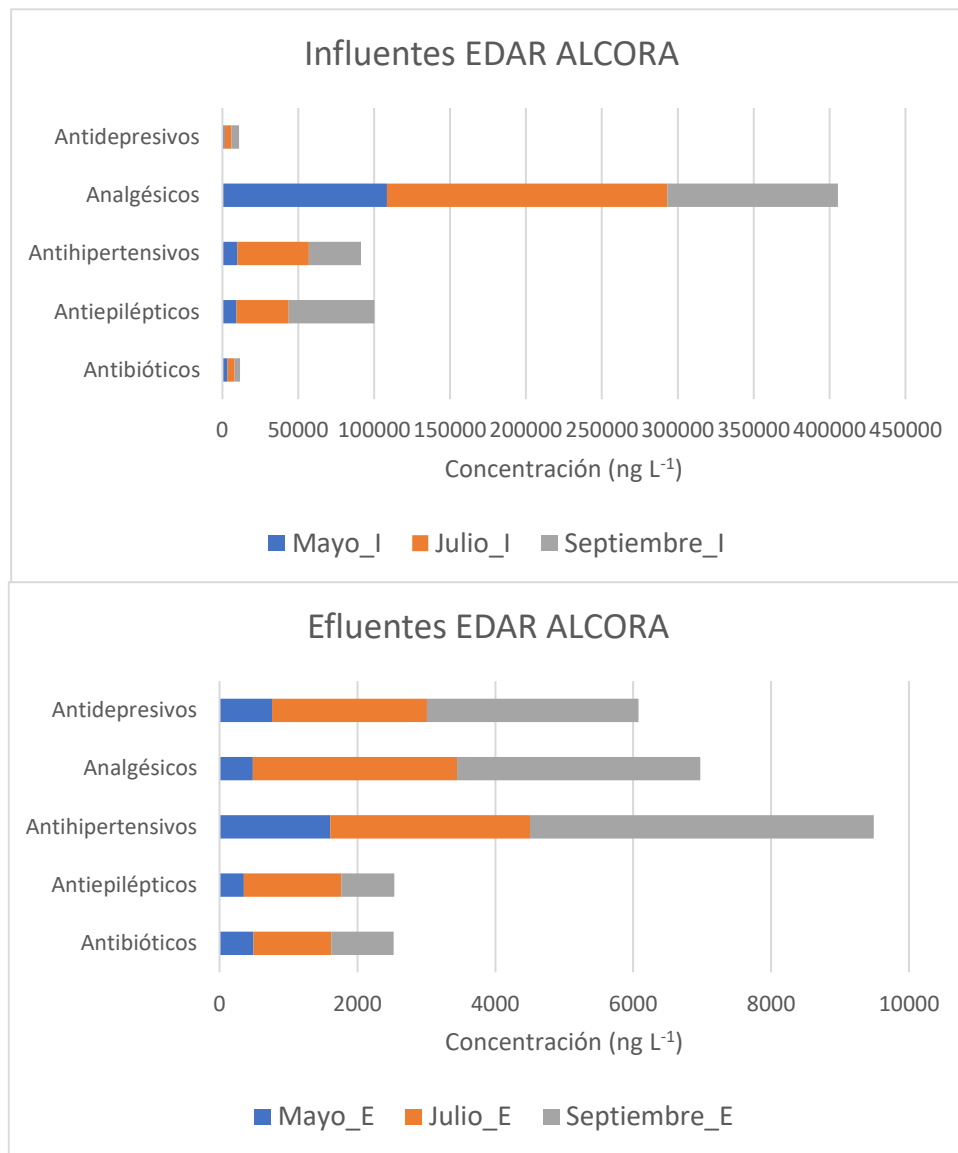


Figura 2.3. Concentracions totals per famílies terapèutiques trobades en aigües d'eixida i d'entrada de l'EDAR de l'Alcora en cadascun dels tres mostrejos.

Encara que resulta complicat establir unes tendències clares de l'ús de fàrmacs en el temps, comparant les concentracions totals en les aigües d'entrada de les tres EDARS es pot arribar a establir algunes similituds i diferències. Les EDARS de Castelló de la Plana i Borriana segueixen un perfil semblant on les concentracions d'antidepressius, analgèsics i antibiòtics són clarament més altes en les aigües d'influent durant el mostreig de setembre, i les concentracions d'antihipertensius i antiepilèptics són més altes durant l'estiu (juliol). No obstant això, a l'Alcora el comportament és un altre, ja que els antidepressius i antiepilèptics es troben en major concentració en les aigües d'entrada del mes de setembre, i la resta sembla que el seu ús

augmenta a l'estiu. En totes les EDARS, el mostreig dut a terme durant la primavera (maig) ha determinat les menors concentracions de les cinc famílies, a excepció dels analgèsics.

Comparant les aigües d'eixida, s'observa que en general les concentracions de les famílies dels fàrmacs són majors durant el mes de setembre, a excepció dels antibiòtics i antiepilèptics en l'EDAR de l'Alcora la determinació de la qual és major durant l'estiu.

2.4. Eficàcia d'eliminació de fàrmacs en les EDARS

L'eficiència d'eliminació dels fàrmacs seleccionats s'ha estimat comparant les càrregues totals diàries dels compostos en les aigües d'entrada i d'eixida (Bijlsma et al., 2021), fent ús dels cabals ($m^3/24\text{ h}$) dels corrents corresponents (vegeu **Taula 2.1**).

Les càrregues diàries de fàrmacs s'han calculat a partir de les concentracions trobades en les aigües, de la manera següent:

$$q = C \times F \times 1000$$

q: càrrega diària del fàrmac ($g/24\text{ h}$) en la mostra d'influent o d'efluent

C: concentració del fàrmac ($g\ L^{-1}$) en la mostra d'influent o d'efluent

F: cabal ($m^3/24\text{ h}$) d'entrada o d'eixida de l'EDAR

El percentatge d'eliminació s'ha calculat a partir de l'expressió següent:

$$E (\%) = \frac{q_I - q_E}{q_I} \times 100$$

E: percentatge d'eliminació (%)

q_I : càrrega diària del fàrmac ($g/24\text{ h}$) en la mostra d'influent del dia x

q_E : càrrega diària del fàrmac ($g/24\text{ h}$) en la mostra d'efluent del dia x+1

La **Taula 2.9** mostra l'eficiència d'eliminació (%) estimada per als fàrmacs detectats en les tres EDARS estudiades. Per a l'estimació de l'eficiència s'ha comparat les aigües de l'efluent del dia després amb les aigües de l'influent del dia anterior, assumint d'aquesta manera un temps de residència dels fàrmacs de 24 hores en la planta.

Pantoprazole	<0	0	36	0*	<0	0	27	0*	<0	-54	-7	0*
Fenazona	-1500	-176	-528	<0	-600	-104	-427	<0	-500	-3660	-2488	<0
Primidona	36	-9	19	0*	-90	-136	-39	<0	0	-17	-69	0*
Roxitromicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	-	57	39	48	-	44	39	35	-	41	36	39
Sulfadiazina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfametoxazole	83	30 ^a	76	79	83	-10 ^a	83	83	84	67	65	72
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tramadol	30	21	32	28	15	-6	-21	0*	30	5	-19	0*
Trimetoprim	74	32	80	62	2	16	2	6	68	77	60	68
Valsartan	87	79	66	77	28	21	-10 ^a	25	52	96	88	78
Venlafaxina	81	32	56	56	16	-7 ^a	18	17	31	78	50	53
OD Venlafaxina	38	-54	29	0*	-11	-263	-31	<0	30	-93	31	0*

*S'ha considerat eficiència nul·la d'eliminació perquè les dades són altament variables, però amb tendència a la no eliminació

^a Valor no considerat en la mitjana pel fet de ser anòmal a la resta

S'observa que 4 dels 30 fàrmacs que es van trobar en les aigües es van eliminar en major o menor mesura en l'EDAR per damunt del 70 % (acetaminofèn, enalapril, gabapentina i sulfametoxazole) en les tres EDARS. Val a destacar que uns altres cinc compostos (atorvastatina, ciprofloxacina, claritromicina, norfloxacina i valsartan) van ser eliminats gairebé totalment ($\geq 70\%$) en les EDARS de Castelló i l'Alcora, però no obstant això l'eliminació va ser inferior en l'EDAR de Borriana. Cinc fàrmacs van mostrar, en general, eficiències d'eliminació parcials amb valors inferiors al 60 % (metoprolol, àcid nalixídric, salbutamol, trimetoprim i venlafaxina). També hi ha un gran nombre de fàrmacs que van mostrar eficiència d'eliminació altament variable durant els diferents mostrejos realitzats, i fins i tot també entre les tres EDARS estudiades, encara que amb tendència a la no eliminació (alprazolam, clindamicina, diclofenac, eritromicina, iopromida, levamisole, lorazepam, pantoprazole, tramadol i OD venlafaxina). Finalment, s'han obtingut eficiències negatives per a alguns compostos en alguns mostrejos de les tres EDARS, pel fet de presentar nivells de concentració en l'aigua d'eixida superiors que els de l'aigua d'entrada. Convé destacar l'antiinflamatori fenazona, que ha sigut el compost amb eficiència negativa en totes les estacions i en les tres EDARS. Aquest fet d'eliminació negativa pot semblar sorprenent però ha sigut recollit en la literatura científica (Botero-Coy et al., 2018; Bijlsma et al., 2021). La baixa eficiència de la planta per a l'eliminació d'aquests compostos unida al possible alliberament de conjugats (generalment glucorònids i sulfats) durant el pas de l'aigua per la planta podrien ser possibles causes d'aquest augment de concentració.

La **Figura 2.4** mostra gràficament les eficiències d'eliminació mitjana per als fàrmacs en les tres EDARS estudiades. S'ha considerat una eficiència de 0 % quan el valor de l'eliminació ha sigut <0 . Com ja s'ha indicat anteriorment, 12 dels 30 compostos detectats (atorvastatina, ciprofloxacina, claritromicina, gabapentina, irbesartan, losartan, metoprolol, norfloxacina, salbutamol, trimetoprim, valsartan i venlafaxina) van mostrar una eficiència d'eliminació inferior en l'EDAR de Borriana, comparada amb la de Castelló i la de l'Alcora. Contràriament, l'antibiòtic sulfametoxazole va presentar una major eliminació en l'EDAR de Borriana. Aquests fets poden indicar que, encara que en les tres EDARS s'apliquen tractaments convencionals, l'eliminació no sempre és eficient.

