



# UNIVERSIDAD DE GRANADA

INSTITUTO DEL AGUA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL

## ELIMINACIÓN DE XENOBIÓTICOS DE AGUAS RESIDUALES URBANAS MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANA SUMERGIDA

Tesis Doctoral

*Memoria de doctorado*

**DANIEL MARÍA GONZÁLEZ PÉREZ**

Mayo 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Daniel María González Pérez

ISBN: 978-84-9163-386-0

URI: <http://hdl.handle.net/10481/47866>



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

**ELIMINACIÓN DE XENOBIÓTICOS DE AGUAS RESIDUALES  
URBANAS MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANA  
SUMERGIDA**

**Directores de la Tesis**

**Fdo.: Dr. Miguel Angel Gomez Nieto**  
Catedrático de Universidad  
Departamento de Ingeniería Civil  
Universidad de Granada

**Fdo.: Dr. Jorge Ignacio Perez Perez**  
Profesor Titular de Universidad  
Departamento de Ingeniería de la  
Construcción y Proyectos de Ingeniería  
Universidad de Granada



**El doctorando Daniel María González Pérez, el Dr. Miguel Ángel Gómez Nieto,** Catedrático de Universidad del Departamento de Ingeniería Civil de la Universidad de Granada y el **Dr. Jorge Ignacio Pérez Pérez,** Profesor Titular de Universidad del Departamento de Ingeniería de la Construcción y Proyectos de Ingeniería de la Universidad de Granada, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo de investigación que se recoge en esta memoria, titulada **“Eliminación de xenobióticos de aguas residuales urbanas mediante biorreactores de membrana sumergida”**, ha sido realizado en su totalidad por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores al ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Mayo de 2017.

### **El Doctorando**

Fdo: Daniel María González Pérez

### **Directores de la Tesis**

Fdo.: Dr. Miguel Angel Gomez Nieto  
Catedrático de Universidad  
Departamento de Ingeniería Civil  
Universidad de Granada

Fdo.: Dr. Jorge Ignacio Perez Perez  
Profesor Titular de Universidad  
Departamento de Ingeniería de la  
Construcción y Proyectos de Ingeniería  
Universidad de Granada



Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada

Fdo: Daniel María González Pérez

Granada, Mayo de 2017





*Eppur si muove*  
(Galileo Galilei)



## **Agradecimientos**

Una etapa importante concluye, y es grato poder mirar atrás y sentirse orgulloso del trabajo realizado, aún cuando no siempre fue fácil.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis D. Jorge I. Pérez Pérez y, especialmente, a D. Miguel Ángel Gómez Nieto, porque sin ellos y sus conocimientos esto no hubiera sido posible.

A todos y cada uno de mis compañeros y compañeras, ahoramismo no podría recordarlos a todos sin olvidar a alguno... por lo tanto nombraré solo a unos pocos: a Juan, Julián, Cristina, Sergio, Luz Marina, Gloria, Fátima, Lucia, Peter, etc... porque cada uno me aportó o enseñó algo importante, o nos echamos una risas juntos. A los técnicos de laboratorio cuya labor pasa muchas veces desapercibida.

A los grandes maestros, y a los profesores también. Especialmente a D. Juan Luis Alcantara, mi gran maestro...el primero, que enseñó a un niño a amar el método científico.

Gracias también a mi familia, especialmente a mis padres porque ellos han sido el aliento en los momentos más difíciles. Me dieron la vida, una educación y unos principios. Sin ellos nunca hubiera llegado hasta aquí.

Gracias al sistema de enseñanza público, que me permitió llegar al principio del camino, sin el cual hubiera sido imposible llegar hasta aquí.

A todos aquellos compañeros que me he encontrados durante los últimos años, tanto en los realionado con los tesis como en los otros puestos que he desempeñado.

A mi muñeca derecha que me recuerda el precio de la travesía por el desierto, y a Mario que me acompañó durante noches eternas de espera: el que nunca se rindió, enseñandome a ser paciente, trabajar duro y a encontrar el momento adecuado.

A H.M., que me acogió como a uno de los suyos, y me dió la oportunidad de apreder cosas que nunca hubiera imaginado.

A aquellos que confiaron en mí, y a los que no lo hicieron... porque ellos también fueron mi estímulo en los momentos difíciles.

Gracias y salud!





## Resumen

La falta de acceso al agua ha sido siempre un factor limitante para el desarrollo de las sociedades y el sostenimiento de los ecosistemas. En regiones donde coinciden unos escasos recursos hídricos con una elevada densidad de población la mejora en la depuración de las aguas residuales y el uso de fuentes no convencionales de agua se presenta como una necesidad. La *reutilización* de las aguas residuales, permite aumentar los recursos hídricos disponibles a la vez que disminuye el impacto ocasionado por la carga contaminante presente en las aguas residuales.

La sociedad moderna depende de gran cantidad de compuestos *xenobióticos*, los cuales acaban llegando a las aguas residuales presentando estas una mezcla diversa de compuestos xenobióticos habitualmente con bajas concentraciones ( $\mu\text{g/L}$  o  $\text{ng/L}$ ). La eliminación de los xenobióticos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales depende de las características del compuesto y de la naturaleza del proceso. Diversos estudios confirman que muchos xenobióticos son relativamente eliminados durante los tratamientos convencionales de fangos activos (CASP)

sin embargo otros apenas son eliminados y alcanzan las masas de agua a través de los efluentes de EDARs convencionales. Como alternativa se encuentran los *biorreactores de membranas sumergida (MBR)*, basados en el mismo principio biológico de fangos activos que los CASP, realizando la separación sólido-líquido mediante filtración a través de una membrana. La tecnología MBR se ha mostrado eficaz en la eliminación de materia orgánica disuelta, reducción de nitrógeno y desinfección física de las aguas residuales. Por otro lado, los mecanismos por los cuales son parcialmente eliminados los diferentes xenobióticos mediante sistemas de fangos activos son la biotransformación o biodegradación, la volatilización o la adsorción sobre fango, dependiendo de la naturaleza del compuesto. Determinadas variables del proceso biológico como el tiempo de retención celular (SRT) y el tiempo de retención hidráulico (HRT) afectan a la eliminación de estas sustancias, y los MBRs presentan mayores valores que los CASP para estos parámetros, pudiendo representar una interesante opción para su eliminación.

Los xenobióticos se pueden diferenciar entre los considerados como contaminantes clásicos, sobre los que existe preocupación por su presencia en el medio acuático y los efectos que ello acarrea desde hace años, y los contaminantes emergentes, cuyos efectos en el medio ambiente han comenzado a suscitar inquietud en los últimos años. El presente trabajo pretende valorar la eficacia de la tecnología MBR en la eliminación de xenobióticos de las aguas residuales urbanas bajo condiciones de elevado tiempo de retención celular (SRT) y elevado tiempo de retención hidráulica (HRT), y para el desarrollo del mismo se seleccionaron dos de los grupos de xenobióticos más importantes, los *fármacos* entre los considerados contaminantes emergentes y los *hidrocarburos aromáticos policíclicos* entre los contaminantes clásicos. Dada la heterogeneidad de estos grupos, se seleccionaron determinados compuestos cuya importancia se debe a distintos motivos:



- Fármacos que presentan una elevada resistencia a los tratamientos convencionales y por tanto una elevada persistencia en el medio ambiente, como la carbamacepina (CBZ) y el diclofenaco (DCF), cuyos efectos negativos para el medio ambiente representan un riesgo considerable.
- Fármacos considerados menos resistentes a la degradación, cuyo abundante uso hacen que sean habitualmente detectados en distintas masas de agua, y que también presentan efectos nocivos para el medio ambiente, como el ibuprofeno (IBU), naproxeno (NPX) y el ketoprofeno (KTP).
- Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), cuya elevada toxicidad, persistencia y distribución les hace representar un serio riesgo para la salud pública y el medio ambiente. Por esto son considerados contaminantes prioritarios en Europa, pero a pesar de las medidas tomadas para su control siguen estando presentes en múltiples ecosistemas y organismos.

Para determinar la capacidad de eliminación/retención de los diferentes xenobióticos se trabajó con una *instalación experimental* a escala real con dos MBR independientes, ambos configurados en pre-desnitrificación y compuestos por un biorreactor anóxico, un biorreactor aireado y un tanque de membranas. Uno de los biorreactores estaba equipado con membranas planas de microfiltración fabricadas en polietileno clorado y el otro estaba equipado con membranas de fibra hueca de ultrafiltración con una trenza textil interior recubierta con polivinildenfluoruro (PVDF). Ambos MBR eran alimentados con agua residual urbana proveniente del pretratamiento de la EDAR-Sur de Granada tras el desbaste, desarenado y desengrasado. La alimentación se realizaba al reactor anóxico. Posteriormente el fango era bombeado al reactor aireado, desde el que se realizaban las purgas de fango y se alimentaba el tanque de membranas. En el tanque de membranas existía aireación energética para evitar el ensuciamiento/taponamiento de

las mismas y el fango concentrado era recirculado al reactor anóxico. En la instalación se midió en continuo temperatura, oxígeno disuelto y pH del fango activo. En todas las muestras de influente y efluente se analizaron sólidos en suspensión totales, sólidos en suspensión volátiles, demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (5 días) ( $DBO_5$ ), las diferentes formas del nitrógeno ( $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ) y nitrógeno total. Y los xenobióticos se determinan en el influente, efluente, fangos activos de los distintos reactores y la purga para poder realizar un balance de materia para cada sustancia. Se realizaron también ensayos respirométricos y cultivos microbianos encaminados a determinar la toxicidad para el fango activo y la presencia de degradadores de los xenobióticos

Durante la realización del presente trabajo, el HRT fue de 34 horas para el análisis de los PAHs, y de 35 horas para el resto de sustancias, mientras que el SRT fue de 12 y 25 días para los PAHs y de 37 días para los antiinflamatorios no esteroideos (IBU, NPX, KTP y DCF) , alcanzándose 40 días para la carbamacepina.

En el caso de la CBZ, una elevada presencia de la misma en el agua residual mostró efectos negativos en la biomasa, pero a las pocas horas habían desaparecido y no se apreció efecto alguno en la calidad del efluente del sistema, en términos de eliminación de materia orgánica y nitrógeno. No se detectó biodegradación durante el tratamiento en el MBR y este, con un rendimiento inferior al 10 %, se mostró *ineficaz en la eliminación de la CBZ*.

Durante el estudio con IBU, NPX, KTP y DCF se observó que la mayor parte de la eliminación de estos compuestos se realizaba en el reactor aireado. Los rendimientos para IBU, NPX y KTP fueron superiores al 95 %, similares a los registrados para la eliminación de la materia orgánica biodegradable. Por ello es posible afirmar que el principal mecanismo implicado en la eliminación

de estos compuestos fue la *biodegradación/ biotransformación*.

Para el DCF se observó un comportamiento similar al de la CBZ, su eliminación fue baja, incluso con *rendimientos negativos* en determinados periodos. Tanto la eliminación como el incremento de DCF se producían en el reactor aireado; esto indicaba la acumulación del DCF en el sistema, intensificada por la elevada recirculación y la existencia de procesos biológicos implicados en estas transformaciones. Estos rendimientos negativos también fueron observados puntualmente para la CBZ. La eficacia del sistema MBR para la eliminación de los NSAIDs analizados depende en mayor o menor medida de la capacidad de biotransformación de dichos contaminantes.

Para la etapa de la investigación con los PAHs, se llevaron a cabo ensayos en biorreactores de laboratorio empleando fangos activos de un sistema MBR a escala real, y estos mostraron unos elevados rendimientos en la eliminación de fenantreno (*Phen*), pireno (*Py*) y fluoranteno (*F*). No se observó toxicidad durante los ensayos con PAHs, no estando estos biodisponibles. Estos resultados indicaban la importancia del mecanismo del *arrastre por aire* en la eliminación de estos compuestos, quedando en un segundo plano la asociación con la biomasa y cuestionando una insignificante contribución de la volatilización y la biodegradación.

Se desarrolló un segundo estudio con PAHs con la intención de realizar balances de materia en un sistema MBR y poder determinar la importancia de las distintas vías de eliminación de los mismos. En el MBR a escala real, los valores para el rendimiento en la eliminación del *Py* y *F* fueron superiores al 90 %, y en el caso del *Phen* el rendimiento fue del 82 %. Los resultados mostraron una escasa asociación de los PAHs con la biomasa del fango activo y, aunque se habían aislado microorganismos degradadores de PAHs, destacaba la ausencia de biodegradación. Estos hechos revelan que el *arrastre por aire* es el principal mecanismo responsable de la eliminación de

los PAHs en sistemas MBR. Por último, la eficiencia del proceso MBR en términos de calidad del efluente no se vio alterada ante un suceso con elevada concentración de PAHs en el influente.

Por tanto, la eficacia de la tecnología MBR para la eliminación de xenobióticos presentes en aguas residuales urbanas, trabajando con elevados SRT y HRT, varía de unos compuestos a otros. Estas diferencias se deben a la distinta naturaleza química de los contaminantes que, junto con las condiciones operacionales, determinan las principales vías implicadas en la eliminación de cada compuesto.

## **Abstract**

Lack of access to clean water and safe sanitation has been a limiting factor for development of societies and a basic element for almost all ecosystems. Proper wastewater treatment systems are essential especially in areas where limited water resources coincide with high population densities and the use of non-conventional water resources appears as a necessary option to supplement diminishing fresh water availability. Treated *wastewater reuse* has been increasingly used for a number of applications, including agricultural, industrial, urban and direct potable purposes.

Modern society depends on a large range of organic chemicals and these may ultimately enter urban wastewater. Over the last decades, the occurrence of *xenobiotic compounds* in the aquatic environment has become a worldwide issue of increasing environmental concern. Xenobiotics compounds group consist of a vast array of anthropogenic as well as natural substances. The removal of some xenobiotic compounds using conventional activated sludge

process (CASP) is often incomplete and low concentrations of these pollutants ( $\mu\text{g/L}$  or  $\text{ng/L}$ ) pass through the treatment plants and enter the receiving water systems. *Membrane bioreactor (MBR)* is an alternative membrane application in wastewater treatment. This technology combines the biological activated sludge process with solid/liquid physical separation by membrane. MBR technology merges the second and third treatment phases allowing the construction plants capable of producing directly reusable effluent. This technology is expected to enhance the removal of xenobiotics compounds produced by industrial activities and it has been selected for wastewater treatment due to this capacity. The elimination of xenobiotic compounds can occur through various mechanisms in the activated-sludge process, mainly by biodegradation, sorption or volatilization. So, their removal mechanism in MBR can differ with respect to CASP. The MBR system can operate with high SRTs and high HRTs, which may allow the development of more diverse slow-growing microbial communities capable of biodegrading specific organic compounds. A high SRT causes high biomass retention in the activated sludge, so a higher contact between biomass and pollutants is possible, increasing the adsorption of hydrophobic compounds and thereby improving the retention capacity of several pollutants. Given these characteristics, MBR systems offer a good alternative to improve the removal of pollutants such as xenobiotic compounds.

The xenobiotic pollutants can be a classical persistent organic pollutant, long considered as a risk to human health and the environment due to their persistence, potential to bioaccumulation and toxicity; or they can be an emerging pollutant, these are chemicals that are not commonly monitored but have the potential to enter the environment and cause adverse ecological and human health effects. Over the last years, the occurrence of emerging pollutants in treated wastewater has been identified as a significant environment and health concern. The present work is focused on the behaviour and removal efficiency of xenobiotic compounds during the real urban wastewater treatment by an experimental full-scale MBR working at high sludge retention time (SRT) and

high hydraulic retention time (HRT). Two of the main groups of xenobiotics were selected, *pharmaceuticals products* were chosen from among emerging pollutants and *polycyclic aromatic hydrocarbons* from among classical pollutants. Given the heterogeneity of these groups, some important compounds were selected due to different reasons:

- Pharmaceutical pollutants which are resistant to conventional activated sludge treatment therefore they are persistent in the environment, such as carbamazepine (CBZ) and diclofenac (DCF) and their negative effects pose a risk to the environment
- Pharmaceutical pollutants considered less resistant and more easily degradable compounds being commonly detected in different water bodies due to their abundant and widespread use, and with potential negative effects on the environment, such as ibuprofen (IBU), naproxen (NPX) and ketoprofen (KTP).
- Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) hazardous to ecosystems and a human health risk due to their high toxicity, persistence and widespread distribution. Some of these compounds are considered priority pollutants during the last decades; however they are still commonly detected in different ecosystems and organisms.

An *experimental facility* with two independent *full-scale MBRs* working in pre-denitrification configuration was used for this work. One membrane reactor was equipped with hydrophilicised micro-filtration flat-sheet membranes (0.4  $\mu\text{m}$  nominal pore size) made of chlorine polyethylene; and the other membrane reactor was equipped with hollow fibre submerged ultrafiltration membranes (0.034  $\mu\text{m}$  nominal pore size) made of polyvinylidene fluoride (PVDF). Both systems were composed of an anoxic bioreactor, aerobic bioreactor and membrane reactor. The facility was fed with pre-treated urban wastewater from Granada Wastewater Treatment Plant (Granada-Sur, Spain) without rubbish, sand and oils. The pre-treated wastewater was fed into

anoxic reactor. Activated sludge of anoxic reactor was pumped to aerobic reactor which fed membrane tank. The membrane tank concentrate returned to the anoxic reactor and permeate passed to the backwashing tank, the membrane reactor was also aerated by a blower to remove solids from the membrane and to control fouling. A constant sludge purge was carried out from the aerobic reactor. Influent, effluent, purge flow, and operational parameters such as dissolved oxygen (DO), pH, temperature, and transmembrane pressure (TMP) were continuously monitored. All influent and effluent samples were analysed for total (TSS) and volatile (VSS) suspended solids, biochemical oxygen demand at five days ( $BOD_5$ ), chemical oxygen demand (COD),  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$  and total nitrogen. Activated sludge samples were analysed for TSS and VSS. The total concentrations of the selected xenobiotic compounds were determined in influent, effluent, purge, and activated sludge samples in order to determine the mass balance of each substance in the experimental MBR. Respirometric assays were made in the absence and presence of different xenobiotic compounds in order to evaluate their influence in the bacterial activity. Data were supplemented by microbiological analyses to determine the presence of culturable microorganisms capable of degrading the selected pollutants.

During the experimental period with PAHs, the operational HRT was 35 h and the SRT were 12 and 25 d. While operational HRT was 34 h for the works with pharmaceutical products and the SRT was 37 d, except during the CBZ assays when SRT reached 40 d.

The CBZ concentration assayed was higher than in the usual urban wastewater and negative effects were detected in the MBR bacterial community during the initial period of dosing. However, the effects were not permanent and the biomass spiked with CBZ had behaviour similar to that of the biomass without CBZ after a few hours. During and after the experimental process, CBZ did not significantly affect the efficiency of the MBR system, and the quality of the effluent



was not affected by the dosing of CBZ in terms of COD and nitrogen removal. Biodegradation was not detected during the MBR treatment. The system showed an *inefficient elimination of CBZ* (less than 10%) with a high concentration in the effluent. The small percentage of CBZ removal was associated with the sludge retention and eliminated by the purge.

The MBR system showed *high efficiency* eliminating IBU, NPX, and KTP from urban wastewater, with performance levels higher than 95%, whose main transformation occurred in the aerobic reactor with a low contribution from the anoxic reactor. The system reached a biodegradable organic matter removal higher than 99.5 % and worked with complete nitrification, also achieving an effective retention of the unbiodegradable organic matter due to recirculation. *Biodegradation/biotransformation* is the main mechanism involved in IBU, NPX and KTP removal by MBR.

DCF *removal was low with negative removal yields* for several samplings. Both removal and increase transformation of DCF also occurred in the aerobic reactor, this not being observed in the anoxic one. DCF tends to accumulate in the system and to be recirculated. Thus, during the sampling in which DCF influent concentration decreases, removal yields turn negative. The increase of DCF concentration in the aerobic bioreactor also contributes to the negative removal yields. A similar behaviour was observed for CBZ.

The elimination values for the NSAIDs assayed depended on the greater or lesser capacity of *biotransformation* on the part of the microorganisms of the activated sludge, being more significant for co-metabolisable compounds, so that the final concentrations of these compounds in the effluents will depend both on their concentration in the influent as well as their biodegradability.

Bench-scale experiments with experimental MBR activated sludge showed a high removal capacity for the selected PAHs. They reveal that PAHs removal is mainly due to sorption and *air stripping*, however the volatilization and biodegradation present a questionable insignificant contribution. Toxicity by PAHs during MBR treatment cannot be expected due to the low bioavailable for the microorganisms mainly as a result of the high removal by air stripping.

A second period of assays with PAHs was carried out. The fate and removal of phenanthrene (*Phen*), fluoranthene (*F*) and pyrene (*Py*) in urban wastewater treatment by membrane bioreactor (MBR) with low influent polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) concentration were studied. All effluent samples presented concentrations of PAHs, with removal levels of 91% and 92% for *F* and *Py* respectively, while for *Phen* performance did not surpass 82%. Levels are lower for compounds with greater solubility in water, which are more easily carried away in the effluent. In spite of the high hydrophobicity of the tested compounds, their accumulation in the biomass was scarce and the sludge presented a low PAH concentration. The experiments reveal that PAHs removal is mainly due to air stripping, which reduces the accumulation of PAHs in the biomass and limits the establishment of microorganisms capable of biodegrading or biotransforming these compounds, most of which are released directly into the atmosphere. Biodegradation and adsorption make an insignificant contribution.

Therefore, removal efficiencies of xenobiotic compounds during the real urban wastewater treatment by an experimental full-scale MBR working at high sludge retention time (SRT) and high hydraulic retention time (HRT) are diverse. Different physicochemical properties of the xenobiotic compounds and MBR operating conditions determine the main removal mechanisms.

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
1.1.Revisión del Estado del arte	3
1.1.1. La problemática de la escasez de recursos hídricos, necesidades históricas del tratamiento de las aguas residuales	3
1.1.2. La reutilización de aguas residuales regeneradas	5
1.1.3. Problemática de los Xenobióticos, Contaminantes orgánicos persistentes y Contaminantes emergentes	8
1.1.3.1. Los xenobióticos en el medio acuático	10
1.1.3.2. El papel de las estaciones depuradoras de aguas residuales en el control de los contaminantes xenobióticos.	12

1.1.3.3. Productos farmacéuticos	15
1.1.3.4. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)	23
1.1.4. Los Biorreactores de Membrana sumergida y su papel en la eliminación de xenobióticos	27
1.2. Definición del problema y justificación del trabajo de investigación	31
1.3. Diseño y estructura del Trabajo de Investigación	33
<b>2. Objetivos de la investigación</b>	<b>39</b>
<b>3. Comportamiento y efectos de las carbamacepina en un sistema MBR para el tratamiento de aguas residuales urbanas, trabajando con elevados tiempos de retención celular e hidráulica</b>	<b>43</b>
3.1. Introducción	43
3.2. Materiales y Métodos	45
3.2.1. La planta piloto	45
3.2.2. Procedimiento experimental	46
3.2.3. Ensayos respirométricos y análisis microbiológico	47
3.2.4. Métodos analíticos	48
3.3. Resultados y discusión	49
3.3.1. Funcionamiento del MBR	49
3.3.2. Ensayos respirométricos y análisis microbiológico	51
3.3.2.1 Ensayos dinámicos (Rs)	51
3.3.2.2. Ensayos estáticos (OUR)	51

3.3.2.3. Análisis microbiológico	52
3.3.3. Comportamiento de la CBZ en el sistema MBR	52
3.4. Conclusiones	57
<b>4. Comportamiento de los principales fármacos antiinflamatorios no esteroideos en biorreactor de membrana sumergida tratando agua residual urbana con un elevado tiempo de retención hidráulica y celular</b>	61
4.1. Introducción	61
4.2. Materiales y métodos	64
4.2.1. Descripción de la planta piloto y condiciones de trabajo	64
4.2.2. Procedimiento experimental	65
4.2.3. Métodos analíticos	66
4.2.4. Análisis estadístico	68
4.3. Resultados y discusión	68
4.3.1. Funcionamiento del MBR	68
4.3.2. Presencia y eliminación de los NSAIDs seleccionados en el MBR	72
4.3.3. Balances de masas	76
4.4. Conclusiones	84
<b>5. Eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua residual mediante un biorreactor de membrana sumergida</b>	89
5.1. Introducción	89
5.2. Materiales y Métodos	91
5.2.1. Estudio en la planta piloto	91

5.2.2. Estudio a escala de laboratorio	92
5.2.3. Determinación analítica de los PAHs	93
5.2.4. Cultivo de microorganismos degradadores de PAHs	93
5.3. Resultados y discusión.	94
5.4. Conclusiones	101
<b>6. Eliminación de bajas concentraciones de fenantreno, fluoranteno y pireno de agua residual urbana mediante tecnología MBR</b>	<b>105</b>
6.1. Introducción	105
6.2. Materiales y métodos	107
6.2.1. Descripción de la planta piloto	107
6.2.2. Metodología experimental	108
6.2.3. Análisis microbiológicos	109
6.2.4. Ensayos respirométricos	109
6.2.5. Ensayos a escala de laboratorio	110
6.2.6. Condiciones analíticas	110
6.3. Resultados y discusión	111
6.3.1. Ensayo sin adición de PAHs	111
6.3.2. Análisis microbiológicos	112
6.3.3. Ensayos respirométricos	112
6.3.4. Balances de Materia	114
6.3.5. Ensayos a escala de laboratorio	117
6.4. Conclusiones	120

<b>7. Conclusiones</b>	123
<b>8. Líneas futuras de investigación</b>	129
<b>9. Referencias bibliográficas</b>	132
<b>10. Anexos</b>	159





## Tablas

<b>Tabla 1.1.</b> Contaminantes emergentes presentes en algunas EDARs ( $\mu\text{g/L}$ )	14
<b>Tabla 1.2.</b> Algunos fármacos presentes en aguas residuales, concentraciones expresadas en $\mu\text{g/L}$	15
<b>Tabla 1.3.</b> Concentraciones de algunos fármacos presentes en aguas depuradas y aguas superficiales ( $\mu\text{g/L}$ )	16
<b>Tabla 1.4.</b> Algunas de las concentraciones máximas encontradas de PhACs en aguas subterráneas	17
<b>Tabla 1.5.</b> Concentraciones de PAHs detectadas en aguas residuales.	26
<b>Tabla 1.6.</b> Rendimientos en la eliminación de PAHs (%) para sistemas ASTP y MBR	31
<b>Tabla 3.1.</b> Caracterización del fango activo del MBR durante el periodo experimental CBZ	50
<b>Tabla 3.2.</b> Concentraciones de CBZ ( $\mu\text{g/L}$ ) en las diferentes etapas del sistema MBR.	53
<b>Tabla 4.1.</b> LODs-LOQs para los NSAIDs estudiados ( $\text{ng/L}$ ).	67
<b>Tabla 4.2.</b> Parámetros y variables operacionales del MBR durante el periodo experimental	71

<b>Tabla 4.3</b> Concentración de los NSAIDs estudiados en el influente del sistema MBR, comparadas con estudios previos (Luo <i>et al.</i> , 2014).	73
<b>Tabla 4.4</b> Concentración de los NSAIDs estudiados en el influente del sistema MBR y rendimientos alcanzados en su eliminación (%)	74
<b>Tabla 5.1</b> Presencia de contaminantes orgánicos persistentes ( $\mu\text{g/L}$ ) en la planta piloto MBR	92
<b>Tabla 6.1.</b> Concentraciones de los PAHs analizados ( $\mu\text{g/L}$ ) en las diferentes etapas del tratamiento MBR.	115
<b>Tabla 6.2.</b> Características físico-químicas de los PAHs de estudiados	115

## Figuras

<b>Figura 3.1.</b> Diagrama esquemático de la instalación MBR	46
<b>Figura 3.2.</b> La velocidad de consumo de oxígeno (OUR) de diferentes fangos activos endógenos, procedentes del sistema MBR, sin y con CBZ	54
<b>Figura 3.3.</b> Balance de la CBZ en el sistema MBR durante el periodo experimental	56
<b>Figura 4.1.</b> Esquema de la planta piloto MBR	65
<b>Figura 4.2.</b> Caracterización del influente y efluente durante el periodo experimental:	69
<b>Figure 4.3.</b> Resumen del balance para IBU, NPX y KTP en el MBR	78
<b>Figure 4.4.</b> Resumen del balance de masas para DCF en el MBR	82
<b>Figura 5.1</b> Esquema de la planta piloto	92
<b>Figure 5.2</b> <i>Phen</i> y <i>F</i> en el fango activo, después de 24h	96
<b>Figura 5.3</b> Concentración de pireno: Evolución de la concentración de pireno	97
<b>Figura 5.4</b> Velocidad de consumo de oxígeno (OUR). Presencia y ausencia pireno	98
<b>Figura 5.5</b> Tasa dinámica de consumo de oxígeno ( $R_s$ ) en presencia de pireno	100

<b>Figura 6.1.</b> Esquema de la planta experimental MBR.	108
<b>Figura 6.2</b> Evolución a lo largo del tiempo de la tasa de consumo de oxígeno (OUR) tras adición de pireno (40 µg/l).	113
<b>Figura 6.3.</b> Balance diario para los PAHs estudiados (Phen, F and Pyr) en el sistema MBR	117
<b>Figura 6.4</b> Concentración de fluoranteno ( <i>F</i> ), fenantreno ( <i>Phen</i> ) y pireno ( <i>Py</i> ) presente en el fango active después de 24 h	118

## **Acrónimos y abreviaturas**

BSM: Basal salt medium

CBZ: Carbamacepina

COP: Contaminante orgánico persistente

DBO<sub>5</sub>: Demanda biológica de oxígeno (5 días)

DCF: Diclofenaco

DDT: Dicloro difenil tricloroetano

DEET: Dietiltoluamida

DL<sub>50</sub>: Dosis media letal

DQO: Demanda química de oxígeno

EC<sub>50</sub>: concentración media con efectos

EDAR: Estación depuradora de aguas residuales

ERY: Eritromicina

et al.: et alii (y otros)

*F*: Fluoranteno

F:M: Carga másica

HLB: Balance hidrofílico-lipofílico

HPLC: Cromatografía líquida

HRT: Tiempo de retención hidráulica

IBU: Ibuprofeno

Kow: Coeficiente de partición octanol-agua  
Koc: Coeficiente de partición carbono orgánico y agua  
KTP: Ketoprofeno  
LOD: Límite de detección instrumental  
LOEC: Concentración menor con efectos  
LOQ: Límite de cuantificación instrumental  
LSD: Mínimas diferencias significativas  
MBR: Biorreactor de membrana sumergida  
MF-FS: Membrana plana de microfiltración  
MS: Espectrometría de masas  
N<sub>org</sub>: Nitrógeno orgánico  
N<sub>T</sub>: Nitrógeno total  
NCA: Normas de calidad ambiental  
ND: No detectado  
NOEC: Concentración sin efectos no observados  
NPX: Naproxeno  
NSAID: Anti inflamatorio no esteroideo  
OD: Oxígeno disuelto  
OUR: Tasa de consumo de oxígeno (modo estático)  
PAH: Hidrocarburo aromático policíclico  
PCB: Bifenilos policlorados  
PE: Polietileno clorado  
PhAC: Compuestos farmacéuticos activos  
*Phen*: Fenantreno  
PNEC: Concentración prevista sin efecto  
PPCP: Producto farmacéutico y de higiene y cuidado personal  
PVDF: Polivinilideno fluoruro  
*Py*: Pireno  
RD: Real decreto  
ROX: Roxitromicina  
Rs: Tasa dinámica de consumo de oxígeno  
S<sub>i</sub>: Fracción soluble inerte (DQO)  
S<sub>s</sub>: Fracción soluble biodegradable (DQO)

SBSE: Extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras

SMX: Sulfametoxazol

SPE: Extracción en fase sólida

SRT: Tiempo de retención celular

SS: Sólidos en suspensión

SST: Sólidos en suspensión totales

SSV: Sólidos en suspensión volátiles

TCB: Triclorobenceno

TCEP: Tris(2-cloroetil)fosfato

T CPP: Tris(1-cloro-2-propyl)fosfato

TMP: Presión transmembrana

TRP: Trimetoprima

X<sub>i</sub>: Fracción particulada inerte (DQO)

X<sub>s</sub>: Fracción particulada biodegradable (DQO)





**CAPÍTULO 1**

*Eliminación de xenobióticos de aguas residuales urbanas mediante biorreactores de membrana sumergida*

---

## **1. Introducción**

### **1.1. Revisión del Estado del arte**

#### **1.1.1. La problemática de la escasez de recursos hídricos, necesidades históricas del tratamiento de las aguas residuales**

El agua es un recurso renovable pero limitado, esencial para la vida y el desarrollo de las sociedades. La falta de acceso al agua ha sido siempre un factor limitante para la vida humana, históricamente, se observan significativas diferencias, en cuanto a su desarrollo, entre sociedades con menor o mayor disponibilidad de recursos hídricos.

Griegos y romanos fueron los primeros en desarrollar sistemas de recogida y separación de las aguas residuales para evitar la contaminación de las aguas de abastecimiento (Angelakis y Gikas, 2014). Los romanos desarrollaron enormemente el uso del agua en Europa y el arco mediterráneo mediante la construcción de presas y acueductos. La captación, almacenamiento y distribución alcanzaron un nivel que, a excepción de Al-Ándalus, no se igualaría en Europa durante los siguientes mil años a la caída de Roma.

Durante siglos el aumento poblacional y la presión sobre los recursos hídricos obligó a la humanidad a buscar nuevas fuentes de agua en un planeta cada vez más poblado; tras la Revolución industrial se produjo un gran aumento en la presión sobre los recursos hídricos: mayor crecimiento de la población mundial unido al desarrollo de transformaciones socioeconómicas y tecnológicas que provocaron la entrada de grandes cantidades de contaminantes en las masas de agua. A lo largo del siglo XIX aparecen los primeros grandes sucesos de contaminación de aguas como el del Támesis y el famoso "hedor de Londres" de mediados del siglo XIX, y las epidemias de cólera y fiebre tifoidea que tuvieron lugar en Inglaterra estaban relacionadas con la contaminación de las fuentes de agua con aguas residuales. Esto obliga al desarrollo de los primeros sistemas de tratamiento de aguas residuales modernos e hizo patente la necesidad de implementar el saneamiento y proteger las fuentes de agua de la contaminación (Angelakis y Gikas, 2014).

A lo largo del siglo XX con el rápido incremento de la población mundial, la presión sobre los recursos hídricos se hizo cada vez mayor; especialmente en aquellas regiones con elevadas densidades de población. Este hecho se agudiza aún más en zonas donde coinciden elevadas densidades de población con unos recursos hídricos limitados, como ocurre en el arco mediterráneo. En este tipo de regiones, como España, se hace necesario un cambio en el modelo de gestión del agua; dentro de este nuevo marco, el uso de fuentes no convencionales de agua se presenta como parte de la solución (Bixio *et al.*, 2006). Entre las fuentes no convencionales de agua, la reutilización del agua residual regenerada juega un papel clave, ya que permite la renovación del recurso mediante la eliminación del residuo.

Además, no podemos olvidar que el agua es componente fundamental de los ecosistemas y por tanto, la calidad en que esta se presente va a determinar el correcto funcionamiento de los mismos. El crecimiento desmesurado de la población en los últimos años unido a un incremento parejo en cuanto al consumo de agua y producción de residuos ha dado como resultado un aumento en los niveles de contaminación que llegan a las masas de aguas (ríos, lagos, mares, acuíferos...). La principal fuente de entrada de estos contaminantes son las aguas residuales. Como resultado, el equilibrio y correcto funcionamiento de los ecosistemas está en riesgo, en consecuencia, también las garantías de un futuro recurso utilizable por el ser humano. Por tanto, la depuración de las aguas residuales juega un papel clave para mantener el buen estado ecológico los ecosistemas acuáticos y

asegurar la calidad del agua (también como recurso para el ser humano) a lo largo del tiempo.

En ese sentido, la Unión Europea ha establecido un marco comunitario para la protección y la gestión del agua. La denominada Directiva europea Marco del Agua (2000/60/CE) que entre otros aspectos, en el tratamiento de aguas residuales hace especial hincapié en la necesidad de mantener unos niveles de calidad adecuados en los efluentes que provienen de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs).

### **1.1. 2. La reutilización de aguas residuales regeneradas**

El proceso de tratamiento necesario para que un agua residual vuelva a ser utilizada se denomina generalmente *regeneración* y como resultado de dicho proceso se obtiene *agua regenerada*, esto consiste en devolver al agua, parcial o totalmente el nivel de calidad que tenía antes de su uso por parte del ser humano. Y el término *reutilización* corresponde al proceso por el cual se produce una segunda utilización del agua.

La reutilización de aguas residuales no es de reciente aparición, de hecho, forma parte del ciclo del agua. Históricamente las aguas residuales han sido vertidas a ríos, lagos y otras masas de agua. Allí se producía la dilución, para posteriormente, ser reutilizada en otro punto o momento (Iglesias y Ortega de Miguel, 2008).

Hay que diferenciar dos tipos de reutilización de aguas, la reutilización indirecta que es la anteriormente expuesta, y la reutilización directa. En la reutilización indirecta, el agua residual regenerada o no, es vertida a los reservorios ambientales (ríos, lagos, mares, acuíferos) antes de su posterior captación y tratamiento para su futuro uso. El Proyecto NeWater en Singapur, devuelve los efluentes de las plantas de regeneración a reservorios naturales, para posteriormente captar ese agua y someterla a un tratamiento de potabilización previo a su consumo (Bennett, 2011).

Mediante la reutilización directa, el segundo uso del agua se realiza sin que el agua vuelva a los reservorios naturales. (Iglesias y Ortega de Miguel, 2008; Sadr *et al.*, 2015). Existen ejemplos antiguos, de zonas con extremada limitación de recursos hídricos, como diversas zonas áridas o semiáridas de África, oriente medio y el mediterráneo que han reutilizado las aguas grises a lo largo

de la historia, como método de ahorro de agua. (Al-Jayyousiri, 2003). Uno de los ejemplos modernos con mayor relevancia, es la ciudad Windhoek (Namibia) donde la Planta de Regeneración de Aguas Goreangab (Water Reclamation Plant) trata efluentes de aguas residuales domésticas para su reutilización directa como agua potable (Lahnsteiner y Lempert, 2007).

En España, principalmente en la franja litoral mediterránea y en sus dos archipiélagos, coinciden unas elevadas densidades de población con unos recursos hídricos limitados. A esto, además, se une un marcado carácter estacional en la distribución de las precipitaciones, característico del clima mediterráneo: la xericidad estival, que implica que el periodo de mayores temperaturas coincide con el de menores precipitaciones. Este fenómeno produce diversos desajustes en el uso de los recursos hídricos, pues coinciden el aumento de la demanda y las necesidades de los asentamientos humanos y otros seres vivos con el periodo en el que es menor la disponibilidad de agua y la capacidad de carga de los ecosistemas. Es aquí donde entra en juego la reutilización de las aguas residuales, permitiendo aumentar los recursos hídricos disponibles a la vez que se disminuye el impacto ocasionado por la carga contaminante presente en las aguas residuales (Asano, 2002).