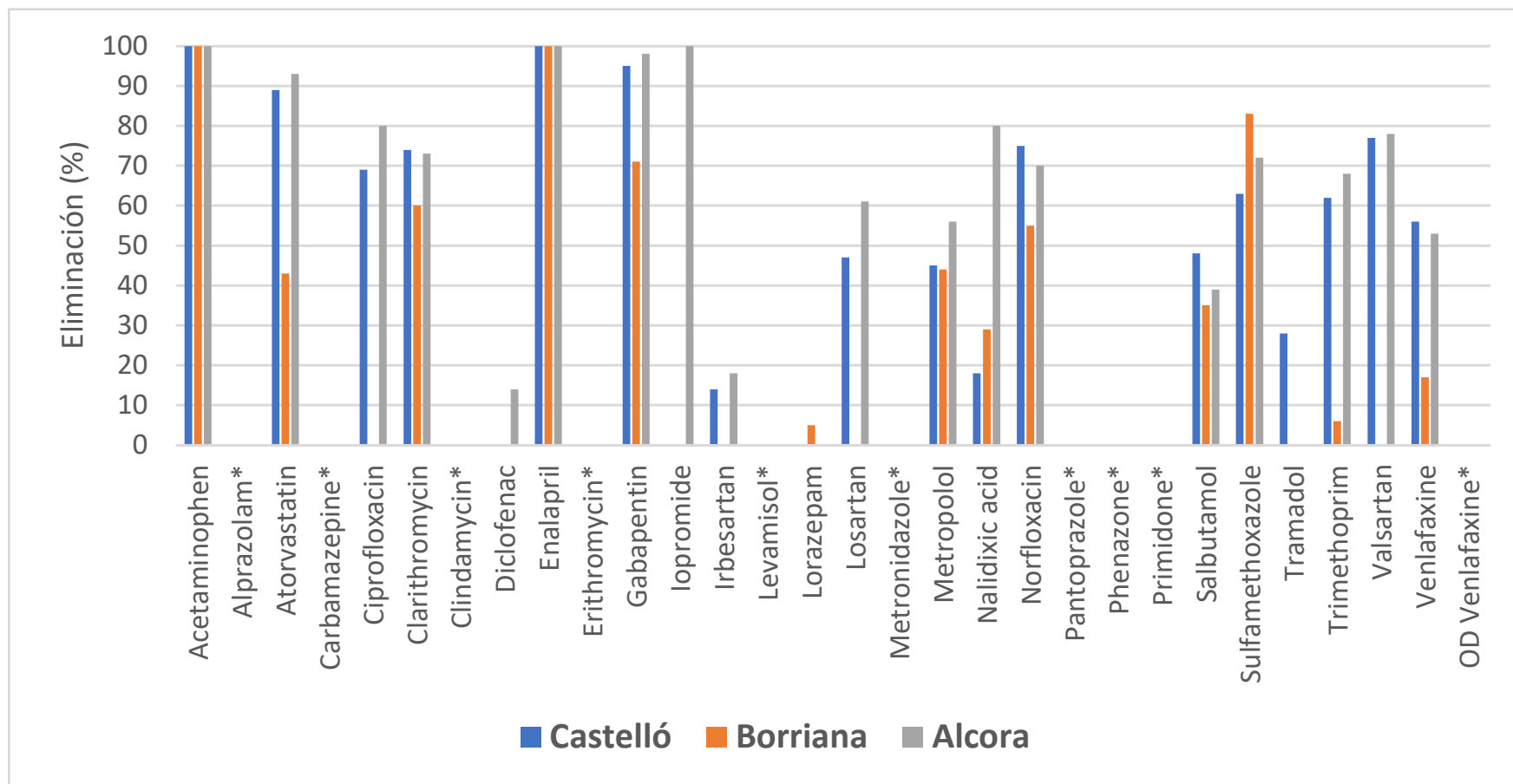


Figura 2.4. Eficiència d'eliminació mitjana (%) dels fàrmacs detectats en les aigües residuals de les tres EDARS (compost amb eficiència d'eliminació 0 % en les tres EDARS)

3. ESTUDI DE DEGRADACIÓ DELS FÀRMACS EN LES AIGÜES RESIDUALS D'EIXIDA DESPRÉS DE L'APLICACIÓ DE TRACTAMENTS AVANÇATS

Aquesta part del projecte es va portar a terme conjuntament amb l'Institut de Tecnologia Química (ITQ) de la Universitat Politècnica de València (UPV), en què l'ITQ va desenvolupar i va aplicar els tractaments terciaris i el IUPA va portar a terme les anàlisis de les aigües.

3.1. Aplicació d'ozonització catalítica en aigua fortificada

L'aplicació de tractaments avançats es va dur a terme, en una primera fase, per a estudiar l'eliminació de l'antiinflamatori ibuprofèn. La selecció d'aquest fàrmac es va fer sobre la base de l'experiència prèvia de l'ITQ i al fet que és un compost que no s'elimina en els tractaments convencionals de l'EDAR.

Es van fer dos assajos, un amb aigua Milli-Q fortificada amb ibuprofèn a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ i un altre amb aigua d'eixida de l'EDAR de Castelló fortificada amb ibuprofèn a $500 \mu\text{g L}^{-1}$. En tots dos casos, es van aplicar tractaments terciaris utilitzant el reactor de columna que es troba en les instal·lacions de l'ITQ utilitzant tant l'ozonització simple (O_3) com l'ozonització catalítica usant òxid de manganès com a centre actiu (MnO_2) suportat en diferents tipus de zeolites comercials (zeolita I) amb relacions molars $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$: 60 i 12 (H-CBV760 i NH_4 -CBV712, abreujades en aquest informe com ZY60 i ZY12). Les condicions experimentals van ser: cabal gas = 2.0 L/min; concentració ozó d'entrada = 6.1 g/Nm^3 ; pH natural = 6.5; temperatura ambient $23 \text{ }^\circ\text{C}$.

Més detall sobre la síntesi dels catalitzadors i la configuració experimental s'inclou en l'**Annex 1**.

La **Taula 3.1** mostra els diferents tractaments avançats aplicats per a l'eliminació d'ibuprofèn usant diferents temps de reacció.

Taula 3.1. Tractaments avançats aplicats

Tractament	Temps (min)		
O_3	10	30	60
$\text{O}_3/\text{ZY60}$	10	30	60
$\text{O}_3/\text{ZY12}$	10	30	60

El primer assaig va consistir a analitzar la mostra d'aigua Milli-Q fortificada abans i després del tractament per a dur a terme un seguiment quantitatiu de l'eliminació d'ibuprofèn mitjançant LC-MS/MS. La **Figura 3.1** mostra els resultats obtinguts per a aquest assaig.

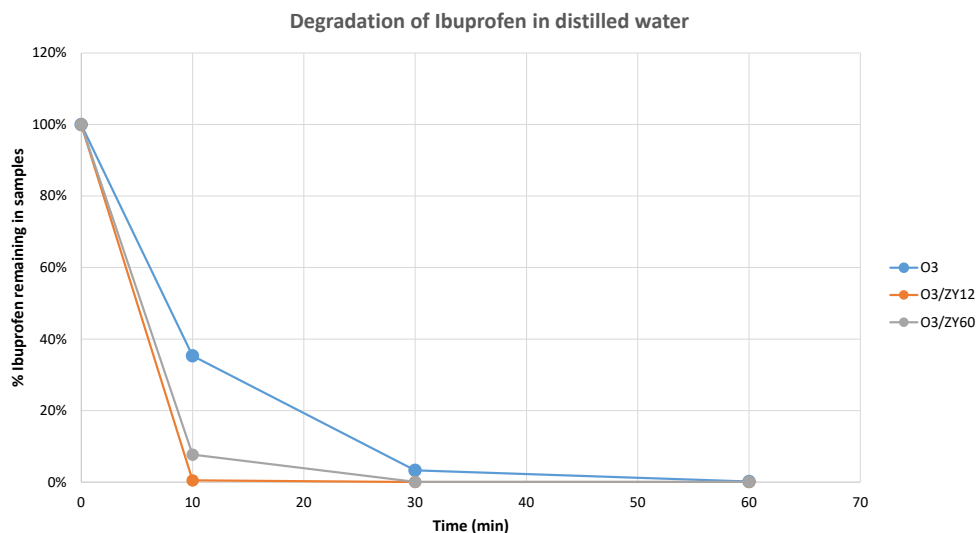


Figura 3.1. Evolució de l'eliminació d'ibuprofèn en aigua Milli-Q fortificada a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ utilitzant tres tractaments terciaris.

En la figura s'observa que pràcticament en passar 30 min, l'eliminació d'ibuprofèn és gairebé completa utilitzant els tres tractaments aplicats. Al cap de 10 min és on s'observen majors diferències, ja que l'eliminació d'ibuprofèn en l'ozonització simple és molt de menor que utilitzant tractaments d'ozonització catalítica. Aquest fet es pot atribuir al fet que la molècula d'ibuprofèn no té grups funcionals que reaccionen amb l'ozó. Així mateix, estudis previs mostren que la constant de segon ordre per a la reacció d'ibuprofèn amb ozó és 9.1 Ms^{-1} i amb radical hidroxil és $7.4 \times 10^9 \text{ Ms}^{-1}$ en un efluent d'una planta de tractament d'aigües residuals (Nakada et al., 2007). L'addició de zeolita en l'ozonització va accelerar la velocitat de degradació de l'ibuprofèn, que arriba a eliminar gairebé el 100 % amb $\text{O}_3/\text{ZY12}$ i el 92 % amb $\text{O}_3/\text{ZY60}$.

En general, les zeolites Y es consideren un adsorbent polar que pot adsorbir fàcilment molècules polars. La molècula d'ozó, que pot reaccionar com un dipol i un agent nucleòfil, és molt inestable en l'aigua i quan s'acosta a la zeolita I, pot adsorbir-se preferentment sobre l'estructura de la zeolita i dissociar-se posteriorment (Qi et al., 2015). Per tant, es pot dir que la zeolita Y és avantatjosa per a l'adsorció i la descomposició de l'ozó. Una possible explicació de la major mineralització de totes dues zeolites en solució aquosa en comparació amb ozonització simple

o no catalítica també pot ser l'efecte de les zeolites en la generació del radical OH i la seua capacitat de reaccionar directament amb l'ozó (Staehelin and Hoigne, 1985).

El segon assaig va consistir a analitzar la mostra d'aigua residual d'eixida fortificada abans i després del tractament per a fer un seguiment quantitatiu de l'eliminació d'ibuprofèn mitjançant LC-MS/MS. La **Figura 3.2** mostra els resultats obtinguts en aquest assaig.

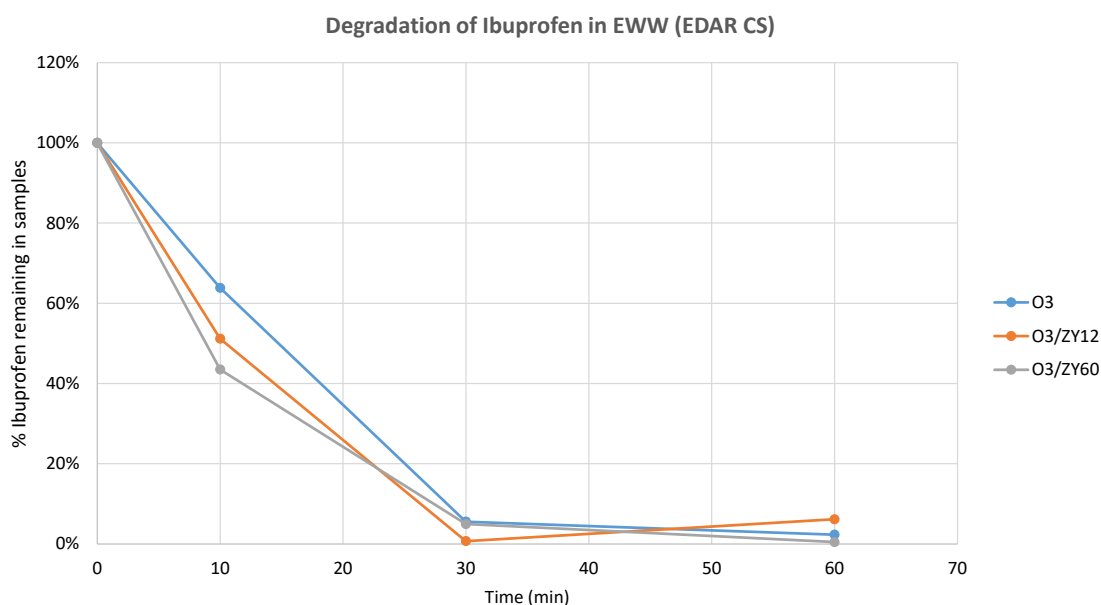


Figura 3.2. Evolució de l'eliminació d'ibuprofèn en aigua residual de sortida de l'EDAR de Castelló a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ utilitzant tres tractaments terciaris.

Els resultats obtinguts van mostrar, de nou, pràcticament al cap de 30 min, que l'eliminació d'ibuprofèn va ser gairebé completa amb qualsevol dels tres tractaments utilitzats. No obstant això, al cap de 10 min, cap tractament va aconseguir una eliminació d'ibuprofèn més gran del 60 % (36 % amb O_3 , 49 % amb $\text{O}_3/\text{ZY12}$ i 56 % amb $\text{O}_3/\text{ZY60}$), a diferència dels resultats obtinguts amb aigua Milli-Q, en què l'eliminació amb ozonització catalítica era gairebé completa. Aquest fet possiblement es deu a la major complexitat de la matriu i a la presència de matèria orgànica que disminueix la capacitat d'adsorció de l'ozó i dels catalitzadors.

3.2. Seguiment quantitatiu de l'eliminació de fàrmacs en aigua residual

En una segona fase, i per a entendre l'aplicabilitat dels sistemes seleccionats $\text{O}_3/\text{ZY12}$ i $\text{O}_3/\text{ZY60}$, l'aplicació de tractaments avançats es va portar a terme en un tercer assaig utilitzant directament l'aigua residual d'eixida de l'EDAR de Castelló. L'objectiu va ser fer un seguiment quantitatiu dels 38 fàrmacs seleccionats en la secció 2 després de l'aplicació de tractaments com l'ozonització simple i l'ozonització catalítica a diferents temps de reacció (vegeu **Taula 3.1**).

L'assaig va consistir a analitzar la mostra d'aigua EWW abans i després del tractament per a dur a terme un seguiment quantitatiu mitjançant LC-MS/MS de l'eliminació dels fàrmacs seleccionats. Els resultats van mostrar que per a 17 dels 25 fàrmacs quantificats en l'aigua residual (atorvastatina, carbamazepina, ciprofloxacina, claritromicina, clindamicina, diclofenac, enalapril, eritromicina, levamisole, losartan, metropolol, fenazona, tetraciclina, tramadol, trimetoprim, venlafaxina i OD venlafaxina), l'ozonització sense catalitzadors era capaç d'eliminar completament el contaminant fins i tot al temps més baix de reacció de 10 min. Vuit fàrmacs van mostrar un comportament diferent, ja que al cap de 10 min dels tractaments aplicats encara hi havia fàrmac en l'aigua residual. La **Figura 3.3** mostra l'evolució de l'eliminació dels vuit fàrmacs després d'aplicar els diferents tractaments d'ozonització.

Entre els vuit fàrmacs, s'observen quatre comportaments diferents:

- Gabapentina, irbesartan, sulfametoxazole i valsartan van mostrar una eliminació completa al cap de 30 min tant amb ozonització simple com amb ozonització catalítica. En general, cal destacar que al cap de 10 min l'ozonització catalítica va ser més eficaç, especialment amb zeolita ZY12.
- Lorazepam i metronidazole van ser eliminats completament al cap de 10 min amb ozonització catalítica (indistintament amb ZY12 o ZY60), mentre que amb ozonització simple van ser necessaris 30 min per a l'eliminació al 100 %.
- Norfloxacin també va ser eliminat completament al cap de 10 min amb ozonització catalítica, no obstant això, l'ozonització simple no va aconseguir eliminar més del 70 % ni fins i tot amb 60 min.
- Primidona va mostrar un comportament similar amb els tres tractaments, i va necessitar 60 min per a l'eliminació completa tant amb ozonització simple com amb ozonització completa.

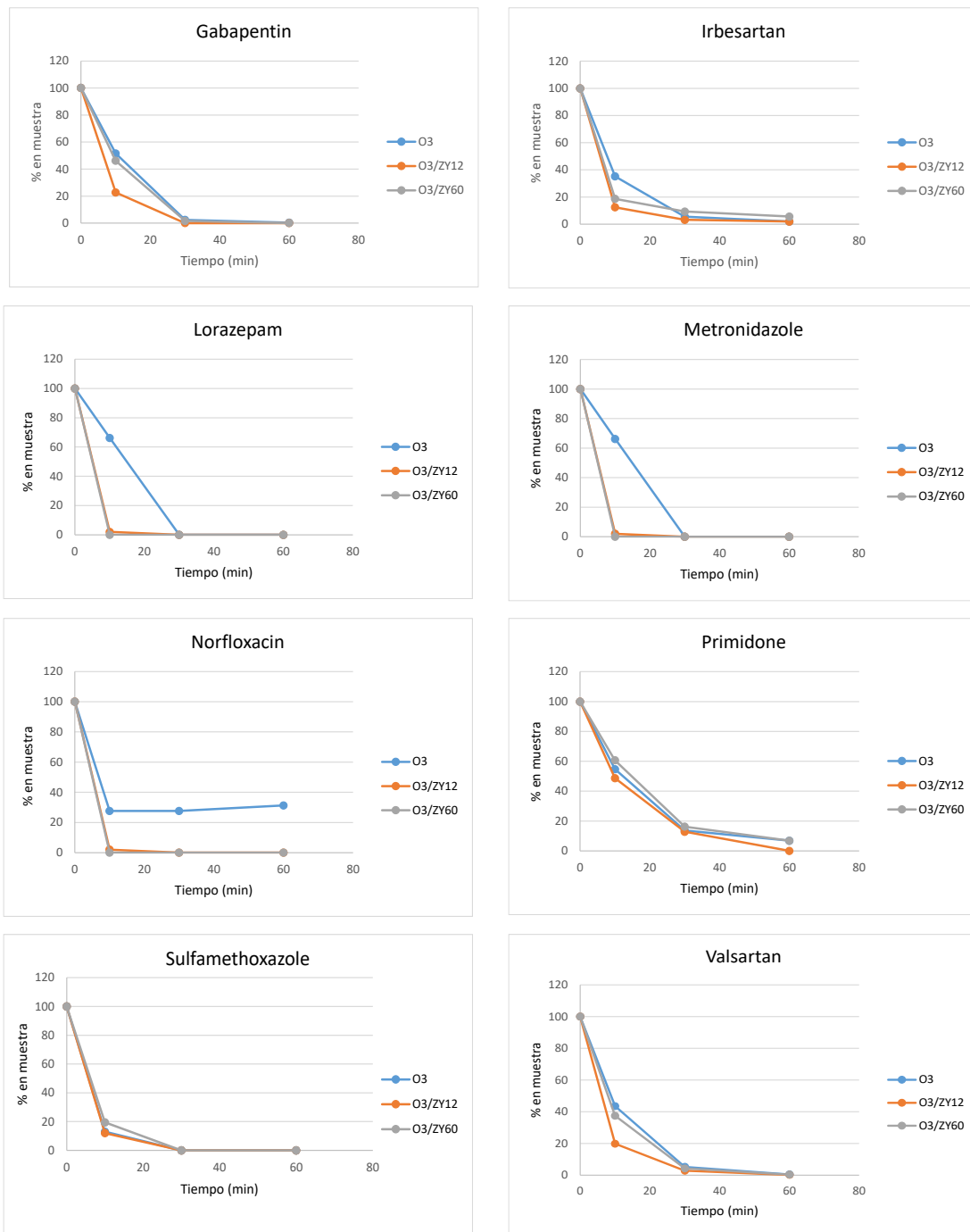


Figura 3.3. Evolució de l'eliminació de fàrmacs en aigua residual d'eixida de l'EDAR de Castelló emprant tres tractaments terciaris.

4. ESTUDI DE LES RESISTÈNCIES A ANTIBIÒTICS EN LES AIGÜES RESIDUALS

Aquesta part del projecte es va portar a terme en col·laboració amb la Unitat Predepartamental de Medicina de l'UJI.

4.1. Detecció i quantificació dels GRA mitjançant PCR quantitativa

L'estudi dels gens de resistència a antibiòtics (GRA) s'ha dut a terme en mostres residuals de l'EDAR de Castelló, emmagatzemades i congelades (-18 °C) en les instal·lacions del IUPA. Concretament, es corresponen a 16 mostres d'influent (d'entrada) recollides durant els mesos maig-octubre 2021 i gener 2022.

Per a avaluar la presència dels GRA i quantificar-los en les mostres estudiades, en primer lloc, es va dur a terme l'extracció i quantificació d'ADN total/mostra segons la metodologia explicada en l'**Annex 1**. A continuació, es va estudiar la presència de cada gen mitjançant l'ús de la PCR quantitativa (qPCR) (vegeu **Annex 1**). Els gens que es van analitzar van ser els següents:

- qnrS (família de proteïnes, que protegeix a l'ADN girasa de la inhibició de les quinolones)
- erm (gen que codifica la 23S RNA metilasa, associada a l'eritromicina)
- sul1 (dihidropteroat sintasa resistent a les sulfonamides)
- blaCTX -M-32 (β -lactamasa de classe A, cefalosporinasa),
- tet (W) (proteïna de protecció ribosòmica que protegeix el ribosoma de la inhibició de la traducció de la tetraciclina),
- int1 (integrasa de classe I, aquest gen està associat amb la transferència horitzontal de gens i la contaminació ambiental)
- 16S rRNA, que és un indicador de l'abundància microbiana total

A continuació, es van calcular les còpies gèniques de cada gen estudiat, sobre la base de les dades de les corbes de calibrat d'aquests, i es van relacionar els valors de Ct (valor llindar) amb els valors de còpies gèniques. En la **Figura 4.1** es mostra un exemple dels càlculs per al gen int1, gen que codifica per a la integrasa de classe I que està associat amb la transferència horitzontal de gens i la contaminació ambiental. Posteriorment, es fan els càlculs pertinents per a obtenir els valors de còpies gèniques/dia (vegeu metodologia en **Annex 1**).