Este escenario ya fue considerado por Wolman (1965) hace cinco décadas cuando, en su artículo "The Metabolism of Cities" (El metabolismo de las ciudades), analizó el desarrollo de las sociedades modernas, su consumo de los recursos y el crecimiento poblacional. Wolman concluyó que sería necesaria la reutilización del agua utilizada para poder garantizar el suministro en un futuro próximo.

Territorios como California, Israel, Australia Singapur, Japón, South África y México fueron los primeros en desarrollar proyectos a gran escala para la reutilización de las aguas. Considerando la reutilización como una de las fuentes clave de su modelo de consumo de agua. (Salgot, 2008).

Sin embargo, la reutilización de aguas residuales puede conllevar diversos riesgos para la salud pública y el medio ambiente. Para minimizar dichos riesgos es necesario que el agua a reutilizar cumpla con determinados parámetros que garanticen su adecuada calidad. Debido a esto, en los últimos años diversos estados y agencias u organismos internacionales han desarrollado

distintas regulaciones para la reutilización de aguas (Carr *et al.*, 2004). Ejemplos son los estándares de la Organización Mundial de la Salud recogidos en sus Directrices para el uso seguro de aguas residuales en agricultura y acuicultura (WHO, 1989) y las nuevas directrices de uso de aguas residuales, excretas y aguas grises (WHO, 2006) o la Directrices para la reutilización de aguas del Programa para la Evaluación y el Control de la Contaminación en la región Mediterránea (MED POL, 2005); la Agencia de Protección medioambiental de Estados Unidos también tiene sus propias directrices (USEPA, 2004 y 2012); y el estado de California, pionero en diversos aspectos de la reutilización de aguas, posee una regulación propia (State of California Water Recycling criteria, 1978); Australia e Israel son otros territorios que también han desarrollado directrices (Australian Guidelines for Water Recycling, 2008; Inbar, 2007).

La Directiva 2000/60/CE, por la que se estableció un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, dispone una estrategia para luchar contra la contaminación de las aguas. Esta estrategia implica la identificación de sustancias prioritarias entre aquellas que suponen un riesgo significativo para el medio acuático o a través de este. La Decisión número 2001/2455/CE estableció la primera lista de 33 sustancias prioritarias, en el ámbito de la política de aguas a escala de la Unión Europea, para incluirlos en el anexo X de la Directiva 2000/60/CE. Mientras que la Directiva 2008/105/CE establecía las normas de calidad ambiental (NCAs) para las 33 sustancias prioritarias y otros 8 contaminantes. Posteriormente, la Directiva 2013/39/UE modificaba las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE.

En España, el Real Decreto 1620/2007, establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, en él se recogen los criterios de calidad que debe cumplir el agua destinada a la reutilización en todo el territorio español. Dependiendo del uso al que esté destinado el agua a reutilizar se fija distintos valores máximos admisibles para cada uno de los parámetros a controlar. Los distintos usos, implican distintos parámetros, más restrictivos en función de riesgo que puedan representar para la salud y el medio ambiente. El riesgo viene determinado por el uso que puede ser: urbano, agrario, industrial, recreativo o ambiental. Por tanto se vigilan los siguientes parámetros: huevos de nematodos intestinales, *Escherichia coli*, sólidos en suspensión, turbidez, nitrógeno total, nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), fósforo total, *Legionella spp.*, *Salmonella spp.*, *Taenia saginata* y *Taenia solium*, y otros contaminantes recogidos en la autorización de vertido. Deberá limitarse la entrada de dichos

contaminantes al medio ambiente, y si se considera una sustancia peligrosa es necesario asegurar el cumplimiento de las NCAs. Según el RD 606/2003, que modifica al RD 849/1986, norma de calidad ambiental es “la concentración de un determinado contaminante o grupo de contaminantes en el agua, en los sedimentos o en la biota, que no debe superarse con el fin de proteger la salud humana y el medio ambiente”, y una sustancia se considera peligrosa si es tóxica, persistente y bioacumulable, o si entraña un nivel de riesgo análogo. El RD 907/2007 establece las listas de sustancias peligrosas, como desarrollo de la normativa europea previa y las listas de sustancias prioritarias y peligrosas

### **1.1.3. Problemática de los Xenobióticos, Contaminantes orgánicos persistentes y Contaminantes emergentes**

La sociedad moderna depende de gran cantidad de compuestos químicos orgánicos, los cuales acaban por llegar a las aguas residuales en su forma original o como metabolitos secundarios. Muchos de estos compuestos son xenobióticos, término de origen griego xenos (extraño) y bio (vida). Un xenobiótico es un compuesto orgánico poco o no existente en la naturaleza, normalmente será un contaminante orgánico persistente.

El diccionario Mosby de Medicina define a un xenobiótico como un "compuesto extraño a un sistema (organismo) biológico. Respecto a seres vivos, los xenobióticos pueden ser fármacos, metabolitos de fármacos y determinados compuestos ambientales, tales como contaminantes no producidos por el organismo. En el medio ambiente, el término xenobiótico incluye pesticidas sintéticos, herbicidas, y contaminantes industriales que no serían encontrados en la naturaleza". (Mosby's, 2009). Según el diccionario Collins de Biología, un xenobiótico es un compuesto sintetizado químicamente que está presente en la naturaleza, pero que generalmente no se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo se consideran los pesticidas, pigmentos sintéticos, contaminantes industriales. Dichos compuestos pueden estar relacionados estructuralmente con compuestos naturales y pueden ser degradados lentamente por la enzima que degrada el compuesto homólogo natural. Otros pueden no estar relacionados con ningún compuesto natural y su degradación, si ocurre, lo hace muy lentamente. Los xenobióticos normalmente son persistentes en los medios



donde los microorganismos capaces de su degradación no tienen presencia natural (Hale *et al.*, 2005).

Las aguas residuales urbanas presentan una mezcla diversa de compuestos xenobióticos procedentes de productos farmacéuticos, productos higiene personal, estrógenos, productos químicos de uso industrial y doméstico, y otros compuestos arrastrados por escorrentías, etc. (Manoli y Samara, 1999; Press-Kristensen, 2007). En los últimos años, debido en parte a los avances en las técnicas analíticas y a la preocupación concernientes a la presencia de xenobióticos en el medio acuático, se han desarrollado diversos estudios para analizar la presencia, el comportamiento y los efectos de gran cantidad de contaminantes orgánicos presentes en todo tipo de masa de aguas, muchas veces con bajas concentraciones ( $\mu\text{g/L}$  o  $\text{ng/L}$ ), (Luo *et al.*, 2014; Evgenidou *et al.*, 2015). Este maremágnum de contaminantes orgánicos, engloba compuestos con naturaleza, origen, usos y efectos sobre la salud y el medio ambiente muy diversos. Por ello, en la literatura científica actual, pueden encontrarse diversos nombres que hacen alusión a algunos de estos contaminantes; esta variedad de propiedades de dichos compuestos y de clasificaciones de los mismos puede generar confusión.

Durante décadas, los esfuerzos científicos y legislativos se han centrado en el control y la eliminación de contaminantes químicos frecuentes y abundantes en aguas residuales industriales, serían los considerados contaminantes “clásicos”. Entre estos compuestos, se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) que son uno de los grupos de contaminantes orgánicos persistentes más importantes. Por otra parte, en los últimos años ha aumentado la preocupación por la presencia de otros compuestos potencialmente peligrosos para el medio ambiente y/o la salud, son los denominados “contaminantes emergentes”. Aunque no todos son de reciente aparición, si es nueva la preocupación por sus posibles efectos y su necesario control. Su constante llegada a las aguas residuales y al medio ambiente hace que aunque muchos de ellos no sean recalcitrantes, presenten unos niveles de entrada en el medio constantes y por tanto se puede hablar de su persistencia en el medio (Fent *et al.*, 2006). Entre los contaminantes emergentes se encuentran gran cantidad de compuestos de naturaleza y propiedades muy diversas, pertenecientes a diversas familias químicas: hormonas y esteroides, fragancias sintéticas, fitosanitarios, pesticidas, aditivos alimentarios, nanomateriales, etc. Entre estos grupos, uno de los que ha despertado mayor

interés en los últimos años ha sido el de los productos farmacéuticos y de higiene personal (PPCPs) (Gibson *et al.*, 2007; Bolong *et al.*, 2009; Lapworth *et al.*, 2012).

El término contaminante orgánico persistente (COP) engloba a una gran cantidad de sustancias de distinta naturaleza química y distintas génesis, pero con unas características en común: gran resistencia a la degradación biológica y química, susceptible de presentar bioacumulación en los tejidos vivos, y capaz de producir efectos negativos en la salud y en el medio ambiente a concentraciones muy bajas (Katsoyianis y Samara, 2005).

Como ya se ha expuesto, existen diversos grupos de contaminantes xenobióticos, cada uno con características particulares, aunque pueden ser muy diversos todos presentan alguna o varias de las siguientes características:

- Presentan una elevada permanencia en el medio ambiente al ser resistentes a la degradación.
- Son bioacumulables, pueden acumularse en los tejidos de los seres vivos, pudiendo potenciarse este efecto a través de la cadena trófica (biomagnificación).
- Son altamente tóxicos y pueden provocar graves efectos sobre la salud y el medio ambiente.
- Suponen una amenaza global para la salud y el medio ambiente, dada su capacidad para ser distribuidos a grandes distancias sin apenas alterar su composición.

#### **1.1.3.1. Los xenobióticos en el medio acuático**

Las fuentes de origen de los contaminantes xenobióticos pueden ser puntuales (urbanas e industriales) o difusas (principalmente agrícolas). Los mecanismos de transporte desde los lugares de origen hasta los diferentes cuerpos de agua dependen de las propiedades de los contaminantes y del entorno. En los últimos años se ha detectado la presencia de xenobióticos en todo tipo de masas de agua

Kleywegt *et al.* (2011) identificaron carbamacepina, ibuprofeno, triclosan, sulfametoxazol y bisfenol A en aguas superficiales de Canadá. En Corea se ha detectado nonilfenol, bisfenol A, estradiol y atenolol entre otros (Kim *et al.*, 2009). Pesticidas como atrazina, diuron y diazinon están

presentes en cuerpo de agua de España (Köck *et al.*, 2010). El TCEP, TCP, bisfenol A, triclosan y galaxolide han sido detectados en Alemania (Regnery *et al.*, 2010; Reinstorf *et al.*, 2008).

En las marismas de Doñana se han detectado concentraciones entre 0,2 y 2 µg/L de ibuprofeno, diclofenaco, ácido salicílico, cafeína y gemfibrozil entre otros compuestos (Camacho *et al.*, 2010). A lo largo del cauce del río Rijn, Ruff *et al.* (2015) encontraron más de 140 contaminantes orgánicos en concentraciones que oscilaban entre varios a cientos de ng/L, de diversos grupos: PPCPs, drogas ilícitas, biocidas, edulcorantes, anticorrosivos y otros. Algunos de estos contaminantes orgánicos como bifenilos policlorados (PCBs), DDTs o retardantes de llama bromados son detectados en el ártico, donde se acumulan y biomagnifican en los organismos, (Letcher *et al.*, 2010). Aldrin, dieldrin y otros pesticidas se han detectado en aguas superficiales de Tanzania (Elibariki y Maguta, 2017). Spongber *et al.* (2011) informaron de la presencia de ibuprofeno, ketoprofeno, diclofenaco, carbamacepina, gemfibrozil, sulfametoxazol, triclosan y cafeína en masa de agua de Costa Rica, con concentraciones medias de unos cuantos ng/L y máximas de varios µg/L (mg/L en el caso de la cafeína). En aguas superficiales de Reino Unido se detectó la presencia de ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, diclofenaco, carbamacepina, atenolol, sulfametoxazol, trimetoprima, triclosan y bisfenol A, con concentraciones que oscilaban entre menos de 1 y cientos de ng/L (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009).

También han alcanzado las aguas subterráneas, han sido detectados a concentraciones del orden de ng/L países como Francia (diclofenaco, carbamacepina, naproxeno, estradiol, estrona) o Estados Unidos (ibuprofeno, carbamacepina, sulfametoxazol, cafeína, triclosán, bisfenol A, estrona y estradiol) (Vulliet y Cren-Olive, 2011; Barnez *et al.*, 2008; Fram y Belitz, 2011; Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011). En aguas subterráneas de Francia, Vulliet y Cren-Olivé (2011) encontraron naproxeno, ketoprofeno, diclofenaco, carbamacepina, atenolol, sulfametoxazol y trimetoprima. En España, se ha encontrado ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, gemfibrozil, atenolol, cafeína, triclosan, atrazina, diazinon y diuron en aguas subterráneas (Postigo *et al.*, 2010; Teijon *et al.*, 2010). En concreto en Barcelona, Teijon *et al.* (2010) detectaron 20 de los compuestos prioritarios en aguas subterráneas (entre ellos TCBS, benzo(a)pireno y otros PAHs, diuron, simazina, trifluralin y otros) y diversos compuestos no incluidos en la lista como atenolol, carbamacepina, codeína, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, oxifloxacina, galaxolide, sulfapiridina,

etc.

Incluso se han detectado algunos xenobióticos como carbamacepina, ibuprofeno, gemfibrozil, y bisfenol A en aguas destinadas al consumo humano en Ontario (Canadá) (Kleyweight *et al.*, 2011). Benotti *et al.* (2009), tras analizar muestras de distintos puntos de sistemas de abastecimiento de agua potable en Estados Unidos con la intención de determinar la presencia de contaminantes orgánicos, informaron que los compuestos más frecuentemente detectados, siempre a concentraciones inferiores a 12 ng/L, eran: atenolol, atrazina, carbamacepina, estrona, gemfibrozil, meprobamato, naproxeno, fenitoína sulfametoxazol, TCEP y trimetoprima. En España, Huerta-Fontela *et al.* (2011) analizaron el agua bruta de sistema de potabilización de aguas provenientes del río Llobregat y determinaron que había cinco compuestos que, a pesar de ser eliminados con una elevada eficacia, eran detectados en el efluente a concentraciones de trazas: carbamacepina epóxido, fenitoína, atenolol, sotalol e hidroclorotiazida.

### **1.1.3.2. El papel de las estaciones depuradoras de aguas residuales en el control de los contaminantes xenobióticos.**

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales presentan una elevada eficiencia en la eliminación de determinados parámetros, cuya presencia en las aguas depuradas se encuentra regulada bajo legislación: SS, DQO, DBO<sub>5</sub>, nutrientes, parámetros microbiológicos, patógenos, etc. Pero una gran cantidad de contaminantes orgánicos presentes en las aguas residuales, generalmente en pequeñas concentraciones ( $\mu\text{g/L}$  o  $\text{ng/L}$ ), no se encuentran regulados.

Los estudios realizados durante las últimas dos décadas, indican que algunos de estos compuestos no son completamente eliminados con los actuales sistemas de depuración convencionales (Clarke y Smith, 2011); incluso algunos presentan elevada resistencia a la eliminación mediante distintos tratamientos terciarios aplicados para la reutilización de aguas (Zorita *et al.*, 2009; Al-Rifay *et al.*, 2011). Se ha encontrado la presencia de dichos contaminantes en distintas masas de aguas naturales y artificiales indicando su amplia distribución (Tabla 2).

Las EDARs son consideradas como la principal vía de llegada de los contaminantes emergentes que alcanzan el medio acuático (Tabla 1.1). Debido a las propiedades de estos compuestos (elevada hidrofobicidad, baja biodegradabilidad) y sus bajas concentraciones, los sistemas convencionales de depuración de aguas residuales pueden realizar una eliminación incompleta de los mismos.

Se puede considerar que más de 700 contaminantes emergentes y sus subproductos de transformación están presentes en aguas de Europa (Geissen *et al.*, 2015; NORMAN NetWork, 2013). La presencia de estos compuestos en el medio acuático representa un riesgo ecológico y para salud humana, pudiendo llegar a comprometer las fuentes de agua destinada al consumo humano. La presencia de determinados contaminantes emergentes en las masas de agua está relacionada con diversos efectos negativos en los ecosistemas acuáticos (Kümmerer, 2009), debido a su elevada toxicidad, potencial carcinogénico, mutagénico y teratogénico, efecto disruptor endocrino. También se asocian a la resistencia a los antibióticos de algunos microorganismos (Fent *et al.*, 2006; Rubio-Clemente *et al.*, 2014). Los efectos varían unos compuestos a otros, y en función de la concentración y tiempo de exposición.

Sin embargo apenas existe legislación, directrices o protocolos que regulen el vertido y el seguimiento de estas sustancias mediante el establecimiento de valores límite. Algunos países y regiones, han establecido estándares para un reducido número de contaminantes emergentes. Actualmente en Europa, se ha conformado la Red NORMAN para el seguimiento de los contaminantes emergentes en un intento de establecer directrices de actuación frente a este tipo de contaminantes. Es necesario identificar los mecanismos adecuados para la correcta eliminación de estos compuestos de las aguas depuradas, mediante la aplicación de nuevos tratamientos de depuración o el desarrollo de los existentes.

**Tabla 1.1.** Contaminantes emergentes presentes en algunas EDARs ( $\mu\text{g/L}$ )

Compuesto	Categoría	Localización	Influyente	Efluente	Eliminación (%)
Cafeína	Estimulante	China, UE, Corea	0,22 - 209	ND – 43,50	49,9 – 99,6
Carbamacepi na	Fármaco, anticonvulsivo	China, Corea, UE	<0,04 -3,78	<0,005 – 4,6	< 0 – 62,3
Gemfibrozil	Fármaco, antibiótico	España, Grecia, Corea	0,1 – 17,1	0,0025 – 5,24	< 0 – 92,3
Diclofenaco	Fármaco, NSAIDs	Grecia, Corea, Suecia, Suiza, R.U.	<0,001 – 94,2	N.D. - 0,69	< 0 – 81,4
Naproxeno	Fármaco, NSAIDs	España, Grecia, Corea, Suecia, R.U.	<0,002-52,9	<0,0002-5,09	43,3 – 98,6
Ibuprofeno	Fármaco, NSAIDs	China, U.E, Grecia, Corea, Suecia, R.U., EEUU	<0,004-603	ND - 55	72 - 100
Ketoprofeno	Fármaco, NSAIDs	China, UE, Corea, R.U.	<0,004-8,56	<0,003 – 3,92	09/08/00
Galaxolide	Fragancia	España	0,03 - 25	<0,06 – 2,77	87,8
Triclosan	desinfectante	España, EEUU, Corea, R.U, Francia	0,03 – 23,9	0,01 – 6,88	71,3 – 99,2
DEET	Repelente insectos	China, UE	2,56 -3,19	0,61 – 15,8	65,6 – 79,5
Nonilfenol	surfactante	China, EEUU, UE	<0,03-101,6	<0,03-7,8	21/07/99
Bisfenol A	Plastificante Recubrimiento	China, Francia, Grecia, EEUU	<0,013-2,14	<0,03-1,1	62,5-99,6
TCEP	Plastificante ignífugo	UE	0,06-0,5	0,06-2,4	< 0
Atrazina	herbicida	España, Francia, Suiza	0,02-28	0,004-0,73	< 0-25
Diazinon	insecticida	España, UE	<0,684	0,0007-4,16	< 0
Tebuconazol	fungicida	España, Grecia	ND – 1,89	0,0005-0,69	< 0 – 58,7

Fuente: (Luo *et al.*, 2014)

### 1.1.3.3. Productos farmacéuticos

Durante las últimas décadas, el uso productos farmacéutico y de higiene personal (PPCPs) se ha hecho extensivo e incrementado más que ningún otro grupo de contaminantes emergentes. Debido a ello la preocupación concerniente a sus posibles efectos en el medio ambiente es cada vez mayor, de esta forma en la última se han desarrollado diversos estudios enfocados a mejorar el conocimiento de estos contaminantes y reducir su presencia en el medio ambiente.

Como resultado de la metabolización en el cuerpo humano (y animal, para el caso de los productos veterinarios), tras el consumo de medicamentos, estos se excretan en parte sin metabolizar (ya sea por defecto en la asimilación u otras causas) junto con distintos metabolitos secundarios, resultantes de su transformación en el organismo. Se aportan por tanto a las aguas residuales compuestos farmacéuticos activos (PhACs) como sus metabolitos que posteriormente pueden entrar en los ecosistemas acuáticos (Zhang *et al.*, 2008).

En la Unión europea se encuentran registrados más de 3000 fármacos distintos para humanos. Las técnicas de análisis varían de unos a otros y por tanto la detección de los mismos e identificación de efectos negativos que pudieran tener se hace laboriosa. Múltiples estudios surgen cada año con el objeto de conocer la presencia y los efectos de los PhACs, cuyos comportamientos y efectos son muy variados.

**Tabla 1.2.** Algunos fármacos presentes en aguas residuales, concentraciones expresadas en µg/L

<b>Compuesto</b>	Kim <i>et al.</i> , 2007	Radjenovic <i>et al.</i> , 2009	Clara <i>et al.</i> , 2005	Bernhard <i>et al.</i> , 2006	Gómez <i>et al.</i> , 2007	Zorita <i>et al.</i> , 2009
IBU	0.532	14.6-31.3	1,2-2,68	0.108	34-168	14,3-6,9
DCF	0.01	1.0-1.6	0,905-4,114	0.098	0,2-0,36	0,21-07
KTP		0.7-1.2				
NPX	0.262	0.13-0.67				6,6-20,2
CBZ	0.042	0.054-0.22	0,325-1,85	0.110	0,12-0,31	
ERY	0.044	0.32-2.7				
ROX			0,025-0,117			
SMX	0.194	0.25-1.3	ND-0,145			
TRP	0.021	0.15-0.43				

Múltiples investigadores han detectado diversos PhACs a lo largo del planeta en aguas residuales brutas, efluentes de EDARs, aguas superficiales y aguas subterráneas; a concentraciones que van, principalmente, de unos pocos ng/L a varios µg/L (Luo *et al.*, 2014). A pesar de estas bajas concentraciones, estos contaminantes han estado asociados con efectos en los organismos, mediante alteraciones metabólicas o de comportamiento, y en los ecosistemas acuáticos (Fent *et al.*, 2006; Ruhmland *et al.*, 2015).

Debido a las bajas concentraciones en las que aparecen en las aguas residuales brutas y la elevada persistencia de alguno de ellos, la eliminación de los mismo en los tratamientos convencionales de fangos activos (CASP) es, a menudo, incompleta (Anderson *et al.*, 2013). Las EDARs convencionales no fueron diseñadas para la eliminación de contaminantes emergentes (Binelli *et al.*, 2014) y las aguas depuradas son una importante fuente de entrada de contaminantes emergentes a las masas de agua superficiales u subterráneas (Zhang *et al.* 2008) tal y como puede observarse en las tablas 1.2, 1.3 y 1.4.

**Tabla 1.3.** Concentraciones de algunos fármacos presentes en aguas depuradas y aguas superficiales (µg/L)

<b>Compuesto</b>	<b>Efluente EDAR (Kim <i>et al.</i>, 2007)</b>	<b>Efluente EDAR (Zorita <i>et al.</i>, 2009)</b>	<b>Efluente MBR (Clara <i>et al.</i>, 2005)</b>	<b>Efluente Trat. Terc.(Zorita <i>et al.</i>, 2009)</b>	<b>Agua Reciclada RO (Al-Rifai <i>et al.</i>, 2011)</b>	<b>Ríos y Lagos (Kim <i>et al.</i>, 2007)</b>
IBU	0,010-0,137	0,048	73-1,55	0,048	ND-0,055	0,011-0,038
DCF	0,009-0,127	0,49	2,033-3,464	0,49	N.D	0,001-0,007
KTP					ND-0,044	
NPX	0,02-0,483	0,29		0,29	ND-0,055	0,002-0,018
CBZ	0,073-0,729		0,794-1,619			0,005-0,061
ERY	0,009-0,294					0,002-0,005
ROX			ND-0,042			
SMX	0,004-0,407		ND-0,056			0,002-0,036
TRP	0,01-0,188					0,003-0,005



**Tabla 1.4.** Algunas de las concentraciones máximas encontradas de PhACs en aguas subterráneas.

PhACs	Máxima concentración (ng/L)	Referencia
Carbamacepina	4310	Rozman <i>et al.</i> , 2014
Diclofenaco	3050	Müller <i>et al.</i> , 2012
Ibuprofeno	1860	Carrara <i>et al.</i> , 2008
Naproxeno	160	Carrara <i>et al.</i> , 2008
Ketoprofeno	2886	Loos <i>et al.</i> , 2010

Entre los fármacos, algunos aparecen como compuestos orgánicos persistentes debido a su naturaleza química que los hace muy resistentes a la degradación. Al ser persistentes se acumulan en los ecosistemas, siendo uno de los más persistentes la **carbamacepina** (CBZ).

La CBZ es un antiepiléptico utilizado también para la neuralgia y los desórdenes de conducta (Matalon *et al.*, 2002). Alrededor del 28% de la CBZ administrada oralmente no es adsorbida y se excreta con las heces, mientras que el 1% se excreta sin metabolizar a través de la orina (Zhang *et al.*, 2008). Se trata de un contaminante muy lentamente degradable y es considerado uno de los fármacos más recalcitrantes que existen (Zhang *et al.*, 2011). Está presente en aguas residuales e influentes de EDARs alrededor del mundo, con concentraciones que van de 0,04 µg/L a 4,4 µg/L (Clara *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Vieno *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009; Carranza-Díaz *et al.*, 2014) y atraviesa los sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales, sin apenas ser eliminada.

Se ha encontrado CBZ en aguas tratadas efluentes de EDARs distribuidas por todo el planeta, mostrando su elevada resistencia y capacidad para atravesar los principales sistemas biológicos de tratamiento de aguas (Zhang *et al.*, 2008; Clara *et al.*, 2005). De esta forma la CBZ y sus metabolitos alcanzan el medio natural donde puede persistir durante mucho tiempo (Camacho-Muñoz *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2010), puede ser absorbida por los organismos y acumulada en sus tejidos (Winker *et al.*, 2010). Diversos son los autores que han detectado CBZ en diferentes masas de agua, sedimentos y suelos de distintos territorios (Zhang *et al.*, 2008).

Debido a lo recalcitrante que es la CBZ y a su capacidad para acumularse, su presencia en aguas superficiales es común y puede presentar concentraciones mayores que en aguas residuales brutas. En Alemania se ha encontrado CBZ a concentraciones que van desde 102 hasta 1194 ng/L (Vulliet *et al.*, 2011; Regnery *et al.*, 2010). Kim *et al.*, (2009) detectaron CBZ Corea del Sur con un concentración máxima de 595 ng/L. Mientras que en Reino Unido y en Canadá, se ha detectado con unas concentraciones máximas de 684 y 749 ng/L, respectivamente (Kleywegt *et al.*, 2011; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009).

En aguas subterráneas también puede encontrarse CBZ a concentraciones similares, así Fram y Belitz (2011) encontraron CBZ con una concentración media de 40 ng/L pero con un máximo de 420 ng/L en Estados Unidos (Luo *et al.*, 2014). En Europa la media de las concentraciones registradas por Loos *et al.*, (2010) fue de 12 ng/L, con una concentración máximo de 390 ng/L. Rozman *et al.* (2014) en las cercanías de un hospital psiquiátrico en la República checa encontraron una concentración máxima 4310 ng/L.

Al ser un compuesto muy recalcitrante, difícil y lentamente degradable en sistemas naturales, la CBZ ha sido propuesta como un indicador para la presencia de compuestos farmacéuticos en el medio ambiente (Clara *et al.*, 2004). Las características físico-químicas de la CBZ son las causantes de su baja eliminación en las EDARs convencionales (Zhou *et al.*, 2011), su hidrofobicidad hace que la CBZ se adsorba sobre las partículas de materia orgánica disponibles (Matamoros *et al.*, 2008; Carranza-Díaz *et al.*, 2014)

La CBZ es tóxica para organismos acuáticos (Quinn *et al.*, 2008). Ferrari *et al.* (2003) estudió la toxicidad de la CBZ en bacterias, algas, microcrustáceos y peces, observando una limitada ecotoxicidad aguda. Sin embargo, la toxicidad crónica se mostró mucho mayor que la aguda. La concentración máxima de un compuesto, a la que puede estar expuesto un organismo sin que se aprecien efectos negativos (PNEC), en el caso de la CBZ es de 25 µg/L (Luo *et al.*, 2014). Dada su capacidad de acumulación en el medio ambiente, debe tenerse en cuenta el valor de PNEC para la evaluación de los riesgos asociados a la CBZ. Los niveles de concentración de CBZ que

pueden presentar efectos tóxicos para los ecosistemas son mayores los niveles de concentración conocidos en masas de agua naturales, pero se encuentran en el mismo orden de magnitud, por tanto esta sustancia puede provocar efectos negativos para los ecosistemas. Los riesgos asociados a bajas concentraciones de esta sustancia, no están del todo claros, los efectos crónicos y los efectos sinérgicos con otras sustancias no deben descartarse.

Otro fármaco que presenta elevada resistencia a la degradación, similar a la CBZ, es el **diclofenaco** (DCF). Este compuesto ha sido incluido en la primera lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión Europea en el ámbito de la política de aguas publicada en la Decisión 2015/495/UE, con el objetivo de recabar datos que permitan determinar el riesgo que pueda suponer su presencia en el medio, las medidas adecuadas para su control y, en tal caso, ser incluido en la lista de sustancias prioritarias de conformidad con la Directiva 2008/105/CE. Se trata un anti inflamatorio no esteroideo (NSAID), uno de los más utilizados y más habitualmente detectado en aguas, siendo también uno de los NSAIDs que presenta mayor toxicidad aguda.

Vieno y Sillanpää (2014), en su revisión sobre el comportamiento y destino del DCF en el tratamiento de aguas residuales, informaron de concentraciones máximas de DCF en aguas residuales que oscilaban entre 0,44 a 7,1 µg/L, mientras que las medias se encontraban entre 0,11 y 2,3 µg/L. En los efluentes EDARs, el DCF se ha encontrado con una concentración media entre <0,002 y 2,5 µg/L, con máximos que van de 0,12 a 4,7 µg/L (Vieno y Sillanpää, 2014). Otros autores señalan una capacidad de eliminación de DCF en las EDARs convencionales que oscilan entre el 0 % y el 81,4 % (Luo *et al.*, 2014), estas eficiencias dependen del tipo de tratamiento y los parámetros de funcionamiento de cada caso.

El DCF es tóxico para organismos acuáticos, diversos estudios de ecotoxicidad se han realizado con el DCF, determinando la concentración mínima a la que se observan efectos sobre el organismo expuesto (LOEC) a dicha concentración de DCF. Feito *et al.* (2012) determinaron el LOEC en 0,3 µg/L, concentración a partir de la cual los embriones de *Danio rerio* presentan efectos. Quinn *et al.* (2011) establecieron el LOEC en 1 µg/L, con *Dreissena polymorpha*.

Schwaiger *et al.* (2004) observaron que a determinadas concentraciones ( $> 1 \mu\text{g/L}$ ), el DCF provocaba un deterioro en la salud general en peces. Para *Salmo trutta* se ha identificado  $0,5 \mu\text{g/L}$  como el valor del NOECs (Hoeger *et al.*, 2005) y para otra especie de pez, *Oncorhynchus mykiss*, Triebkorn *et al.* (2004) establecieron el NOEC en  $4,95 \mu\text{g/L}$ . Estos valores son relativamente bajos.

El DCF, al igual que la CBZ, ha mostrado que puede bioconcentrarse en organismos como mejillones y peces (Ericson *et al.*, 2010). Sin embargo, este compuesto es reconocido como de difícil degradación pero más fácilmente degradable que la CBZ. Pero si por algún suceso ecotóxico se ha hecho conocido el DCF, es por el caso extremo de toxicidad a bajas concentraciones en algunas aves que fue descrito por Swan *et al.* (2006) y Taggart *et al.* (2007). Determinaron una dosis letal ( $DL_{50}$ ) para buitres (*Gyps spp.*) en 230 y 15.300 veces menor que la dosis letales previamente descritas para ratas, conejos y cerdos de guinea. El DCF produjo la reducción drástica de poblaciones de buitres en la India, afectados por la ingesta de ganado tratado con DCF (Taggart *et al.*, 2007), y significó un punto de inflexión en la consideración del riesgo potencial que representan algunos contaminantes emergentes. Los estudios de toxicidad del DCF realizados con ratas, conejos, perros y otros mamíferos muestran unos  $DL_{50}$  del orden de  $\text{mg/kg}$  de masa corporal, sin embargo tras lo ocurrido con los buitres indios, algunos autores estiman unas dosis letales para dichas aves mucho menores ( $98\text{-}225 \mu\text{g/L}$ ) de lo esperado (Taggart *et al.*, 2007), por lo tanto los contaminantes emergentes deben ser tenidos en consideración aun cuando se encuentren en concentraciones muy bajas.

El DCF es un **antiinflamatorios no esteroideo (NSAID)**, los cuales forman uno de los grupos de fármacos más utilizados a nivel mundial. En este grupo se encuadran más de 100 compuestos, son conocidos por su efecto analgésico y antiinflamatorio (Manrique-Moreno *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2013). Esta circunstancia hace que sea uno de los grupos de PhACs más relevantes desde el punto de vista medioambiental (Gómez *et al.*, 2007). Entre los NSAIDs se encuentran ibuprofeno (IBU), ketoprofeno (KTP), naproxeno (NPX), fenoprofeno, flurbiprofeno y tolmetin.

Diversos autores han informado de citotoxicidad y genotoxicidad, inducida por la exposición a determinados NSAIDs, en algunos organismos acuáticos. Son los casos de *Oryzias latipes*, *Ruditapes philippinarum* y *Daphnia magna* (Hong *et al.*, 2007, Matozzo *et al.*, 2012; Gómez-Olivan *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta lo sucedido con el DCF y sus DL<sub>50</sub> conocidos en el caso de los buitres, es necesario considerar la posibilidad de que concentraciones inferiores a las determinadas como niveles tóxicos, puedan suponer un riesgo para el medio ambiente y provoquen efectos negativos que aún no se hayan detectado. Algunos autores ya han descrito perjudiciales perceptibles en vertebrados expuestos a NSAIDs, SanJuan-Reyes *et al.* (2015) describen genotoxicidad y citotoxicidad en la carpa *Cyprinus carpio*) que se une al caso comentado anteriormente, de la toxicidad del DCF en aves.

En los últimos años, se ha detectado la presencia de distintos NSAIDs en aguas superficiales en diferentes puntos del planeta. En China, se han medido concentraciones de IBU y NPX de hasta 1417 y 328 ng/L respectivamente (Peng *et al.*, 2008). En Reino Unido, Kasprzyk-Horden *et al.* (2009) detectaron la presencia de IBU (0,3 – 100 ng/L), NPX (0,3 – 149 ng/L), KTP (0,5 -14 ng/L) y DCF (0,5 -261 ng/L). En Grecia también han sido detectados ibuprofeno (1 – 67 ng/L), naproxeno (3 – 322 ng/L), ketoprofeno (0,4 -39,5 ng/L) y diclofenaco (0,8 -1043 ng/L) (Stasinakis *et al.*, 2012). En España se ha detectado la presencia de IBU, NPX, KTP y DCF en el agua de las marismas de Doñana a concentraciones del orden de 1-2 µg/L (Camacho *et al.*, 2010). En la cuenca de los ríos Tajo-Jarama-Henares (España), el NPX estaba presente en más del 80 % de las muestras analizadas; se detectó IBU, KTP Y DCF en más del 90 % de las muestras analizadas (Fernández *et al.*, 2010). En aguas de la cuenca del Llobregat (España) se han registrado concentraciones de IBU y DCF entre 100 y 500 ng/L (Osorio *et al.*, 2012). Son por tanto unos de los PhACs cuya presencia es más frecuentemente detectada en el medio ambiente.

El ibuprofeno (IBU) es probablemente el compuesto más conocido de este grupo, consumido en grandes cantidades por todo el planeta, tiene efectos tóxicos agudos asociados a problemas endocrinos en humanos y animales (Loraine y Pettigrove, 2006; Madhavan *et al.*, 2010). Han *et al.* (2010) determinaron su EC<sub>50</sub> (342 mg/L), NOEC (<1,23 mg/L) y PNEC (0,01 µg/L) observando el crecimiento de *Scenedesmus subspicatus*, y un considerablemente bajo valor para

NOEC de 0,1 µg/L en *Daphnia magna*.

Otro de los NSAIDs cuyo uso es de los más extendidos es el naproxeno (NPX) que es utilizado para el tratamiento humano y animal, el cual presenta mayor toxicidad crónica que aguda (Yu *et al.*, 2008). Estudios de ecotoxicidad llevados a cabo por Straub y Steward (2007) en *Daphnia magna*, determinaron su EC50 (37 mg/L), NOEC (0,032 mg/L) y PNEC (4,2 µg/L). Brun *et al.* (2006) encontró el mismo valor para NOEC en *Lepomis macrochirus* y un valor EC 50 algo mayor (560 mg/L).

Otro NSAID de uso extendido es el ketoprofeno (KTP), que ha sido utilizado principalmente con fines veterinarios. Aunque Cuklev *et al.* (2012) identificaron un riesgo relativamente bajo para organismos acuáticos expuestos a concentraciones de KTP, sin embargo Naidoo *et al.*, (2010) detectaron concentraciones de KTP en carroñas de animales en la India que tenían efectos tóxicos para dos especies de buitres (*Gyps coprotheres* y *G. africanus*), y por tanto podían representar un riesgo para el medio ambiente. Mulcahy *et al.* (2003) habían descrito en aves anátidas (*Somateria fischeri* y *S. spectabilis*) los mismos efectos para el KTP que los previamente descritos para el DCF.

Las EDARs presentan un amplio abanico de rendimientos en la eliminación de estos NSAIDs, dependiendo de las características del tratamiento, los parámetros operacionales y las características propias del NSAID. Para el IBU se han detectado distintos rendimientos de eliminación, que van del 72 al 100% en diferentes EDARs de en España, China, Corea, EEUU, Suecia, Grecia, Reino Unido y los Balcanes (Luo *et al.*, 2014), siendo de amplio consenso la consideración del IBU como un PhACs fácilmente degradable. Sin embargo, para NPX, KTP y DCF hay disparidad de resultados. Luo *et al.* (2014) revisaron la literatura existente referente a estos compuestos, e informaron de la diversidad de rendimientos en su eliminación. En el caso del NPX se han identificado rendimientos entre el 43,3 y el 98,6 % en tratamientos de aguas residuales urbanas existentes en España, Suecia, Reino Unido, los Balcanes y Corea (Luo *et al.*, 2014). Los rendimientos en la eliminación de KTP presentan un rango aún mayor, desde un 10,85 al 100%; para efluentes de EDARs en España, Reino Unido, China, Corea del Sur y los Balcanes (Luo *et al.*, 2014). Respecto al DCF, En EDARs de Suecia, Grecia, Corea, Suiza y Reino Unido, se ha

observado que van desde valores negativos a valores por encima del 80 %; es decir, que a veces se ha detectado mayor cantidad de DCF en los efluentes que en los influentes (Luo *et al.*, 2014).