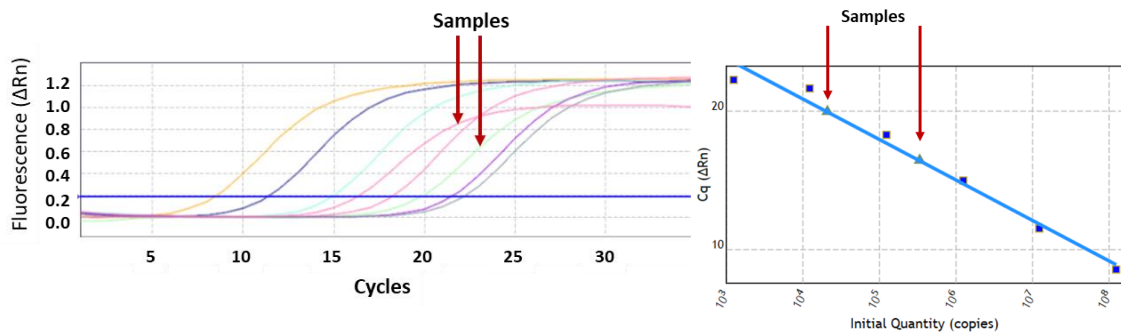


Figura 4.1. Gràfic d'amplificació en què es mostra la fluorescència i els cicles per als punts de la corba patró del gen *intl 1*, així com dues mostres d'aigües a estudiar. També es mostra el gràfic, en què s'extrapolen les còpies gèniques enfront del valor de fluorescència, tant per als punts de la corba patró del gen *intl 1*, com per a aquest gen en dues mostres d'aigües a estudiar.

La **Figura 4.2** mostra els resultats de les còpies gèniques de cada gen/dia per a les 16 mostres d'aigua residual analitzades. Tal com s'ha comentat anteriorment, entre els gens estudiats s'inclou el gen ribosomal 16S RNA, que ens permet mesurar l'abundància bacteriana present en la mostra. En la **Figura 4.3** es mostren els valors de les còpies gèniques/dia per a aquest gen, la qual cosa ens permet confirmar que tant el procés d'extracció d'ADN i quantificació del gen per qPCR ha sigut apropiat. Tenint això en consideració, i a la vista dels resultats, podem concloure que totes les mostres d'aigües residuals analitzades contenen gens que confereixen resistència a tots els gens estudiats. De tots aquests, se n'observa una major proporció per al gen de resistència *ermB* (antibiòtics macròlids), seguit dels genera *sul1* (sulfonamides), *tet (W)* (tetraciclina) i *intl1* (transferència horitzontal de gens i la contaminació ambiental), que mostren un patró similar. Finalment, trobaríem el gen *qnrS* (quinolones) i, finalment, *blaCTX -M-32* (cefalosporinasa).

Quan es compara cada gen de resistència en relació amb el gen 16sRNA, que ens indica l'abundància bacteriana, s'observen els resultats de la **Figura 4.3**. En general, s'observa que la major abundància relativa correspon als macròlids (*ermB*), seguits en menor mesura de les sulfonamides (*sul1*), tetraciclins (*tetW*), quinolones (*qnrS*) i cefalosporines (β -lactàmics) (*blaCTX*).

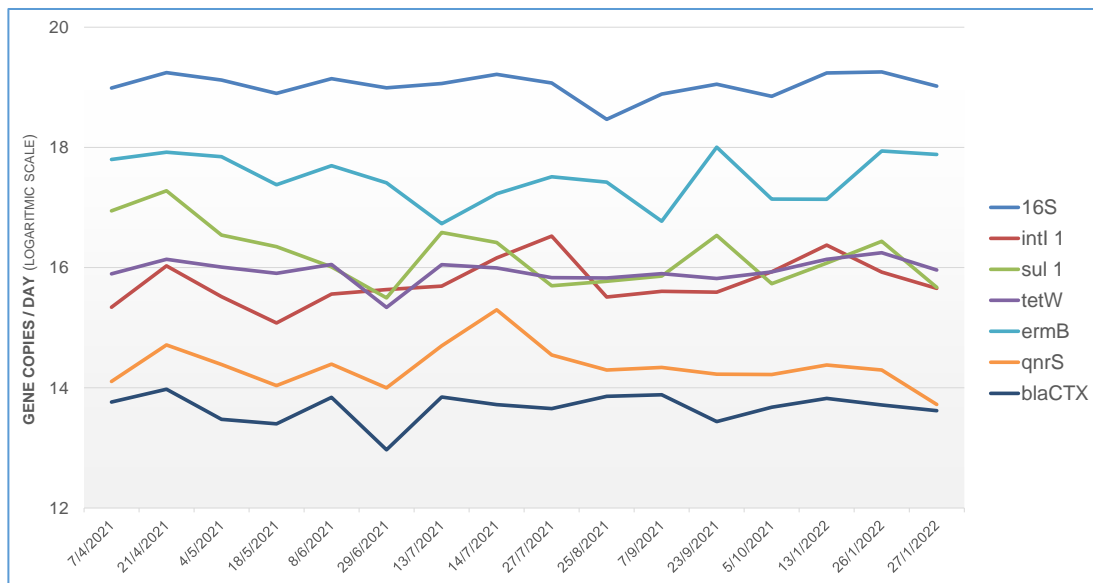


Figura 4.2. Càrrega de gens de resistència i del gen 16SrRNA còpies per dia en aigües residuals de Castelló.

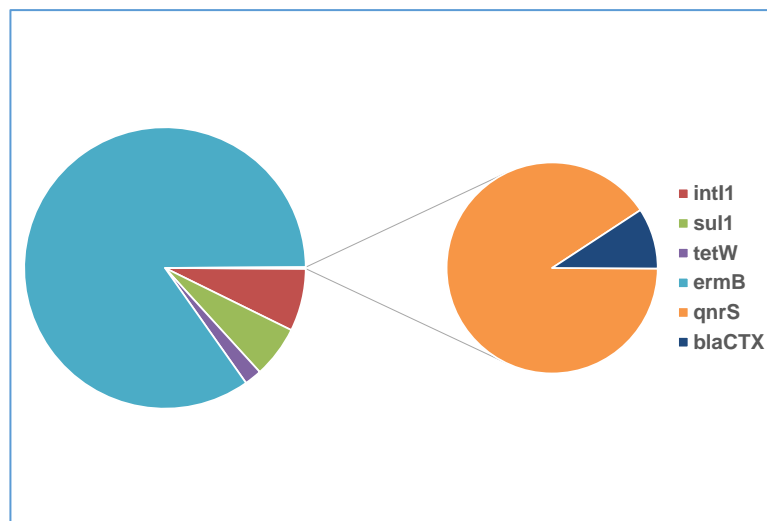


Figura 4.3. Còpies gèniques relatives per a cada gen de resistència relatiu al gen 16S rRNA que indica abundància bacteriana.

4.2. Caracterització microbiana de les aigües residuals

Cultiu de bacteris viables a partir de mostres d'aigües fresques

De les mostres d'aigua residual recollides per a fer el seguiment dels nivells de concentració de fàrmacs (**secció 2.1, Taula 2.1**), se'n va seleccionar una mostra d'influent i una d'efluent en cadascuna de les tres EDARS. En concret, van ser les mostres de setembre (CS-I-018, CS-E-019, BU-I-018, BU-E-019, AL-I-018 i AL-E-019), les quals es van processar a les 24 hores de la recollida (mostres fresques), tal com s'indica en l'apartat de metodologia de l'**Annex 1** per a avaluar la presència de coliformes i enterococs totals, així com la població de tots dos grups bacterians, resistents a tetraciclina i ciprofloxacina.

Els resultats de les mostres corresponents a l'EDAR de Castelló es mostren en la **Figura 4.4** com la mitjana i desviació típica dels logaritmes en base 10 de les unitats formadores de colònies (UFC) per mil·lilitre (UFC/ml). En el cas dels coliformes fecals, tant la població total, representada per la barra de control +, com les poblacions de coliformes fecals resistents a tetraciclina i ciprofloxacina, es detecten tant en les aigües d'influent i efluent, sent-ne menors en la mostra d'efluent. En tots dos tipus de mostres d'aigua s'observa una menor població de coliformes resistents a ciprofloxacina. En el cas de la població d'enterococs fecals, s'observen resultats similars als descrits per als coliformes fecals, i no hi ha una disminució significativa en les mostres d'efluents respecte a les d'influents. De nou, s'observa que les poblacions d'enterococs resistents a la ciprofloxacina són menors que les de tetraciclina.

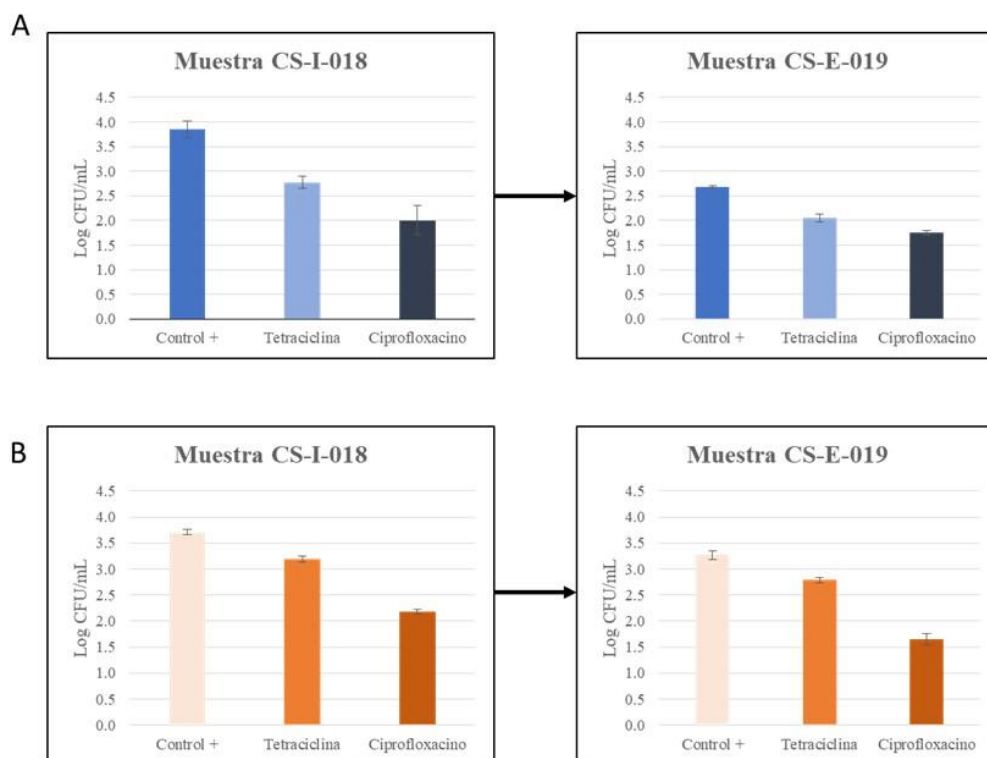


Figura 4.4. Poblacions de coliformes fecals (A) i enterococs (B), totals (control +) i resistents a tetraciclines o ciprofloxacina corresponents a les mostres d'aigua residual de l'EDAR de Castelló.

En el cas de l'EDAR de Borriana (vegeu **Figura 4.5**) es mostren resultats diferents dels observats anteriorment per a l'EDAR de Castelló. En el cas dels coliformes fecals, encara que s'observa una disminució de les poblacions totals i resistents a tots dos antibiòtics en el cas de les mostres d'efluents respecte a les d'influent, la població de coliformes resistents a ciprofloxacina és lleugerament superior a la població resistent a tetraciclina. En el cas dels enterococs, s'observa presència de les tres poblacions bacterianes en l'influent, però no en l'efluent; de fet, s'observa una disminució en la població resistent a tetraciclines i absència de la població resistent a ciprofloxacina.