En los efluentes de las EDARs en Sevilla (España), IBU, NPX y KTP han sido identificados con concentraciones medias de 8.20, 2.10 y 0.84  $\mu\text{g/L}$  respectivamente (Santos *et al.*, 2009).

Dado que la presencia de estos compuestos en el medio representa un riesgo para el medio ambiente y para la salud, unido a su distribución cosmopolita (Evgenidou *et al.*, 2015), entre los distintos grupos de fármacos, es de interés estudiar los NSAIDs. Dentro de este grupo, se tomaron como modelo algunos de los compuestos de uso más extendido y más frecuentemente encontrados en aguas: IBU, NPX, KTP y DCF.

#### **1.1.3.4. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)**

Entre los COPs clásicos se encuentran los PAHs, grupo de xenobióticos identificados como contaminantes desde hace décadas. Debido a su amplia distribución y persistencia, unidas a sus características tóxicas, carcinogénicas y/o mutagénicas (Busetti *et al.*, 2006), 16 PAHs han sido incluidos en la lista de sustancias prioritarias de la Unión Europea; igual número de PAHs fueron incluidos en la lista equivalente de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos para controlar su presencia en el medio ambiente (CE, 2001/2455; USEPA, 1987).

A pesar de las medidas de control establecidas en las últimas décadas, que han permitido reducir sus concentraciones en la fauna marina, se ha observado en ecosistemas árticos que su concentración en tejidos de invertebrados ha aumentado de 10 a 30 veces desde 1985 (Laender *et al.* 2011), y han pasado a ser el principal grupo de COPs clásicos en esta región. Similar situación ha sido descrita por Khim y Hong (2014) en sedimentos a lo largo de la costa de Corea, donde son considerados uno de los principales contaminantes. Estos datos son preocupantes, ya que los PAHs pueden tener efectos carcinogénicos y mutagénicos (Letcher *et al.*, 2010).

Los PAHs son derivados poliméricos del benceno, compuestos formados por dos o más anillos aromáticos fusionados compartiendo un par de átomos de carbono. La estructura resultante es una molécula donde todos los átomos de carbono e hidrógeno se encuentran en el mismo plano. Los diversos PAHs se diferencian por el número de anillos aromáticos, las posiciones en la que dichos anillos se fusionan unos con otros, y el número, composición química y posición de los posibles sustituyentes.

Las características físico-químicas de los PAHs varían con el peso molecular: la resistencia de los PAHs a la oxidación, reducción y vaporización es mayor conforme aumenta el peso de la molécula, mientras que la solubilidad en agua disminuye. Como resultado, los PAHs difieren en su comportamiento, distribución en el medio y efectos en los sistemas biológicos, pudiendo dividirse en dos grandes grupos basados en sus características físicas, químicas y biológicas:

- PAHs de bajo peso molecular, formados por 2, 3 y 4 anillos aromáticos, como naftaleno, fenantreno, antraceno, fluoranteno o pireno, presentan elevada toxicidad en los organismos (Zheng *et al.*, 2007);
- PAHs de alto peso molecular que poseen de cinco a siete bencenos, como el perileno, rubiceno o coroneno, algunos de los cuales son conocidos por su potencial carcinogénico o mutagénico.

Como resultado de su estructura química, son compuestos muy estables, de naturaleza hidrofóbica con un elevado coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) y una alta afinidad por la materia orgánica ( $K_{oc}$ ), lo cual juega un papel fundamental en la acumulación de estos en los sedimentos de las masas de agua. Estas características hacen que los PAHs que llegan al medio acuático se asocien fácilmente a las partículas suspendidas en la columna de agua, y se sedimenten en los fondos (Koh *et al.*, 2002; Khim y Hong, 2014). Esta concentración en los fondos de los ecosistemas, unida a sus características da como resultado una tendencia a acumularse en los organismos acuáticos (Laender *et al.* 2011).

Los PAHs se generan principalmente por la combustión incompleta de la materia orgánica a elevadas temperaturas (500-900 °C). Las fuentes de PAHs pueden ser de origen natural o



antropogénico, entre las primeras destacan: los incendios forestales. La cantidad y tipo de los PAHs originados va a depender de la naturaleza del combustible, del tipo de fuego y la intensidad del mismo. La actividad volcánica y la biosíntesis por parte de microorganismos y plantas, son otras fuentes naturales de PAHs. Suelen adsorberse sobre partículas atmosféricas y posteriormente llegan al medio terrestre o acuático por la deposición de éstas (Blanchard *et al.*, 2004). Las fuentes antropogénicas generan un volumen mucho mayor de PAHs, entre estas cabe destacar, por su carácter numeroso y difuso, la combustión de los vehículos que utilizan combustible fósil. Cualquier otro proceso doméstico o industrial en el que el carbono sea sometido a elevadas temperaturas producirá PAHs, así se consideran fuentes de los mismos: las calefacciones, plantas industriales que requieran quema de combustibles, plantas generadoras de derivados del petróleo, etc. Algunos PAHs se utilizan en medicina y para la fabricación de plásticos y pesticidas pero esta producción comercial no es una fuente significativa de estos compuestos para el medio ambiente (Blanchard *et al.*, 2004; Brandli *et al.*, 2007)

Los PAHs han sido considerados uno de los grupos de COPs más complicados de eliminar, debido a la elevada estabilidad que les confieren sus características físico-químicas (Volkering y Breure, 2003). Estos compuestos llegan a las EDARs provenientes de las aguas residuales domésticas, las aguas industriales, así como de posibles vertidos accidentales, y tras deposición atmosférica arrastrados por las escorrentías superficiales (Blanchard *et al.*, 2004; Sánchez-Ávila *et al.*, 2009).

Diversos autores indican que aumentan considerablemente las concentraciones de PAHs en las aguas residuales durante el periodo invernal, cuando se dispara el consumo de las calefacciones domésticas. Pudiendo llegar a ser 10 y 20 veces superiores a las registradas durante el resto del año, Manoli y Samara (1999) registran este fenómeno en la ciudad de Tesalónica (Grecia), Pham y Prolux (1997) lo hacen en la región de Montreal (Canadá) y Blanchard *et al.* (2004) en el área de Paris, este último también determinó una relación entre los periodos de lluvias y el aumento de la presencia de PAHs en las aguas residuales urbanas debido a la escorrentía superficial.

Por consiguiente, las concentraciones de PAHs en aguas residuales son bastante diversas. Para aguas residuales de origen mixto, se han registrado valores en un rango de 2.69-27.7 µg/l

(Tabla 1.5). Con una mayor presencia de compuestos de bajo peso molecular (2-4 anillos aromáticos) (Blanchard *et al.*, 2004).

Se ha detectado fluoranteno en bajas concentraciones (de media 1,17 ng/L) en aguas subterráneas de Barcelona (Teijon *et al.*, 2010). También detectaron benzo(a)pireno y otros PAHs,

**Tabla 1.5.** Concentraciones de PAHs detectadas en aguas residuales.

<b>Aguas residuales urbanas y mixtas</b>	<b><math>\Sigma</math> PAHs (<math>\mu</math>/L)</b>	<b>Referencia</b>
Paris	27.7	Blanchard <i>et al.</i> , 2004
Mataró	2.69 - 26.4	Sánchez-Ávila <i>et al.</i> , 2009
Venecia	3.36 - 4.62	Busetti <i>et al.</i> , 2006
Tesalónica	11.2	Manoli y Samara, 2008

La naturaleza hidrófoba y lipofílica de estos compuestos, que determina que sean fácilmente asociados a la materia orgánica particulada, hace que la mayoría de los PAHs se encuentran asociados a la materia orgánica del agua residual que llega a las EDARs, esta distribución se hace más acusada a medida que aumenta el número de anillos aromáticos de los PAHs. A medida que aumenta el número de anillos aromáticos va disminuyendo la cantidad de PAH presente en la fase disuelta: 2 anillos (65%), 3 anillos (31%), 4 anillos (26%), 5 anillos (21%), 6 anillos (20%) (Byrns, 2001; Blanchard *et al.*, 2004). Por tanto, los PAHs son fácilmente retirados del agua residual tanto en la primera etapa del tratamiento como en la segunda por medio de los decantadores y se concentran en la corriente de tratamiento de fangos (Busetti *et al.*, 2006).

Existen otras vías de retirada de PAHs en los tratamientos de fangos activos tales como la volatilización, la advección, la biodegradación/biotransformación (en función de los metabolitos secundarios resultantes) y el arrastre por aire (*air-stripping*). Estos procesos tienen mayor o menor importancia en función de las características del compuesto (coeficiente de partición octanol/agua  $\text{Log } K_{ow}$ , constante de Henry  $\text{Log } H_w$ , peso molecular), las características del agua residual, del tipo de proceso y de las condiciones de operación (Tiempo de Retención Hidráulica, Tiempo de

Retención Celular) (Byrns, 2001, Manoli y Samara, 2008). Esto supone que a menor número de anillos aromáticos se observa mayor facilidad de eliminación en los tratamientos de aguas residuales (Zheng *et al.*, 2007; Blanchard *et al.*, 2001).

Algunos resultados indican que los tratamientos de fangos activos presentan una elevada eficiencia en la retirada de los PAHs del agua residual que puede alcanzar el 92%, otros autores encontraron rendimientos menores (entre 37-89% dependiendo del PAHs) (Blanchard *et al.*, 2004; Manoli y Samara, 2008). Por otro lado los rendimientos para tratamientos químicos se sitúan entre el 61% y el 78% (Vogelsang *et al.*, 2006), bastante inferiores a los obtenidos en los CASP

#### **1.1.4. Los Biorreactores de Membrana sumergida y su papel en la eliminación de xenobióticos**

La eliminación de los contaminantes xenobióticos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales depende de las características del compuesto y de la naturaleza del proceso. Diversos estudios confirman que muchos xenobióticos son relativamente eliminados durante los tratamientos convencionales de fangos activos sin embargo otros apenas son eliminados y alcanzan las masas de agua a través de los efluentes de EDARs convencionales. Teniendo en cuenta las características expuestas sobre los xenobióticos, se hacen necesarios tratamientos complementarios a los convencionales o tratamientos alternativos para garantizar la eliminación de dichos compuestos.

Como alternativa a los tratamientos de fangos convencionales para el tratamiento de aguas residuales se encuentran los biorreactores de membrana sumergida (MBR). El principio del proceso biológico de degradación es el mismo que en los fangos activos convencionales, salvo que la separación sólido-líquido del fango activo se realiza por filtración a través de una membrana (Judd, 2011). Los primeros ensayos sobre el uso de fangos activos combinados con membranas datan de la década de 1960, pero hasta la década de los 80s no se desarrollan determinados avances que permiten su implantación con usos comerciales. En 1993 se construyen en Japón las primeras plantas de tratamiento de aguas basadas en la combinación de membranas con un sistema de fangos activos (Aya, 1994). A lo largo de la década de 1990 se produce un desarrollo notable de

los MBR que pasan a consolidarse como una alternativa a los CASP, siendo actualmente una tecnología madura, establecida en miles de plantas que tratan aguas residuales urbanas e industriales en todo el planeta (Judd, 2011; Krzeminski *et al.*, 2017).

Se estima que para el año 2019 más de 5 millones de metros cúbicos de aguas residuales serán tratados diariamente en todo el mundo mediante plantas de tratamientos de aguas con tecnología MBR. Actualmente las principales investigaciones sobre MBR tienen como objetivo aspectos relacionados con el ensuciamiento y limpieza de las membranas, la modelización de los procesos, la adición de carbón activo, el tratamiento de aguas residuales industriales y la eliminación de contaminantes emergentes (Krzeminski *et al.*, 2017).

Los sistemas MBR presentan ciertas ventajas:

- construcción de instalaciones más reducidas, el proceso MBR requiere menos espacio que los CASP reduciendo costes e impactos en el medio (Judd, 2008).
- control independiente del tiempo de retención hidráulica (HRT) y el tiempo de retención celular (SRT), el sistema MBR que permite trabajar con HRT y SRT considerablemente mayores a los habituales. El elevado SRT puede permitir el desarrollo de comunidades microbianas de lento crecimiento y capaces de degradar compuestos más complejos, además de reducir la producción de la purga (Judd, 2008).
- comportamiento más robusto frente a muchas variaciones en el agua residual a tratar (Arévalo *et al.*, 2012).
- efluentes de mayor calidad, (Judd, 2008; Arévalo *et al.*, 2012).

La calidad del efluente de un sistema MBR es comparable a la de sistemas que combinan un CASP con una etapa de tratamiento terciario (Arévalo *et al.*, 2009). Los MBR alcanzan una elevada eficacia en la eliminación de materia orgánica (DBO<sub>5</sub> y DQO) y nutrientes (N, P), así como la total eliminación de los sólidos en suspensión (Mozo *et al.*, 2011). Respecto a indicadores bacterianos fecales, también presentan una alta eficacia en su eliminación (Arévalo *et al.*, 2012). No obstante, al tratarse de una tecnología de expansión relativamente reciente, existe menos

conocimiento sobre el comportamiento de los MBR en la eliminación los xenobióticos. Debido a las particularidades del proceso de MBR, el comportamiento de estos contaminantes puede ser distinto al observado en los CASP dependiendo de las características del proceso y la naturaleza de la sustancia (Clara *et al.*, 2005; Maeng *et al.*, 2013). Se considera que la asociación con el fango y la biodegradación son los principales mecanismos de eliminación para muchos los contaminantes orgánicos. Estos mecanismos están estrechamente influenciados por el HRT y el SRT, parámetros que en los MBR presentan mayores valores que en los sistemas de fagos activos.

Como consecuencia de sus características apolares e hidrófobas, muchos xenobióticos tienden a asociarse con las partículas y la biomasa durante el tratamiento biológico; esto sugiere que los sistemas MBR tenderían a retirar los compuestos de la fracción acuosa y concentrarlos en el fango. (Belgiorno *et al.*, 2007). Por tanto, un mayor SRT puede permitir el desarrollo de microorganismos de crecimiento lento capaces de degradar determinados xenobióticos. Por otro lado, un elevado HRT provee al sistema de mayor tiempo de contacto entre el agua a tratar y la biomasa responsable del proceso de degradación.

En la última década, distintos autores han llevado a cabo investigaciones para evaluar el comportamiento de los MBR en la eliminación de determinados grupos de contaminantes emergentes. Como resultado se ha informado de la eficacia de los MBR para la eliminación de algunos de estos compuestos, en muchos casos superior a las observadas en sistemas CASP (Luo *et al.*, 2014; Vieno y Sillanpää, 2014). Los sistemas MBR podrían presentar mayores rendimientos en la eliminación de xenobióticos, dado que pueden mantener unos HRT y SRT mucho más elevados (Vieno y Sillanpää, 2014, Luo *et al.* 2014). Maeng *et al.* (2013), estudiaron la eliminación PPCPs mediante sistemas MBR a escala de laboratorio trabajando a tres SRT distintos (8, 20 y 80 d) concluyendo que para determinadas sustancias, entre las que se encuentra el KTP, el rendimiento en la eliminación está directamente relacionado con el SRT. Sin embargo, a pesar de que los MBRs pueden presentar mayores rendimientos en la eliminación de algunos compuestos, otros pueden presentar una menor biodegradabilidad y mostrar rendimientos limitados a la hora de su eliminación (Kruglova *et al.*, 2016).

Trinh *et al.* (2016) estudiando un MBR durante un periodo anual, ha encontrado una alta eliminación de determinados compuestos como atenolol (> 80%), cafeína (>95%) o naproxeno (> 95%), mientras que el mismo MBR no era capaz de eliminar el 50% del DCF presente en el influente. Otros autores han realizado estudios comparados entre sistemas MBR y CASP, Clara *et al.* (2005) informaron de resultados muy parecidos en ambos sistemas en cuanto la eliminación de IBU, un compuesto fácilmente degradable. Radjenovic *et al.* (2007) encontraron mayor rendimiento en la eliminación en el MBR para distintos NSAIDs, superiores al 90% para IBU, NPX y KTP, excepto para el DCF que era mayor de un 80%; los cuatro NSAIDs eran eliminados más eficazmente en el MBR, pero en el caso del DCF y KTP, el rendimiento en el MBR era entre un 70 y un 80% mayores que los registrados en el CASP.

Otros xenobióticos como el gemfibrozil, el atenolol y algunos antibióticos presentaban el mismo comportamiento; sin embargo para la CBZ registraron rendimientos negativos con un incremento de la concentración de CBZ tras el tratamiento, este incremento era más notable en el MBR (Radjenovic *et al.*, 2007). Este suceso también fue descrito para el DCF en CASP, que en efluentes de EDARs del Sur de Suecia estaba presente a concentraciones dos veces mayores a la registrada en el influente (Zorita *et al.* 2009); Kim *et al.* (2007) obtuvo similares resultados en MBRs (incrementos del 300 % en la concentración de DCF).

Las principales vías de eliminación retirada de los PAHs presentes en los tratamientos de fangos activos son la volatilización, la advección, la biodegradación/biotransformación (en función de los metabolitos secundarios resultantes) y el arrastre por aire (*air-stripping*). Estos procesos tienen mayor o menor importancia en función de las características del compuesto (coeficiente de partición octanol/agua  $\text{Log } K_{ow}$ , constante de Henry  $\text{Log } H_w$ , peso molecular), las características del agua residual, del tipo de proceso y de las condiciones de operación (SRT y HRT) (Manoli y Samara, 1999 y 2008; Byrns, 2001). La naturaleza hidrófoba y lipofílica de estos compuestos determina que sean fácilmente asociados a la materia orgánica particulada y, unidos a ésta, son fácilmente retirados del agua residual tanto en la primera etapa del tratamiento como en la segunda y se concentran en la corriente de tratamiento de fangos (Beck *et al.*, 1996; Buseti *et al.*, 2006).

Algunos resultados indican que los CASP presentan una elevada eficiencia en la eliminación de los PAHs presentes en residuales, superiores al 90 % (Sánchez-Ávila *et al.*, 2009), otros autores encontraron rendimientos menores (entre 37-89%, dependiendo del PAHs) (Manoli y Samara, 2008). Por otro lado los rendimientos para tratamientos químicos se sitúan entre el 61% y el 78% (Vogelsang *et al.*, 2006), bastante inferiores a los obtenidos en los CASP.

**Tabla 1.6.** Rendimientos en la eliminación de PAHs (%) para sistemas CASP y MBR (Fatone *et al.*, 2011).

PAH	ASTP - A	MBR - A	ASTP - B	MBR - B
Naftaleno	24	56	88	94
Fenantreno	73	77	94	88
Pireno	33	na	86	88
Fluoranteno	72	na	91	87

En el caso de los MBRs, los rendimientos en la eliminación de los PAHs son similares a los observados en los CASP. Para algunos compuestos e instalaciones, el MBR puede presentar un rendimiento algo mayor o menor que el CASP (Tabla 1.5.), sin embargo no está claro el motivo de estas diferencias.

Teniendo en cuenta lo expuesto, los MBR representan una buena alternativa a tener en cuenta para la eliminación de determinados xenobióticos.

## **1.2. Definición del problema y justificación del trabajo de investigación**

La tecnología MBR se ha mostrado eficaz en la eliminación de materia orgánica disuelta, reducción de nitrógeno y desinfección física de las aguas residuales. Por otro lado, los mecanismos por los cuales son parcialmente eliminados los diferentes xenobióticos en los CASP de aguas residuales son la biotransformación o biodegradación, la volatilización o la adsorción sobre fango, dependiendo de la naturaleza del compuesto. Determinadas variables del proceso biológico como

el SRT Y HRT afectan a la eliminación de estas sustancias (Clara *et al.*, 2005b; Radjenović *et al.*, 2007), y los MBRs presentan mayores valores que los tratamientos convencionales para estos parámetros, pudiendo representar una interesante opción para su eliminación.

Recordemos que los xenobióticos son un grupo extremadamente amplio, los distintos compuestos tienen naturalezas químicas diferentes y por tanto su comportamiento durante el tratamiento de aguas residuales y en el medio ambiente es muy diverso, del mismo modo que los riesgos que pueden representar para el medio ambiente y la salud pública. Durante los últimos quince años, diversos autores han centrado sus esfuerzos en el estudio de los xenobióticos, y aunque estos estudios han aportado mucha información para entender el comportamiento de estos contaminantes, podríamos aventurarnos a considerar que, aún hoy solo conocemos la punta del iceberg, es necesario identificar los mecanismos adecuados para la correcta eliminación de estos compuestos de las aguas residuales, mediante la aplicación de nuevos tratamientos de depuración o el desarrollo de los existentes.

Por tanto, es primordial realizar nuevas investigaciones en el campo de los xenobióticos que aporten más conocimiento sobre el comportamiento, los efectos, el destino y la eliminación de dichas sustancias durante el ciclo del agua. De esta forma, este estudio pretende analizar el comportamiento de determinados contaminantes xenobióticos a lo largo del tratamiento de aguas residuales urbanas en MBR, y la eliminación de los mismos.

Entre los distintos xenobióticos, se han seleccionado tres grupos de compuestos que llaman la atención por distintos motivos:

- Fármacos que presentan una elevada resistencia a los tratamientos convencionales y por tanto una elevada persistencia en el medio ambiente, como la carbamacepina y el diclofenaco (DCF), cuyos efectos negativos para el medio ambiente presentan un riesgo considerable.
- Fármacos considerados menos resistentes a la degradación, pero de abundante uso, como el ibuprofeno (IBU), naproxeno (NPX) y el ketoprofeno (KTP).



- Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), cuya elevada toxicidad, persistencia y distribución les hace representar un serio riesgo para la salud pública y el medio ambiente.

### **1.3. Diseño y estructura del Trabajo de Investigación**

El presente trabajo de investigación se ha desarrollado como resultado del Proyecto de Investigación *Estudio de Tecnologías Avanzadas para la Eliminación de Nutrientes y Xenobióticos en el Tratamiento de Aguas Residuales*. (Subvencionado por la Secretaría de Estado de Medio Rural y Agua del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino con nº de referencia 094/RN08/03.1), en cuyo desarrollo colaboraron el grupo de investigación Tecnologías para la Gestión y el Tratamiento del Agua (TEP-239) de la Universidad de Granada y el departamento de I+D de la empresa CADAGUA.

Uno de los objetivos del mencionado proyecto fue “Valorar la capacidad de retención y eliminación de los xenobióticos más destacados en aguas residuales urbanas mediante un sistema MBR”. Para ello se seleccionaron dos de los grupos de xenobióticos más importantes, los fármacos entre los considerados contaminantes emergentes y los PAHs entre los contaminantes clásicos.

Los fármacos, son uno de los grupos de contaminantes emergentes cuyas entradas al medio ambiente han experimentado un mayor crecimiento en los últimos años. Sus potenciales efectos negativos varían de unos a otros al ser un grupo muy diversos, como ya se expuso hay más de 3000 fármacos reconocidos en Europa. Algunos fármacos presentan una mayor degradación, entre ellos destacan los NSAIDs que al ser muy consumidos, son constantemente detectados en el medio acuático. Otros fármacos tienen unas tasas de consumo menores pero, debido a su elevada resistencia a la degradación, pueden presentar una elevada persistencia en el medio acuático; entre estos compuestos se seleccionó la carbamacepina. Todos los fármacos estudiados durante la presente investigación han sido identificados como causantes de distintos efectos negativos para los organismos vivos, y por tanto es necesario profundizar en el conocimiento sobre su comportamiento y su eliminación, que permitan un mejor control de estas sustancias.

Los PAHs fueron seleccionados porque son un grupo con una amplia distribución y elevada persistencia, reconocidos como contaminantes desde hace décadas por sus efectos tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos. A pesar de ser considerados como contaminantes prioritarios en Europa y EEUU, y de las medidas para su control llevadas a cabo, siguen siendo contaminantes habituales en muchos ecosistemas. Por tanto pueden considerarse uno de los grupos de COPs más importantes, y aún requieren estudios que puedan ayudar a su mejor control y eliminación con el objetivo de reducir los riesgos que representan para el medio ambiente y la salud pública.

Para el desarrollo de la investigación se realizó un seguimiento de la presencia de diferentes contaminantes en las aguas residuales urbanas. Entre los PAHs fueron habituales el fenantreno, fluoranteno y pireno; mientras que entre los fármacos, se detectó frecuentemente la presencia de algunos NSAIDs como el diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno, y otros fármacos con mayor resistencia a la degradación entre los que destaca por sus características la CBZ. Sobre estas sustancias se valoró la eficacia y eficiencia en su eliminación mediante la tecnología MBR. Para determinar la capacidad de eliminación/retención de los diferentes xenobióticos se utilizó una instalación experimental a escala real, trabajando en continuo y alimentada con agua residual urbana pretratada.

La instalación experimental, diseñada por el grupo de investigación de la Universidad de Granada, constaba de dos sistemas MBR experimentales, ambos configurados en pre-desnitrificación y compuestos por un biorreactor anóxico, un biorreactor aireado y un tanque de membranas. Uno de los biorreactores estaba equipado con membranas planas de microfiltración (Kubota) con 0,4  $\mu\text{m}$  de diámetro medio de poro fabricadas en polietileno clorado. El otro biorreactor estaba equipado con membranas de fibra hueca de ultrafiltración (Zenon-General Electric Company), cuyo tamaño medio de poro era de 0,034  $\mu\text{m}$ , con una trenza textil interior recubierta con polivinilideno fluoruro (PVDF). El diseño de la instalación se realizó por el grupo de investigación *Tecnologías para la Gestión y Tratamiento del Agua* de la Universidad de Granada, y posteriormente se ha modificado en función de los requerimientos de las investigaciones y los problemas operacionales surgidos. La instalación se sitúa en la estación depuradora de aguas residuales EDAR-Sur de la ciudad de Granada, ambos MBR son alimentados con agua residual

urbana proveniente del pretratamiento de la EDAR-Sur tras el desbaste, desarenado y desengrasado.

Como novedad tecnológica se presenta el estudio de la eliminación de contaminantes emergentes mediante la tecnología MBR en una instalación experimental a escala real, trabajando con HRT y SRT más elevados de los habituales para esta tecnología en instalaciones reales y de forma simultánea a la eliminación de materia orgánica y nitrógeno del agua. Estudios previos han demostrado que mayores SRTs incrementan el rendimiento en la eliminación de determinados xenobióticos debido al incremento de la diversidad microbiana y a mayor tiempo de contacto entre el fango activo y los compuestos orgánicos. Pueden verse incrementados diferentes mecanismos como la asociación con la biomasa o la biodegradación al posibilitar el crecimiento de determinados microorganismos de lento crecimiento capaces de degradar compuestos resistentes. Por este motivo, durante la realización del presente trabajo, el HRT fue de 34 horas para el análisis de los PAHs, y de 35 horas para los realizados con el resto de sustancias. Mientras que el SRT fue de 12 y 25 días para los PAHs, para los NSAIDs fue de 37 días y en el caso de la CBZ se alcanzaron los 40 días de SRT.

Esta tesis doctoral está dividida en las siguientes secciones: introducción, objetivos, capítulos intermedios para las distintas etapas de la investigación (capítulos 3, 4, 5 y 6), conclusiones, y líneas futuras de investigación.

En el capítulo de Introducción se realiza una revisión de la literatura científica, comenzando por la problemática de la escasez de recursos hídricos y como la reutilización de las aguas se presenta como posible solución, posteriormente se evalúan los riesgos que podría acarrear la presencia de xenobióticos en las aguas residuales tratadas y en las aguas regeneradas, centrándonos en dos grupos representativos (los fármacos y los PAHs). Finalmente se repasa la literatura referente al uso de MBR como tecnología para el tratamiento de aguas residuales y sus ventajas respecto a las CASP que podrían hacerla una herramienta eficaz en el control de estos contaminantes. Por tanto la definición del problema y la motivación de la investigación quedan expuestos en este apartado.

El capítulo de Objetivos recoge el objetivo principal del estudio, así como los objetivos distintos objetivos secundarios de cada etapa de la investigación.

Los capítulos intermedios cubren las distintas partes de la investigación e incluyen sus propias secciones de introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, y conclusiones. Todos han sido publicados en distintas revistas científicas.

Capítulo 3: Comportamiento y destino de un fármaco con elevada resistencia a la degradación (*Comportamiento y efectos de las carbamacepina en un sistema MBR para el tratamiento de aguas residuales urbanas, trabajando con elevados tiempos de retención celular e hidráulica*). Capítulo 4: Determinar el comportamiento y la eficiencia en la eliminación de los NSAIDs (*Comportamiento de los principales fármacos antiinflamatorios no esteroideos en biorreactor de membrana sumergida tratando agua residual urbana con un elevado tiempo de retención hidráulica y celular*). Capítulo 5: conocer los principales mecanismos que intervienen en la eliminación de los PAHs (*Eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua residual mediante un biorreactor de membrana sumergida*). Debido a los resultados obtenidos en el capítulo 5, se consideró oportuno seguir profundizando en el comportamiento de los PAHs para comprender mejor su eliminación mediante el arrastre por aire, y poder descartar la presencia de otro mecanismo relevante en su eliminación. Para ello se realizó otro estudio recogido en el capítulo 6 (*Eliminación de bajas concentraciones de fenantreno, fluoranteno y pireno de agua residual urbana mediante tecnología MBR*).

Para concluir, el capítulo de Conclusiones recoge las principales deducciones y resultados obtenidos mediante la presente investigación. Y en el capítulo de Líneas futuras de investigación recoge aquellas cuestiones no resueltas o resultantes de las respuestas encontradas mediante esta investigación, que requieren de especial atención en investigaciones futuras.

## **CAPÍTULO 2**



## **2. Objetivos de la investigación**

El objetivo principal del trabajo de investigación es valorar la eficacia de la tecnología de biorreactores de membranas sumergida (MBR) en la eliminación de xenobióticos de las aguas residuales urbanas bajo condiciones de elevado tiempo de retención celular (SRT) y elevado tiempo de retención hidráulica (HRT).

Para ello se determinó la presencia de los diferentes contaminantes en el agua residual de alimentación, en las distintas etapas del proceso MBR y en el efluente, con el objeto de realizar balances de materia para cada uno de los contaminantes considerados. Teniendo en cuenta los diferentes compuestos analizados durante la investigación se establecen los siguientes objetivos secundarios:

- Evaluar el comportamiento y destino de la CBZ presente en agua residual urbana durante el tratamiento en un MBR a escala real, trabajando con un SRT y un HRT mayores que los utilizados habitualmente en instalaciones reales, así como su efecto en la actividad bacteriana y eficiencia del proceso (Capítulo 3).
- Determinar el comportamiento y la eficiencia en la eliminación de ibuprofeno, diclofenaco,

naproxeno y ketoprofeno presentes en aguas residuales urbanas durante el tratamiento mediante un MBR experimental a escala real, trabajando con elevados valores de SRT Y HRT (Capítulo 4).

- Conocer los principales mecanismos que intervienen en la eliminación de los PAHs existentes en el agua residual urbana durante el tratamiento en un MBR mediante ensayos a escala de laboratorio y valorar su potencial toxicidad sobre el proceso biológico (Capítulo 5).
- Determinar los principales mecanismos que intervienen en la eliminación de los PAHs en un sistema MBR a escala real, tratando agua residual con bajas concentraciones de PAHs (Capítulo 6).



### **CAPÍTULO 3**

*Este capítulo corresponde al artículo titulado "Carbamazepine behaviour and effects in an urban wastewater MBR working with high sludge and hydraulic retention time" publicado en Journal of Environmental Science and Health, Part. A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering en Mayo de 2016.*



### **3. Comportamiento y efectos de las carbamacepina en un sistema MBR para el tratamiento de aguas residuales urbanas, trabajando con elevados tiempos de retención celular e hidráulica.**

#### **3.1. Introducción**

Los fármacos y productos de higiene y cuidado personal (pharmaceuticals and personal care product, PPCP), los cuales se han asociado con diversos efectos negativos en organismos acuáticos y en sus hábitats, son consumidos globalmente y por tanto son frecuentemente detectados en el medio acuático (Ruhmland *et al.*, 2015). Actualmente, existe consenso respecto a que las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) convencionales no están diseñadas para la eliminación cuantitativa de microcontaminantes (Binelli *et al.*, 2014) y sus efluentes constituyen la principal vía por la cual los fármacos de consumo humano llegan a las masas de agua (Zhang *et al.*, 2008).

La carbamacepina (CBZ), un fármaco antiepiléptico de uso oral, es excretado en formas metabolizadas a través de las heces y la orina (Zhang *et al.*, 2008). Este fármaco es un microcontaminante con muy pobre biodegradabilidad, considerado uno de los fármacos más recalcitrantes (Zhang *et al.*, 2011) existente en los influentes de las EDARs de todo el mundo,

presentando concentraciones de 0,04 – 4,4 µg/L (Clara *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Vieno *et al.*, 2007; Carranza-Díaz *et al.*, 2014). El bajo rendimiento en la eliminación de la CBZ durante los tratamientos de aguas residuales puede atribuirse a sus propiedades físico-químicas (Bernhard *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2011) y su pobre eliminación está relacionada con la sorción sobre las superficies orgánicas disponibles (Zhang *et al.*, 2011; Carranza-Díaz *et al.*, 2014).

Los biorreactores de membrana sumergida (MBR) representan una tecnología emergente en el tratamiento de aguas residuales basada en la combinación de un proceso biológico de fangos activos con una separación física sólido/líquido realizada por una membrana, capaz de producir efluentes directamente reutilizables (Arevalo *et al.*, 2012). En función de la calidad final deseada para el agua tratada, pueden utilizarse diferentes configuraciones en los sistemas MBR (Gonzalez-Perez *et al.*, 2012), además los MBR pueden operar con elevados tiempos de retención celular (SRT) y/o elevados tiempos de retención hidráulica (HRT) (Arevalo *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2010), los cuales podrían permitir el desarrollo de bacterias de crecimiento lento y comunidades microbianas más diversas, capaces de degradar compuestos orgánicos específicos (Aubenneau *et al.*, 2010). Por otra parte, es posible mantener una mayor concentración de biomasa en el sistema gracias a los mayores SRT, de este modo el contacto entre las superficies orgánicas y los microcontaminantes es posible. Bajo estas condiciones operacionales, diversos PPCPs podrían acumularse en el interior del sistema (Maeng *et al.*, 2013). Sin embargo, una elevada concentración de PPCPs puede afectar negativamente a las comunidades bacterianas del fango activo, generando posibles cambios en las distintas poblaciones bacterianas, en la capacidad de tratamiento del sistema y en la calidad del efluente final (Ahmed *et al.*, 2012).

La eficacia de los MBR en la eliminación de microcontaminantes está relacionada con la capacidad del sistema para funcionar bajo condiciones operacionales no convencionales, tales como un elevado SRT y un elevado HRT. Debido a las características de las CBZ, se ha trabajado con sistemas MBR con elevado HRT con la intención de permitir un contacto más prolongado entre la CBZ y las partículas del fango (Bernhard *et al.*, 2006; Radjenovic *et al.*, 2009; Maeng *et al.*, 2013). De esta forma, un HRT muy elevado, quizás, podría ayudar a la eliminación de la CBZ mediante la sorción sobre las partículas del fango y/o mediante la biodegradación.

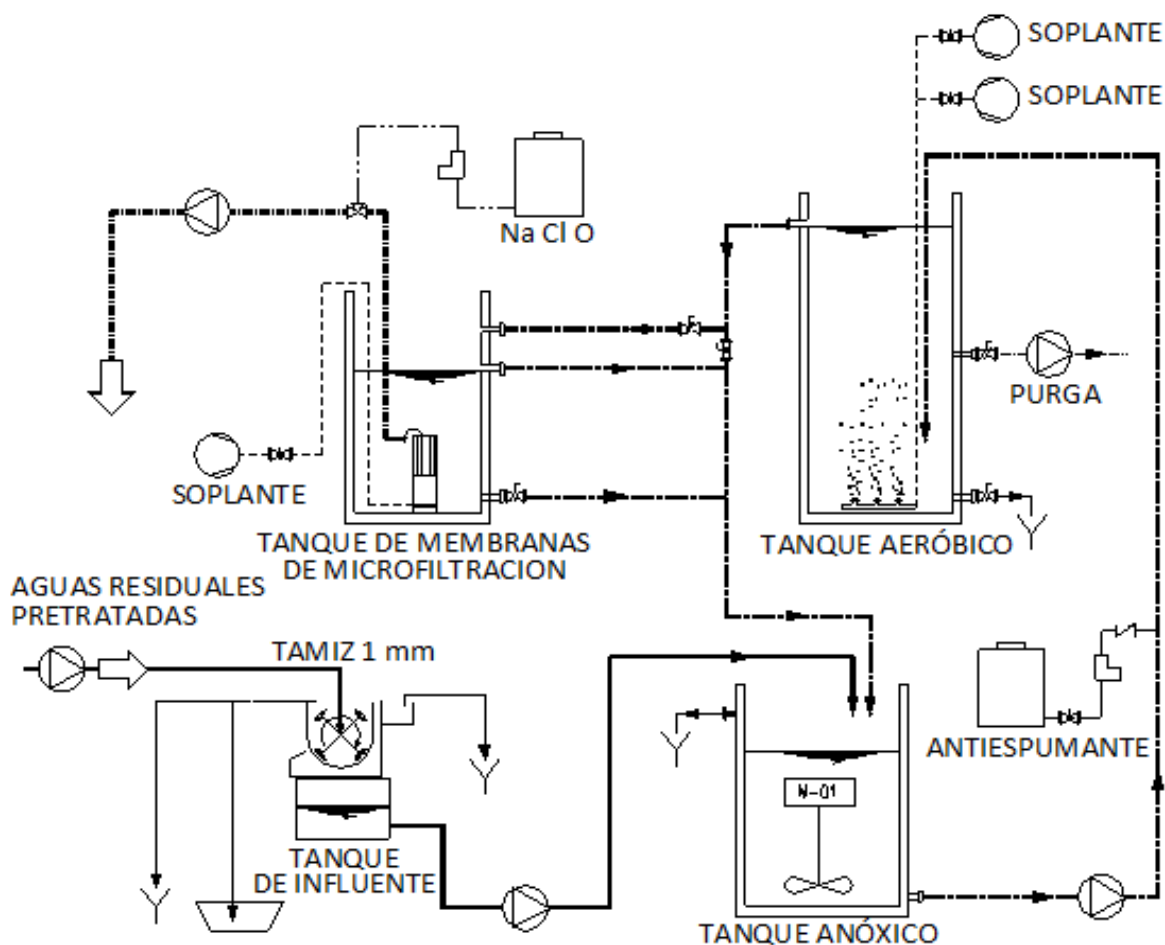
Por tanto, el objeto del presente estudio fue evaluar el comportamiento y el destino de la CBZ, presente en aguas residuales urbanas, durante el tratamiento en un MBR experimental a escala real, trabajando con valores de SRT y HRT más elevados que los utilizados habitualmente en las instalaciones reales. Así mismo, los posibles efectos sobre el rendimiento del sistema y la actividad bacteriana fueron monitorizados y evaluados mediante respirometría.