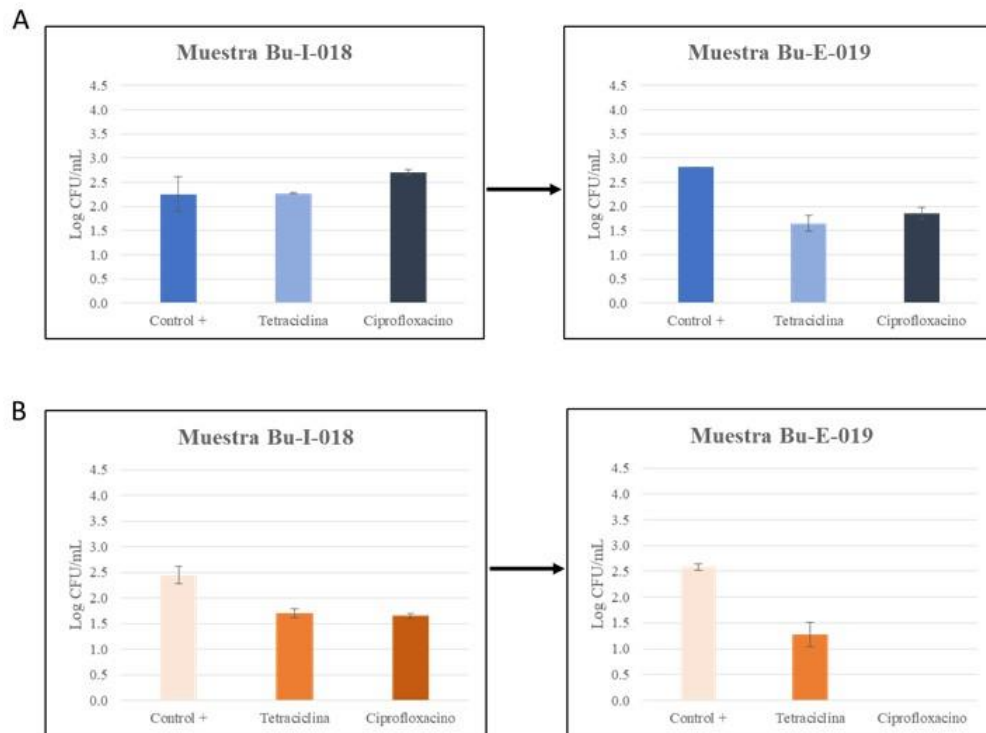


Figura 4.5. Poblacions de coliformes fecals (A) i enterococs (B), totals (control +) i resistents a tetraciclines o ciprofloxacina corresponents a les mostres d'aigua residual de l'EDAR de Borriana.

Finalment, els resultats obtinguts per a les mostres d'aigües residuals de l'EDAR de l'Alcora es mostren en la **Figura 4.6**. En aquest cas, les poblacions de coliformes fecals, totals i resistents a tots dos antibiòtics, van ser elevades en les mostres d'influent, i especialment elevades en el cas de la població resistent a ciprofloxacina, la qual cosa va fer impossible el comptatge de colònies, fins i tot en la mostra més diluïda (1/100). No obstant això, les poblacions bacterianes (control i resistents a antibiòtics) van disminuir en les mostres d'efluent, i la població de resistents a tetraciclines va ser lleugerament menor respecte al control i a la de ciprofloxacina. Pel que fa a la població d'enterococs, les tres poblacions bacterianes van mostrar elevats valors en les mostres d'influent, però van disminuir dràsticament en les mostres d'efluent, fins i tot arribant a ser inexistents en el cas de la població d'enterococs resistents a ciprofloxacina.

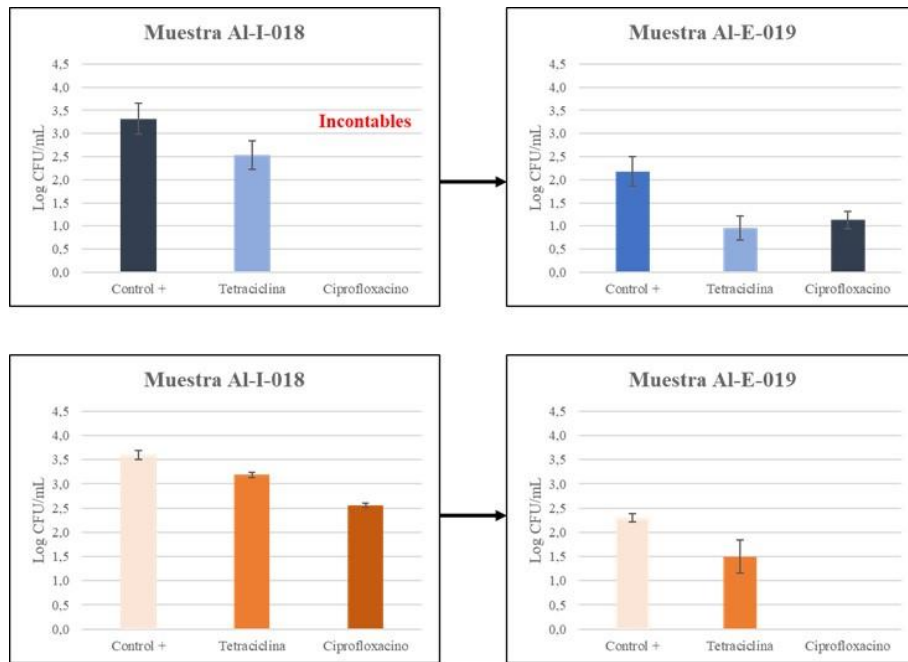


Figura 4.6. Poblacions de coliformes fecals (A) i enterococs (B), totals (control +) i resistents a tetraciclines o ciprofloxacina corresponents a les mostres d'aigua residual de l'EDAR de l'Alcora.

Cultiu de bacteris viables a partir de mostres d'aigües glicerínades

L'anàlisi microbiològica de qualsevol mostra ambiental o clínica requereix que aquestes mostres siguin recollides, transportades i emmagatzemades en condicions òptimes per a poder conrear i aïllar el major nombre de microorganismes viables presents. Com que poden existir situacions que impedisquen que l'anàlisi microbiològica es pugui realitzar immediatament després de la recollida de mostres, es va avaluar l'impacte que tindria l'emmagatzematge de les mostres d'aigües a -20 °C afegint-hi un 15 % de glicerol.

Per a això, es van prendre com a referència les mateixes mostres d'aigües analitzades en l'apartat anterior (CS-I-018, CS-E-019, BU-I-018, BU-E-019, AL-I-018 i AL-E-019). Es va aplicar el mateix procediment, però a partir d'una alíquota que va ser prèviament congelada a -20 °C amb un 15 % de glicerol per a la conservació.

A tall d'exemple, les **Figures 4.7 i 4.8** mostren les dades de l'estudi microbiològic (poblacions bacteris com ara log UFC/ml) per a les mostres, fresques i glicerades, d'aigua residual d'influent i efluent de les EDARS de Castelló i Borriana, respectivament. En les mostres de Castelló, els resultats indiquen que l'emmagatzematge de les mostres a -20 °C amb un 15 % de glicerol és un mètode adequat per a preservar les poblacions microbianes, ja que en la majoria dels casos s'obtenen resultats molt similars entre les mostres fresques i les glicerínades, tant d'influent com d'efluent. Principalment s'observa una bona correlació en el cas de les poblacions

d'enterococs. En el cas de les poblacions de coliformes fecals, fins i tot s'observen valors més elevats en les mostres glicerínades respecte de les fresques. En el cas de les mostres de Borriana, s'observen resultats similars als obtinguts per a les aigües de Castelló. De fet, en les mostres d'efluents s'aconsegueix recuperar un percentatge de la població d'enterococs resistent a ciprofloxacina.

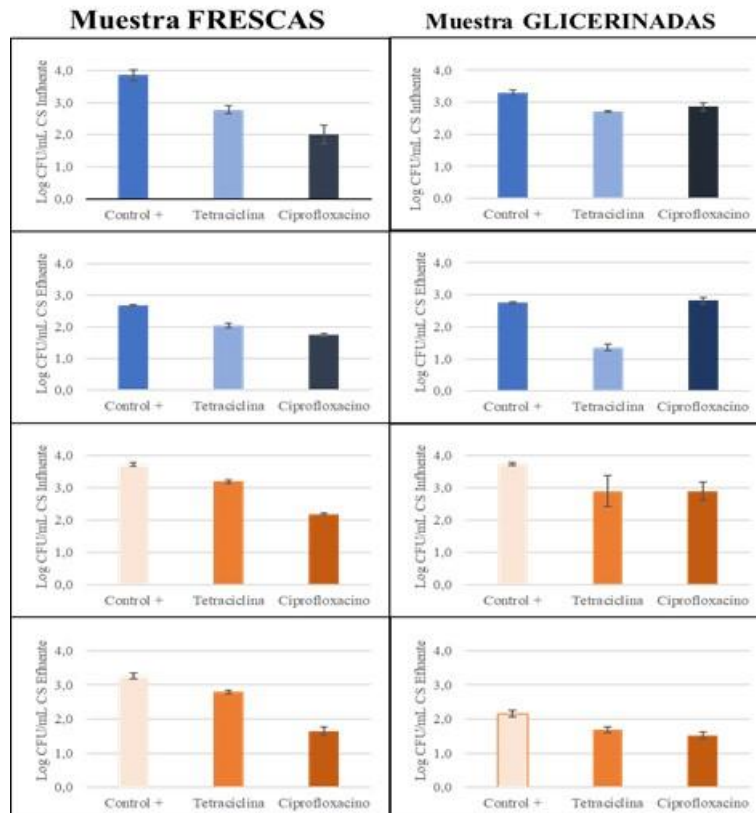


Figura 4.7. Estudi microbiològic (poblacions de bacteris com ara log UFC/ml) per a les mostres d'influent i efluent de l'EDAR de Castelló, comparant les mostres fresques amb les glicerínades emmagatzemades a -20 °C amb un 15 % de glicerol. Les poblacions d'enterococs es mostren amb barres taronges i les de coliformes fecals amb barres blaves.