## **3.2. Materiales y Métodos**

### **3.2.1. La planta piloto**

Para la realización de este estudio se utilizó una instalación experimental a escala real, con capacidad para tratar  $10,8 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ . El sistema estaba formado por un biorreactor anóxico ( $4 \text{ m}^3$ ), un biorreactor aireado ( $20 \text{ m}^3$ ) y un reactor de membranas ( $4 \text{ m}^3$ ), donde el fango activo y el permeado fueron separados, trabajando con una configuración en pre-desnitrificación (Fig. 3.1). El fango era purgado diariamente desde el biorreactor aireado, con la finalidad de obtener un SRT de 40 días. El HRT para la instalación completa fue de 35 horas.

El reactor de membranas fue equipado con membrana hidrofóbica plana de microfiltración (MF-FS) fabricadas por la compañía Kubota (Japón), trabajando con un caudal constante de permeado  $Q = 0.42 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  y un caudal de recirculación entre biorreactores de  $4Q$ . Las membranas fabricadas en polietileno clorado (PE) presentaban un tamaño de por medio de  $0,4 \mu\text{m}$ . El sistema estaba alimentado con agua residual urbana real, tras pasar por un tamiz con una luz de malla de 1mm. Influyente, efluente, purga, y parámetros operacionales tales como oxígeno disuelto (OD), pH, temperatura, y presión transmembrana (TMP) fueron continuamente monitorizados. La tabla 3.1 recoge las principales características del fango activo del MBR analizado.



**Figura 3.1.** Diagrama esquemático de la instalación MBR.

### **3.2.2. Procedimiento experimental**

Para el balance de la CBZ, se añadió CBZ (Sigma-Aldrich. Número CAS 298-46-4) al influente del MBR, y se tomaron muestras de influente, efluente, purga, y fango activo de los diferentes reactores. Se tomaron muestras compuestas diarias de cada punto, mediante el uso de una bomba peristáltica reversible; las muestras eran almacenadas en botellas de 5 L de cristal oscuro con tapón de teflón, manteniéndose refrigeradas a 4 °C, analizándose durante las siguientes 48 h.

Antes, durante, y después de la adición de CBZ, el funcionamiento del sistema MBR fue evaluado mediante el análisis de la concentración de los sólidos en suspensión totales y volátiles en los reactores, los requerimientos de oxígeno y la calidad del efluente (DQO y nitrógeno total), los cuales fueron controlados para evaluar los efectos de las concentración de CBZ en el funcionamiento del tratamiento MBR.

### **3.2.3. Ensayos respirométricos y análisis microbiológico**

Se realizaron análisis respirométricos en ausencia y presencia de CBZ, con la intención de evaluar su influencia en la actividad bacteriana. La velocidad de consumo de oxígeno o tasa de respiración (OUR) fue vigilada bajo condiciones endógenas y exógenas con etanol como sustrato. Para asegurar un estado endógeno del fango, se tomaron muestras de fangos activos del biorreactor aireado de la instalación experimental, y se mantuvieron bajo aireación durante 24h antes de realizar los ensayos de respirometría. Posteriormente, el fango activo se depositó dentro del respirómetro (Surcis BMT, España), donde se midió en continuo la concentración de oxígeno disuelto en el seno del reactor, y el dato era registrado cada 2 segundos. El respirómetro trabajó en modo estático de operación para la determinación del OUR. Todos los experimentos se desarrollaron a una temperatura constante de 20 °C controlada mediante un baño termostático conectado al respirómetro. El pH también se mantuvo constante, dentro del rango de 7,0 a 8,0. Los experimentos se llevaron a cabo con presencia y ausencia de 10 µg/L de CBZ.

Se realizaron ensayos para determinar la tasa de respiración exógena (Rs) del fango activo, en ausencia de CBZ y con diferentes concentraciones de CBZ: 1, 10, y 100 µg/L. La línea base para el oxígeno disuelto se fijó mediante el uso de un fango en estado endógeno, y tras añadirle una determinada cantidad de sustrato (acetato sódico y cloruro amónico) se calculó la tasa de respiración del fango. Esa misma muestra de fango activo era alimentada de nuevo con sustrato y CBZ para analizar la actividad microbiana.

Para determinar la presencia, en el fango activo, de microorganismos cultivables capaces de degradar CBZ se utilizó una adaptación del medio de cultivo de sales elementales con agar (Basal salt medium, A-BSM) (Miller *et al.*, 2004). 1 mL de fango activo proveniente del biorreactor

anóxico o el biorreactor aireado era diluido en 1 mL de agua destilada estéril, seguidamente se realizaban diluciones seriadas. Entonces, 1 mL de cada dilución se esparcía sobre una placa de Petri con medio de cultivo A-BSM sin otra fuente de carbono. Las placas eran pulverizadas con una solución de CBZ (1mg/mL en una mezcla de hexano/acetona (1/1)) y eran conservadas en oscuridad a temperatura constante (20°C). Durante un periodo de seis semana se observó la aparición y desarrollo de colonias.

#### **3.2.4. Métodos analíticos**

La determinación de la concentración CBZ se realizó según el método EPA-1694 mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS-MS) (USEPA, 2007). Para la extracción de los compuestos del fango y el agua residual se utilizó un sistema SPE-HLB (Solid Phase Extraction—Hydrophilic Lipophilic Balance) Spark Holland, equipado con un módulo de cartuchos Prospekt con relleno Oasis HLB, en línea con un automuestreador MIDAS (Spark Holland BV, Países Bajos). Las muestras, volumen de 5 mL, eran filtradas, se trataban la fase sólida y la líquida y se extraían los analitos por separado; posteriormente eran combinados antes de su paso por el HPLC-MS/MS. Para la determinación analítica se utilizó un HPLC MS/MS modelo Agilent Serie 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) equipado con detector de masas triple cuadrupolo modelo Agilent 6410. Las separaciones se realizaron con una columna Agilent ZORBAX Eclipse XDB C18 (4.5 mm. i.d. x 50 mm., tamaño de partícula 1,8 µm). Las extracciones se llevaron a cabo a pH 2, mediante ionización por electrospray en modo positivo (ESI+).

La DQO se midió mediante el método de oxidación ácida con dicromato potásico a reflujo cerrado, y la DBO<sub>5</sub> fue determinada con el método manométrico (APHA, 2012). Los sólidos en suspensión totales (SST) en el fango activo se calcularon con el método gravimétrico utilizando filtros de 0,45 µm de tamaño de poro, secados a 105 °C durante una hora. Los filtros eran posteriormente incinerados a 550 °C para la determinación de los sólidos en suspensión volátiles (SSV) (APHA, 2012). Para la determinación del nitrógeno total, 50 mL de muestra sin filtrar eran diluidos (1/10) y oxidados a 120 °C durante 30 minutos en presencia de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), hidróxido sódico (NaOH) y persulfato potásico (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), de esta forma se oxidaban todas las



formas de nitrógeno presentes en las muestras a nitrato. El resultado de la oxidación era determinado por medio del kit analítico para nitrato Merck Spectroquant (Kit No. 1.14773.0001).

Los datos recopilados se analizaron con el programa STATGRAPHICS Plus 3.0 para entorno Windows. Para medir la homogeneidad de los datos durante los diferentes periodos analizados, se utilizó el test de mínimas diferencias significativas (LSD). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la homogeneidad de la varianza con un nivel de significancia del 5% ( $P < 0,05$ ).

### **3.3. Resultados y discusión**

#### **3.3.1. Funcionamiento del MBR**

El sistema experimental MBR a escala real había estado trabajando en continuo durante 530 días con un elevado SRT y HRT, y por tanto se habían alcanzado condiciones estables ( tres veces el SRT). Las características del influente fueron similares durante todo el periodo de investigación, con una DQO media de  $1.200 \pm 395 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ .

Se analizó el funcionamiento del MBR antes, durante y después de la adición con CBZ. La concentración de SST en el fango activo se encontraba en el rango de  $5,6 \text{ g L}^{-1}$  a  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Sin diferencias estadísticas significativas entre los periodos analizados ( $p\text{-valor} = 0,2211$ ). Se observó un comportamiento similar para los SSV en los distintos reactores, representando el 75 % de los SST (Tabla 3.1.).

La calidad del efluente en cuanto a su contenido en materia orgánica fue constante. Los valores de DQO estuvieron situados entre  $10,5$  y  $71,5 \text{ mg O}_2/\text{L}$  (Tabla 3.1.), sin diferencias estadísticas significativas ( $p\text{-valor} = 0,0960$ ) respecto al periodo estudiado. La tasa de eliminación de DQO fue superior al 98 % durante todo el periodo, y la materia orgánica biodegradable representó el 7% de la DQO total, de acuerdo con los análisis de la  $\text{DBO}_5$ . Por tanto, pese a los diferentes valores de la DQO, no se apreció influencia de la adición de la CBZ al influente (Tabla

3.1). La fracción soluble de la DQO estaba constituida por compuestos biodegradables y no biodegradables. De acuerdo con el SRT, los compuestos biodegradables deben haber sido completamente degradados en el proceso MBR (Arevalo *et al.*, 2012), hecho observado en la concentración de DBO<sub>5</sub> de los efluentes (Tabla 3.1) sin influencia significativa de la CBZ añadida. Algunos compuestos no biodegradables pueden ser retenidos por la membrana debido su peso molecular (Rojas *et al.*, 2011) o por su biosorción a la biomasa (Santos *et al.*, 2010), mientras el resto atraviesa fácilmente el sistema de tratamiento.

El valor medio para la concentración de nitrógeno total en el influente, durante el periodo analizado, fue de  $73,9 \pm 28,7$  mgN/L, compuesto principalmente por NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. De acuerdo con el elevado SRT, era de esperar una elevada nitrificación en el sistema MBR. Sin embargo, la concentración de nitrógeno total en el efluente varió de 13,2 a 31,5 mg N/L (Tabla 3.1), principalmente compuesto por NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sin diferencias estadísticas significativas (p valor = 0,2831) respecto al periodo analizado. La eliminación de nitrógeno del sistema MBR se situó por encima del 70 % debido a que la eliminación de nitrato estaba limitada en el sistema experimental por la recirculación (Arevalo *et al.*, 2012).

**Tabla 3.1.** Caracterización del fango activo del MBR durante el periodo experimental, los seis meses previos y el mes siguiente al periodo de adición de CBZ.

Parámetros	Antes (180 días)	Durante periodo de adición	Después (30 días)
Fango activo			
SST (g/L)	5,6-10,0 (7,6)	6,3-7,1 (6,8)	6,1-7,8 (7,0)
SSV (g/L)	4,6-6,6 (5,6)	4,8-5,4 (5,2)	4,7-6,0 (5,4)
Efluente			
DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	10,4-71,5 (20,8)	11,5-26,5 (22,5)	11,5-41,5 (22,4)
DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)	0,0-9,0 (1,5)	0,0-3,0 (1,6)	0,0-4,0 (1,4)
N <sub>T</sub> (mg N/L)	13,2-30,7 (17,5)	17,2-26,5 (22,1)	16,4-31,5 (21,0)

### **3.3.2. Ensayos respirométricos y análisis microbiológico**

#### **3.3.2.1 Ensayos dinámicos (Rs)**

Los ensayos propuestos para evaluar la toxicidad aguda potencial de la CBZ, mediante la tasa de respiración dinámica ( $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{h}$ ) del fango activo, mostraron que el fango sin CBZ presentaba una tasa de consumo de oxígeno similar a la observada en el fango activo bajo la presencia de CBZ. Con las diferentes concentraciones de CBZ, la situación fue similar.

Debido a las elevadas concentraciones añadidas de CBZ, la ausencia de efectos negativos en la actividad microbiana indica que los microorganismos no utilizaron la CBZ como sustrato, debido a su baja biodegradabilidad (Kim *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que es necesario evaluar los efectos tóxicos de la CBZ para exposiciones prolongadas.

#### **3.3.2.2. Ensayos estáticos (OUR)**

Los ensayos OUR mostraron una variación a lo largo del tiempo en los efectos resultantes de la adición de CBZ, con una concentración de  $10 \mu\text{g/L}$  (Figura 3.2).

Al comienzo ( $t = 0 \text{ h}$ ), ambos fangos presentaron similares OURs, indicando que la CBZ aún no estaba disponible para los microorganismos. Este hecho concuerda con la baja biodisponibilidad mostrada por la CBZ durante los ensayos para determinar la tasa de respiración dinámica (Rs).

Después de tres horas, se observó un descenso en ambas respiraciones endógenas, sin embargo, el fango con CBZ presentó un valor de OUR 1,5 veces superior a la correspondiente para el fango sin CBZ. Este comportamiento fue detectado a las 6 horas y a las 12 horas después de la adición de CBZ; aunque tras 24 horas, los requerimientos de oxígeno en el fango con CBZ eran similares a aquellos detectados en el fango sin CBZ. Incluso, después de 24 horas, el fango activo sin CBZ tenía tasas de OURs ligeramente superiores. Por tanto, la presencia de CBZ implica efectos no permanentes en la respiración de la biomasa.

Otros autores han detectado aumentos en la respiración endógena de los fangos activos tras la adición de microcontaminantes (Henriques *et al.*, 2005; Aubenneau *et al.*, 2010), informando de una recuperación de los requerimientos de oxígeno algunas horas después del incremento. Henriques *et al.* (2005) explicaban este comportamiento en presencia de 2,4-dinitrofenol, como una adaptaciones metabólicas adoptadas por las células con la finalidad de habituarse a la presencia del contaminante. Aubenneau *et al.* (2010) se mostraban de acuerdo con estas observaciones y con las realizadas por Kraiger *et al.* (2008) quienes detectaron diversos cambios en la comunidad bacteriana en presencia de microcontaminantes, los cuales podrían explicar los diferentes requerimientos de oxígeno. Sin embargo, Aubenneau *et al.* (2010) y Henriques Henriques *et al.* (2005) observaron que el OUR aumentó inmediatamente tras la adición de los microcontaminantes. El hecho de que los efectos de la CBZ no fueran detectables al comienzo de los ensayos, parece estar relacionado con las propiedades físico-químicas del contaminante, que aportan a la CBZ una baja solubilidad en agua y una baja biodisponibilidad (Al-Rifai *et al.*, 2011); y esas propiedades, al parecer, retrasan la disponibilidad de la CBZ para los microorganismos.

### **3.3.2.3. Análisis microbiológico**

Después de seis semanas de incubación, los cultivos de fangos activos (procedentes de los biorreactores aireado y anóxico), encaminados a determinar la presencia de microorganismos capaces de degradar CBZ, no mostraron ningún signo de crecimiento; en consonancia con la elevada dificultad para la biodegradación de la CBZ (Zhang *et al.*, 2011). De este modo, no cabría esperar que se encuentren procesos de biodegradación durante el tratamiento MBR, esto concuerda con los estudios realizados por otros autores trabajando con diferentes sistemas MBR (Clara *et al.*, 2005; Bernhard *et al.*, 2006).

### **3.3.3. Comportamiento de la CBZ en el sistema MBR con elevados SRT y HRT**

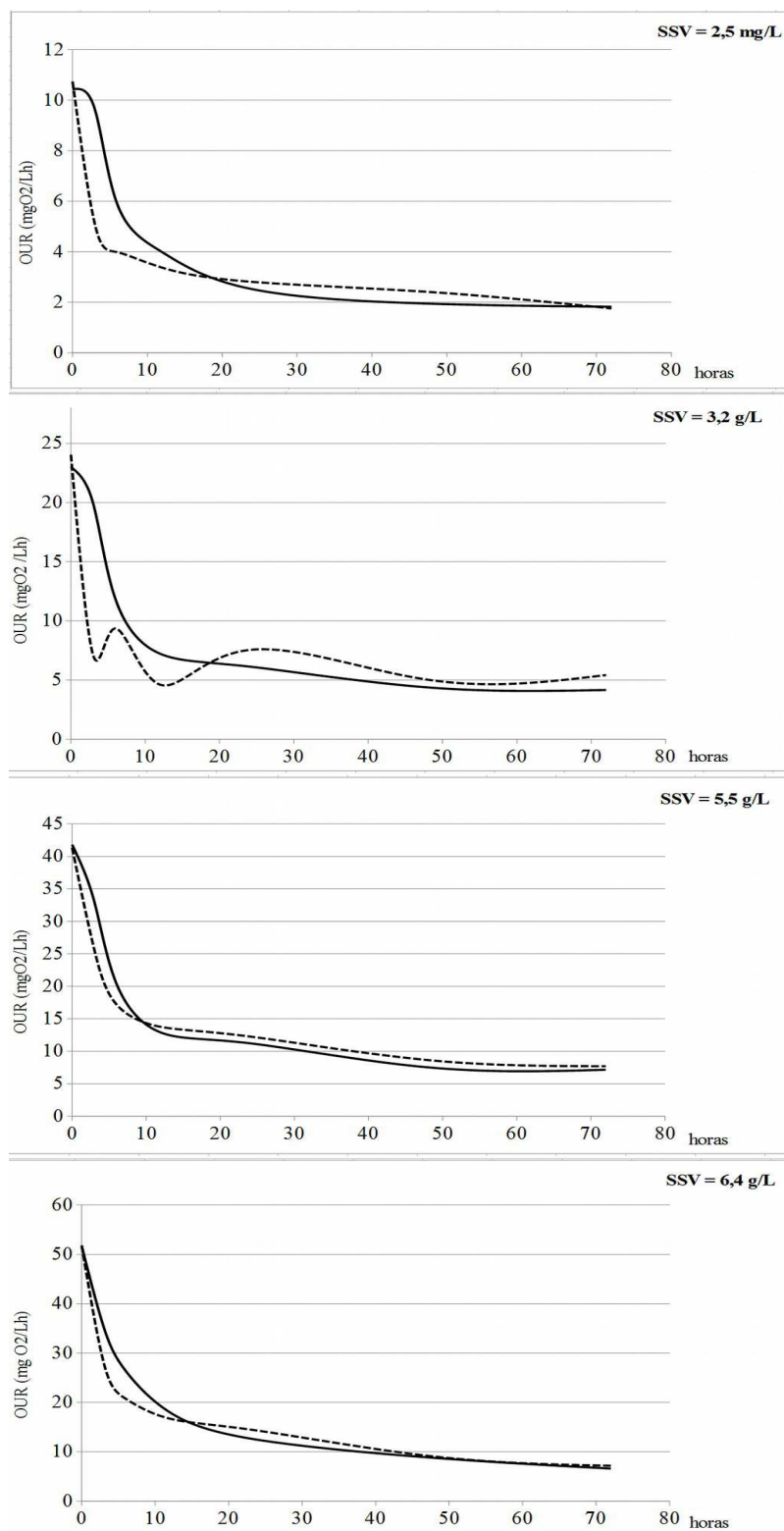
Clara *et al.* (2005) y Kim *et al.* (2007) detectaron que la CBZ no era eliminada durante el tratamiento en MBR, trabajando con biorreactores de membrana a escala piloto. Sus resultados están en la misma línea que los mostrados por Radjenovic *et al.* (2009) cuando trabajó con MBRs

equipados con membranas de ultrafiltración y membranas de microfiltración también a escala piloto. Esta baja eliminación para la CBZ se debía en parte a su naturaleza hidrofílica ( $\log K_{ow} < 2,5$ ) y su estabilidad química (Zhou *et al.*, 2011); estas características hacen de la CBZ un microcontaminante persistente no degradable en EDARs con tecnología MBR. Sin embargo, Bernhard *et al.* (2006) informó, trabajando a escala de laboratorio, de un rendimiento del 13% para la eliminación de la CBZ en un biorreactor de membranas de microfiltración con un elevado SRT (>400 d). La instalación objeto de este estudio, con elevados SRT y HRT, fracasó en la eliminación de la CBZ por medio del sistema MBR. El bajo porcentaje de CBZ eliminada del agua residual a través de la purga, alrededor del 3,16 % de la entrada total de CBZ, estaba relacionado con su retención por el fango (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Concentraciones de CBZ ( $\mu\text{g/L}$ ) en las diferentes etapas del sistema MBR.

Influyente	Max.	11,38
	Min.	1,34
	Media	6,19
Biorreactor anóxico	Max.	10,42
	Min.	2,66
	Media	5,72
Biorreactor aireado	Max.	6,19
	Min.	3,84
	Media	5,29
Reactor de membranas	Max.	13,5
	Min.	3,63
	Media	7,69
Efluente	Max.	9,69
	Min.	3,65
	Media	6,5

*Eliminación de xenobióticos de aguas residuales urbanas mediante biorreactores de membrana sumergida*



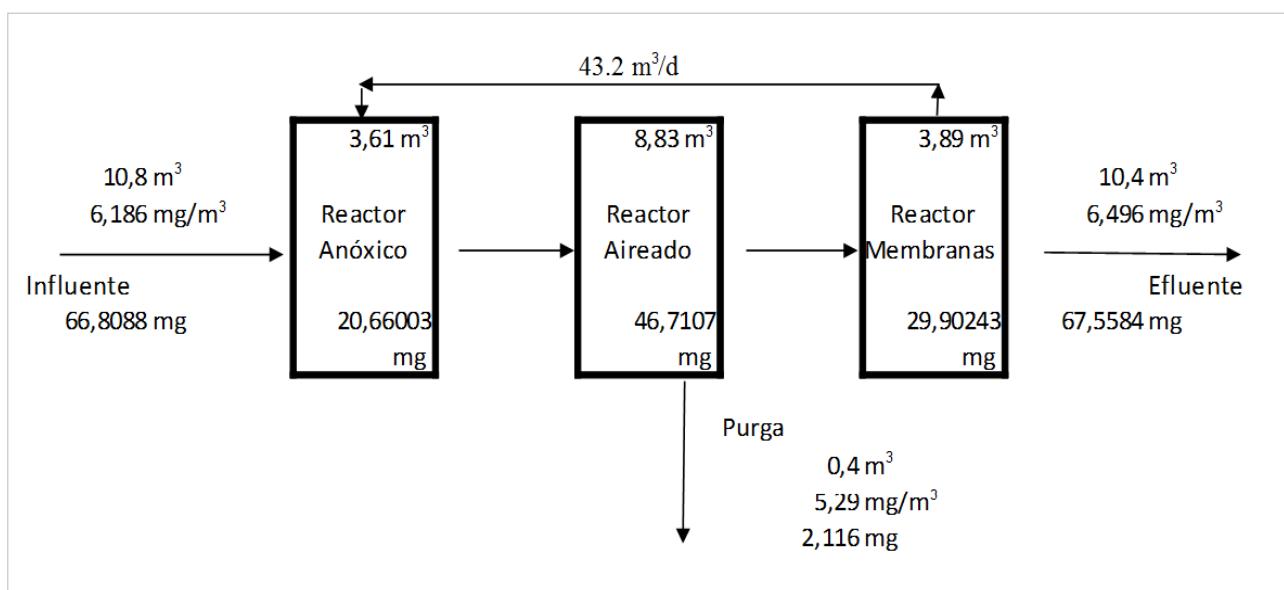
**Figura 3.2.** La velocidad de consumo de oxígeno (OUR) de diferentes fangos activos endógenos, procedentes del sistema MBR, sin (---) y con (—) CBZ (10 µg/L).

La cantidad total de CBZ presente en el efluente durante un día (67,6 mg) fue significativamente superior a la cantidad total de CBZ entrante en el sistema (66,8 mg). Si se considera la cantidad total de CBZ que sale del sistema junto a la purga (2,1 mg), el balance de la CBZ en el sistema no se ajustaba, y parecía indicar que había más CBZ saliendo del sistema que entrando en él (Figura 3.3). Varios autores han descrito el incremento de la concentración de CBZ durante el tratamiento biológico de aguas residuales. Kim *et al.* (2007) detectaron que las concentraciones de CBZ medidas en los efluentes de dos MBR diferentes eran mayores que las concentraciones medidas en los influentes, y previamente Clara *et al.* (2005) y Castiglioni *et al.* (2006) habían observado resultados similares durante el tratamiento MBR.

Zhou *et al.* (2011) encontraron el mismo incremento en la concentración de CBZ, sugiriendo que estaban probablemente relacionado con la fragmentación enzimática de metabolitos conjugados de la CBZ, como demostraron Vieno *et al.* (2007). La CBZ presente en el agua residual bruta es principalmente CBZ sin metabolizar excretada a través de la orina y las heces, representando el 29 % de la CBZ total administrada por vía oral (Zhang *et al.*, 2008), mientras que el resto de las CBZ consumida es transformada y excretada en forma de diferentes productos metabólicos. Los principales metabolitos son 10,11-dihydro-10,11-epoxycarbamacepina y trans-10,11-dihydro-10,11-dihydrocarbamacepina, que constituyen una gran parte de la dosis oral previamente administrada, p. e. superior al 30% (Zhang *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2011). Algunos de estos metabolitos pueden dar lugar a formas conjugadas, que son excretadas principalmente como conjugados glucoronicos (Maggs *et al.*, 1997), y entrar en las EDARs con las agua residuales. Ternes (1998) informó que había encontrado actividad glucuronidasa en los fangos activos y por tanto, la ruptura del fragmento del ácido glucurónico sería posible durante el tratamiento del agua residual. Entonces, la CBZ glucuronidada y otros metabolitos conjugados son, probablemente, lisados y transformados en formas libres mediante procesos enzimáticos durante el tratamiento del agua residual (Miao *et al.*, 2005). Vieno *et al.* (2007) durante el análisis de los conjugados glucurónidos de la CBZ, con LC MS/MS utilizando tres transiciones de masas para la CBZ-N-glucorinido, encontraron picos alrededor de 2,5 min más cortos que los correspondientes a la CBZ en las cromatografías de las muestras de los influentes; sin embargo, esos picos no fueron detectados en las muestras de los efluentes, incluso cuando las muestras estaban más concentradas que las muestras de los influentes.

Los picos probablemente eran debidos al conjugado glucorónico de la CBZ presente en el influente pero no en el efluente. Esos resultados demuestran que la ruptura del ácido glucoronico desde CBZ glucuronidada sería posible trabajando con elevado SRT y elevado HRT.

La mayor parte de la CBZ presente en el influente fue añadida en forma no metabolizada, por tanto la cantidad de metabolitos conjugados de la CBZ susceptibles de ser transformados era proporcionalmente menor en la instalación analizada que en otros estudios, en los que se utilizó aguas residual bruta sin adición de CBZ. El incremento de CBZ observado durante el tratamiento MBR (<4,3%) fue sustancialmente menor que los encontrados por otros autores, quienes llegaron a detectar incrementos superiores al 100 %, incluso cercanos al 200 %, comparados con la concentración en el influente (Clara *et al.*, 2004; Vieno *et al.*, 2007).



**Figura 3.3.** Balance de la CBZ en el sistema MBR durante el periodo experimental, se muestran los resultados medios para un día de estudio.

Se ha demostrado que el permeado de los sistemas MBR son apropiados para la reutilización de agua residual tratada, en base a diferentes directrices (Gonzalez-Perez *et al.*, 2012). Aunque los sistemas MBR presentan mejor rendimiento que los CASP en la eliminación de algunos microcontaminantes (Miller *et al.*, 2004; Clara *et al.*, 2004), el tratamiento MBR no fue capaz de



eliminar CBZ a pesar de estar trabajando con un elevado SRT y un elevado HRT.

Tratamientos físicos y/o químicos adicionales al sistema MBR deben ser aplicados para la eliminación de algunos microcontaminantes persistentes, como la CBZ. Aun así, la presencia de CBZ u otros microcontaminantes persistentes en los permeados, y sus efectos potenciales sobre el medio ambiente y la salud pública, deberían ser considerados para la elaboración de futuras directrices.

### **3.4. Conclusiones**

Tras la adición de CBZ en el sistema MBR para el tratamiento del agua residual, las posteriores pruebas y los ensayos de respirometría, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El sistema MBR, a escala real, trabajando con elevados SRT y HRT resultó ineficiente para la eliminación de CBZ. El pequeño porcentaje de CBZ eliminada estuvo siempre asociado con la eliminación a través de la purga.
- De acuerdo con los ensayos OUR (Tasa de respiración), la presencia de CBZ afecta ligeramente a la actividad microbiana del fango activo procedente de un MBR con elevados SRT y HRT.
- La presencia de elevadas concentraciones de CBZ en el influente del sistema MBR operando con elevados HRT y SRT no afectó a la capacidad del sistema para la eliminación de materia orgánica y/o nitrógeno.



## **CAPÍTULO 4**

*Este capítulo corresponde al artículo titulado "Behaviour of the main nonsteroidal anti-inflammatory drugs in a membrane bioreactor treating urban wastewater at high hydraulic- and sludge- retention time" publicado en Journal of Hazardous Materials, en el año 2017.*



## **4. Comportamiento de los principales fármacos antiinflamatorios no esteroideos en biorreactor de membrana sumergida tratando agua residual urbana con un elevado tiempo de retención hidráulica y celular.**

### **4.1. Introducción**

Durante las últimas décadas, se ha extendido el uso global de muchos microcontaminantes como los fármacos (principios activos), y gran número de ellos han sido detectados en aguas residuales, en los efluentes de las EDAR, en aguas superficiales y en aguas subterráneas, con concentraciones que varían desde unos pocos ng/L a varios µg/L (Luo *et al.*, 2014). Debido a las características de estos compuestos, su eliminación mediante las tecnologías convencionales para el tratamiento de aguas residuales, tales como los fangos activos, es a menudo incompleta (Rosal *et al.*, 2010) y por ello, es común su presencia en los efluentes de las EDARs. Actualmente, es aceptado el hecho de que las CASP no están diseñadas para la eliminación cuantitativa de microcontaminantes (Feng *et al.*, 2013) y sus efluentes constituyen una importante vía para que los fármacos de uso humano y veterinario lleguen a las masas de aguas (Rosal *et al.*, 2010).

La eliminación de los fármacos durante el procesos de fangos activos puede deberse a varios mecanismos, principalmente biodegradación, sorción o volatilización (Pomiès *et al.*, 2013). Los fangos activos estan diseñados para la eliminación sustancial de compuestos orgánicos realizada por

el metabolismo microbiano, el cual varía dependiendo de las condiciones operacionales como el SRT, HRT, y la temperatura. Estudios previos han demostrado que mayores SRTs incrementan el rendimiento en la eliminación de los *PhACs* debido a la presencia de especies de lento crecimiento y al incremento de la diversidad microbiana (Suarez *et al.*, 2010). Por otro lado, mayores HRTs implican un mayor tiempo de contacto entre el fango activo y los compuestos orgánicos, y por tanto una mayor eficacia en su eliminación (Tambosi *et al.*, 2010; Kruglova *et al.*, 2016).

La sorción sobre el fango, en referencia a las interacciones hidrofóbicas o electrostáticas con la biomasa, es un mecanismo habitual cuya efectividad depende de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos y de la concentración de la biomasa (Carballa *et al.*, 2005). La adsorción de los compuestos hidrofílicos sobre el fango es limitada (Feng *et al.*, 2013), y por consiguiente su eliminación por medio de la vía de la sorción es ineficiente y, también, puede obstaculizar la degradación de dichos compuestos (Vieno *et al.*, 2007).

La volatilización puede deberse a la volatilización en superficie o al arrastre por aire, lo cual depende de las propiedades físico-químicas de los microcontaminantes y de las condiciones operacionales del proceso como la aireación, agitación, temperatura o presión atmosférica (Pomiès *et al.*, 2013). Los compuestos con bajo peso molecular pueden ser liberados del fango, y enviados directamente hacia la atmósfera, por medio del arrastre por aire (González-Pérez *et al.*, 2012).

Los *NSAIDs*, los cuales se encuentran entre los agentes terapéuticos de uso más extendido, incluyen más de 100 compuestos y son utilizados en todo el mundo por su función antiinflamatoria y analgésica (Feng *et al.*, 2013). Se consumen en grandes cantidades de *NSAIDs* y su producción aumenta a un ritmo del 12 % anual (Feng *et al.*, 2013). Por consiguiente, gran cantidad de estos fármacos y sus metabolitos son continuamente liberados en el medio ambiente.

El Ibuprofeno (IBU), ácido (RS)-2-(4-(2-metilpropil) fenil) propanoico, es uno de los *NSAIDs* más consumidos a nivel global y unos de los más estudiados. Este compuesto puede hallarse a concentraciones significativas que van desde 3,7 a 603,0 µg/L (Santos *et al.*, 2009), no solo en aguas residuales sino incluso en fuentes de agua potable (Luo *et al.*, 2014). La biodegradación es la principal vía para la eliminación del IBU en las EDARs, logrando la casi completa eliminación del contaminante (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012). Otros derivados del ácido propanoico globalmente utilizados en humanos y animales son el naproxeno (NPX), ácido (+)-(S)-

2-(6-metox-2-naftil) propanoico, y el ketoprofeno (KTP), ácido (RS)-2-(3-benzoilfenil) propanoico. Debido a su hidrofilia, su eliminación depende principalmente del proceso biológico o químico, pero la eliminación por medio de los CASP aportan resultados muy diferentes (Feng *et al.*, 2013).

Uno de los NSAIDs con una menor capacidad de eliminación en los CASP es el diclofenaco (DCF), ácido 2-[2-(2,6-diclorofenil)-aminofenil] acético. Es un derivado del ácido antranílico comúnmente utilizado en cuidados ambulatorios, y uno de los NSAIDs más frecuentemente detectados en aguas, con uno de los índices de toxicidad aguda más elevados (Fent *et al.*, 2006). Además, el DCF ha sido incluido en la primera lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión Europea en el ámbito de la política de aguas (Decision UE 2015/495).

Para comprender el comportamiento de los NSAIDs a lo largo de los procesos de fangos activos, hay que entender la influencia de las condiciones operacionales del proceso y, también, la influencia de las propiedades fisico-químicas de los compuestos respecto a los principales mecanismos de eliminación (Pomiès *et al.*, 2013).

Los MBR combinan el proceso biológico de degradación de los fangos activos con un proceso de separación sólido/líquido mediante una filtración por membrana (Judd, 2011). El sistema MBR puede operar con elevados SRTs y elevados HRTs, los cuales podrían permitir el desarrollo de unas comunidades microbianas más diversas y de lento crecimiento, capaces de biodegradar compuestos orgánicos específicos (Suarez *et al.*, 2010). Un elevado SRT causa mayor retención de biomasa en el fango activo, también es posible que permita un mayor contacto entre la biomasa y los microcontaminantes, incrementando la adsorción de compuestos hidrófobos y, de este modo, aumentando la capacidad de retención de diversos microcontaminantes (Maeng *et al.*, 2013). Dadas estas características, los sistemas MBR ofrecen una buena alternativa para mejorar la eliminación de microcontaminantes como los NSAIDs.

Por estos motivos, el objetivo de este estudio fue determinar el comportamiento y el rendimiento en la eliminación del IBU, DCF, KTP y NPX presentes en aguas residuales urbanas reales, durante su tratamiento en un MBR experimental, a escala real trabajando con unos elevados SRT y HRT. Con este propósito, los NSAIDs a considerar fueron medidos en los influentes y los efluentes, así como a lo largo de los distintos reactores, y se realizaron los pertinentes balances de

masas en el sistema.

## **4.2. Materiales y métodos**

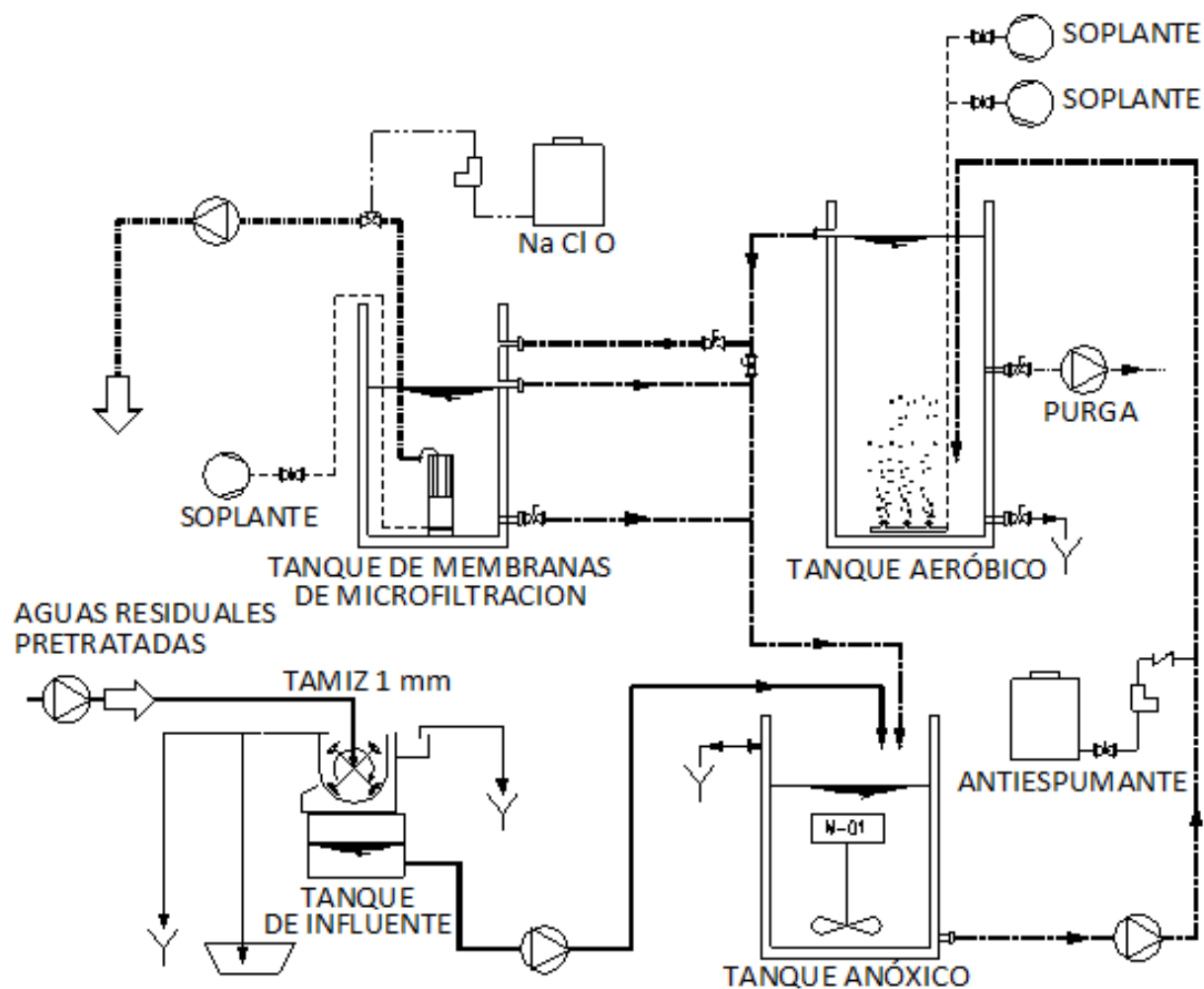
### **4.2.1. Descripción de la planta piloto y condiciones de trabajo**

Para este estudio se utilizó una instalación experimental MBR a escala real (Figura 4.1). El sistema estaba formado por un biorreactor anóxico (3,6 m<sup>3</sup>), un biorreactor aireado (8,8 m<sup>3</sup>) y un reactor de membranas (3,5 m<sup>3</sup>), trabajando con una configuración de pre-desnitrificación. El reactor de membranas estaba equipado con membranas planas hidrofílicas de microfiltración (MF-FS, tamaño medio de poro de 0,4 μm) fabricadas en polietileno clorado (PE).