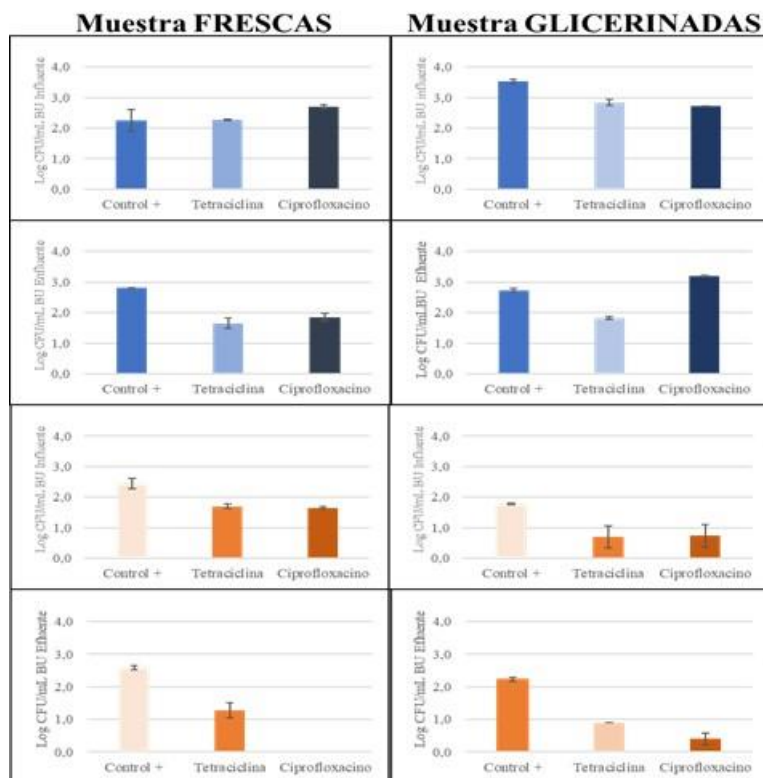


Figura 4.7. Estudi microbiològic (poblacions bacteris com log UFC/ml) per a les mostres d'influent i efluent de l'EDAR de Borriana, comparant les mostres fresques amb les glicerínades emmagatzemades a -20 °C amb un 15 % de glicerol. Les poblacions d'enterococs es mostren amb barres taronges i les de coliformes fecals amb barres blaves.

5. BIBLIOGRAFIA

- Bellver-Domingo, A., Maldonado-Devis, M., Hernández-Sancho, F., Carmona, E., Picó, Y., 2019. Identification of effective parameters for anti-inflammatory concentration in València City's wastewater using fuzzy-set qualitative comparative analysis. *Sci Tot. Environ.* 663, 110-124
- Bijlsma, L., Pitarch, E., Fonseca, E., Ibáñez, M., Botero, A.M., Claros, J., Pastor, L., Hernández, F., 2021. Investigation of pharmaceuticals in a conventional wastewater treatment plant: Removal efficiency, seasonal variation and impact of a nearby hospital. *J. Environ. Chem. Eng.* 9, 105548
- Botero-Coy, A.M., Martínez-Pachón, D., Boix, C., Rincón, J., Castillo, N., Arias-Marín, L.P., Manrique-Losada, L., Torres-Palma, R.A., Moncayo-Lasso, A., Hernández, F., 2018. An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater. *Sci. Total Environ.* 642, 842-853
- Buelow, E., Rico, A., Gaschet, M., Lourenço, J., Kennedy, S.P., Wiest, L., Ploy, M.-C., Dagot, C., 2020. Hospital discharges in urban sanitation systems: Long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome. *Water Res.* X 7, 100045
- Derco, J., Gotvajn, A.Z., Cizmárová, O., Dudás, J., Sumegová, L., Simovicová, K., 2021. Removal of micropollutants by ozone-based processes. *Processes* 9, 1013
- European Commission. Decision (EU) 2022/1307 of 22 July 2022 Establishing a Watch List of Substances for Union-Wide Monitoring in the Field of Water Policy Pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council. *Off. J. Eur. Union* 2022, 48-
- Ferré-Aracil, J., Valcárcel, Y., Negreira, N., López de Alda, M., Barceló, D., Cardona, S.C., Navarro-Laboulais, J., 2016. Ozonation of hospital raw wastewaters for cytostatic compounds removal. Kinetic modelling and economic assessment of the process. *Sci. Total Environ.* 556, 70-79
- Fonseca, E., Hernández, F., Ibáñez, M., Rico, A., Pitarch, E., Bijlsma, L., 2020. Occurrence and ecological risks of pharmaceuticals in a Mediterranean river in Eastern Spain. *Environ. Int.* 144, 106004
- Giwa, A., Yusulf, A., Balogun, H.A., Sambudi, N.S., Bilad, M.R., Adeyemi, I., Chakraborty, S., Curcio, S., 2021. Recent advances in advanced oxidation processes for removal of contaminants from water: A comprehensive review. *Process Safety Environ. Protection* 146, 220-256
- López, F.J., Pitarch, E., Botero-Coy, A.M., Fabregat-Safont, D., Ibáñez, M., Marín, J.M., Peruga, A., Ontañón, N., Martínez-Morcillo, S., Olalla, A., Valcárcel, Y., Varó, I., Hernández, F., 2022. Removal efficiency for emerging contaminants in a WWTP from Madrid (Spain) after secondary and tertiary treatment and environmental impact on the Manzanares River, *Sci. Tot. Environ.* 812, 152567
- Nakada, N., Shinohara, H., Murata, A., Kiri, K., Managaki, S., Sato, N., Takada, H., 2007. Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Res.* 41, 4373–4382. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2007.06.038>
- Pärnänen, K.M.M., Narciso-Da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T.U., Cacace, D., Do, T.T., Elpers, C., Fatta-Kassinos, D., Henriques, I., Jaeger, T., Karkman, A., Martínez, J.L., Michael, S.G., Michael-Kordatou, I., O'Sullivan, K., Rodriguez-Mozaz, S., Schwartz, T., Sheng, H., Sorum, H., Stedtfeld, R.D., Tiedje, J.M., Varela Della Giustina, S., Walsh, F., Vaz-Moreira, I., Virta, M., Manaia, C.M. 2019. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci. Advance* 5(3)
- Qi, F., Chu, W., Xu, B., 2015. Ozonation of phenacetin in associated with a magnetic catalyst CuFe₂O₄: The reaction and transformation. *Chem. Eng. J.* 262, 552–562. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.09.068>

- SANTE/12682/2019. European Commission, 2019. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Directorate-General for Health and Food Safety
- Singh, A., 2021. A review of wastewater irrigation: environmental implications. *Resour. Conserv. Recycl.* 168, 105454
- Sousa, J.C.G., Ribeiro, A.R., Barbosa, M.O., Pereira, F.R., 2018. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *J. Hazard. Mat.* 344, 146-162
- Staehelin, J., Hoigne, J., 1985. Decomposition of Ozone in Water in the Presence of Organic Solutes Acting as Promoters and Inhibitors of Radical Chain Reactions. *Environ. Sci. Technol.* 19, 1206–1213. <https://doi.org/10.1021/es00142a012>
- Wang, J., Chen, H., 2020. Catalytic ozonation for water and wastewater treatment: recent advances and perspective. *Sci. Total Environ.* 704, 135249

ANNEX 1

Metodologia analítica per a fàrmacs

La determinació de la resta de fàrmacs també s'ha dut a terme mitjançant la injecció directa de les mostres d'aigua, sense tractament/preconcentració previ. La metodologia aplicada en aquest estudi és la que s'aplica en els últims anys en el IUPA per a la determinació de fàrmacs en aigües residuals, i està contínuament sotmesa a avaluació a través de l'anàlisi de nombrosos controls de qualitat (QC) amb resultats satisfactoris. Per consegüent, no s'ha dut a terme la validació d'aquesta metodologia.

Preparació de les mostres

Totes les mostres d'aigua es van centrifugar a 12000 rpm durant 15 minuts i es van preparar de la següent manera:

- Influent: 200 µL de mostra, 750 µL d'aigua MilliQ i 50 µL de dissolució ILIS de 10 ng mL⁻¹ en metanol s'introdueixen en el vial d'injecció (dilució × 5 de la mostra)
- Efluent: 500 µL de mostra, 450 µL d'aigua MilliQ i 50 µL de dissolució ILIS de 10 ng mL⁻¹ en metanol s'introdueixen en el vial d'injecció (dilució × 2 de la mostra)

Determinació UHPLC-MS/MS

L'anàlisi de les mostres s'ha dut a terme en un sistema UPLC Waters Acquity (Waters, Milford, MA, EUA) acoblat a un espectròmetre de masses amb analitzador de triple quadrupol (TQS, Waters Micromass, Manchester, Regne Unit) utilitzant la interfase electroesprai (ESI).

Columna: Cortecs C18 2.7 µm, 100 × 2.1 mm (Waters)

Fase mòbil:

- Dissolvent A: aigua 0.01 % àcid fòrmic i 1 mm acetat amònic
- Dissolvent B: metanol 0.01 % àcid fòrmic i 1 mm acetat amònic

Gradient fase mòbil:

temps (min)	% A	B
0.00	95	5
9.00	5	95
9.10	1	99
10.00	1	99
10.10	95	5
12.00	95	5

Flux fase mòbil: 0.400 mL/min; volum d'injecció: 50 µL

La **Taula A1** mostra les condicions MS/MS utilitzades per als fàrmacs seleccionats, així com la família terapèutica a què pertanyen. S'indica la manera de ionització (ESI), l'energia de con, les transicions seleccionades -quantificació (Q) i confirmació (q)-, i les respectives energies de col·lisió (EC). En la **Taula A2** s'inclouen les condicions de mesura per als ILIS que s'han utilitzat.

Taula A1. Condicions MS/MS per als fàrmacs

Compost	Família terapèutica	ESI	Con (V)	Transició Q	EC (eV)	Transicions q	EC (eV)
Acetaminofèn	<i>Analgèsic</i>	+	10	152 > 110	15	152 > 93 152 > 65	20 25
Alprazolam	<i>Benzodiazepina</i>	+	10	309 > 281	25	309 > 274 309 > 205	25 25
Atorvastatina	<i>Agent hipolipidèmic</i>	+	10	559 > 440	20	559 > 466 559 > 292	15 25
Carbamazepina	<i>Antiepilèptic</i>	+	10	237 > 194	20	237 > 179 237 > 192	25 10
Ciprofloxacina	<i>Antibiòtic</i>	+	10	332 > 245	20	332 > 231 332 > 294	20 25
Claritromicina	<i>Antibiòtic</i>	+	10	748 > 158	35	748 > 590 748 > 83	15 35
Clindamicina	<i>Antibiòtic</i>	+	10	425 > 126	20	425 > 377 425 > 389	20 15
Diclofenac	<i>Antiinflamatori no esteroïdal</i>	+	10	296 > 214	30	296 > 250 296 > 278	10 5
Enalapril	<i>Antihipertensiu</i>	+	10	377 > 234	15	377 > 303 377 > 177	15 25
Eritromicina	<i>Antibiòtic</i>	+	10	734 > 158	25	576 > 158 576 > 116	25 30
Flumequina	<i>Antibiòtic</i>	+	10	262 > 202	30	262 > 126 262 > 146	40 40
Furaltadona	<i>Antibiòtic</i>	+	10	325 > 100	20	325 > 281 325 > 252	10 15
Gabapentina	<i>Antiepilèptic</i>	+	10	172 > 154	15	172 > 137 172 > 95	15 20
Iopromida	<i>Solució de contrast radiològic</i>	+	10	792 > 573	30	792 > 559 792 > 445	30 30
Irbesartan	<i>Antihipertensiu</i>	+	10	429 > 207	25	429 > 195 429 > 180	20 25
Levamisole	<i>Agent antihelmíntic</i>	+	10	205 > 178	20	205 > 91 205 > 123	25 25
Lincomicina	<i>Antibiòtic</i>	+	10	407 > 126	20	407 > 359 407 > 389	15 15
Lorazepam	<i>Benzodiazepina</i>	+	10	321 > 275	20	321 > 303 321 > 229	15 25
Losartan	<i>Antihipertensiu</i>	+	10	423 > 405	10	423 > 377 423 > 207	15 15
Metoprolol	<i>Agent blocador β</i>	+	10	268 > 116	15	268 > 74 268 > 191	20 15
Metronidazole	<i>Antibiòtic</i>	+	10	172 > 128	15	172 > 82 172 > 56	20 20
Àcid nalixídic	<i>Antibiòtic</i>	+	10	233 > 215	10	233 > 187 233 > 159	25 25