La instalación estaba localizada en la EDAR de Granada (Granada-Sur, España). El sistema estaba alimentado con agua residual urbana procedente de la etapa de pretratamiento de la EDAR, formada por tamizado de gruesos de 3 mm y una cámara de desarenado/desengrasado. Antes de entrar a la instalación MBR, el influente pretratado pasaba por un tamiz (1mm) para retirar las partículas que pudieran atascar o dañar las membranas.

El MBR trabajó con una con un caudal constante de permeado  $Q = 0,45 \text{ m}^3/\text{h}$  (35,4 h de HRT) y un caudal de recirculación entre los biorreactores de  $4Q$ . Desde el reactor aireado se realizaba de manera constante la purga, para obtener un SRT de 37 d. En el reactor aireado se mantuvo una concentración de oxígeno disuelto entre 0,6 y 1,5 mgO<sub>2</sub>/L mediante aireación forzada por dos soplantes (flujo máximo 50 Nm<sup>3</sup>/h). El tanque de membranas estaba también sometido a aireación (40 Nm<sup>3</sup>/h) cuya función era retardar el ensuciamiento de la membrana. El régimen de trabajo era de 9 minutos de filtrado por 1 minuto de relajación. Para la limpieza química de la membrana se utilizaba NaOH, las limpiezas se efectuaban cada seis meses o cuando la presión transmembrana (TMP) era excesivamente alta ( $< - 0,17$  bares).





**Figura 4.1.** Esquema de la planta piloto MBR

#### **4.2.2. Procedimiento experimental**

La puesta en marcha de la instalación experimental se realizó mediante inoculación con biomasa procedente de la EDAR con un sistema de fangos activos convencional. Tras la inoculación, el sistema estuvo trabajando en continuo durante 18 meses antes de realizar el presente estudio, por lo que se considera que la instalación trabajó en estado estacionario.

La fase experimental abarcó cuatro semanas (de febrero a marzo). Durante este periodo, se tomaron muestras diarias del influente, efluente, purga, y fango activo de cada reactor. En cada apunto del sistema se toma una muestra compuesta a lo largo de 24 horas, para lo cual se disponía

de una bomba peristáltica de flujo reversible, con el objeto de prevenir la acumulación de muestra en la tubería de captación. Las muestras se almacenaban a 4 °C en recipientes de vidrio de 5 litros, previamente lavados y cerrados con teflón. Todos los parámetros físico-químicos eran analizados por triplicado, al día siguiente a la recogida de las muestras. Para el análisis de los microcontaminantes, tres réplicas de cada muestra eran congeladas en botes de cristal (1 L) y conservadas hasta el momento del análisis. Previa a las determinaciones analíticas, las muestras eran descongeladas a temperatura ambiente.

Oxígeno disuelto, pH y temperatura del fango activo eran continuamente medidos (Endress & Hauser). Se utilizaron caudalímetros (Rosemount) para el seguimiento de caudales del influente, efluente, permeado, y purga, y para la recirculación del fango activo entre los tanques. La TMP y los niveles del tanque fueron continuamente monitorizados. Cada segundo, los datos eran automáticamente registrados en una base de datos.

Todas las muestras compuestas de influente y efluente fueron analizadas para SST, SSV, DBO<sub>5</sub> total y filtrable (0,45µm), DQO total y filtrable (0,45µm), y nitrógeno total. Las muestras de fango activo se analizaron para SST y SSV. Las concentraciones de los NSAIDs estudiados se determinaron en las muestras procedentes del influente, efluente, purga, y fangos activos para realizar el balance de masa de cada compuesto en el MBR experimental.

#### **4.2.3. Métodos analíticos**

Los SST se determinaron mediante filtración, secado a 105 °C, y determinación gravimétrica, con filtros de 0,45 µm, mientras que para los SSV se añadía una fase de incineración a 550 °C de acuerdo con Standard Methods (APHA, 2012). La DQO se determinó empleando el método de oxidación ácida con dicromato potásico (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) a reflujo cerrado (APHA, 2012), una solución madre de ftalato ácido de potasio (HOCC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOK) (Sigma) fue utilizada como patrón para la determinación espectrofotométrica a λ=600 nm. La DBO<sub>5</sub> se determinó por medio del método manométrico (APHA, 2012), incubando la muestra en oscuridad durante 5 días, se añadiendo aliltiourea para inhibir la nitrificación. Para obtener las principales fracciones del influente y efluente (S<sub>s</sub>: Soluble biodegradable; S<sub>i</sub>: soluble inerte; X<sub>s</sub>: particulada biodegradable; X<sub>i</sub>: particulada inerte) se utilizó el método físico-químico descrito por Ruiz *et al.* (2014). Para la aplicación de este método, la DBO última se calculó utilizando el método manométrico para 30 días

con presencia de alitiourea como inhibidor de la nitrificación.

Las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  se midieron con electrodos ion-selectivo (Orion 9307BNWP, 9512BNWP y Crison 96-64 nitrite Electrode). La calibración automática de los electrodos se realizó con patrones estándares de cada compuesto. Para la determinación de la concentración de nitrógeno total se procedió a la oxidación de 50 mL de muestra diluida (1/10) sin filtrar a 120 °C durante 30 minutos en presencia de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), hidróxido sódico (NaOH) y persulfato potásico ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ). Tras la oxidación, las muestras eran analizadas con kits analíticos para la determinación de  $\text{NO}_3^-$  (Kit No: 1.14773.0001; Merck-Spectroquant).

La determinación de los NSAIDs se realizó según el método EPA-1694 mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS-MS) (USEPA, 2007). Para la extracción de los compuestos del fango y el agua residual se utilizó un sistema SPE-HLB (Solid Phase Extraction—Hydrophilic Lipophilic Balance) Spark Holland, equipado con un módulo de cartuchos Prospekt con relleno Oasis HLB, en línea con un automuestreador MIDAS (Spark Holland BV, Países Bajos). Las muestras (5 ml) eran filtradas y la fase sólida y la líquida se trataban por separado extrayendo los analitos por separado; posteriormente eran combinados antes de su paso por el HPLC-MS/MS. Para la determinación analítica se utilizó un HPLC MS/MS modelo Agilent Serie 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) con detector de masas triple cuadrupolo modelo Agilent 6410. Las separaciones se realizaron con una columna Agilent ZORBAX Eclipse XDB C18 (4.5 mm. i.d. x 50 mm., tamaño de partícula 1,8  $\mu\text{m}$ ). Las extracciones se llevaron a cabo a pH 2, mediante ionización por electrospray en modo positivo (ESI+). La Tabla 4.1 recoge los límites de detección instrumental (LODs) y los límites de cuantificación instrumental (LOQs).

**Tabla 4.1.** LODs-LOQs para los NSAIDs estudiados (ng/L)

<b>NSAID</b>	<b>Agua residual bruta y fango activo</b>	<b>Agua residual tratada</b>
IBU	4,0 – 2,0	4,0 – 1,8
NPX	5,0 – 2,0	1,0 – 0,5
KTP	40,0 – 25,0	30,0 – 20,0
DCF	2,0 – 1,0	0,05 – 0,02

#### **4.2.4. Análisis estadístico**

Los datos recopilados en continuo por los medidores automáticos de la planta experimental, fueron tratados mediante el software específico, Active Factory 9.2 (Wanderware), para eliminar errores y obtener los valores medios diarios. Los datos recogidos fueron analizados con el software SPSS (IBM-SPSS Statistics, v22). Para medir la homogeneidad de los datos durante los diferentes periodos analizados, se utilizó el test de mínimas diferencias significativas (LSD). Un análisis de varianza (ANOVA) se realizó para evaluar la homogeneidad de la varianza con un nivel de significancia del 5% ( $P < 0,05$ ). Se realizaron los balances de masas para cada día, y la homogeneidad de los datos obtenidos fueron comprobados mediante análisis ANOVA y LSD; las muestras con datos no homogéneos se descartaron. Para el DCF se observaron dos comportamientos muy diferentes, con rendimientos en la eliminación positivos y negativos, los cuales se estudiaron por separado.

### **4.3. Resultados y discusión**

#### **4.3.1. Funcionamiento del MBR**

Durante las cuatro semanas que duro la fase de análisis de los NSAIDs, la instalación MBR estuvo trabajando con un elevado SRT y HRT, los cuales se establecieron mediante el control del permeado y la purga de fangos. Durante este periodo no se observaron alteraciones en los procesos y los valores de SRT y HRT permanecieron constantes. La temperatura del fango activo y la carga orgánica sufrieron ligeras variaciones que afectaron a los valores de carga másica (F:M) y a las concentraciones de SST y SSV (Tabla 4.2.). A pesar de estas variaciones, los valores de carga másica fueron inferiores a 0,1 Kg DBO<sub>5</sub>/ Kg SST. La TMP varió ligeramente, sin mostrar una tendencia ascendente, con valores muy inferiores a los niveles marcados como máximo de seguridad para las membranas (Tabla 4.2)

**Tabla 4.2.** Parámetros y variables operacionales del MBR durante el periodo experimental.

Variable o Parámetro	Unidades	Valores
SRT	d	37
HRT	h	35,6
Temperatura del fango activo	°C	17,4-19,0
Carga orgánica	Kg COD/m <sup>3</sup> d	0,83-0,98
F:M	Kg BOD <sub>5</sub> /Kg TSS d	0,066-0,079
TMP	-bar	0,088-0,096
SST	g/L	6,3-7,1
SSV	%	75-77

Durante el periodo de investigación, las características del influente fueron muy parecidas; con valores medios para la DQO de  $1345 \pm 77$  mg O<sub>2</sub>/L (Figura 4.2.). El fraccionamiento de la DQO mostró que la fracción rápidamente biodegradable (S<sub>s</sub>) y la fracción lentamente biodegradable (X<sub>s</sub>) representaban, respectivamente, el 45,8 % y el 35,6 % de la DQO total del influente. Mientras que las fracciones inertes representan el 18,6 %, con una fracción soluble de 7,9 %. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras diarias de las distintas fracciones de la DQO, excepto para la fracción S<sub>SO</sub>, la cual permaneció prácticamente constante durante todo el periodo.

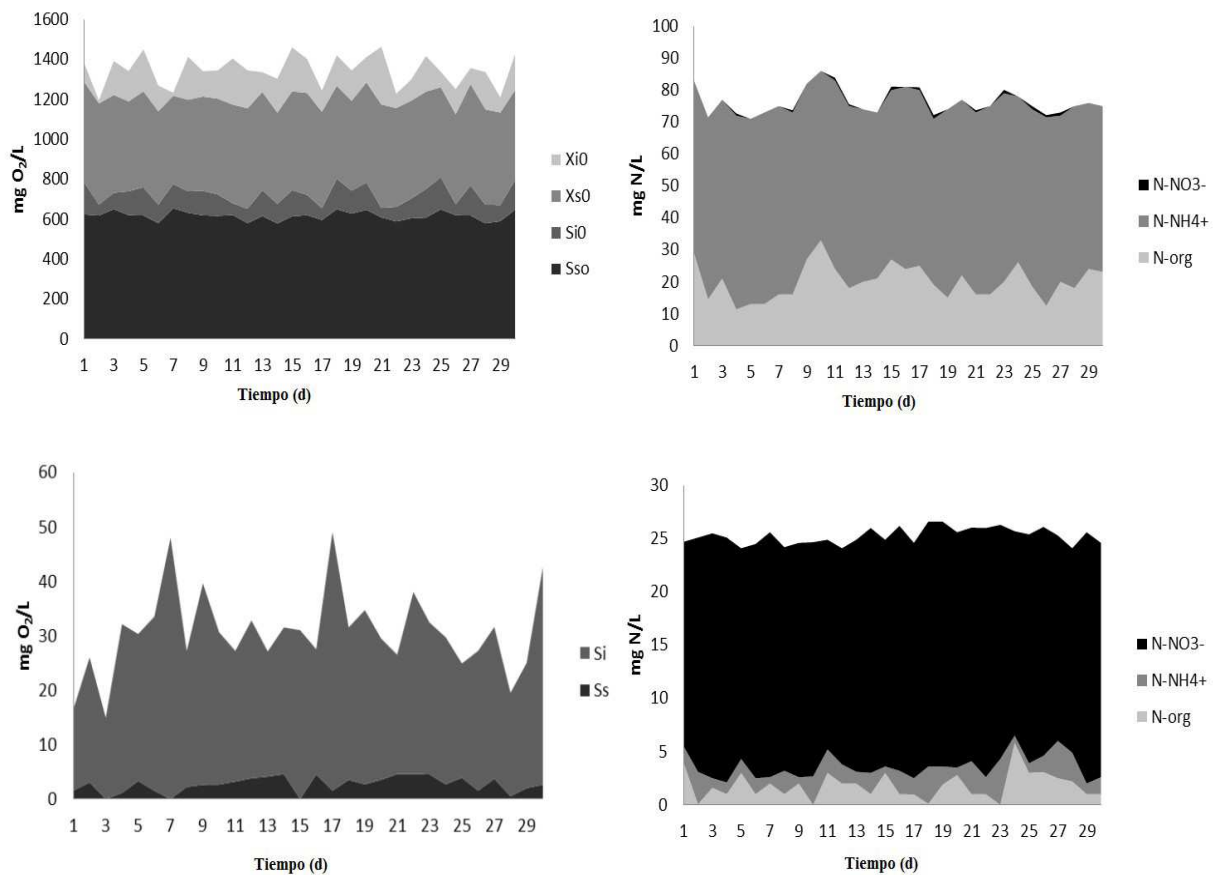
Las variaciones en la concentración de la fracción particulada del influente no afectaron la eficacia en la eliminación de la materia orgánica, con una retención del 100% de la fracción particulada. Se observó una gran capacidad en la eliminación de la materia orgánica soluble biodegradable (S<sub>s</sub>) con rendimientos del 99,6 %; mientras que la capacidad de retención para la materia orgánica soluble inerte (S<sub>i</sub>) fue también destacable con una media del 74 %.

El elevado SRT permitió que, durante el procesos biológico, prácticamente todos los compuestos orgánicos biodegradables presentes en el influente fueran transformados (Massé *et al.*, 2006). Las fracciones particuladas, más lentamente biodegradables, fueron retenidas con eficacia por la membrana, permitiendo así su completa biotransformación en el sistema MBR. Tan solo la fracción soluble inerte pudo atravesar el tratamiento (Sperandio *et al.*, 2008), aunque debido a la recirculación existente, representó el 26% de la fracción presente en el influente. El elevado SRT

causa el desarrollo de comunidades microbianas de lento crecimiento y más especializadas, mientras que el alto HRT permite un mayor tiempo de contacto entre los compuestos que son menos biodegradables y los microorganismos capaces de transformarlos (Luo *et al.*, 2014). El fraccionamiento de la DQO basado en análisis físico-químicos mediante análisis de la DBO<sub>5</sub> filtrada a través de 0,45 µm puede considerarse como compuestos soluble inertes a algunos que, por su naturaleza, son lentamente biodegradables (Ruiz *et al.*, 2014) y que, bajo determinadas condiciones operacionales pueden ser biotransformados.

La capacidad de los sistemas MBR para retener parte de la fracción soluble inerte puede ser explicada por otros mecanismos, como la sorción con la biomasa por diferentes vías que podrían verse reforzadas por la mayor concentración de biomasa en el sistema. Otro mecanismo de retención considerado en los MBR es el efecto que ejerce la membrana, el cual depende del corte molecular de la misma o sus propiedades físico-químicas, al tiempo que también puede darse la sorción (Tambosi *et al.*, 2010).

Durante el periodo de investigación las concentraciones de nitrógeno presente en el influente se mantuvieron constantes, con un valor medio de  $76,4 \pm 4.1$  mg N/L (Figure 4.2) para el nitrógeno total (N<sub>T</sub>), sin diferencias estadísticamente significativas entre los distintos días. Amonio y nitrógeno orgánico (N<sub>org</sub>) representan, respectivamente, el 73% y el 26 % del total de nitrógeno presente en el influente con un 1% de nitrato. Se alcanzó una eliminación de nitrógeno del 67 %, con apenas presencia de amonio en el efluente, sin embargo la concentración media de nitrato en el efluente fue de 21,7 mg N-NO<sub>3</sub> /L.



**Figura 4.2.** Caracterización del influente y efluente durante el periodo experimental: DQO Influyente (A), DQO Efluente (B), nitrógeno influente (C), nitrógeno efluente (D). Fraccionamiento de la DQO: S<sub>s</sub>: soluble biodegradable; S<sub>i</sub>: soluble inerte; X<sub>s</sub>: particulada biodegradable; X<sub>i</sub>: particulada inerte.

La cantidad de nitrógeno del influente necesario para el crecimiento de la biomasa es equivalente al contenido de N presente en la purga diaria de fango activo. Si suponemos una concentración de 0,1% de N en los SSV (Arévalo *et al.*, 2014), es esperable una eliminación entre 18,0 y 21,5 mg N/L de acuerdo con la concentración de SSV en el fango activo. Considerando la eliminación de N a través de la purga y la concentración de nitrógeno orgánico y amonio presentes en el efluente, se pueden estimar 54,8- 51,5 mg N/L nitrificados. Por tanto, bajo las condiciones experimentales, se alcanzó un índice de nitrificación del 94 %. De acuerdo con las concentraciones de nitrato presentes en el efluente, el sistema experimental obtuvo un índice de desnitrificación entre 58-61 %.

Era esperable una elevada nitrificación en el sistema MBRs experimental a escala real, debido al elevado SRT con la única presencia en el influente de la fracción inerte de amonio

(Arévalo *et al.*, 2014). El rendimiento en la eliminación de nitrógeno en el sistema depende de la limitación en la desnitrificación, debida a la recirculación establecida entre el reactor de membranas y el anóxico, y probablemente también, al arrastre de oxígeno residual a través de la recirculación (Arévalo *et al.*, 2014).

#### **4.3.2. Presencia y eliminación de los NSAIDs seleccionados en el sistema MBR**

Los análisis realizados al influente durante el periodo de muestreo, revelaron la presencia de significativas concentraciones de los cuatro NSAIDs estudiados en todas las muestras del influente (Tabla 4.3). El compuesto más abundante fue IBU mientras que DCF presentaba las concentraciones menores, manteniendo las diferencias entre sus concentraciones al igual que observaron otros autores (Luo *et al.*, 2014).

El IBU es habitualmente detectado en aguas residuales urbanas, a pesar de su bajo índice de excreción para el consumo humano. Sin embargo, el elevado consumo de esta sustancia hace que sea detectada en concentraciones que pueden superar los 600 µg/L en aguas residuales urbanas, con grandes variaciones estacionales (Santos *et al.*, 2009). El otro compuesto cuya presencia fue significativa fue el NPX, con una concentración media de 5,57 µg/L, mientras que las concentraciones de KTP y DCF fueron menos significativas, siempre por debajo de 1 µg/L. Todas las concentraciones medidas en los influentes durante el periodo de estudio estaban dentro del rango descrito por otros autores (Luo *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2012). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones detectadas en las diferentes muestras de todos los NSAIDs analizados, las cuales fueron mayores en el caso del DCF cuya variación en la concentración entre dos días consecutivos llegó casi al 70 %.

Las concentraciones medias de los NSAIDs en el efluente se encuentran recogidas en la Tabla 4.4. La concentración de KTP se encontró por debajo del LOQ en todas las muestras de efluente analizadas, mientras que el resto de las sustancias analizadas se encontraron en todas las muestras de efluentes. Excepto para el DCF, la concentración del NSAID estudiado en el efluente puede considerarse dependiente de la concentración en el influente, y por tanto presentaban valores mayores para el IBU y menores para el KTP.



**Tabla 4.3** Concentración de los NSAIDs ( $\mu\text{g/L}$ ) estudiados en el influente del sistema MBR, comparadas con estudios previos (Luo *et al.*, 2014).

NSAID	Media	DS	Mínimo	Máximo	Bibliografía
IBU	33,21	14,74	12,56	66,40	0,01 - 603,00
NPX	5,57	1,71	2,88	8,73	0,01 - 52,90
KTP	0,39	0,17	0,15	0,67	0,01 - 8,56
DCF	0,23	0,16	0,03	0,58	0,01 - 94,20

De los cuatro compuestos estudiados, el DCF es el único que ha sido incluido en la primera lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento en el ámbito de la política de aguas de la Unión Europea (Decision UE 2015/495), y no hay límites específicos establecidos en la UE. En comparación, podemos observar las normas australianas para la reutilización de aguas (Australian Guidelines for Water Recycling, 2008) que establecen unos límites en la concentración de los NSAIDs estudiados varios ordenes de magnitud mayores a los encontrados en el efluente del sistema experimental MBR; y por tanto, podemos considerar que el vertido del efluente del MBR con elevado SRT y elevado HRT representa, en referencia a los NSAIDs analizados, un riesgo bajo para la salud pública. Sin embargo, la presencia de estos compuestos en los efluentes obligan a una evaluación de los potenciales riesgos para el medio ambiente y la salud pública, especialmente para los compuestos más recalcitrantes.

Tres de los NSAIDs analizados fueron eficientemente eliminados. IBU fue eliminado casi en su totalidad (98%) con un rendimiento similar a los encontrados por otros autores durante procesos MBR (Luo *et al.*, 2014; Radjenovic *et al.*, 2009; Trinh *et al.*, 2016) y mayores que los observados en los CASP trabajando con similares concentraciones en el influente (Santos *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2012). La eficacia en la eliminación de NPX fue similar o ligeramente superior a los mayores valores previamente registrados en sistemas MBR (Radjenovic *et al.*, 2009; Trinh *et al.*, 2016), y significativamente mayor que la registrada en el trabajo desarrollado por Martín *et al.* (2012) en CASP. Considerando el límite de detección para el KTP, se puede asumir que la eliminación media del KTP para el MBR experimental fue, al menos, entre el 80 y el 95 % dependiendo de la concentración en el influente. Entonces, el rendimiento en la eliminación del KTP fue bastante elevado comparado con los rendimientos encontrados en otros tratamientos MBR (Radjenovic *et al.*, 2009) y similares a los registrados por Trinh *et al.* (2016).

**Tabla 4.4** Concentración de los NSAIDs ( $\mu\text{g/L}$ ) estudiados en el efluente del sistema MBR y rendimientos alcanzados en su eliminación (%).

NSAID	Media	SD	Mínimo	Máximo	Eliminación (%)	Rango
IBU	<b>0,62</b>	0,27	0,50	1,11	<b>98,12</b>	96,01-98,60
NPX	<b>0,09</b>	0,07	0,01	0,16	<b>98,20</b>	96,52-99,81
KTP	<b>&lt;0,03</b>	0,00	<LOQ	<LOQ	<b>92,26</b>	80,00-95,52
DCF	<b>0,20</b>	0,04	0,16	0,27	<b>20,70</b>	(-18,75)-53,40

IBU, NPX y KTP son compuesto hidrófilos, por tanto su eliminación por sorción a la biomasa puede ser considerada insignificante (Trinh *et al.*, 2016). Varios estudios han atribuido los elevados rendimientos para la eliminación de estas sustancias en MBR a la biodegradación (Luo *et al.*, 2014; Salgado *et al.*, 2012). Fernández-Fontaina *et al.* (2013) determinaron las constantes cinéticas de biodegradación para varios NSAIDs trabajando con sistemas MBRs, encontraron los mayores valores para el IBU, y también destacaron al NPX como compuesto fácilmente biodegradable. Joss *et al.* (2006) informaron de resultados similares trabajando con sistemas MBR y CAS, y calcularon constantes cinéticas de biodegradación similares para ambos tipos de tratamiento. KTP ha sido considerado un compuesto altamente biodegradable (Salgado *et al.*, 2012).

La elevada biodegradabilidad de estas sustancias es responsable de la mayor o menor eficiencia en su eliminación, que depende las variables operacionales del tratamiento biológico, siendo el SRT una de las más influyentes (Tambosi *et al.*, 2010; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012). Elevados valores de SRT dan lugar al desarrollo de un comunidad microbiana más diversa y favorece la proliferación de bacterias de crecimiento lento, algunas de las cuales pueden estar implicadas en la biodegradación de microcontaminantes (Suarez *et al.*, 2010). Martín *et al.* (2012) encontraron que el CASP era altamente efectivo en la eliminación de IBU, aunque significativamente menor que el alcanzado en este estudio, en el caso del NPX y KTP los rendimientos estaban más limitados. EL SRT puede ser la principal diferencia entre un CASP y un MBR, ya que no es común un CASP que trabaje con valores de SRT en torno a 37 d, que son los valores utilizados en el MBR objeto de este estudio. Esta influencia del SRT en la eliminación de KTP y NPX fue ya observada por Tambosi *et al.* (2010) cuando detectaron el aumento en la

eliminación de estos, al aumentar el SRT de 15 d a 30 d. En este sentido, Maeng et al. (2013) demostraron la importancia de la degradación biológica en la eliminación de compuestos como el IBU y especialmente NPX y KTP, observando una relación directa entre el incremento del SRT y el aumento de la eliminación de estos compuestos.

El HRT también juega un papel importante en la transformación de compuestos biodegradables, especialmente para aquellos que son lentamente biodegradables (Vieno *et al.*, 2007; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012). El incremento del HRT implica un mayor tiempo de contacto entre el compuesto y los microorganismos capaces de su transformación, y por consiguiente su asociación con mayores SRT, que permiten a su vez el desarrollo de microorganismos de lento crecimiento, podrían permitir una mayor eliminación biológica. Fernández-Fontaina *et al.* (2013) no encontraron disminución en la eficiencia de la biodegradación de IBU y NPX a pesar de reducir el HRT de 4,6 d a 1,0 d, trabajando con un SRT > 10 d; mientras que Krugobla *et al.* (2016) observaron una elevada capacidad de eliminación en MBR trabajando a bajas temperaturas con un HRT de 8,5 h. A causa de la elevada biodegradabilidad de estos compuestos, el efecto negativo de la disminución en el HRT pasa desapercibida, siendo más limitantes otras variables como el SRT.

El DCF, al contrario que las otras sustancias, fue resistente al tratamiento MBR, siendo solo parcialmente eliminado (21 %). Esta poca eliminación no es sorprendente, ya que la biodegradación del DCF es muy lenta o inexistente (Salgado *et al.*, 2012; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2013; Vieno y Sillanpää, 2014) y ha sido identificado como una sustancia bastante persistente en los procesos de tratamiento biológico (Vieno y Sillanpää, 2014). Otros investigadores han detectado un comportamiento similar en MBR y en CASP (Luo *et al.*, 2014; Maeng *et al.*, 2013; Trinh *et al.*, 2016), sin embargo Radjenovic *et al.* (2009) encontraron unos porcentajes de eliminación para el DCF mayores al 60 % en sistemas MBRs, considerando la biodegradación como el principal mecanismo para su eliminación. De este modo, existe bastante controversia en la literatura concerniente al rendimiento en la eliminación del DCF en sistemas de fangos activos, a lo que hay que añadir el hecho de que durante la presente investigación las concentraciones de DCF en el efluente fueron mayores que las del respectivo influente en el 40 % de las muestras analizadas. Por consiguiente, el rendimiento de la eliminación de DCF fue negativo en el 40 % de los días de estudio. En el otro lado, el mayor rendimiento en la eliminación de DCF registrado fue de 53,4 % (Tabla 4.4), mostrando un gran variabilidad en la eliminación del DCF. Estos resultados son similares a los registrados por Vieno y Sillanpää (2014).

Los resultados obtenidos muestran la gran capacidad del sistema MBR para la eliminación de NSAIDs como IBU, NPX y KTP trabajando con elevados SRT y HRT. Sin embargo, otras alternativas son necesarias para eliminar los NSAIDs más recalcitrantes como el DCF. A pesar de los elevados rendimientos alcanzados para la mayoría de los NSAIDs analizados, es necesario hacer énfasis en el hecho de que la biotransformación de NSAIDs mediante la transformación oxidativa genera otros compuestos tales como derivados hidroxilados y carboxilados (Tambosi *et al.*, 2010) que podrían ser vertidos al medio ambiente y cuyos efectos ambientales y sobre la salud pública son desconocidos. Es necesario impulsar nuevos esfuerzos para el mejorar el conocimiento sobre la generación de derivados de la transformación oxidativa de los NSAIDs y sus efectos ambientales, con el objeto de establecer la efectividad real de los MBR en la eliminación segura de los NSAIDs.

#### **4.3.3. Balances de masas**

De acuerdo con el comportamiento de los NSAIDs analizados en el sistema experimental MBR, podemos diferenciar dos grupos distintos. Por un lado están IBU, NPX, y KTP, que han sido descritos como fácilmente biodegradables (Salgado *et al.*, 2012; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2013). En el otro lado está el DCF, considerado poco biodegradable en sistemas de fango activos (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2013) y para el que se han encontrado rendimientos de eliminación tanto positivos como negativos, su comportamiento difiere respecto al resto (Salgado *et al.*, 2012; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2013; Vieno y Sillanpää, 2014)

La figura 4.3. representa los balances de masas medios, obtenidos de la serie de datos estadísticamente homogéneos, de los compuestos más biodegradables. Los tres compuestos presentan una tendencia similar, especialmente IBU y NPX; el KTP muestra ciertas diferencias respecto a los otros dos, pero siguiendo el mismo patrón. La mayor eliminación de estos compuestos se produce en el reactor aireado, siendo la más significativa la del IBU (81 %) y la menor para el KTP (77,9 %). Aparte de las cantidades de NSAIDs que permanecen en el sistema, el otro punto donde se produjo eliminación de los compuestos estudiados fue en el reactor anóxico, llegando al 11 % en el caso el NPX, algo menor para el IBU (7,8 %) y apenas apreciable para el KTP.

El rendimiento en la eliminación de estas sustancias, especialmente en el reactor aireado, parece estar relacionada con la diferente biodegradabilidad de la sustancia en el fango activo, la cual ha sido descrita como mayor para el IBU que para el NPX (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2013). No hay datos comparativos en la literatura para el KTP. Quintana *et al.* (2005) observaron que el KTP podía ser utilizado por los microorganismos presente en el fango activo como fuente de carbono en ausencia de otros compuestos biodegradables, mientras que esto no ocurría en el caso del IBU y el NPX. Sin embargo, en presencia de otros compuestos biodegradables, KTP no era biodegradado por los microorganismos del fango activo, mientras para IBU y NPX se observaba degradación co-metabólica. Esto podría explicar las diferencias en la eliminación de estos compuestos, dado el elevado SRT utilizado en el MBR que, bajo la falta de sustancias fácilmente biodegradables, podría causar la degradación significativa de sustancias metabolizables como el KTP.

El reactor anóxico de la planta experimental posee un HRT 2,6 veces menor que el del reactor aireado, lo cual no explicaría las diferencias en el rendimiento encontradas entre los reactores, especialmente para el KTP, por tanto la vía aeróbica puede considerarse como la más efectiva para la eliminación de estos compuestos con una elevada biodegradabilidad. La capacidad de eliminación de estos compuestos mediante la vía aeróbica no estaba solo condicionada por la mayor o menos biodegradabilidad, sino también por la concentración de los NSAIDs en el agua residual. La mayor eliminación se observó para el IBU, con una capacidad de 6,6 mg IBU/Kg SSV d, mientras que para el NPX el rango medio obtenido fue 1,1 mg NPX/ Kg SSV d, 6 veces inferior al valor obtenido para el IBU, equivalente a la diferencia de concentraciones en el influente. El rango en el caso del KTP fue 0,07 mg KTP/Kg VSS d, también equivalente a la diferencia de concentraciones en el influente.

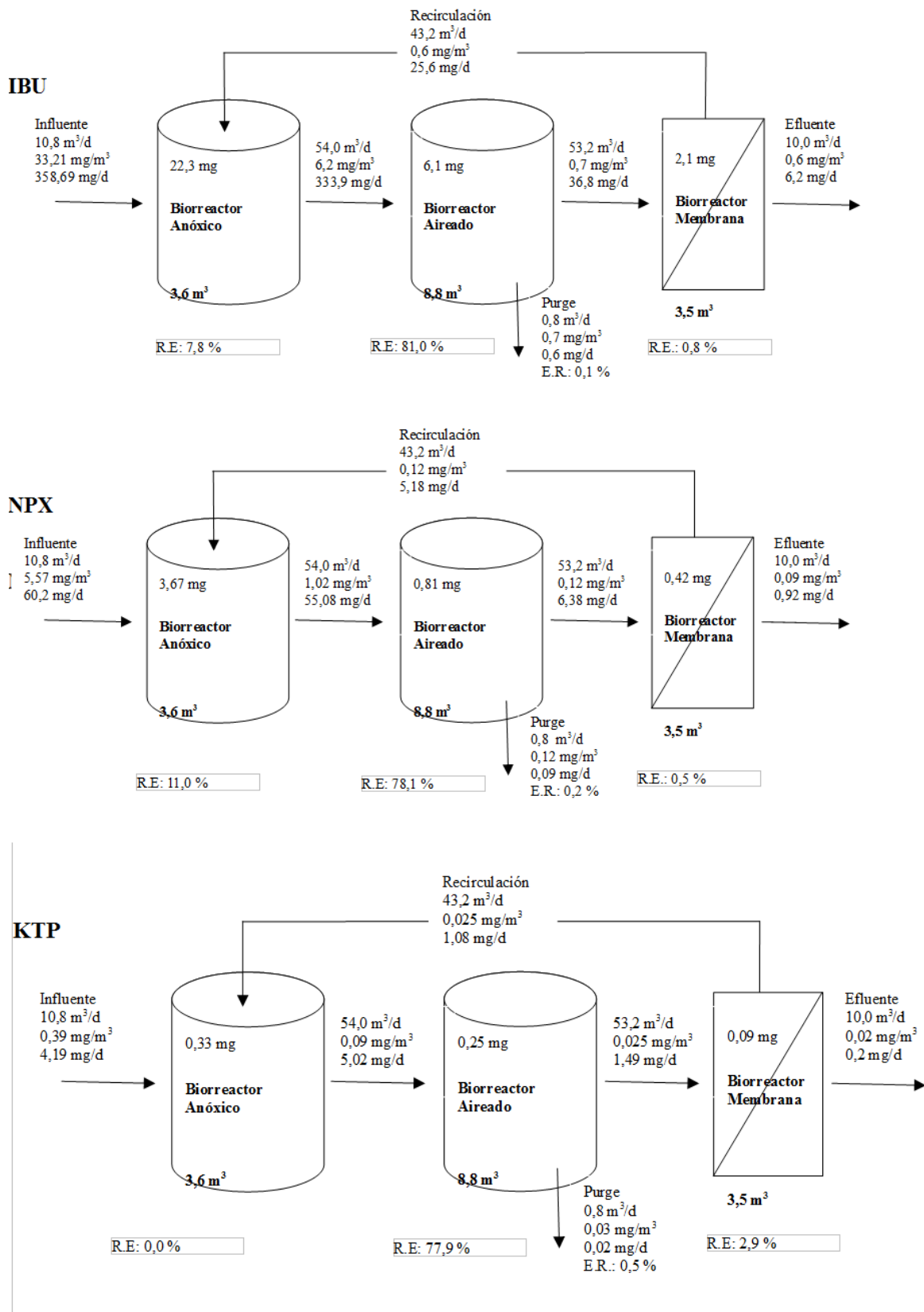


Figure 4.3. Resumen del balance para IBU, NPX y KTP en el MBR durante el periodo experimental; Se muestran los resultados de un día medio. R.E. (Rendimiento en la eliminación %)

Phan *et al.* (2014) observaron que la recirculación interna entre los biorreactores aireado y anóxico era un importante prerrequisito para la biodegradación anóxica de los NSAIDs, en ausencia de la cual se esperaba una baja la capacidad de eliminación de NSAIDs en la fase anóxica. Como se comentó previamente, uno de los grandes problemas en la desnitrificación en el reactor anóxico es el arrastre de oxígeno residual a través de las recirculación (Arévalo *et al.*, 2014). Este arrastre puede estar relacionado con la efectividad del proceso anóxico en la eliminación de ciertos compuestos como IBU, NPX y KTP. Phan *et al.* (2014) observaron que la incorporación de un sistema de recirculación interna entre el reactor aireado y el anóxico, en una planta MBR con nitrificación/desnitrificación simultánea, estimulaba, en el reactor anóxico, la eliminación de compuestos como IBU, NPX y KTP, sin que variara el rendimiento general de la instalación. Durante estos estudios, se detectó que la recirculación interna elevaba el potencial de oxidación reducción, presumiblemente por el arrastre de compuestos como el oxígeno, la presencia de los mismos podía haber causado la mayor eliminación de NSAIDs en el reactor anóxico. La instalación experimental tenía recirculación interna entre el tanque de membranas y el reactor anóxico (4Q), no realizándose desde el reactor aireado. Esto afectó negativamente a la desnitrificación, probablemente por el arrastre de oxígeno residual, afectando a la biotransformación de determinados NSAIDs, facilitando su metabolización aeróbica en el primer reactor del sistema, donde las concentraciones de los NSAIDs son mayores. Dado que en este reactor la presencia de compuestos orgánicos biodegradables es elevada, la eliminación de los NSAIDs se llevó a cabo mediante cometabolismo, siendo menor para el KTP, descrito por Quintana *et al.* (2005) como no metabolizable en presencia de otros compuestos biodegradables.

Los balances realizados para los compuestos objeto de estudio, revelan que la salida de NSAIDs con la purga fue insignificante (Figura 4.3). Estos resultados confirman que IBU, NPX y KTP no presentan acumulación en la biomasa y, por tanto, esta no es responsable de la eliminación de estos compuestos. Los NSAIDs analizados han sido descritos como compuestos hidrófilos (Radjenovic *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2013; Trinh *et al.*, 2016) y por lo tanto su eliminación mediante la sorción es ineficaz a pesar de la elevada concentración de TSS en los biorreactores como consecuencia del elevado SRT.

Respecto a los NSAIDs estudiados, se observó una insignificante capacidad de eliminación en el tanque de membranas. Pese al HRT de este tanque y la presencia de suficiente oxígeno para la eliminación biológica, los porcentajes de reducción de los NSAIDs fueron menores al 3 %. Estos

valores tan reducidos pueden atribuirse a la baja concentración de los NSAIDs analizados en este reactor, la cual en el caso de KTP era inferior al LOQ, aunque eran apreciables en el caso del IBU y NPX. Las concentraciones en el fango activo entrante y saliente de este reactor eran muy parecidas y por tanto la mayoría de los NSAIDs presentes en el reactor de membranas eran arrastrados hacia el reactor anóxico a través de la recirculación o salía del sistema en el efluente.

La retención por la membrana ha sido descrito como otro mecanismos para la eliminación de fármacos en MBRs (Tambosi *et al.*, 2010), pero considerando el corte molecular del material de la membrana y el peso molecular de los NSAIDs analizados, la retención física por medio de la membrana es improbable. La sorción sobre las membranas también fue limitada por la pequeña superficie de la membrana y el carácter hidrófilo de los NSAIDs analizados.

La figura 4.4 muestra los balances de masas medios, obtenidos de una serie de datos estadísticamente homogéneos reflejando dos situaciones opuestas, rendimientos de eliminación positivos y negativos. Por un lado, las muestras con rendimientos positivos en la eliminación de DCF por el sistema MBR, con un rendimiento máximo de 53,4 %, y por el otro lado, las muestras cuyos valores fueron negativos. La reducción de la concentración de DCF se produjo solo en el biorreactor aireado, aunque el grado de eliminación no es muy elevado. Fernández-Fontaina *et al.* (2013) consideraron al DCF como difícilmente biodegradable, confirmando el carácter recalcitrante de este compuesto en sistemas MBR. Otros autores que trabajaron con sistemas MBR y CASP describieron resultados similares (Salgado *et al.*, 2012; Vieno y Sillanpää, 2014; Kruglova *et al.*, 2016). Las condiciones operacionales como la temperatura del fango activo, SRT o HRT afectan a la degradación del DCF, siendo ésta probablemente la razón de tanta discrepancia en la literatura concerniente a la eliminación del DCF en plantas de tratamiento de aguas residuales (Radjenovic *et al.*, 2009; Salgado *et al.*, 2012; Vieno y Sillanpää, 2014). Los resultados del balance de masas del DCF confirman dichas observaciones y añaden un elemento más de discrepancia por los rendimientos negativos observados para varias muestras, lo cual también ha sido descrito por otros investigadores (Zorita *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012).

Zorita *et al.* (2009), al encontrar valores negativos para la eliminación del DCF en tratamientos de CAS, sugirieron que se debía a la ruptura de los conjugados glucuronidados o sulfatados de DCF. Conclusiones similares fueron expuestas por Lee *et al.* (2012), suponiendo la existencia de hidrólisis microbiológica y abiótica en el fango activo, que aumentaba la presencia de

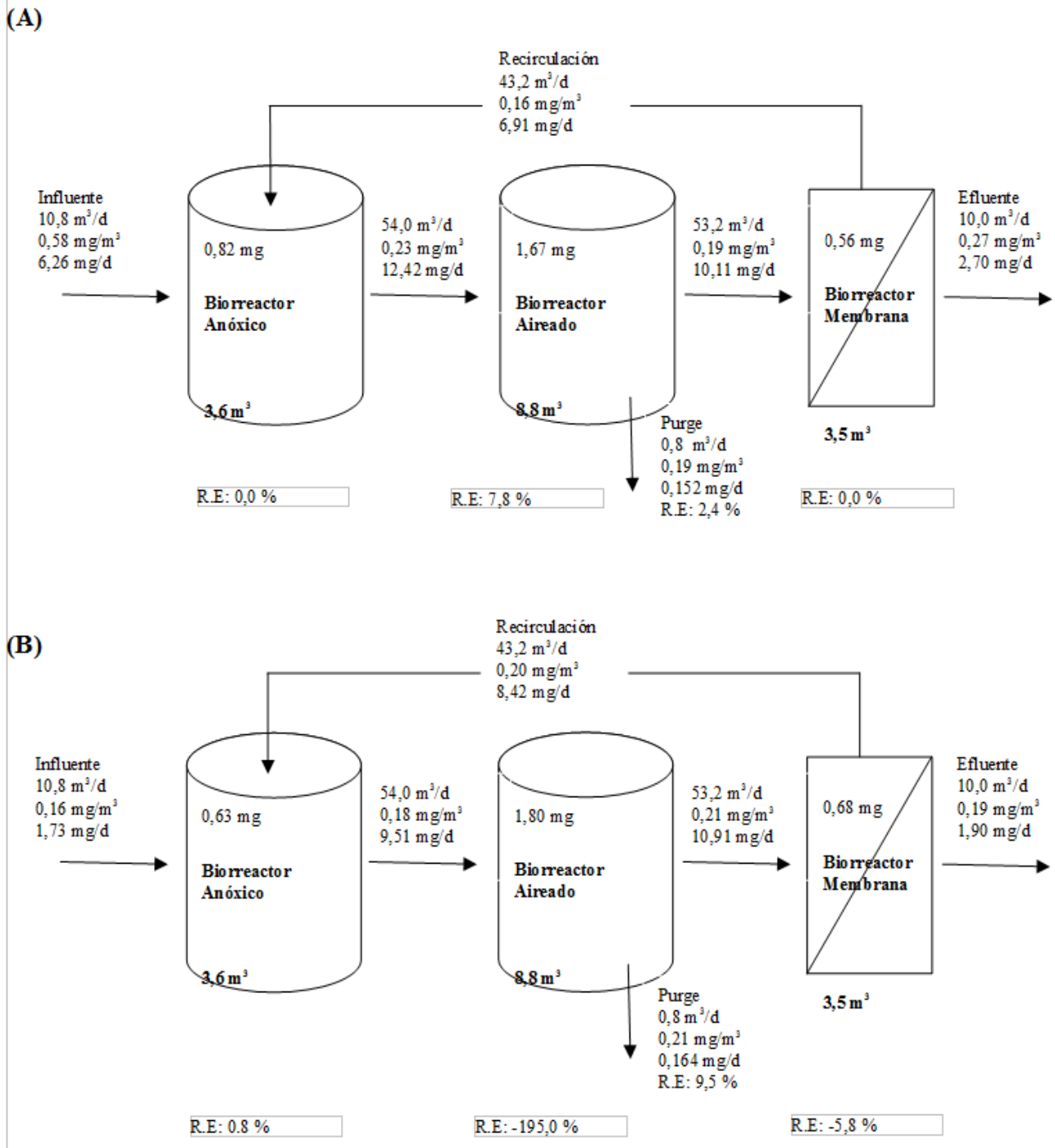


DCF. Menos del 1 % del DCF consumido por los humanos es excretado como forma sin metabolizar, y más del 11 % es excretado metabolizado como conjugado con taurina, glucuronido o sulfato (Vieno y Sillanpää, 2014). Estos metabolitos conjugados del DCF probablemente son separados y transformados en su forma libre por procesos enzimáticos durante el tratamiento del agua residual (Lee *et al.*, 2012). En muestreos con rendimientos negativos, el incremento de DCF era especialmente significativo en el reactor aireado y apenas apreciable en los reactores anóxico y de membranas, y dado que esta transformación de los metabolitos del DCF se produce en la forma no metabolizada, esto ocurre principalmente en el reactor aireado.

Este comportamiento ha sido propuesto anteriormente para otros fármacos. Ternes *et al.* (1999) observaron un comportamiento similar para distintos estrógenos debido a la actividad glucuronidasa del fango activo aireado; y González *et al.* (2016) también observaron un incremento en la concentración de CBZ en la misma planta experimental MBR, proponiendo una separación enzimática de los metabolitos conjugados y sugiriendo la actividad glucuronidasa en este mismo MBR, debido a los elevados SRT y HRT.

En lo que respecta al reactor anóxico, no se apreciaron variaciones entre las cantidades de DCF que entraban y las que salían del sistema, tanto en los muestreos con rendimientos positivos como en los negativos. Suarez *et al.* (2010) encontraron que el DCF no era degradado biológicamente bajo condiciones anóxicas, siendo su biodegradación más acentuada en condiciones de nitrificación. Estas condiciones, a pesar del posible arrastre de oxígeno residual, eran improbables en el reactor anóxico de la instalación experimental.

En el reactor de membranas la eliminación del DCF no fue apreciable, a pesar de que ha dicho reactor, por el contrario a los otros NSAIDs estudiados, llegaban elevadas concentraciones de DCF, coincidentes con los valores de salida. Este reactor mantiene condiciones aeróbicas, aunque la concentración de oxígeno disminuye, ya que el aire es suministrado a través de burbujeo grueso con la finalidad de controlar el ensuciamiento de la membrana. Estas condiciones podrían afectar la disponibilidad de OD para ciertos microorganismos involucrados en la transformación del DCF, haciendo que su transformación biológica en el reactor de membranas sea insignificante



**Figure 4.4.** Resumen del balance de masas para DCF en el MBR durante el periodo experimental con el mayor rendimiento observado (A) y con rendimiento negativo (B). R.E. (Rendimiento en la eliminación %)

El mayor HRT del reactor aireado y la mayor disponibilidad de OD puede favorecer la biodegradación de este compuesto recalcitrante, además del (mejor que) desarrollo de una significativa actividad nitrificante, que ha sido relacionada con el incremento en la biodegradación del DCF (Vieno y Sillanpää., 2014). Sin embargo, la eliminación biológica de este compuesto ha sido prácticamente insignificante. Para alcanzar una mayor biodegradación del DCF, Vieno y Sillanpää (2014) sugirieron el uso de sistemas MBR que trabajen con un SRT mayor de 150 d y un HRT mayor de 3 días, valores muy por encima de los utilizados en el presente estudio y que podrían comprometer la viabilidad del sistema MBR, técnica y económicamente, dado el tamaño de la instalación y el consumo energético dedicado principalmente a la aireación (Fernández-Álvarez *et al.*, 2014).

El DCF, como los otros NSAIDs analizados, es un compuesto hidrófilo con un Log  $K_{ow}$  similar al del IBU (Feng *et al.*, 2013). De acuerdo con estas características, la sorción del DCF puede considerarse insignificante (Trinh *et al.*, 2016). Sin embargo, el carácter recalcitrante de este compuesto en sistemas MBR, la posible transformación de formas metabolizadas en formas no metabolizadas, la elevada concentración de biomasa en el sistema MBR debido al elevado SRT y el elevado HRT, pueden conducir a un incremento en la retención de DCF por sorción. Radjenovic *et al.* (2009) observaron una mayor capacidad de retención de DCF en el fango activo de un MBR comparado con un proceso CASP, lo cual puede deberse a las características y elevada concentración de la biomasa.

La mayor acumulación del DCF dentro del sistema MBR es la causa del que porcentaje de este compuesto que sale del sistema a través de la purga sea mayor que el observado para el resto de los NSAIDs analizados. Sin embargo, el poco caudal de purga establecido por el elevado SRT provoca que esa salida de DCF sea escasa comparada con la entrada del mismo a través del influente. El efluente fue la principal vía para la salida del DCF no transformado en el sistema MBR, debido a las características hidrofílicas y recalcitrantes del DCF.

Junto al posible incremento en la concentración de DCF por la transformación de las formas metabolizables (Zorita *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012), la acumulación en el sistema fue otra posible causa de los valores negativos para el rendimiento en su eliminación aparecidos en el MBR (Kruglova *et al.*, 2016). Los balances realizados al DCF mostraron que, por medio de la

recirculación (4Q) entre el tanque de membranas y el reactor anóxico, cantidades considerables de DCF regresan al principio del sistema.

Esta recirculación, indispensable para el sistema MBR (Judd, 2011), unida a las fluctuaciones en la concentración de DCF en el influente (para la que se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre muestras) y al elevado HRT, puede ser responsable de parte de los rendimientos negativos para la eliminación de esta sustancia. Por tanto, tras un periodo con elevada entrada de DCF a la instalación MBR, el cual se acumulaba en la biomasa, retornándose al reactor anóxico debido a la recirculación. Si, tras un periodo con elevada concentración de DCF en el influente, desciende la concentración de entrada, se producirá el arrastre junto con el efluente de parte del DCF acumulado en la biomasa recirculada, de esta forma las concentraciones en el efluente pueden ser mayores que las concentraciones en el influente. Sin tener en cuenta esta tendencia, causada por las características de los sistemas MBRs, los efluentes de los sistemas que trabajan con elevados valores de SRT y HRT, según características técnicas y económicas viables, presentan un considerable aporte de DCF al medio ambiente. Los efectos causados por la liberación de esta sustancia en el medio ambiente y su inclusión en la primera lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión Europea en el ámbito de la política de aguas (Decision UE 2015/495), hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de aquellas sustancias que, como el DCF, se vuelven recalcitrantes.

#### **4.4. Conclusiones**

Un sistema MBR experimental a escala real trabajando en conformación desnitrificación/nitrificación con unos elevados SRT y HRT (37,0 d y 35,6 h, respectivamente) mostró elevada eficiencia en la eliminación de IBU, NPX y KTP del agua residual urbana, con unos niveles de rendimiento superiores al 95 %. Sin embargo, se observó un bajo rendimiento para la eliminación de DCF, incluso con rendimientos negativos en varios muestreos.

Los valores de eliminación de los NSAIDs analizados depende en mayor o menor medida de la capacidad, de parte de los microorganismos del fango activo, para la biotransformación, siendo más significativa para los compuesto cometabolizables, ya que las concentraciones de esos compuestos en el efluente dependerá tanto de su concentración en el influente, como de su

biodegradabilidad.

Dada la escasa biodegradación del DCF y su naturaleza hidrófila, bajo las condiciones operacionales del sistema MBR estudiado, el compuesto tendía a acumularse en el sistema y ser recirculado. Sin embargo, al contrario de lo observado para la materia orgánica no biodegradable, para el DCF se observaron valores negativos en su eliminación, principalmente durante los muestreos en los que la concentración del influente disminuía. La débil adsorción y el incremento en la concentración observada en el reactor aireado también contribuyen a los rendimientos negativos.

La mayor parte de la transformación de los compuestos biodegradables como el IBU, NPX y KTP, en los sistemas que trabajan en condiciones de desnitrificación/nitrificación con elevados SRT y elevado HRT, sucede en el reactor aireado mientras que la contribución del reactor anóxico es irrelevante.

Para los compuestos hidrófilos que apenas son biodegradables como el DFC, la mayor transformación también se produjo en el reactor aireado; dicha transformación implica tanto la eliminación como la aparición del compuesto.



## **CAPÍTULO 5**

*Este capítulo corresponde al artículo titulado "Wastewater polycyclic aromatic hydrocarbons removal by membrane bioreactor" publicado en Desalination and Water Treatment en abril de 2012.*





## **5. Eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua residual mediante un biorreactor de membrana sumergida.**

### **5.1. Introducción**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son compuestos orgánicos hidrófobos con dos o más anillos aromáticos unidos, los cuales presentan una solubilidad relativamente baja en agua y un alto coeficiente octanol/agua ( $K_{ow}$ ).

Estos compuestos son originados por la pirolisis de compuestos orgánicos a elevadas temperaturas, situadas en el intervalo de 500 a 900 °C, especialmente por la combustión incompleta durante los procesos industriales y otras actividades humanas, tales como los procesos con carbón, petróleo, la combustión de gas natural o madera, combustión de residuos, tráfico de vehículos, las cocinas y el consumo de tabaco; así como por procesos naturales como la carbonización (USEPA, 1994; Blanchard *et al.*, 2004).

Los niveles de PAHs en el agua residual dependen de los efluentes industriales, las aguas domésticas y la escorrentía superficial (Blanchard *et al.*, 2004; Manoli y Samara, 2008). La concentración de PAHs en aguas residuales domésticas varía de 0,005 a 14,3 µg/L y en aguas residuales urbanas de origen mixto las concentraciones oscilan entre 2,7 y 26,4 µg/L (Sánchez-Ávila *et al.*, 2009). En aguas residuales urbanas se ha observado cierta predominio de compuestos

con bajo peso molecular predominando el fenantreno (*Phen*), naftaleno, fluoranteno (*F*) y pireno (*Py*) (Blanchard *et al.*, 2004).

Debido a su amplia distribución y sus características tóxicas, carcinogénicas y/o mutagénicas, unidas a su persistencia y su naturaleza lipofílica, varios PAHs son considerados peligrosos para los ecosistemas y suponen un riesgo para la salud pública (Blanchard *et al.*, 1999; Sweetman *et al.*, 2000). Debido a esto, algunos PAHs han sido identificados como sustancias prioritarias por la Unión Europea y la US EPA para reducir sus emisiones al medio ambiente y su presencia en el mismo (Manoli y Samara, 1999).

La presencia y el destino de los PAHs en EDARs con CASP han sido previamente estudiados (Manoli y Samara, 2008). Las aguas residuales tratadas muestran niveles de PAHs menores, resultado de su eliminación a través de diferentes procesos. Como consecuencia de sus propiedades físico-químicas, los PAHs son eliminados del agua residual, principalmente mediante su sorción al fango (Buseti *et al.*, 2006). Otros mecanismos como la volatilización, advección, biotransformación/biodegradación o el arrastre por aire han de tenerse en cuenta como vías de eliminación de PAHs del agua residual; estos procesos están relacionados con las características del influente, el tipo de proceso y las condiciones de operación del sistema (Byrns, 2001; Manoli y Samara, 2008). En los reactores anóxicos con agitación, los mecanismos a considerar en la eliminación de los PAHs son sorción, volatilización y biotransformación; mientras que en los reactores aireados, estos compuesto son eliminados mediante sorción, volatilización, arrastre por aire y biotransformación/biodegradación (Byrns, 2001; Katsoyiannis y Samara, 2005).

Los MBR son una alternativa a los CASP. Esta tecnología combina el proceso biológico de fangos activos con una separación sólido/líquido mediante membrana, evitando la necesidad de una etapa de sedimentación. De esta forma, se ha desarrollado un nuevo sistema que une la primera, segunda y tercera etapas del tratamiento de aguas, permitiendo la construcción de plantas más compactas capaces de producir efluentes directamente reutilizables (Wisniewski, 2007). Además, se pueden utilizar diferentes configuraciones del sistema en función de la calidad del efluente que se pretenda obtener. Por tanto, los mecanismos implicados en la eliminación de los PAHs en el tratamiento MBR pueden variar respecto a los CASP.

El objetivo del presente estudio es conocer los principales mecanismos implicados en la eliminación de PAHs del agua residual urbana mediante el tratamiento en un MBR. Con este propósito, se determinaron los PAHs presentes en el agua residual bruta y en el agua residual tratada de un MBR piloto. Distintas etapas del proceso fueron analizadas a escala de laboratorio, realizando ensayos de respirometría para conocer la toxicidad potencial de los PAHs.

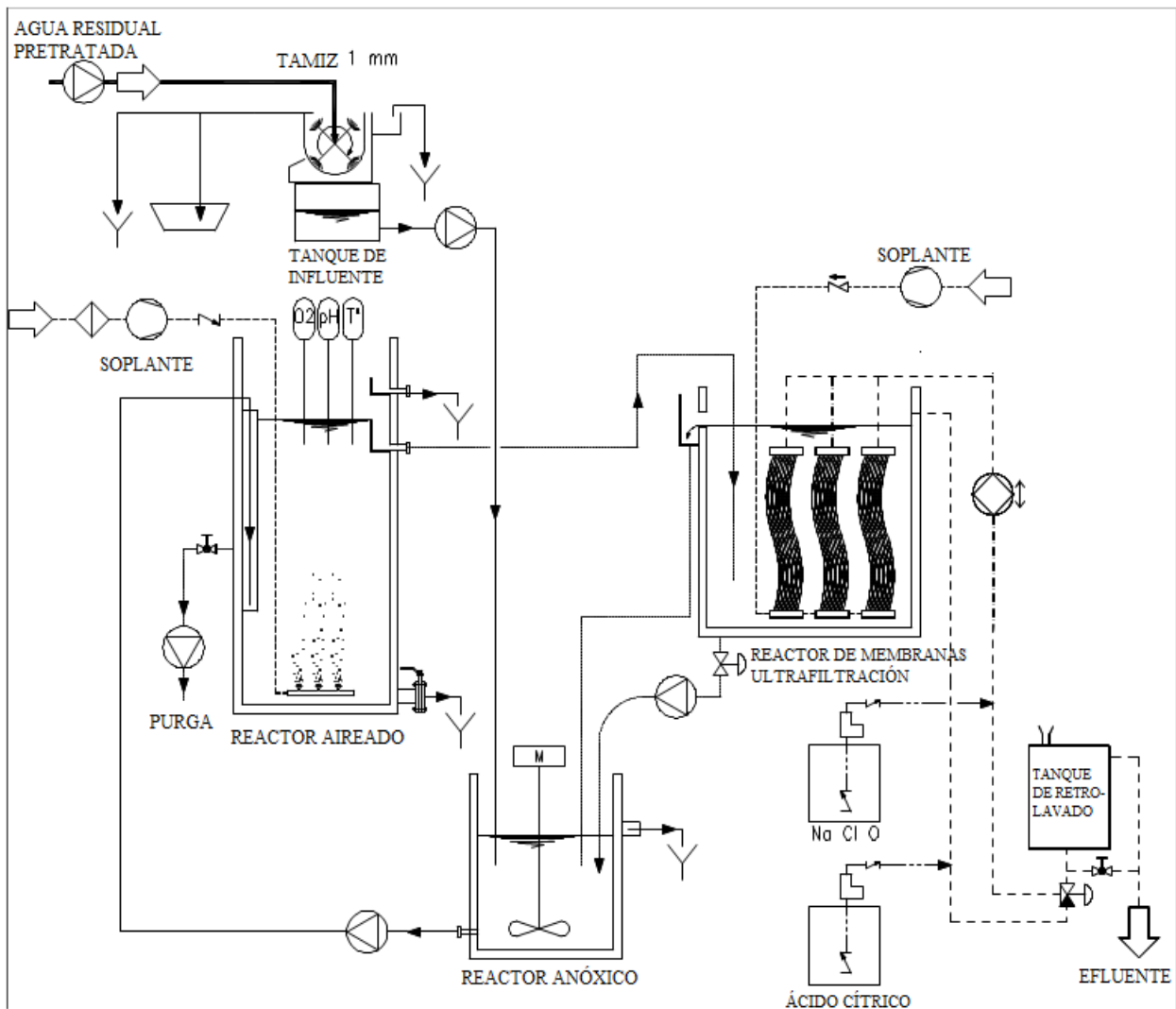
## **5.2. Materiales y Métodos**

### **5.2.1. Estudio en la planta piloto**

Una primera etapa del estudio fue desarrollada en una planta piloto MBR, localizada en la estación depuradora de aguas residuales urbanas de Granada (España). El sistema estaba equipado con membranas de fibra hueca Zenon Zeewedd 500 de ultrafiltración (con tamaño de poro nominal de  $0,04\ \mu\text{m}$ ), consistentes en una matriz de fibra porosa recubierta por polivinilideno (PVDF) (Figura 5.1).

La instalación fue alimentada con agua residual pretratada la cual se pasó a través de un tamiz de 1 mm de luz de malla como pretratamiento adicional. La planta piloto trabajó en configuración de pre-desnitrificación, realizando la alimentación al reactor anóxico, pasando posteriormente el fango activo a un reactor aireado y de este al reactor de membranas donde se realizaba la separación entre el fango activo y el permeado. El concentrado era recirculado al reactor anóxico y el permeado ( $0,8\ \text{m}^3/\text{h}$ ) pasó al tanque de contralavado. Una purga constante de  $1,05\ \text{m}^3/\text{d}$  de fango activo se realizó desde el reactor aireado para obtener un SRT de 25 d. El HRT fue de 35 h.

Se tomaron muestras diarias del influente, efluente y purga durante una semana. La toma de muestras estaba automatizada mediante un muestreador ubicado en cada una de las tuberías correspondientes. Una porción de muestra era tomada cada hora y depositada en una botella de vidrio topacio (100 ml), llenada completamente y sellada herméticamente. Se analizó la presencia de los compuestos orgánicos persistentes en todas las muestras.



**Figura 5.1** Esquema de la planta piloto.

### **5.2.2. Estudio a escala de laboratorio**

Para realizar los ensayos a escala de laboratorio se utilizaron varios biorreactores trabajando en paralelo. El volumen de los reactores era de 10 L; y todos tenían un sistema de agitación. Dos de los reactores, además, tenían un sistema de inyección de aire y se llenaron con fango activo procedente del reactor aireado de la planta piloto. El resto de los reactores del laboratorio se llenaron con el fango activo del reactor anóxico.

Diferentes concentraciones de *Py*, *Phen* y/o *F* fueron añadidas a determinados reactores con la intención de obtener unas concentraciones de PAHs elevadas. Después de 24 h, los la fase acuosa y la fase sólida del fango activo fueron separadas mediante decantación en probetas de 250 ml, para la determinación del comportamiento y el destino de los PAHs. Ambas fases fueron utilizadas para la extracción y el análisis de los PAHs. Las muestras se tomaron manualmente.

Con el objeto de determinar la posible toxicidad de los PAHs y la capacidad potencial de biodegradación del fango, se evaluó la actividad de la biomasa y la tasa de consumo de oxígeno mediante respirometría; realizando ensayos en configuración dinámica y cíclica. La configuración cíclica se utilizó para determinar la tasa de consumo de oxígeno (OUR) y la respuesta de la biomasa durante un tiempo de exposición prolongado. La configuración dinámica se utilizó para los ensayos Rs para evaluar la posible toxicidad aguda.

### **5.2.3. Determinación analítica de los PAHs**

Todas las muestras se recogieron en botellas de vidrio topacio (100 ml), llenadas completamente y selladas herméticamente. Los PAHs se analizaron en todas las muestras. La extracción de los PAHs del fango y del agua residual se realizó por medio de twister (*Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE) y fueron medidos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (APHA, 1989).

### **5.2.4. Cultivo de microorganismos degradadores de PAHs**

Cepas de microorganismos de la planta piloto fueron cultivadas en un medio de cultivo selectivo BSM (*Basal salt medium*), que posee nutrientes minerales pero ninguna fuente de carbono (Miller *et al.*, 2004); para ello se tomaron muestras de fango de los reactores aireado y anóxico (0,1 ml) por cada placa con 20 mL de BSM. Posteriormente la superficie se pulverizó con una solución de *Py* y acetona (1 mg/mL). Los cultivos fueron incubados a 20 °C en oscuridad y la aparición de colonias se controló durante un mes.

### 5.3. Resultados y discusión

La presencia de diversos contaminantes orgánicos persistentes fue analizada, y únicamente se encontró la presencia de algunos PAHs (Tabla 5.1). Por ello se estudió el comportamiento y el destino de los PAHs en el MBR.

Debido a las pocas descargas industriales existentes en Granada, se podría esperar la baja concentración de PAHs en el agua residual urbana. *Py*, *F* y *Phen* fueron los principales PAHs detectados, observando un predominio de compuestos con bajos pesos moleculares, tal y como Blanchard *et al.* (2004) observaron para aguas residuales urbanas.

Después del tratamiento MBR, las concentraciones de PAHs en el efluente se encontraban por debajo de los límites de detección. Lo cual indica una elevada eficacia, en la eliminación de los PAHs. Por tanto, durante el tratamiento fueron posibles mecanismos de sorción, volatilización, arrastre por aire o biotransformación/biodegradación como los identificados en otras investigaciones (Byrns, 1999; Katsoyiannis y Samara, 2005). No se encontraron PAHs en las muestras de purga por lo que se descartó la sorción como mecanismo significativo para la eliminación de los PAHs.

**Tabla 5.1** Presencia de contaminantes orgánicos persistentes ( $\mu\text{g/L}$ ) en la planta piloto MBR.

Contaminantes	Agua residual bruta	Efluente	Purga
Triazinas	<0,02	<0,02	<0,02
Comp. organofosforados	<0,03	<0,03	<0,03
Comp. organoclorados	<0,05	<0,05	<0,05
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)	0,48	<0,05	<0,05
Fenantreno	0,09	<0,05	<0,05
Fluoranteno	0,11	<0,05	<0,05
Pireno	0,28	<0,05	<0,05
Otros PAHs	<0,5	<0,5	<0,5
Bifenilos policlorados (PCBs)	<0,05	<0,05	<0,05

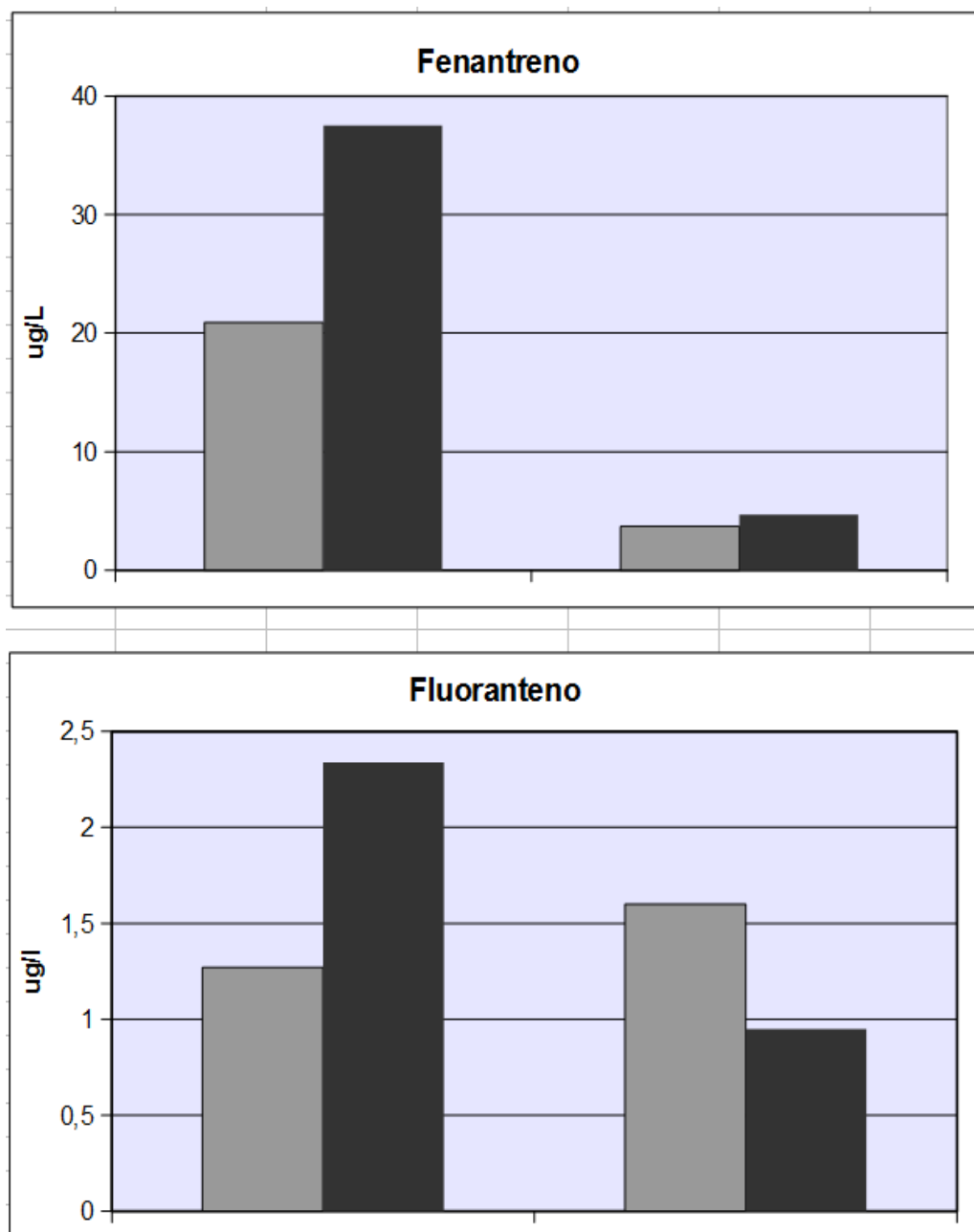
Después de un mes de incubación, los cultivos mostraron la presencia de microorganismos degradadores de PAHs, indicado por la aparición y desarrollo de halos transparente en la costra superior de pireno-acetona. Los cultivos positivos provenían tanto del reactor aireado como del anóxico. Las colonias estaban desarrolladas por hongos y su número era escaso, una o dos por placa de Petri. Estos resultados prueban la posibilidad de que se den mecanismos de biotransformación/biodegradación durante el tratamiento MBR. Sin embargo, su importancia fue desdeñable, en consonancia con los resultados de Haritash y Kaushik (2009).

Los experimentos a escala de laboratorio desvelaron que la presencia de *Phen* en el fango tras 24 h de aireación era un 85 % menor que en el fango no aireado (Figura 5.2). En ambos fangos, aireado y no aireado, la concentración de PAHs era mayor en la fase sedimentada que en la fase acuosa. Tal y como otros autores demostraron que ocurre para el naftaleno, durante el tratamiento secundario, el *Phen* podría haber sido arrastrado por el aire inyectado, este proceso ha sido identificado por otros autores como un mecanismo importante para la eliminación de PAHs con bajo peso molecular durante los tratamientos convencionales (Byrns, 2001; Manoli y Samara, 2008).

Para el *F* se observó un comportamiento similar, este compuesto fue obtenido principalmente de la fase sedimentada. Sin embargo, se observó una mayor concentración de *F* en la fase acuosa (Figura 5.2). Esto podría deberse a su mayor peso molecular y otras diferentes propiedades físico-químicas que podrían hacer que la eliminación del *F* fuera menor. La concentración de *F* en el reactor aireado fue un 50 % menor que la determinada en el reactor no aireado, este es un rendimiento mayor al observado por Manoli y Samara (2008).

En los reactores a escala de laboratorio se encontraron diferencias significativas entre el aireado y el no aireado. Esto indica el importante papel que desempeña la aireación, al provocar que el arrastre por aire sea la principal vía para la eliminación de los PAHs. Para los distintos PAHs se registraron rendimientos de eliminación entre 0 y 86 % para la fase de sedimentos, y entre 50 y 100% en la fase acuosa. Los rendimientos de eliminación de los PAHs en el agua residual y el fango varían según las propiedades de los diferentes compuestos. Los PAHs con bajo peso molecular (*Phen*) fueron más fácilmente eliminados que aquellos que presentaban mayores pesos moleculares

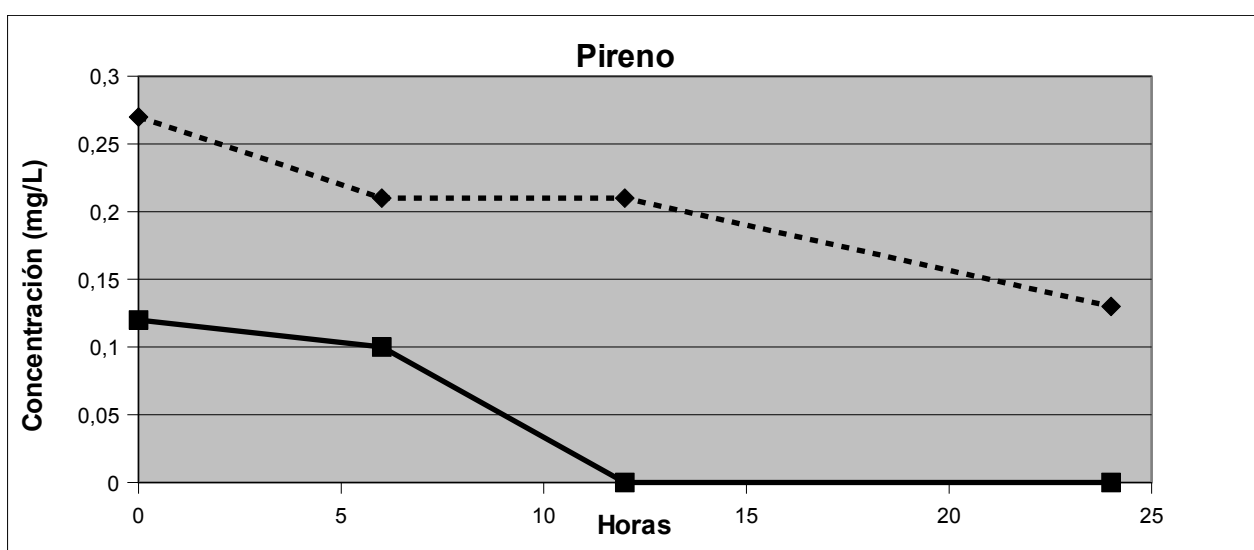
(F). La volatilización fue un importante mecanismo durante el tratamiento no aireado, pero su contribución a la eliminación total de PAHs no es muy significativa comparada con el arrastre por aire.



**Figure 5.2** *Phen* y *F* en el fango activo, después de 24h: (1) Biorreactor agitado; (2) Biorreactor agitado y aireado. Fase acuosa (gris pálido) y fase sedimentada (negras).



Tras 24 h de agitación y aireación del fango activo al que se le adicionaron 0,4 mg/L de *Py*, se observó que el compuesto se había distribuido entre la fase acuosa (1/3) y la fase sedimentada (2/3). El *Py* de la fase acuosa fue fácilmente eliminado durante las primeras 12 h. Sin embargo, la fase sedimentada presentaba presencia de *Py* después de 24 h, con un rendimiento del 50 % en la eliminación del *Py* (Figura 5.3). De nuevo, el *Py* fue mayoritariamente eliminado mediante arrastre por aire, ya que sus propiedades físico-químicas favorecen una menor eliminación desde el sedimento.



**Figura 5.3** Concentración de pireno: Evolución de la concentración de pireno presente en el sistema, en el sedimento (◆) y en la fase acuosa (■) durante el proceso de agitación y aireación.

Durante los tratamientos convencionales de aguas residuales, se observa una fuerte relación entre la eficacia en la eliminación de los PAHs presentes en la fase sólida y sus  $\log K_{ow}$ , sugiriendo así que los PAHs con mayores pesos moleculares son eliminados a través de la sorción a las partículas del fango y posteriormente eliminados, del agua tratada, durante la fase de separación sólido/líquido (Manoli y Samara, 2008). Sin embargo, por medio del sistema MBR, los PAHs son retirados de la fase líquida mediante la sorción a las partículas del fango y, durante la etapa aireada del tratamiento, los PAHs son transferidos a la atmósfera mediante el arrastre por aire.