Compost	Família terapèutica	ESI	Con (V)	Transició Q	EC (eV)	Transicions q	EC (eV)
Norfloxacina	<i>Antibiòtic</i>	+	10	320 > 233	25	320 > 282 320 > 256	30 20
Àcid oxolínic	<i>Antibiòtic</i>	+	10	262 > 244	15	262 > 216 262 > 283	25 25
Pantoprazole	<i>Antiulcerós</i>	+	10	384 > 200	10	384 > 138 384 > 153	25 15
Fenazona	<i>Antiinflamatori no esteroïdal</i>	+	10	189 > 58	20	189 > 104 189 > 131	20 20
Primidona	<i>Antiepilèptic</i>	+	10	219 > 162	10	219 > 119 219 > 91	15 20
Roxitromicina	<i>Antibiòtic</i>	+	10	419 > 83	15	419 > 158 419 > 116	25 15
Salbutamol	<i>Agent blocador β</i>	+	10	240 > 148	15	240 > 222 240 > 166	10 10
Sulfadiazina	<i>Antibiòtic</i>	+	10	251 > 156	15	251 > 92 251 > 108	25 20
Sulfametoxazole	<i>Antibiòtic</i>	+	10	254 > 156	15	254 > 92 254 > 108	25 20
Tetraciclina	<i>Antibiòtic</i>	+	10	445 > 410	15	445 > 154 445 > 427	25 10
Tramadol	<i>Analgèsic</i>	+	10	264 > 58	10	264 > 246 264 > 121	10 25
Trimetoprim	<i>Antibiòtic</i>	+	10	291 > 123	25	291 > 230 291 > 261	20 25
Valsartan	<i>Antihipertensiu</i>	+	10	436 > 207	25	436 > 235 436 > 291	15 15
Venlafaxina	<i>Antidepressiu</i>	+	10	278 > 58	15	278 > 260 278 > 121	10 25
OD Venlafaxina	<i>Antidepressiu</i>	+	10	264 > 246	10	264 > 107 264 > 133	25 20

Taula A2. Condicions MS/MS per als patrons interns marcats isotòpicament (ILIS) utilitzats en l'anàlisi de fàrmacs

Compost	ESI	CV (V)	Transicions	CE (eV)
Acetaminofèn d ₄	+	10	156.0 > 114.0	10
Atorvastatina d ₅	+	10	564.0 > 445.0	20
Epòxid de carbamazepina d ₁₀	+	30	263.2 > 190.0	30
Ciprofloxacina d ₈	+	20	340.2 > 235.0	40
Claritromicina d ₇	+	10	752.2 > 162.1	30
Diclofenac d ₄	+	10	300.1 > 219.2	20
Enalapril d ₅	+	10	382.3 > 239.2	20
Eritromicina ¹³ C ₄	+	20	738.3 > 162.1	25
Flumequina ¹³ C ₃	+	10	265.0 > 205.0	25
Gabapentina ¹³ C ₃	+	10	175.1 > 157.1	15
Iopromida d ₃	+	10	794.9 > 561.9	25
Irbesartan d ₆	+	10	435.1 > 213.3	25
Levamisole d ₅	+	20	210.2 > 183.1	25
Losartan d ₄	+	10	427.1 > 211.1	20
Metronidazole d ₃	+	20	175.0 > 131.0	15
Metropolol d ₇	+	10	275.2 > 123.1	20
Àcid nalixídric d ₅	+	10	238.1 > 220.1	15
Norfloxacina d ₅	+	20	325.1 > 231.0	35
Àcid oxolínic d ₅	+	10	267.0 > 248.9	15
Pantoprazole d ₆	+	10	390.1 > 206.0	10
Primidona d ₅	+	20	224.1 > 167.0	10
Roxitromicina d ₇	+	20	422.2 > 158.0	15
Salbutamol d ₃	+	20	243.2 > 151.0	20
Sulfadiazina ¹³ C ₄	+	10	257.1 > 162.1	10
Sulfametoxazole ¹³ C ₆	+	10	260.0 > 162.0	15
Tetraciclina d ₆	+	10	451.1 > 416.0	15
Tramadol ¹³ Cd ₃	+	20	268.1 > 57.9	15
Trimetoprim ¹³ C ₃	+	20	294.1 > 123.1	25
Valsartan d ₈	+	10	444.0 > 207.0	25
Venlafaxina d ₆	+	30	284.1 > 64.0	30

Quantificació

La quantificació s'ha fet mitjançant el mètode del patró intern (per als compostos amb ILIS) o del patró extern (quan no es va aplicar ILIS), amb corbes de calibrat preparades en aigua HPLC:metanol (90:10, v/v).

Les dissolucions patró de calibrat s'han preparat mitjançant dilució de diferents barreges patró de tots els antibiòtics estudiats. El rang de concentració nominal de les corbes de calibrat ha estat entre 1 i 5000 ng L⁻¹. Com a valor límit de quantificació s'ha considerat el corresponent al punt del calibrat de menor concentració (*lowest calibration level*, LCL) tenint en compte la dilució de les aigües d'influent (LCLx5) i d'efluent (LCLx2).

Metodologia tractaments avançats amb ozonització catalítica

Síntesi dels catalitzadors

Per a dur a terme la síntesi i caracterització dels diferents materials catalítics utilitzant l'òxid de manganès com a centre actiu (MnO_2) suportat en diferents tipus de zeolites comercials: zeolita I. Es van emprar com a suports les zeolites comercials, zeolita I (adquirides en *zeolyst international*) amb relacions molars $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$: 60 i 12 (H-CBV760 i NH_4 -CBV712, abreujades en aquest informe com ZY60 i ZY12). Inicialment les zeolites de partida es van intercanviar amb sodi amb la finalitat d'eliminar els centres àcids, que podrien afectar en la descomposició de l'ozó. L'intercanvi de sodi (Na) es va dur a terme submergint les zeolites en una dissolució aquosa de NaCl (2.5 M, relació líquid/sòlid de 10) a 80 °C durant 1 h. El sòlid es va filtrar, es va rentar amb aigua destil·lada i es va assecar a 100 °C durant 30 min. Aquest procés es va repetir tres vegades. Finalment, la mostra es va calcinar a 450 °C durant 3 h. El mètode de síntesi dels catalitzadors (MnO_2 /zeolita) va ser preparat seguint el mètode d'impregnació humida a volum de porus usant clorur de manganès ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) com a agent precursor. La impregnació es va dur a terme per l'addició sobre la zeolita ZY60 i ZY12, d'una dissolució aquosa del precursor, per a obtenir un 10 % en pes de MnO_2 en els catalitzadors preparats. Posteriorment, la mescla es va deixar assecant a temperatura ambient per 24 h i després es va calcinar en mufla a 450 °C durant 3 h per a obtenir els catalitzadors, MnO_2 /ZY60 i MnO_2 /ZY12. La selecció de la temperatura de calcinació es va fer sobre la base de prèvies anàlisis termogravimètriques.

Configuració experimental emprada i procediment

Els assajos d'ozonització catalítica es van dur a terme en un reactor de *semi-batch* de capacitat 1 L amb un diàmetre de 65 mm. El sistema de treball estava monitorat mitjançant un programari (Sadyco_v6.5, vegeu figura 2) que permetia adaptar les diferents condicions de l'assaig i registrar l'evolució de la reacció. El corrent de gas d'ozó va ser proporcionada per un generador d'ozó (Ozone Solutions TG-20) alimentat per oxigen pur. La mescla d'ozó-oxigen es va regular mitjançant controladors de cabal màssic digitals i es va alimentar al reactor a través d'un difusor de placa porosa de vidre situat en el fons del reactor de columna, amb un cabal de gas de 2.0 L/min i amb una concentració de 6.1 g N/m³. La concentració d'ozó en fase gas es va mesurar utilitzant un analitzador d'ozó BMT 964, que consisteix en un espectrofotòmetre d'absorbància UV a 254 nm, el qual és capaç de mesurar concentracions fins a 200 g N/ m³. Per a mesurar la concentració d'ozó dissolt es va emprar una sonda òptica connectada mitjançant fibra òptica a

una font lluminosa de deuteri/wolframi (Ocean Optics DH2000S) i a un espectrofotòmetre d'alta resolució HR4000. L'espectròmetre és capaç de realitzar mesures de l'espectre complet entre 200 i 1100 nm amb una resolució de 0.02 nm i temps d'integració mínims de 4 ms. El mostreig de dades es realitza en general cada 500 ms. Aquest espectrofotòmetre es troba connectat per via USB a l'ordinador. Els assajos d'ozonització catalítica es van fer amb la mateixa massa de catalitzador, per a tots els casos 0.2 g/L, a temperatura ambient. Les mostres líquides es van extraure a través d'un port de mostreig en diferents moments i s'addicionava una solució 0.1 M de tiosulfat de potassi per a eliminar l'ozó dissolt residual. Per als assajos, la concentració d'ozó es fixava fent passar el corrent de sortida de l'ozonitzador pel *by-pass*. Es modificava la posició del potenciòmetre de l'ozonitzador fins que el senyal del detector es mantinguera constant. En aquest moment es feia circular el corrent de gasos pel reactor i es recollien les variacions del sistema. A l'hora de començar l'experiment, el programari (vegeu **Figura A1**) tanca la vàlvula d'entrada d'aire al reactor (V1) i la d'entrada al by-pass (V3) i obri la vàlvula que controla l'entrada al reactor (V2). D'aquesta manera el corrent de sortida del ozonitzador deixa de circular pel by-pass i entra al reactor, on es duu a terme la reacció d'ozonització catalítica.