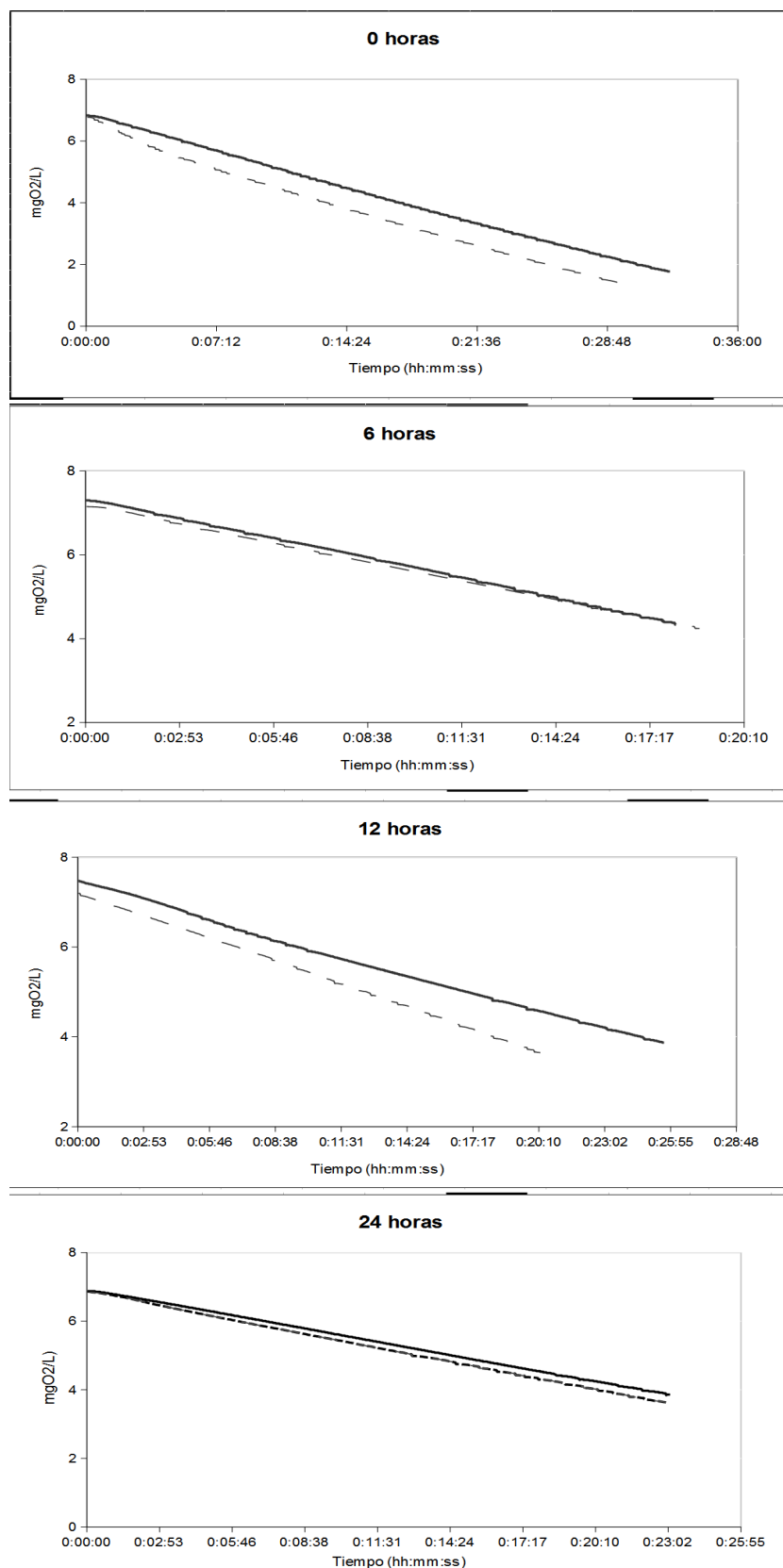
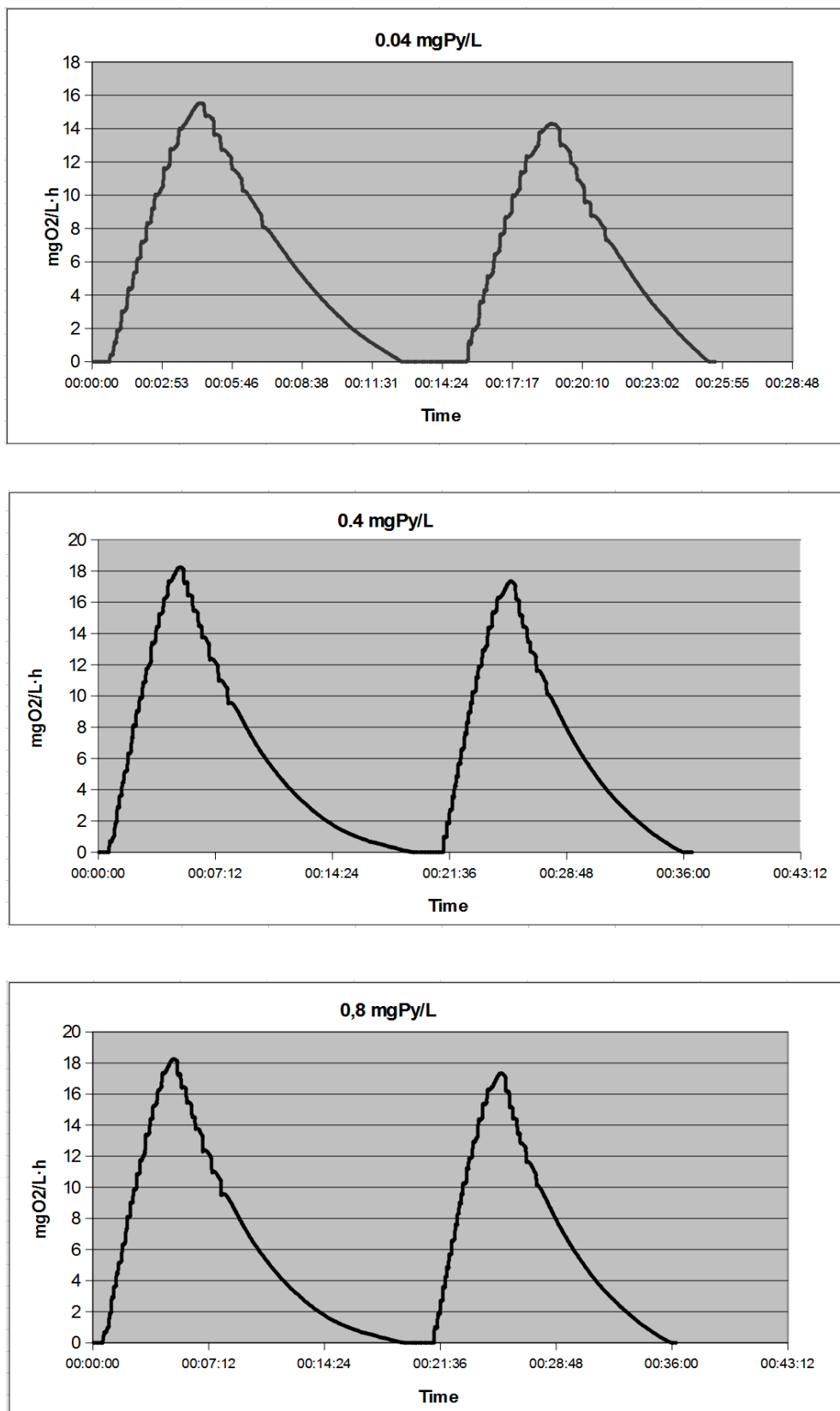


Figura 5.4 Velocidad de consumo de oxígeno (OUR) durante los ensayos respirométricos. Fango sin pireno (línea continua) y fango con pireno (línea de puntos) (0,04 mg/L).

La figura 5.4 muestra los resultados de los ensayos respirométricos; los respirogramas OUR presentan similares pendientes en el fango bruto y el fango con contaminante, lo cual sugiere que no se observó toxicidad para una concentración de 0,04 mg/L de *Py*.

La figura 5.5 refleja la respuesta del fango con diferentes concentraciones de *Py* (0,04-0,8 mg/L). Las tasas de respiración dinámica ( $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{h}$ ) fueron calculadas mediante ensayos de respirometría. Al comienzo, el fango bruto procedente de la planta piloto MBR era inducido al estado endógeno. Entonces, la tasa de respiración del fango era calculada midiendo el consumo mediante la adición de sustrato con una fuente de carbono (200 mg/L de acetato sódico). Una vez consumido el sustrato, y con el mismo fango, se vuelve a aportar sustrato junto con *Py* y se calcula la nueva tasa con la presencia de *Py*. Las tasas de respiración resultaron muy similares, por tanto el *Py* no presentó toxicidad para el fango activo, a una concentración inferior a 0,8mg/L.

La ausencia de toxicidad, observada para una concentración inferior a 0,8 mg/L, y una respuesta similar incluso a concentraciones mayores, indican que el *Py* no ha estado biodisponible durante los ensayos. Esto es debido a la hidrofobicidad del *Py*, a su tendencia a concentrarse adsorbido al fango y, principalmente, al arrastre por el aire que han dificultado su biodisponibilidad.



**Figura 5.5** Tasa dinámica de consumo de oxígeno ( $R_s$ ) en presencia de diferentes concentraciones de pireno: (a) 0,04 mg/L, (b) 0,4 mg/L, and (c) 0,8 mg/L.

## **5.4. Conclusiones**

Las siguientes conclusiones pueden extraerse de este estudio:

- Los rendimientos en la eliminación de los distintos PAHs presentes en aguas residuales mediante la tecnología MBR varían en función de sus propiedades . El fenantreno, un PAH con bajo peso molecular, fue más fácilmente eliminado que el fluoranteno cuya molécula es de mayor tamaño.
- Los PAHs con elevados pesos moleculares fueron principalmente eliminados mediante la sorción a las partículas del fango, y posteriormente transferidos a la atmósfera mediante el arrastre por aire durante las etapas del tratamiento con aireación.
- Mecanismos como la volatilización o biodegradación están limitados debido al elevado arrastre por aire.
- Durante el tratamiento MBR no debe esperarse toxicidad por la presencia de PAHs en el agua residual, debido a la baja biodisponibilidad para los microorganismos, principalmente por el elevado arrastre por aire.



## **CAPÍTULO 6**

*Este capítulo corresponde al artículo titulado "Removal of low concentrations of phenanthrene, fluoranthene and pyrene from urban wastewater by membrane bioreactors technology" publicado en Journal of Environmental Science and Health, Part. A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, en agosto de 2012.*





## **6. Eliminación de bajas concentraciones de fenantreno, fluoranteno y pireno de agua residual urbana mediante tecnología MBR.**

### **6.1. Introducción**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son contaminantes globalmente distribuidos y originados durante la combustión incompleta de la materia orgánica, los cuales pueden entrar en las EDARs como parte vertidos industriales y/o como componentes de los efluentes de los sistemas de alcantarillado doméstico y escurrientías urbanas, incluyendo derrames de combustibles fósiles y deposiciones atmosféricas (Blanchard *et al.*, 2004; Sánchez-Ávila *et al.*, 2009). Las concentraciones de PAHs observadas por otros autores en aguas residuales urbanas oscilan entre 0,01 y 27,7  $\mu\text{g/L}$ , con predominio de los compuestos de bajo peso molecular como el *Phen*, *F* y *Py* (Blanchard *et al.*, 2004; Sánchez-Ávila *et al.*, 2009).

Químicamente, los PAHs son un grupo de compuestos con dos o más anillos de benceno, los cuales por su elevada hidrofobicidad y sus estables estructuras químicas, son progresivamente menos solubles en agua y menos volátiles conforme aumenta el número de anillos de benceno que los conforman. Debido a sus efectos carcinogénicos, mutagénicos y/o fitotóxicos (Warshawsky *et al.*, 1999), muchos PAHs han sido identificados como contaminantes prioritarios por la Unión

Europea y USEPA (Agencia de Protección Ambiental de EEUU), con la intención de reducir la presencia de dichos compuestos en el medio ambiente (Manoli y Samara, 2008).

Generalmente los PAHs que entran en las EDARs, se encuentran principalmente adsorbidos sobre la superficie de la materia orgánica particulada, debido a su naturaleza hidrófoba, y por tanto son eficazmente retirados del agua residual durante la sedimentación y arrastrados con el fango (Buseti *et al.*, 2006). Por otra parte, la biotransformación/biodegradación es considerada el principal proceso implicado en la degradación de los PAHs (Haritash *et al.*, 2009), y así ha sido descrito en tratamientos CASP y en MBRs aplicados al tratamiento de aguas residuales (Fatone *et al.*, 2011).

Otros mecanismos como la volatilización, advección, degradación química o arrastre por aire deben tenerse en cuenta como co-responsables de la eliminación de los PAHs, la contribución de cada mecanismo depende de las características del agua residual, el diseño del proceso y las condiciones de trabajo del sistema (Manoli y Samara, 1999; Byrns, 2001; Manoli y Samara, 2008). Se han observado elevados rendimientos (92%) en la eliminación de PAHs en CASPs (Sánchez-Ávila *et al.*, 2009), debido a la existencia de los mecanismos de eliminación comentados; mientras que los rendimientos para los tratamientos químicos se encuentra en el rango del 61 al 78% (Vogelsang *et al.*, 2006).

Los MBR combinan el proceso biológico de fangos activos con una separación sólido/líquido mediante una membrana, evitando la necesidad de la sedimentación como paso previo. De esta manera, se desarrolló un nuevo sistema que combina el tratamiento secundario y terciario, permitiendo la construcción de plantas más compactas capaces de producir efluentes directamente reutilizables (Arévalo *et al.*, 2009). Se espera que esta tecnología mejore la eliminación de los compuestos xenobióticos producidos por las actividades industriales (Lesjean *et al.*, 2009), y por esta capacidad ha sido seleccionada para el tratamiento de aguas residuales (Lesjean *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha observado que la capacidad de los MBR para eliminar PAHs es similar a la mostrada por los CASP (Fatone *et al.*, 2011), a pesar de que cabría esperar diferentes mecanismos de eliminación debido a las diferentes características operacionales que presentan estos sistemas respecto a los CASP o por la composición de PAHs en el agua residual.

El objetivo de este estudio fue determinar los procesos de eliminación de PAHs que se producen en el tratamiento de aguas residuales urbanas con una baja concentración de PAHs en un sistema MBR. Para ello se determinó la presencia de PAHs en el influente y en el efluente de una planta experimental MBR alimentada con el agua residual real, también se añadió una mezcla de PAHs (*Phen*, *Py* y *F*) y se observó su evolución, realizando balances de materia.

## **6.2. Materiales y métodos**

### **6.2.1. Descripción de la planta piloto**

Para la realización de este estudio se utilizó una instalación MBR a escala real. El sistema estuvo trabajando en configuración de pre-desnitrificación, con un reactor anóxico, seguido de un reactor aireado y el reactor de membranas donde se realizaba la separación entre el fango activo y el permeado. Las purgas se realizaban diariamente desde el reactor aireado (Figura 6.1). La instalación se alimentó con agua residual urbana pretratada de la EDAR de Granada (España) posteriormente a su paso por un proceso de tamizado, desarenado y desengrasado.

El reactor de membranas estaba equipado con membranas de ultrafiltración de fibra hueca (con tamaño de poro nominal de  $0,034 \mu\text{m}$ ), consistentes en una matriz de fibra porosa recubierta por polivinilideno (PVDF). En el reactor aireado se mantuvo una concentración de oxígeno disuelto entre 0,5 y 1,6 mg/L mediante aireación forzada por una soplante (flujo máximo  $92 \text{ Nm}^3/\text{h}$ ). El tanque de membranas también estaba sometido a una aireación energética ( $30 \text{ Nm}^3/\text{h}$ ) cuya función era retirar los sólidos de la superficie de las membranas y, por tanto, evitar el ensuciamiento de las mismas. El régimen de trabajo era de 5 minutos de filtrado por 30 segundos de contralavado ( $1,5 \text{ m}^3/\text{h}$ ). La limpieza química de las membranas se realizaba semanalmente empleando una solución de NaClO (100 mg/L). Se realizaba una purga diaria de  $2,4 \text{ m}^3$  resultando un SRT de 12 días. La capacidad de tratamiento fue de  $0,8 \text{ m}^3/\text{h}$ , de esta forma el HRT para el sistema completo era de 34 horas. La recirculación se realizaba con una relación de 7:1 respecto al influente. Así, el HRT para cada reactor era 1,1 h para el reactor anóxico, 3,5 h para el reactor aireado y 0,35 h para el reactor de membranas.

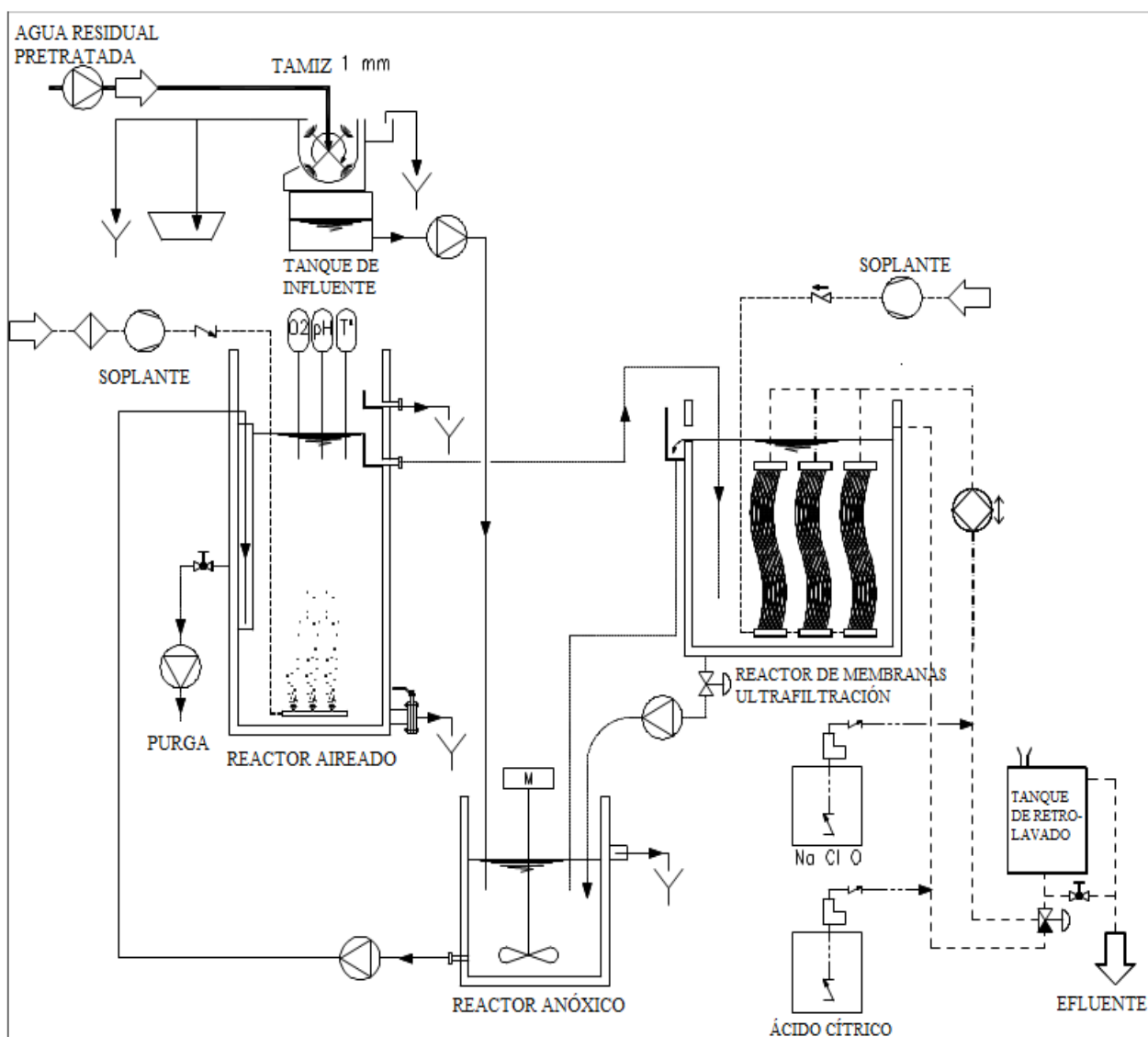


Figura 6.1. Esquema de la planta experimental MBR.

## 6.2.2. Metodología experimental

Para determinar la presencia de PAHs en el agua residual y su comportamiento en la planta experimental se realizó un muestreo semanal durante un periodo de un mes, previo a la fase experimental. Para ello se tomaron muestras del influente, efluente y purga del sistema y se realizaron análisis microbiológicos del fango activo junto con análisis respirométricos para evaluar la toxicidad y biodegradabilidad del *Py*. El estudio se completó con ensayos a pequeña escala.

Después de este periodo, se llevaron a cabo los ensayos para calcular el balance de materia de los PAHs que entran en la instalación experimental. Para ello se añadió al influente una solución concentrada de *Phen*, *Py* y *F* (procedente de un proceso de tratamiento térmico de fangos) con la intención de obtener altas concentraciones de PAHs en el sistema experimental. A lo largo de este periodo, se tomaron muestras del influente, efluente, purga y fango activo de los diferentes reactores.

Durante el estudio se tomaron muestras compuestas mediante la combinación de 24 porciones tomadas de forma horaria. Para ello se disponía de una bomba peristáltica reversible que evitaba la acumulación de fango en la tubería de muestreo. La bomba se activaba durante cinco minutos cada hora. Las muestras era almacenada a 4 °C en botes de vidrio topacio de 5 litros, previamente lavados con hexano, acetona y agua destilada, y cerrados con teflón. Las muestras eran analizadas el día siguiente al muestreo.

### **6.2.3. Análisis microbiológicos**

Para determinar la presencia de microorganismos capaces de degradar *Py* se realizó el cultivo en un medio selectivo BSM basado en el descrito por Miller *et al.* (2008).

1 mL de fango activo de los reactores aireado o anóxico, era diluido en agua destilada estéril, seguido de diluciones seriadas. Posteriormente, 1 mL de cada dilución se depositó en una placa de Petri con el medio Agar-BSM, sin otra fuente de carbono. Las placas fueron pulverizadas con una solución de *Py* (1 mg/mL en hexano/acetona (1:1)) cubriendo homogéneamente toda la superficie con una capa opaca. Las placas fueron incubadas a 20 °C, en ausencia de luz observandose durante un mes para determinar el desarrollo de colonias.

### **6.2.4. Ensayos respirométricos**

Antes de dosificar los PAHs en el influente para la elaboración del balance de materia, se evaluó el posible efecto tóxico de dichos compuestos, mediante ensayos respirométricos en ausencia y presencia de *Py*. Para ello se tomaron muestras de fango activo del reactor aireado de la

instalación experimental, manteniéndolo aireado durante 24 h para garantizar que se alcanzaran las condiciones endógenas, antes de realizar los análisis respirométricos. Posteriormente, el fango se introducía en el respirómetro (Surcis), que permite medir la evolución de la concentración de oxígeno disuelto en el fango activo tomando registros cada 2 segundos. Todos los experimentos se realizaron con temperatura controlada (20°C) mediante un baño termorregulador. El pH se mantuvo constante en el rango entre 7,0 y 8,0.

Los ensayos respirométricos tipo OUR con fango endógeno fueron realizados en ausencia y con 40 µg/L de *Py*.

#### **6.2.5. Ensayos a escala de laboratorio**

Para confirmar los resultados obtenidos mediante la instalación experimental, se realizaron también ensayos a pequeña escala. Para los ensayos se emplearon 2 depósitos de vidrio de 10 L de capacidad que se mantenían en agitación. Uno de los depósitos se equipó con un sistema de inyección de aire y ambos se llenaron con fango activo de la instalación experimental. A ambos se les añadió 1 mL de solución concentrada de PAHs con *Phen*, *Py* y *F*. Una vez mezclado, gracias a la agitación, se tomaba una muestra inicial y, los sistemas se dejaron en reposo durante 24 horas, tras las cuales se tomaba otra muestra. Los ensayos a escala de laboratorio se repitieron cinco veces, determinando la concentración de *Phen*, *Py* y *F* tanto en la fase sólida como en la acuosa.

#### **6.2.6. Condiciones analíticas** Análisis y determinación de los PAHs

Para la extracción de los PAHs del fango y el agua residual se utilizó el método SBSE (*Stir Bar Sorptive Extraction*), y la determinación de los PAHs se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

Para la extracción se utilizaron 100 mL de muestra, que se depositaban en viales a los que se les añadía 0,1 ppb de patrón interno benzo(a)pireno D12 y pireno D10. A continuación los viales se dejaban en agitación (900rpm) incluyendo una barra agitadora para la sorción durante 17 horas. Pasado este tiempo las barras de sorción eran sacadas, enjuagadas y secadas para depositarlas en viales de vidrio preparados para ser transferidos por el muestreador Gerstel MultiPurpose Sample

MPS 2L hacia la unidad de desorción térmica Thermal Desorption Unit (Gerstel TDU) donde serán desorbidos.

El cromatógrafo de gases empleado Agilent HP 6890 Gas Chromatograph estaba acoplado a un espectrómetro de masas Agilent HP 5973 N MS, equipado con una columna de polidimetilsiloxano, y se utilizó helio (2,1 mL/min) como gas portador. La rampa de temperatura comenzaba a 70°C y concluía a 280°C. El límite de detección de este método para los PAHs analizados fue de 0,01 µg/L.

## **6.3. Resultados y discusión**

### **6.3.1. Ensayo sin adición de PAHs**

Los resultados mostraron unas concentraciones de PAHs en el agua residual de Granada (España) que oscilan entre el máximo de 0,48 µg/l y el mínimo por debajo de los límites de detección (0,01 µg/l). Las concentraciones eran menores que las registradas en las aguas residuales de otras ciudades. Por ejemplo, en el área de París, se detectaron concentraciones entre 0,2 y 5,2 µg/L (Blanchard *et al.*, 2004). En la ciudad de Venecia oscilaban entre 1,12 y 4,62 µg/L (Busetti *et al.*, 2006) y en la zona de Mataró se detectaron concentraciones entre 0,009 y 5,05 µg/L (Sánchez-Ávila *et al.*, 2009). Esto podría explicarse en parte por la poca cantidad de vertidos industriales y por las escasas aguas de escorrentía que pueden arrastrar deposiciones atmosféricas debido a las pocas lluvias durante el periodo de estudio.

*Py*, *F* y *Phen* fueron los compuestos más abundantes, representando respectivamente el 55,5 %, 25,5 % y 19 % del total de los PAHs medidos. Existe uno claro predominio de compuestos de bajo peso molecular, lo cual está en consonancia con lo observado por Blanchard *et al.* (2004) para aguas residuales urbanas.

Después del tratamiento del agua residual en la planta experimental MBR, la concentración de PAHs en el efluente se situaba por debajo de los límites de detección, lo cual indica una elevada eficiencia por parte del MBR para la eliminación de los PAHs. Pero sin embargo, las concentraciones de PAHs en la purga de fangos activos también se encontraban por debajo de los

límites de detección. Este hecho descarta la sorción como un vía importante en la eliminación de los PAHs con las condiciones experimentales de este estudio, a pesar de la naturaleza hidrófoba de los PAHs detectados.

### **6.3.2. Análisis microbiológicos**

Tras un mes de incubación, los cultivos para determinar la presencia de microorganismos degradadores de PAHs desarrollaron un halo transparente sobre la capa superior de *Py*. Una o dos colonias (una media de 1,3 ufc/mL de fango activo) fueron observadas en algunas placas (aproximadamente la mitad) inoculadas con fango activo sin diluir de los biorreactores aireado y anóxico. El aspecto morfológico de las colonias aisladas correspondía con hongos, ninguna colonia de bacterias fue aislada.

Este hecho confirma la presencia de un escaso número de microorganismos degradadores de *Py* cultivables en el fango activo del sistema objeto de estudio. Sin embargo, otros microorganismos degradadores del *Py* no cultivables podrían estar presentes en el fango activo, ya que la diversidad de microorganismos presentes en el fango es mayor que el número de microorganismos cultivables (Park *et al.*, 2007).

La biodegradación/biotransformación ha sido descrita como la principal vía para la degradación de los PAHs (Haritash *et al.*, 2009) y gran número de microorganismos capaces de degradar PAHs han sido aislados de aguas residuales (Meyer *et al.*, 1999). En el sistema MBR estudiado podrían darse mecanismos de biodegradación/biotransformación del *Py*, pero probablemente el fango activo del MBR tratando un agua residual con baja concentración de PAHs no presente suficiente concentración de microorganismos capaces de degradar PAHs, tal y como se observó mediante los cultivos para determinar su presencia. Por tanto, la importancia de estos mecanismos en la eliminación de los PAHs puede ser limitada.

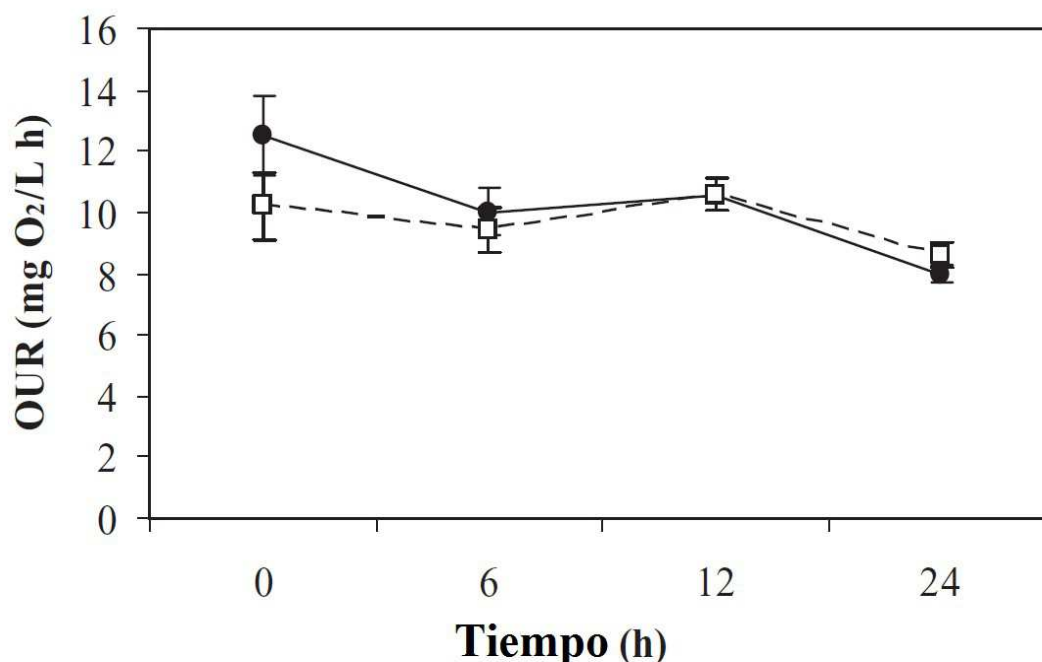
### **6.3.3. Ensayos respirométricos**

La figura 6.2 muestra la evolución en el tiempo de los valores OUR calculados mediante respirometrías realizadas sin y con presencia de *Py*. Los ensayos mostraron unos valores muy



similares en ambos fangos, sin y con presencia de *Py*, sin diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,6075$ ). Estos resultados sugieren que no existe toxicidad a una concentración de  $40 \mu\text{g } Py /\text{L}$ .

Estos resultados indican que, a priori, no existen efectos negativos sobre el fango activo como resultado de la adición de *Py* a la concentración ensayada, y que la actividad metabólica de los microorganismos responsables del tratamiento biológico no se vio alterada. A pesar de ser expuesta a concentraciones inusualmente altas de contaminante, la biomasa no se vio afectada; además el *Py* no fue metabolizado por los microorganismos, con OUR similares a los obtenidos en los ensayos de control (sin presencia de *Py*), estos hechos sugiere una baja biodisponibilidad del *Py*. Esto podría explicarse en parte por su naturaleza hidrófoba que hace que rápidamente se asocie con la biomasa (Busetti *et al.*, 2006) siendo muy limitada su solubilidad en agua ( $120\text{-}180 \mu\text{g/L}$ ), y por tanto dificultando así su disponibilidad para los microorganismos. No obstante, durante los ensayos realizados en la instalación experimental, no se observó acumulación de los PAHs en la biomasa y, por lo tanto, otro mecanismo distinto debe ser el responsable de su baja biodisponibilidad.



**Figura 6.2** Evolución a lo largo del tiempo de la tasa de consumo de oxígeno (OUR) sin (●) y con (□) adición de pireno ( $40 \mu\text{g/l}$ ).

#### **6.3.4. Balances de Materia**

La tabla 6.1 muestra las concentraciones de *Py*, *F* y *Phen* presentes en los distintos puntos del sistema. Se aprecia que el *Phen* fue añadido en mayor cantidad con una concentración de entrada de 13,8 µg/L, mientras que los otros dos compuestos presentaban concentraciones similares con 2,7 µg/L y 2,8 µg/L para *F* y *Py* respectivamente.

En todas las muestras analizadas había presencia de los tres compuestos añadidos, mostrando que el tratamiento MBR no llevó a cabo una eliminación total de los mismos, algo común en los sistemas CAS (Manoli y Samara, 1999) y en otros MBR (Fatone *et al.*, 2011). Los rendimientos de retirada para *F* y *Py* fueron del 91% y el 92% respectivamente, mientras que para el *Phen* no se superó el 82%. Este comportamiento puede estar relacionado con una de las principales diferencias físico-químicas de estos tres compuestos como es la solubilidad en agua, la cual es mayor para *Phen* debido a su menor hidrofobicidad (Tabla 6.2). Durante la separación sólido/líquido, en el reactor de membranas, los compuestos más solubles presentan unas tasas de eliminación menores debido a su mayor facilidad para pasar a través de la membrana de ultrafiltración.

Dada su naturaleza hidrófoba y lipofílica (Tabla 6.2) los PAHs tienden a asociarse a la materia orgánica particulada. Por tanto, el comportamiento de los tres PAHs en el fango debería poder predecirse y sería de esperar su acumulación en la biomasa (Salihoglu *et al.*, 2010). Tal acumulación indicaría que la purga del fango es la principal vía de eliminación para estas sustancias. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que tan solo entre un 2,5 y un 3,3 % de los compuestos añadidos fue eliminado del sistema mediante la purga de los fangos (Figura 6.3). Con una concentración total de PAHs de 0,87 mg/kgTS, este valor es mucho menor que los registrados para sistemas CASP tratando influentes con concentraciones de PAHs mucho menores que las existentes en el presente estudio (Manoli y Samara, 1999). La concentración observada es aproximadamente dos tercios inferior a la observada por Fatone *et al.* (2011) en otro MBR que trabajaba con concentraciones de PAHs en el influente treinta veces menores.

**Tabla 6.1.** Concentraciones de los PAHs analizados ( $\mu\text{g/L}$ ) en las diferentes etapas del tratamiento MBR.

		<b>Fenantreno</b>	<b>Fluoranteno</b>	<b>Pireno</b>
Influente	Max.	17.0	3.6	3.1
	Min.	12.1	2.0	2.3
	Media	13.8	2.7	2.8
Reactor anóxico	Max.	6.4	0.80	0.80
	Min.	4.1	0.65	0.70
	Media	4.8	0.72	0.76
Reactor aireado	Max.	6.0	0.68	0.64
	Min.	2.4	0.30	0.40
	Media	3.8	0.51	0.56
Reactor de membranas	Max.	5.0	0.52	0.50
	Min.	2.2	0.26	0.35
	Media	3.1	0.39	0.44
Efluente	Max.	2.6	0.48	0.40
	Min.	2.0	0.10	0.10
	Media	2.5	0.25	0.23

**Tabla 6.2.** Características físico-químicas de los PAHs de estudiados

<b>Compuesto</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Presión de vapor</b>	<b>Solubilidad (mg/L)</b>	<b>Log <math>K_{ow}</math></b>
		<b>(Pa a 25 °C)</b>		
Fluoranteno	202	0,02	0,25	5,22
Pireno	202	0,00033	0,132	5,2
Fenantreno	178	0,0012	1-2	4,57

Fuente: Byrns (2001) y Haritash y Kaushik (2009)

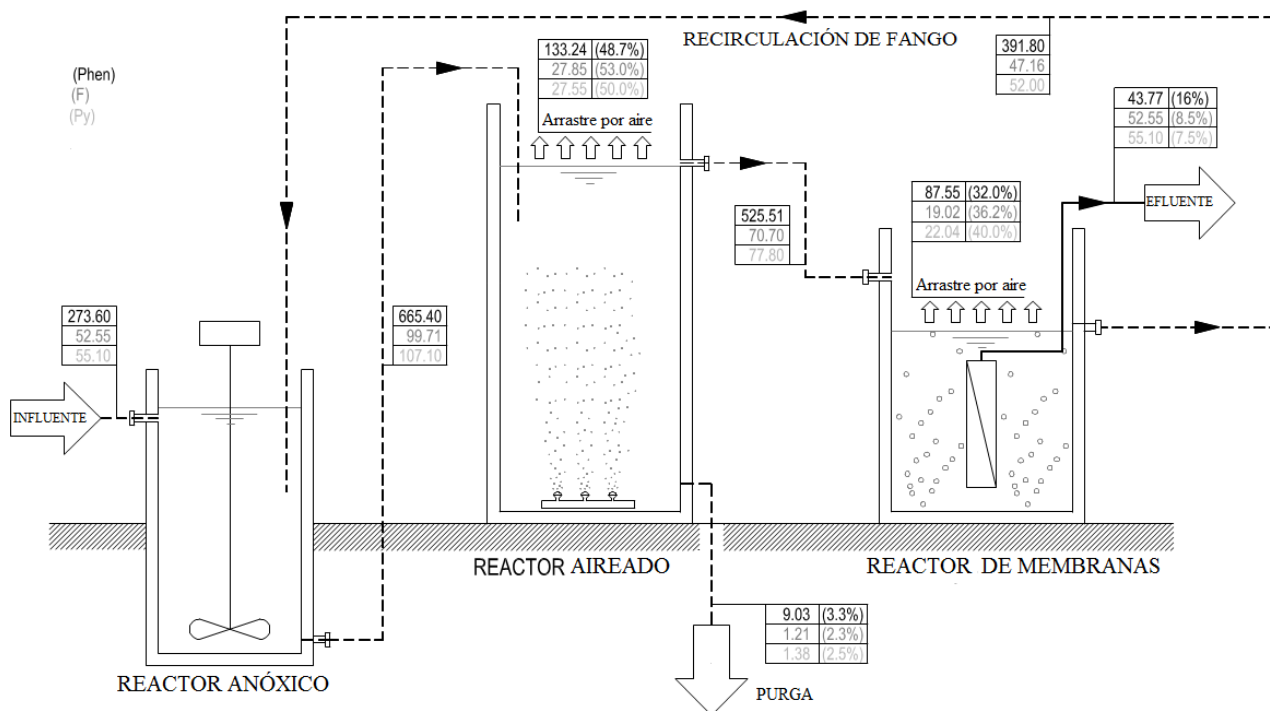
Debido a la escasa presencia de microorganismos cultivables capaces de biodegradar *Py* y a la poca biodisponibilidad observada en los ensayos OUR, puede descartarse la biodegradación o biotransformación como una vía de eliminación de los PAHs en el sistema experimental. Estos

resultados sugieren que no se produce una acumulación de PAHs en la biomasa, a pesar de sus propiedades físico-químicas, ni una biodegradación de los mismos, y por tanto se debe considerar la existencia de otros mecanismos responsables de la eliminación de estos compuestos.

Los balances de masas (Figura 6.3) muestran que en el reactor anóxico, sometido a agitación para mantener la biomasa en suspensión, no se produce eliminación de PAHs. La concentración de los PAHs a la salida del reactor anóxico es la resultante de la combinación de la concentración presente en el influente y la recirculada desde el reactor de membranas, lo que muestra que no se produce retirada alguna de los PAHs en este punto del sistema. Dadas las características de este reactor, solo los procesos de volatilización y biodegradación podrían darse como vías de eliminación de los PAHs, y ambos podrían considerarse casi nulos dados los resultados del balance de masas. Esto podría esperarse dada la escasez de microorganismo degradadores del *Py* presentes en el fango activo y la baja volatilidad de los compuestos en cuestión.