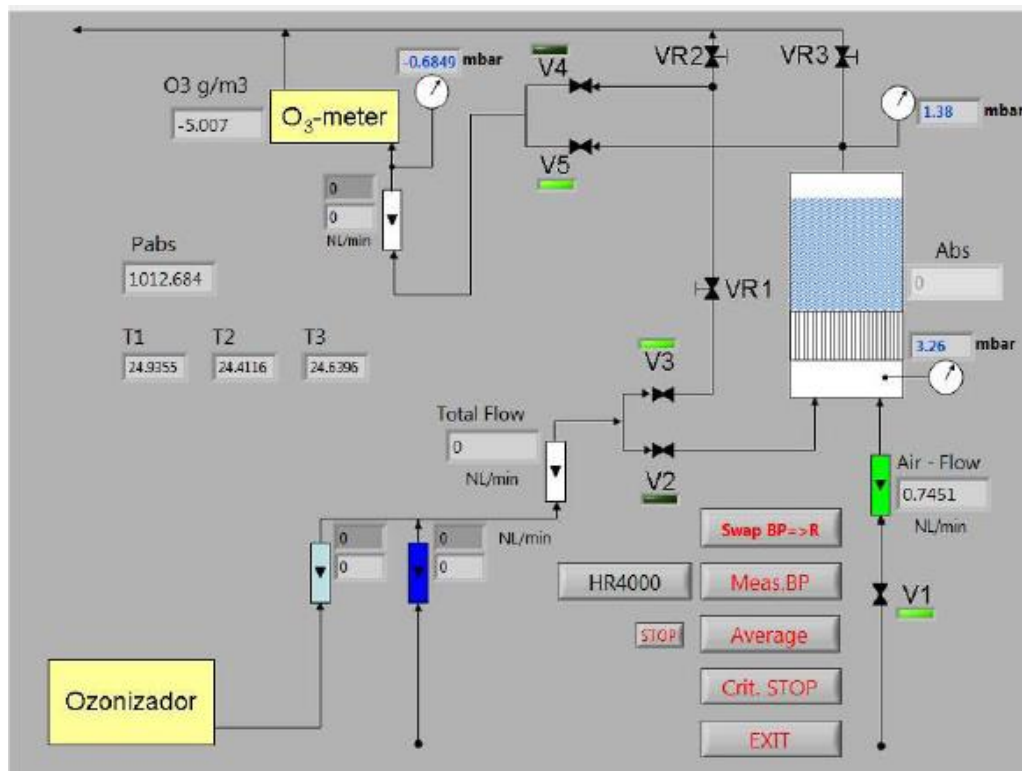


Figura A1. Programari utilitzat en el control del procés i registre de dades experimentals.

Metodologia resistència a antibiòtics

Extracció d'ADN i PCR quantitativa en temps real

Les mostres d'aigües residuals (25-50 ml influents i 150-400 ml d'efluents) es van filtrar a través de membranes de policarbonat estèrils (porositat de 0,22µm; Whatman, Regne Unit) i es van emmagatzemar a -80 °C fins a l'extracció de l'ADN. L'extracció d'ADN de les mostres d'aigües residuals es va fer d'acord amb les instruccions del fabricant utilitzant el kit DNeasy PowerWater. La quantitat i qualitat de l'ADN es va mesurar amb NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Alemanya).

La detecció i quantificació dels GRA es va dur a terme mitjançant l'ús de la PCR quantitativa (qPCR). En primer lloc, es van ajustar les concentracions de totes les mostres d'ADN (obtinguda mitjançant el Nanodrop) i es van guardar al congelador a -20 °C. Per a cada gen es van preparar corbes de calibrat utilitzant per a això els corresponents plasmidis control amb concentració coneguda. Per a totes les corbes es van preparar 6 punts, corresponents a dilucions decreixents, excepte per a qnrS i Bla-CTX en què la corba es va realitzar amb 7 punts.

Les plaques de qPCR de 96 pouets es van carregar amb les mostres d'ADN, els controls negatius i les corbes patró seguint la disposició que es mostra en la **Figura A2**. Cada pouet conté un volum final de 20 µL. En primer lloc, s'afegeixen 15 µL de mescla que conté la màster mix, els engreixadors dels gens corresponents i aigua, i, finalment, s'addicionen els 5 µL restants de l'ADN de cadascuna de les mostres.

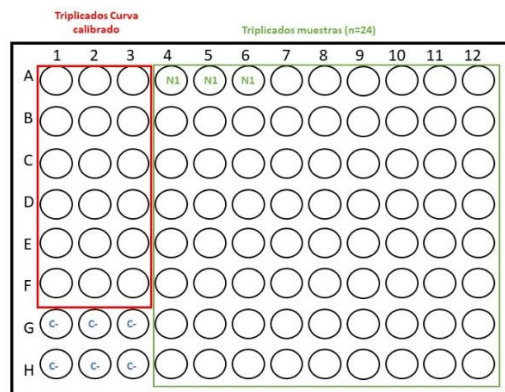


Figura A2. Disposició de la placa de PCR de 96 pouets per a analitzar cada gen de resistència, al costat de la corba de calibrat d'aquest gen, les mostres d'ADN de les aigües per estudiar i els controls negatius on no s'afegeix ADN

El protocol de qPCR que s'ha seguit per a tots els gens és el següent:

1. 50 °C ----- 2 min
2. 95 °C----- 5 min
3. 40 cicles de
 - 95 °C-----15 seg
 - 60 °C-----3 seg

Finalment, els valors de Ct (valor llindar) de cada mostra obtinguts de la qPCR es correlacionen amb els valors de Ct de cada corba de calibrat, i s'obtenen així les còpies de cada gen presents en la mostra. A continuació, es calculen les còpies de cada gen/dia, tenint en compte tant el volum de l'ADN extret, volum d'ADN analitzat en la qPCR, i el volum d'aigua filtrat.

Caracterització microbiana de les aigües residuals: cultiu de bacteris viables

Les mostres d'aigües residuals FRESQUES es caracteritzen pels recomptes de coliformes fecals i enterococs, dos grups de bacteris que s'utilitzen amb freqüència com a indicadors microbiològics de la qualitat de l'aigua. L'enumeració bacteriana es va realitzar en agar de coliformes fecals de membrana (mFC) o en agar Base Slanetz i Bartley, per a enterococs. Aquests mitjans de cultiu van ser suplementats amb un dels següents antibiòtics: tetraciclina (16 mg / litre), o ciprofloxacina (1 mg / litre). De cada mitjà de cultiu es van preparar plaques sense antibiòtics que permetran conèixer la població bacteriana total (control positiu). Les plaques d'aquests mitjans de cultiu es van preparar d'acord amb les instruccions del fabricant i els antibiòtics es van afegir quan el mitjà va aconseguir una temperatura de 50 °C.

De cadascuna de les mostres es van preparar dilucions seriades i es va sembrar per triplicat una alíquota de 0.5 ml, en aquests mitjans, de la mostra directa i les dilucions 1/10 i 1/100. La sembra de cadascuna de les alíquotes/mitjà de cultiu es va realitzar emprant una ansa de Digrafsky per a repartir el volum d'una manera uniforme. A continuació, les plaques es van incubar a 30 °C durant 24 h per als coliformes i 48 h per als enterococs (**Figura A3**). Després del temps d'incubació, es quantifiquen les colònies indicatives de coliformes fecals (colònies blaves) i les d'enterococs fecals (colònies habitades) (**Figura A4**). Els valors s'expressen com la mitjana i la desviació típica de les unitats formadores de colònies per ml de mostra analitzada (UFC/ml).

Les mostres d'aigües residuals que no van poder processar-se per a l'anàlisi microbiològica el mateix dia de la recollida es van guardar a -20 °C, però prèviament es va afegir glicerol estèril (concentració final 15 % v:v) per a garantir la conservació de les espècies microbianes presents en la mostra d'aigua, i poder ser estudiades posteriorment (mostres glicerades). L'anàlisi microbiològica de les aigües que van poder analitzar-se el mateix dia de la recollida es va fer

seguint el mateix procediment descrit anteriorment. En aquest cas, les aigües residuals es van mantenir refrigerades a 4 °C fins a l'anàlisi (mostres fresques).

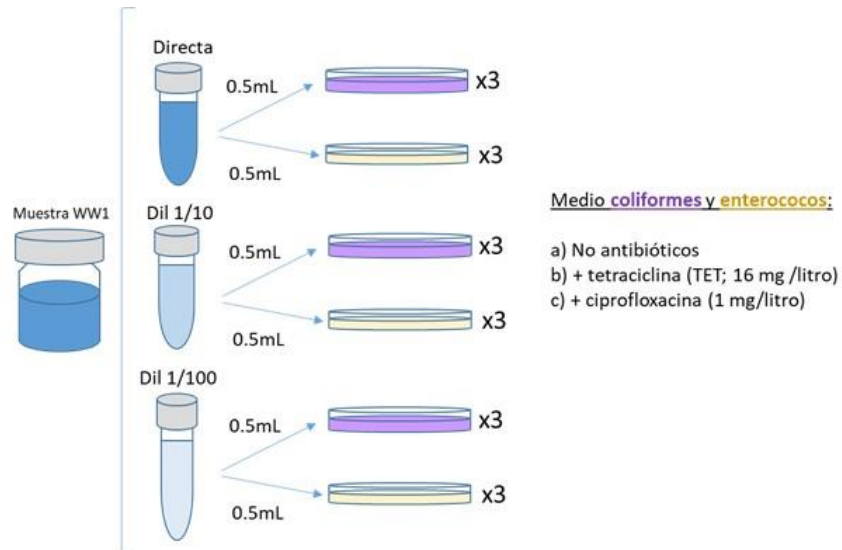


Figura A3. Esquema de l'anàlisi microbiològica. Preparació de dilucions seriades i sembra en plaques de mitjans selectius per a coliformes fecals, agar de coliformes fecals de membrana (mFC) i d'enterococs, en agar Base Slanetz i Bartley. Es van preparar plaques de cada mitjà amb/sense els antibiòtics tetraciclina i ciprofloxacina.

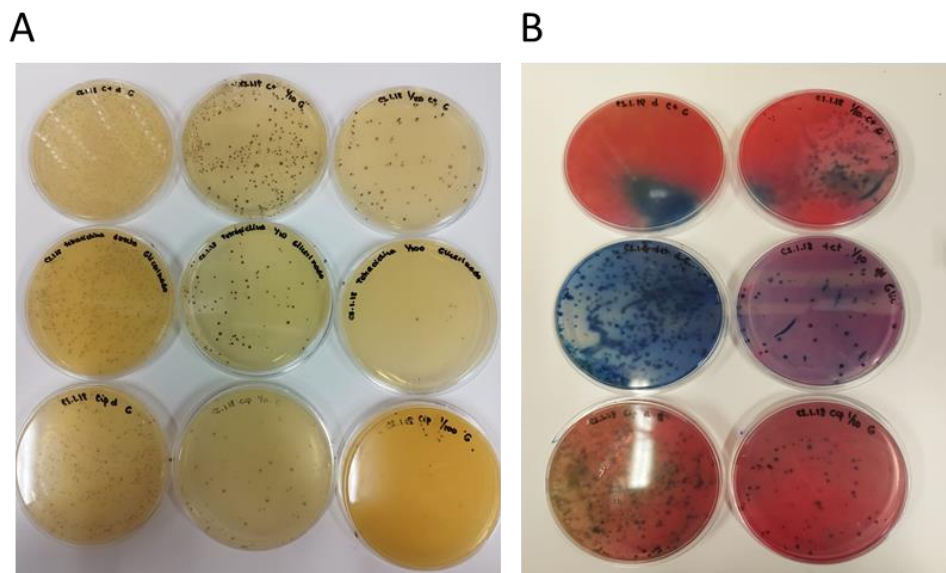


Figura A4. Plaques crescudes dels mitjans d'agar de coliformes fecals de membrana (mFC) per a coliformes fecals i agar Base Slanetz i Bartley per a enterococs. Les plaques sembrades amb les dilucions seriades de cada mostra d'aigua es van inocular en aquests mitjans amb/sense antibiòtics i es van incubar a 30 °C durant 48 h per a enterococs (A) i 24 h per a coliformes (B).