En cambio, en el reactor aireado los balances muestran una eliminación significativa de los tres compuestos analizados, en torno al 50% del total de compuestos añadidos al influente, con los mayores valores para el *F* (53%) y los menores para el *Phen* (48.7%), situándose en el caso del *Py* entre ambos (50%). El reactor aireado presenta un sistema de aireación con burbuja fina que genera considerables turbulencias que permiten mantener una mezcla homogénea del fango exclusivamente mediante la aireación, de este modo se produce el arrastre por aire, el cual podría considerarse como la principal vía para la eliminación de los PAHs en el reactor aireado.

Los balances realizados en el reactor de membranas mostraron una considerable eliminación de los tres PAHs, con una eliminación del orden del 35% del total de los PAHs añadidos al influente, estos resultados apoyan la interpretación previa, con unas sustanciales pérdidas de PAHs a través del arrastre por aire. El reactor de membranas está equipado con un sistema de aireado que produce burbujas gruesas generando turbulencias mayores a las del reactor aireado. Sin embargo, el HRT en el reactor de membranas es de solo 20 minutos, mucho menor que en el reactor aireado donde el tiempo de permanencia es de 3,5 horas, este hecho explicaría la mayor eliminación de PAHs en dicho reactor.



**Figura 6.3.** Balance diario para los PAHs estudiados (*Phen*, *F* and *Pyr*) en el sistema MBR.

### 6.3.5. Ensayos a escala de laboratorio

Con el objetivo de confirmar los resultados de los balances de masas se realizaron una serie de ensayos en laboratorio con los tres compuestos estudiados.

En los recipientes sometidos a agitación, pasadas las 24 horas se observaron pequeñas pérdidas para los tres compuestos, con una mayor acumulación de los mismos en el sedimento resultante una vez que se detuvo la agitación (Figura 6.4), resultado esperado en base a las características físico-químicas de estos compuestos (Salihoglu *et al.*, 2010). Por otro lado, en los recipientes sometidos a aireación, se observaron considerables reducciones para las concentraciones de los PAHs. Esto indicaría la existencia de un intenso arrastre por aire para estos compuestos, dada la reducida presencia en el fango de microorganismos capaces de degradar *Py*.

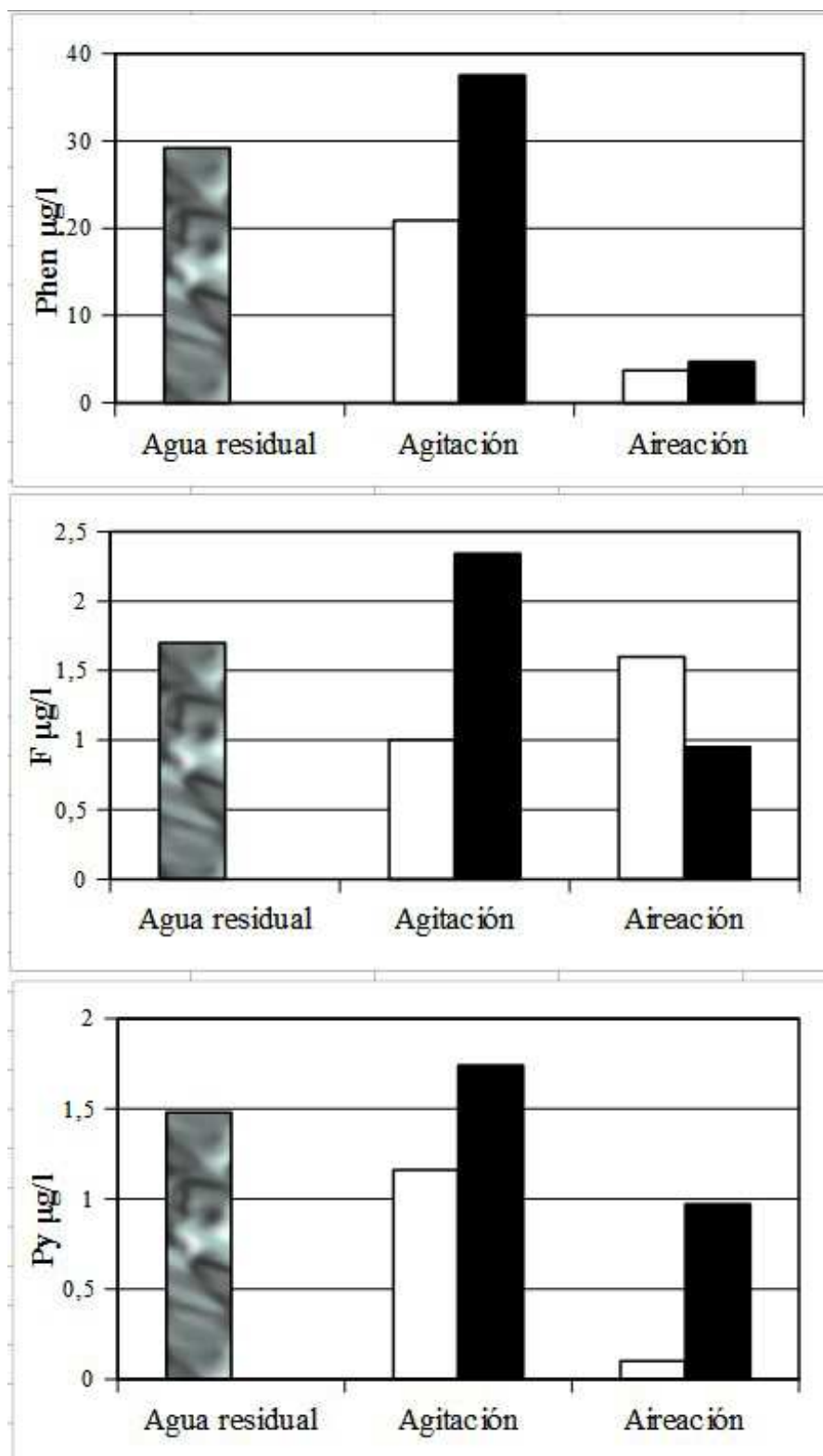


Figura 6.4. Concentración de fluoranteno (*F*), fenantreno (*Phen*) y pireno (*Py*) presente en el fango activo después de 24 horas de agitación o aireación. Fase líquida (barras blancas) y fango (barras negras).

Muchos autores consideran que la principal vía para la retirada de los PAHs en los sistemas de tratamientos de aguas residuales está motivada por su naturaleza hidrófoba y lipofílica (Manoli y Samara, 1999; Byrns, 2001; Vogelsang *et al.*, 2006; Salihoglu *et al.*, 2010), dando como resultado la asociación de los PAHs con la biomasa y su eliminación de la línea de aguas a través de la retirada de los fangos.

Sin embargo, en el sistema MBR objeto de este estudio, la purga del fango se llevaba a cabo desde el reactor aireado, donde el fango estaba sometido a una aireación intensa que generaba constante turbulencia, sin existencia de sedimentación previa. Estas circunstancias dificultan el paso de los PAHs a la biomasa, y por tanto su eliminación a través de la purga con la retirada de fangos; aunque esta sea la principal vía en los sistemas CAS, que realizan la separación sólido/líquido por sedimentación.

Byrns (2001) observó que, en tratamientos CAS, mayores SRT permiten mayor tiempo de contacto entre los PAHs y la biomasa, y como resultado la biodegradación/biotransformación aumenta y se disminuye la presencia de estos contaminantes en los efluentes. Sin embargo, en este sistema MBR no se observó acumulación de los PAHs en la biomasa, y la retirada de PAHs se produce principalmente a través del arrastre por aire. Esto podría dificultar la aparición de procesos de biotransformación y biodegradación, a menos que el influente contenga suficiente concentración de PAHs para permitir el desarrollo de microorganismos capaces de degradar este tipo de compuestos.

Fatone *et al.* (2005) observaron en un sistema MBR, con un proceso automático de ciclos alternos enfocado a la disminución de los periodos de aireación, unos rendimientos en la eliminación de *Py*, *F* y *Phen* menores a los registrados por nuestro sistema. Tales reducciones en la aireación podrían disminuir considerablemente el arrastre por aire, disminuyendo la intensidad y duración de las turbulencias, y podría causar los bajos rendimientos en la eliminación de PAHs en MBR con bajas concentraciones de PAHs, a la vez que permitiría el desarrollo de otras vías de eliminación.

## **6.4. Conclusiones**

Tras realizar los balances de masas para los tres PAHs (*Py*, *F* y *Phen*) en el sistema MBR y corroborar los datos con ensayos de laboratorio, se pueden extraer las siguientes conclusiones para un sistema trabajando con membranas de ultrafiltración y con baja carga de PAHs:

- Los sistemas MBR presentan una elevada eficiencia en la retirada de fenantreno, pireno y fluoranteno de aguas residuales urbanas, con rendimientos en torno al 90%. Los compuestos con mayor solubilidad tienen un rendimiento algo menor debido a que atraviesan con más facilidad la membrana.
- La purga de fango activo desde el reactor aireado, donde la aireación provoca turbulencias, contiene bajas concentraciones de PAHs, y ésta no es la principal vía de retirada de estos compuestos en sistemas MBR con bajas concentraciones de PAHs y con purga directa desde el reactor aireado.
- La principal ruta de retirada de PAHs en sistemas MBR con baja concentración de PAHs es el arrastre por aire, el cual reduce la acumulación de PAHs en la biomasa y limita el desarrollo de microorganismos biodegradadores o biotransformadores de dichos compuestos, que principalmente son expulsados directamente hacia la atmósfera.



**CAPÍTULO 7**



## **7. Conclusiones**

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, y teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos referentes a este campo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La eficacia de la tecnología MBR para la eliminación de contaminantes emergentes presentes en aguas residuales urbanas, trabajando con elevados SRT y HRT, varía de unos compuestos a otros. Estas diferencias se deben a la distinta naturaleza química de los contaminantes que, junto con las condiciones operacionales, determinan las principales vías implicadas en la eliminación de cada compuesto.
- Con respecto a los PAHs, en los ensayos a escala de laboratorio, la eficacia en su eliminación del agua residual varía con las propiedades de los diferentes PAHs. Así, compuestos de bajo peso molecular como *Phen* fueron más fácilmente eliminados que los compuestos con mayor peso molecular como el *F*. Esto se debe a que la aireación en los reactores del laboratorio es menos intensa que la presente en el MBR y, al generar menos turbulencia, resta eficacia al arrastre por aire como mecanismo de eliminación. De esta forma la volatilización pasa a tener más importancia relativa.

- PAHs con elevado peso molecular son principalmente eliminados mediante mecanismos de sorción a las partículas del fango para posteriormente ser arrastrados a la atmósfera desde la fase líquida y sólida por arrastre de aire durante la fase aireada del tratamiento.
- El elevado arrastre por aire que experimental los PAHs durante la fase aireada de los sistemas MBR, limita otros mecanismos como la biodegradación y la volatilización.
- Durante el tratamiento en un MBR, la presencia de PAHs en el agua residual no debe producir efectos tóxicos para el fango activo debido a su baja biodisponibilidad para los microorganismos. Esta se encuentra limitada, principalmente, por el elevado arrastre por aire.
- Los sistemas MBR muestran una elevada eficacia en la eliminación del *Phen*, *Pyr* y *F* presentes en aguas residuales urbanas, con rendimientos en torno al 90%. Para compuestos con mayor solubilidad en agua se alcanzan rendimientos ligeramente menores debido a que atraviesan con más facilidad la membrana.
- La purga de fangos activos realizada desde el biorreactor aireado en el cual se mantiene turbulencia mediante la aireación y que trata agua residual con bajo contenido en PAHs, no es una vía importante para la eliminación de los PAHs mediante el tratamiento con sistemas MBR.
- Durante el tratamiento del agua residual en un MBR trabajando con bajas concentraciones de PAHs, la principal vía de eliminación de estos es el arrastre por aire, que los expulsa directamente hacia la atmósfera durante las etapas sometidas a aireación.
- La biodegradación es un mecanismo de escasa importancia en la eliminación de los PAHs en un sistema MBR. Esto es debido a que el arrastre por aire limita la acumulación de los PAHs en la biomasa y el desarrollo de microorganismos biodegradadores o biotransformadores que pudieran actuar sobre dichos compuestos.

- El sistema MBR, trabajando con elevados valores de SRT y HRT, resulta ineficiente en la eliminación de la CBZ. El pequeño porcentaje de CBZ eliminada durante el tratamiento mediante MBR estuvo siempre asociado con la eliminación a través de la purga.
- De acuerdo con los ensayos OUR, la presencia de CBZ afecta ligeramente a la actividad microbiana del fango activo de un MBR trabajando con elevados SRT y HRT.
- La presencia de elevadas concentraciones de CBZ en el influente del sistema MBR operando con elevados HRT y SRT no afecta a la capacidad del sistema para eliminar materia orgánica y/o nitrógeno.
- El sistema MBR a escala real trabajando en la conformación desnitrificación/nitrificación con elevado SRT y HRT (37,0 d y 35,6 h respectivamente) mostró alta eficacia en la eliminación de IBU, NPX y KTP del agua residual urbana, con unos niveles de rendimiento superiores al 95 %. Sin embargo, con respecto al DCF se observó un bajo rendimiento, incluso con rendimientos negativos en varios muestreos.
- La eficacia del sistema MBR para la eliminación de los NSAIDs analizados depende en mayor o menor medida de la capacidad, de parte de los microorganismos del fango activo, de biotransformación de dichos contaminantes, siendo más significativa para compuestos co-metabolizables, de modo que la concentración final en el efluente dependerá tanto de su concentración en el influente como de su biodegradabilidad.
- Debido a la escasa biodegradabilidad del DCF y su naturaleza hidrófila, el compuesto es proclive a acumularse en el sistema MBR y ser recirculado en las condiciones habituales de operación. Sin embargo, al contrario de lo observado para la materia orgánica no biodegradable, en el caso del DCF se observan rendimientos negativos, principalmente durante los muestreos en los que la concentración del influente disminuía. La débil adsorción y el incremento en la concentración observada en el reactor aireado también contribuye a los rendimientos negativos.

- La mayor parte de la transformación de los compuestos biodegradables como el IBU, NPX y KTP, en los sistemas que trabajan en condiciones de desnitrificación/nitrificación con elevados SRT y HRT, sucede en el reactor aireado mientras que la contribución del reactor anóxico es irrelevante.
- Para los compuestos hidrófilos que apenas son biodegradables como el DFC, la mayor transformación también se produce en el reactor aireado; dicha transformación implica tanto la eliminación como la aparición del compuesto.

**CAPÍTULO 8**





## **8. Líneas futuras de investigación**

La complejidad de la problemática de los contaminantes xenobióticos presentes en el medio acuático hace necesaria una amplia labor de investigación para poder alcanzar soluciones adecuadas que reduzcan su presencia en el mismo. El presente trabajo de investigación es solo una parte de dicho proceso, en consecuencia, durante la elaboración del mismo surgieron nuevas preguntas cuyas respuestas ayudarían a conocer mejor el comportamiento de estos compuestos durante el tratamiento de las aguas residuales. Y por tanto, para seguir profundizando en esta rama de conocimiento, se proponen las siguientes líneas futuras de investigación:

- Estudiar el proceso de biotransformación de los compuestos biodegradables durante el tratamiento en un sistema MBR, para conocer cuáles son los productos de esa transformación, y evaluar el comportamiento y efecto de estos metabolitos respecto a los MBR y al medio ambiente.
- Realizar un análisis de todos los metabolitos resultantes tras el consumo de los PhACs y que llegan a las aguas residuales. De este modo, llevar a cabo balances de materia para entender completamente los procesos de transformación que se producen durante el tratamiento en un MBR. Esto ayudaría en casos como el del DCF o la CBZ que pueden presentar rendimientos negativos, como resultado de la biotransformación de sus metabolitos secundarios. Y permitiría a confirmar la presencia o ausencia de dichas transformaciones, de metabolitos a los PhACs originales, para otros compuestos.

- Buscar opciones de captura de los PAHs arrastrados por aire, antes de que sean enviados a la atmósfera, y evitar de este modo su posterior re-deposición y arrastre junto con la escorrentía superficial de vuelta a las aguas residuales y a las EDARs.
- Probar otras opciones de tratamiento adicionales combinadas con los MBR, tratamientos físicos o químicos pueden resultar eficaces para la eliminación de los compuestos más resistentes a la eliminación como el DCF y la CBZ. En esta línea sería interesante analizar la eficacia en la eliminación que puedan presentar, por ejemplo, otros tipos de membrana (nanofiltración u ósmosis inversa), la combinación procesos de coagulación/floculación o el uso de agentes oxidantes.
- Analizar el comportamiento de otros tipos de contaminantes emergentes y la eficacia de los MBR en su eliminación. Los compuestos analizados durante la presente investigación son solo una parte de la gran variedad de contaminantes emergentes existentes, entre otros grupos de creciente importancia podemos sugerir: los disruptores endocrinos, los antibióticos o, incluso los genes resistentes a los antibióticos (ARGs) que pueden tener efectos nocivos para el medio ambiente y cuyo comportamiento y destino durante los tratamientos de aguas está aún por aclarar. Pero, tal y como se expuso, existen muchos más grupos de sustancias a tener en consideración.

Estas son solo algunas sugerencias, debido a la amplia variedad de contaminantes emergentes y sus diferentes naturalezas, las posibilidades en este campo son inmensas.

**CAPÍTULO 9**

## **9. Referencias Bibliográficas**

- Ahmed, F.N., Lan, C.Q. (2012). Treatment of landfill leachate using membrane bioreactors: A review. *Desalination*, 287, pp. 41–54.
- Al-Jayyousi, O.R. (2003). Greywater reuse: towards sustainable water management. *Desalination*, 156, pp. 181-192.
- Al-Rifai, J. H. , Khabbaz, H., Schäfer, A. I. (2011). Removal of pharmaceutical and endocrine disrupting compounds in a water recycling process using reverse osmosis systems. *Separation and Purification technology*, 77, pp. 60-67.
- Anderson, J.C., Carlson, J.C., Low, J.E., Challis, J.K., Wong, C.S., Knapp, C.W., Hanson, M.L. (2013). Performance of a constructed wetland in Grand Marais, Manitoba, Canada: removal of nutrients, pharmaceuticals, and antibiotic resistance genes from municipal wastewater. *Chem. Cent. J.*, 7 (54) pp. 1-15. doi: 10.1186/1752-153X-7-54
- Angelakis, A.N., Gikas, P. (2014). Water reuse: Overview of current practices and trends in the world with emphasis on EU states. *Water Utility journal*, 8, pp. 67-78.

- APHA, AWWA, WEF. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, 22<sup>a</sup> ed., American Public Health Association, Washington D.C. (EEUU), 2012.
- APHA, AWWA, WPCF. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 17<sup>o</sup> ed., American Public Health Association, Washington D.C. (EEUU), 1989.
- Arévalo, J., Garralón, G., Plaza, F., Pérez, J., Moreno, B., Gómez, M.A. (2009). Wastewater reuse after treatment by tertiary ultrafiltration and a membrane bioreactor (MBR): a comparative study. *Desalination*, 243, pp. 32-41.
- Arévalo, J., Ruiz, L.M., Parada-Albarracín, J.A., González-Pérez, D.M., Pérez, J., Moreno, B., Gómez, M.A. (2012). Wastewater reuse after treatment by MBR. Microfiltration or ultrafiltration?. *Desalination*, 299, 22-27.
- Arévalo, J., Ruiz, L.M., Pérez, J., Gómez, M.A. (2014). Effect of temperature on membrane bioreactor performance working with high hydraulic and sludge retention time. *Biochem. Eng. J.*, 88, 42-49.
- Asano, T. (2002). Water from (waste)water - the dependable water resource . *Water Science and Technology*, 45 (8), pp. 24-33.
- Aubenneau, M.; Tahar, A.; Casellas, C.; Wisniewski, C. (2010). Membrane bioreactor for pharmaceutically active compounds removal: Effects of carbamazepine on mixed microbial communities implied in the treatment. *Process Biochem.*, 45, pp. 1826–1831.
- Aya, H. (1994). Modular membranes for self-contained reuse systems. *Water Quality Intl.*, 4, pp. 21-22.
- Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—I) groundwater. *Science of The Total Environment*, 402, pp.192–200.

- Beck, A. J., Johnson, D.L., Jones, K.C. (1996). The form and bioavailability of non-ionic organic chemicals in sewage sludge-amended agricultural soils. *Science of The Total Environment*, 185 (1-3) pp.125-49
- Belgiorno, V., Rizzo, L., Fatta, D., Della Rocca, C., Lofrano, G., Nikolaou, A., Naddeo, V., Meric, S. (2007). Review on endocrine disrupting-emerging compounds in urban wastewater: occurrence and removal by photocatalysis and ultrasonic irradiation for wastewater reuse. *Desalination*, 215, pp. 166-176.
- Bennett, A. (2011). Potable water: New technology enables use of alternative water sources. *Filtration + Separation*, 48 (2), pp. 24 – 27.
- Benotti, M.K., Trenhol, M.R., Vanderford, B., Holady J.C., Standford, B., Snyder, S. A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environmental Science Technology*, 43, pp. 597–603.
- Bernhard, M., Müller, J., Knepper, T.P., (2006). Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: Comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. *Water Research*, 40, pp. 3419-3428.
- Binelli, A., Magni, S., Soave, C., Marazzi, F., Zuccato, E., Castiglioni, S., Parolini, M., Mezzanotte, V. (2014). The biofiltration process by the bivalve *D. polymorpha* for the removal of some pharmaceuticals and drugs of abuse from civil wastewaters. *Ecological Engineering*, 71, pp. 710 – 721.
- Bixio, D., Thoeye, C., De Koning, J., Joksimovic, D., Savic, D., Wintgens, T., Melin, T. (2006). Wastewater reuse in Europe. *Desalination*, 187, pp. 89–101.
- Blanchard, M., Teil, M.J., Carru, A.M., Ollivon, D., Garban, B., Chesterikoff, A., Chevreuil, M. (1999). PCB and PHA impacts on cytochrome P-450 dependent oxidases in roach

- (*Rutilus rutilus*) from the Seine river (France). *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 37, pp. 242-250.
- Blanchard, M., Teil, M.J., Ollivon, D., Legenti, L., Chevreuil, M. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in wastewaters and sewage sludges from the Paris area (France). *Environmental Research*, 95, pp. 184-197.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2003.07.003>
  - Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*. 239, pp. 229-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>
  - Brandli, R., Bucheli, T.D., Kupper, T., Mayer, J., Stadelmann, F.X., Taradellas, J., (2007). Fate of PCBs, PAHs and their source characteristic ratios during composting and digestion of source-separated organic waste in full-scale plants. *Environmental Pollution*, 148 (2), pp. 520-528. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2006.11.021>
  - Brun, G. L., Bernier, M., Losier, R., Doe, K., Jackman, P., Lee, H.B. (2006). Pharmaceutically active compounds in Atlantic Canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environ. Toxicol.Chem.*, 25, pp. 2163 – 2176.
  - Buseti, F., Heitz, A., Cuomo, M., Badoer, S., Traverso, P. (2006). Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *Journal of Chromatography*, 1102, pp. 104-115.
  - Byrns, G. (2001). The fate of xenobiotic organic compounds in wastewater treatment plants. *Water Research*, 35, pp. 2523-2533.

- Camacho-Muñoz, M.D., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E. (2010). Presence of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain) main watersheds. *Journal of Hazardous Materials*, 177, pp. 1159 – 1162.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M. (2005). Removal of cosmetics ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. *Water Research*, 39, pp. 4790-4796.
- Carr, R.M., Blumenthal, U.J., Duncan Mara, D. (2004) Guidelines for the safe use of wastewater in agriculture: revisiting WHO guidelines. *Water Science & Technology*, 5 (2), pp. 31-38.
- Carranza-Díaz, O., Schultze-Nobre, L., Moeder, M., Nivala, J., Kuschik, P., Koeser, H. (2014). Removal of selected organic micropollutants in planted and unplanted pilot-scale horizontal flow constructed wetlands under conditions of high organic load. *Ecological Engineering*, 71, pp. 234 – 245.
- Carrara, C., Ptacek, C. J., Robertson, W. D., Blowes, D. W., Moncur, M. C., Sverko, E., Backus, S. (2008). Fate of Pharmaceuticals and Trace Organic Compounds in Three Septic System Plumes, Ontario, Canada. *Environmental Science and Technology*, 42, pp. 2805-2811.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanilli, R., Pomati, F., Calamari, D., Zuccata, E. (2006). Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environ. Sci. Technol.*, 40, pp. 357– 63.
- Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N. (2004). Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Research*, 38 (4), pp. 947 – 954.



- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., Kroiss, H. (2005). Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Resaerch*, 39, pp. 4797 – 4807.
- Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., Kroiss, H. (2005b). The solids retention time - a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research*, 39, pp. 97–106.
- Clarke, B.O., Smith, S.R. (2011). Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environmental International*, 37, pp. 226 – 247.
- Cuklev, F., Fick, J., Cvijovica, M., Förlind, L., Larssona, D.G.J. (2012). Does ketoprofen or diclofenac pose the lowest risk to fish?. *Journal of hazardous materials*, 229-230, pp.100-106. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.05.077.
- Decisión 2001/2455/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2001, por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. *Diario Oficial* nº L 331.
- Decisión de ejecución 2015/495/UE de la Comisión, de 20 de marzo de 2015, por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial* nº L 78.
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. *Diario Oficial* nº L 327.

- Directiva 2008/105/CE del Parlamento europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. *Diario Oficial* n° L 348.
- Directiva 2013/39/UE del Parlamento europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. *Diario Oficial* n° L 226.
- Elibariki, R., Maguta, M. (2017). Status of pesticides pollution in Tanzania: A review. *Chemosphere*, 178, pp. 154-164.
- Ericson, H., Thorsén, G., Kumblad, L. (2010). Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquatic Toxicology*, 99, pp. 223–31.
- Evgenidou, E.N., Konstantinou, I.K., Lambropoulou, D. A. (2015). Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. *Science of the Total Environment*, 505, pp. 905-926.
- Fatone, F., Di Fabio, S., Bolzonella, D., Cecchi, F. (2011). Fate of aromatic hydrocarbons in Italian municipal wastewater systems: An overview of wastewater treatment using conventional activated-sludge processes (CASP) and membrane bioreactors (MBRs). *Water Research*, 45, pp. 93–104.
- Fatone, F., Bolzonella, D., Battistoni, P., Cecchi, F. (2005). Removal of nutrients and micropollutants treating low loaded wastewater in a membrane bioreactor operating the automatic alternate-cycles process. *Desalination*, 183, pp. 395– 405.
- Feito, R., Varcárcel, Y., Catalá, M. (2012). Biomarker assessment of toxicity with miniaturised bioassays: diclofenac as a case study. *Ecotoxicology*, 21, pp. 289 – 296.

- Feng, L., van Hullebusch, E., Rodrigo, M.A., Esposito, G., Oturan, M.A. (2013). Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review. *Chem. Eng. J.*, 228, pp. 944–964.
- Fent, K., Weston, A.A., Carminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76, pp. 122–159.
- Fernández, C., González-Doncel, M., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J.V. (2010). Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the henares-jaramatajo river system (madrid, spain) and a potential risk characterization. *Science of the Total Environment*, 408, pp. 543–551.
- Fernández-Álvarez, G., Pérez, J., Gómez, M.A. (2014). Optimization of reactor depth in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *J. of Environmental Engineering ASCE*, 140 (7) pp. 1-7.
- Fernandez-Fontaina, E., Omil, F., Lema, J.M., Carballa, M. (2012). Influence of nitrifying conditions on the biodegradation and sorption of emerging micropollutants. *Water Research*, 46, pp. 5434-5444.
- Fernandez-Fontaina, E., Pinho, I., Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M. (2013). Biodegradation kinetic constants and sorption coefficients of micropollutants in membrane bioreactors. *Biodegradation*, 24, pp. 165-177.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J., (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, pp. 359-370.

- Fram, M.S., Belitz, K., (2011). Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. *Science of the Total Environment*, 409, pp. 3409 – 3417.
- Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauff, G., Nadal, M., van der Ploeg, M., van de Zee, S., Ritsema, C. J. (2015). Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*, 3, pp. 57-65.
- Gibson, R., Becerril-Bravo, E., Silva-Castro, V., Jimenez, B. (2007). Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring water by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1169, pp 31-39.
- Gibson, R., Durán-Álvarez, J.C., Estrada, León, K., Jiménez, B. (2010). Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere*, 81, pp. 1437 – 1445.
- Gómez, M.J., Martínez Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A. (2007). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*. 66, pp. 993-1002.
- Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, A., Islas-Flores, H., Neri-Cruz, N. (2013). Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug Chem. Toxicol.*, 37 (4), pp. 391–399.
- González, D., Ruiz, L.M., Garralón, G., Plaza, F., Arévalo, J., Parada, J., Pérez, J., Moreno, B., Gómez, M.A. (2012). Wastewater polycyclic aromatic hydrocarbons removal by membrane bioreactor. *Desalination and Water Treatment* , 42, pp. 94-99.

DOI:10/5004/dwt.2012.2464

- González-Pérez, D.M., Garralon, G., Plaza, F., Perez, J., Moreno, B., Gomez, M.A. (2012). Removal of low concentration of phenanthrene, fluoranthene and pyrene from urban wastewater by membrane bioreactors technology. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47, pp. 2190–197. DOI: 10.1080/10934529.2012.707496.
- González-Pérez, D.M., Pérez, J., Gómez, M.A. (2016). Carbamazepine behaviour and effects in an urban wastewater MBR working with high sludge and hydraulic retention time. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 51, 855-860.  
DOI:10.1080/10934529.2016.1181462
- González-Pérez, D.M., Pérez, J., Gómez, M.A. (2017). Behaviour of the main nonsteroidal anti-inflammatory drugs in a membrane bioreactor treating urban wastewater at high hydraulic- and sludge- retention time. *Journal of Hazardous Materials*, 336, pp.128-138.  
DOI:10.1016/j.jhazmat.2017.04.059
- Hale, W.G., Suander, V.A., Margham, J.P., Collins Dictionary of Biology, 3<sup>a</sup> ed., Collins, Londres, 2005.
- Hall, K. Miller, C. Sorensen, D.L., Anderson, A.J, Sims, R.C. (2005). Development of a catabolically significant genetic probe for polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading Mycobacteria in soil. *Biodegradation*, 16, pp. 475–484.
- Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B, Yun, J., Choi, K., Khim, J.S., Zhang, X., Giesi, J.P. (2010). Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat Toxicol.*, 98, pp. 256–64.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PHAs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169, pp. 1-15.

- Henriques, I.D.S., Holbrook, R.D., Kelly II, R.T., Love, N.G. (2005). The impact of flocs size on respiration inhibition by soluble toxicants—a comparative investigation. *Water Research*, 39, pp. 2559–2568.
- Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B. (2005). Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*), *Aqua. Toxicol.* 75, pp. 53–64.
- Hong, H.N., Kim, H.N., Park, K.S., Lee, S.K., Gu, M.B. (2007). Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere*, 67 (11), pp. 2115–2121. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2006.12.090](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.090)
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T., Ventura, F. (2011). Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research*, 45, pp. 1432–42.
- Iglesias E., R., Ortega de Miguel, E. (2008). Present and future of wastewater reuse in Spain. *Desalination*, 218, pp. 105-119.
- Inbar, Y. (2007). New standards for treated wastewater reuse in Israel. *Wastewater reuse—risk assessment, decision-making and environmental security*, pp. 291–296.
- Joss, A., Zabcynsky, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., Mc Ardell, C.S., Ternes, T.A., Thomsen, A., Siegrist, H. (2006). Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme. *Water Research*, 40, pp. 1686-1696.
- Judd, S. *The MBR Book: Principles and Applications of Membrane Bioreactors for Water and Wastewater Treatment*, 2<sup>a</sup> ed., Elsevier Ltd., Oxford, 2011.
- Judd, S. (2008). The status of membrane bioreactor technology. *Trends in Biotechnology*, 26 (2), pp. 109 – 116.

- Karnjanapiboonwong, A., Suskim J.G., Shah, A.A., Cai, Q., Morse, A.N., Anderson, T.A. (2011). Occurrence of PPCPs at a wastewater treatment plant and in soil and groundwater at a land application site. *Water Air Soil Pollut.*, 216, pp. 257–73.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research* , 43, pp. 363 – 380.
- Katsoyiannis, A., Samara, C. (2005). Persistent organic pollutants (POPs) in the conventional activated sludge treatment process: fate and mass balance. *Environmental Research*, 97, pp. 245-257.
- Khim. J.S., Hong, S. (2014). Assessment of trace pollutants in Korean coastal sediments using the triad approach: A review. *Science of the Total Environment*, 470 – 471, 1450 – 1462.
- Kim, J.W., Jang, H.S., Kim, J.G., Ishibashi, H., Hirano, M., Nasu, K., Ichikawa, N., Takao, Y., Shinohara, R., Arizono, K.. (2009). Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in surface water from Mankyung River, South Korea. *Journal of Health Science*, 55, pp. 249–58.
- Kim, S.D., Cho, J., Kim, I.S., Vanderford, B.J., Snyder, S.A. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korea surface, drinking and waste water. *Water Resaearch*, 41, pp. 1013 – 1021.
- Kleywegt, S., Pileggi, V., Yang, P., Hao, C., Zhao, X., Rocks,C., Thach, S.,Cheung, P., Whitehead, B. (2011). Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada — Occurrence and treatment efficiency. *Science of the Total Environment*, 409, pp. 1481-1488.

- Köck, M., Farré, M., Martínez, E., Gajda-Schranz, K., Ginebreda, A., Navarro, A., López de Alda, M., Barceló, D. (2010). Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *Journal of Hydrology*, 383, pp. 73–82.
- Koh, C. H., Khim, J. S., Villeneuve, D. L., Kannan, K., Giesy, J.P. (2002). Analysis of trace organic contaminants in sediment, pore water, and water samples from Onsan Bay, Korea: instrumental analysis and in vitro gene expression assay. *Environ Toxicol Chem*, 21 (9) pp. 1796–1803.
- Kraigher, B.; Kosjek, T.; Heath, E.; Kompare, B.; Mandic-Mulec, I. (2008). Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. *Water Res.*, 42, pp. 4578–88.
- Kruglova, A., Kråkström, M., Riska, M., Mikola, A., Rantanen, P., Vahala, R., Kronberg, L. (2016). Comparative study of emerging micropollutants removal by aerobic activated sludge of large laboratory-scale membrane bioreactors and sequencing batch reactors under low-Temperature conditions. *Bioresource Technology*, 214, pp. 81–88.
- Krzeminski, P., Leverette, L., Malamis, S., Katsou, E. (2017). Membrane bioreactors – A review on recent developments in energy reduction, fouling control, novel configurations, LCA and market prospects. *Journal of Membrane Science*, 527, pp 207-227.
- Kümmerer, K. (2009). Review, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 90, pp. 2354–2366.
- Laender, F., Hammer, J., Hendricks, A.J., Soetaert, K., Janssen, C.R. (2011). Combining Monitoring Data and Modeling Identifies PAHs as Emerging Contaminants in the Arctic. *Environmental Science & Technology*, 45, pp. 9024–9029.



- Lahnsteiner, J., Lempert, G. (2007). Water management in Windhoek, Namibia. *Water Science and Technology*, 55, pp. 441-448. DOI:10.2166/wst.2007.022.
- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, 163, pp. 287-303.
- Lee, H.J., Lee, E., Yoon, S.H., Chang, H.R., Kim, K., Kwon, J.H. (2012). Enzymatic and microbial transformation assays for the evaluation of the environmental fate of diclofenac and its metabolites. *Chemosphere*, 87, pp. 969-974.
- Lesjean, B., Ferre, V., Vonghia, E., Moeslang, H. (2009). Market and desing considerations of the 37 largesMBR plants in Europe. *Desalination Water Treatment*, 6, pp.227–233.
- Lesjean, B. y Huisjes, E.H. (2008). Survey of the European MBR market: trends and perspectives. *Desalination*, 231, pp. 71–81.
- Letcher, R.J., Bustnes, J.O., Dietz, R., Jenssen, B.M., Jørgensen, E.H., Sonne, C., Verreault, J., Vijayan, M.M., Gabrielsen, G.W. (2010). Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. *Science of the Total Environment*, 408, pp. 2995–3043.
- Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., (2010). Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Research*, 44, pp. 4115–4126. DOI: [10.1016/j.watres.2010.05.032](https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.032).
- Loraine, G.A., Pettigrove, M.E. (2006). Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. *Environ. Sci. Technol.*, 40, pp. 687–695.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and

- removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473-474, pp. 619-641.
- Madhavan, J., Grieser, F., Ashokkumar, M. (2010). Combined advanced oxidation processes for the synergistic degradation of ibuprofen in aqueous environments. *Journal of Hazardous Materials*, 178, pp. 202–208.
  - Maeng, S. K., Choi, B. G., Lee, K. T., Song, K. G. (2013). Influences of solid retention time, nitrification and microbial activity on the attenuation of pharmaceuticals and estrogens in membrane bioreactors. *Water Research*, 47, pp. 3151-3162.
  - Manoli, E. y Samara, C. (1999). Occurrence and mass balance of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Thessaloniki sewage treatment plant. *Journal of Environmental Quality*, 28, pp. 176-187.
  - Manoli, E. y Samara, C. (2008). The removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the wastewater treatment process: Experimental calculations and model predictions. *Environmental Pollution*, 151, pp. 477-485.
  - Manrique-Moreno, M., Heinbockel, L., Suwalsky, M., Garidel, P., Brandenburg, K. (2016). Biophysical study of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) ibuprofen, naproxen and diclofenac with phosphatidylserine bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858, pp. 2123–2131.
  - Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J.L., Aparicios, 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. *Journal of Hazardous Materials*, 239-240, pp. 40-47.

- Massé, A., Spérandio, M., Cabassud, C. (2006). Comparison of sludge characteristics and performance of a submerged membrane bioreactor and an activated sludge process at high solids retention time. *Water Research*, 40, pp. 2405-2415.
- Matalon, S., Schechtman, S., Goldzweig, G., Ornoy, A. (2002). The teratogenic effect of carbamazepine: a meta-analysis of 1255 exposures. *Reproductive Toxicology*, 16, pp. 9 – 17.
- Matamoros, V., Osorio-Casellees, A., García, J., Bayona, J.M., (2008). Behaviour of pharmaceutical products and biodegradation intermediates in horizontal subsurface flow constructed wetland. A microcosm experiment. *Science of the Total Environment*, 394, pp. 171 – 176.
- Matozzo, V., Rova, S., Marin, M.G. The nonsteroidal anti-inflammatory drug, ibuprofen, affects the immune parameters in the clam *Ruditapes philippinarum*. (2012). *Mar. Environ. Res.*, 79, pp. 116–121.
- MED POL, United Nations Environment Program. *Guidelines for municipal water reuse in the mediterranean region*, UNEP (DEC) /MED/WG. Informe 264,9, Atenas, 2005.
- Meyer, S., Moser, R., Neef, A., Stahl, U., Kämpfer, P. (1999). Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiol.*, 145 (7), pp. 1731–1741.
- Miao, X.S., Yang, J.J., Metcalfe, C.D. (2005). Carbamazepine and its metabolites in wastewater and in biosolids in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.*, 39, pp. 7469–7475.
- Miller, C., Hall, K., Liang, Y.N., Nieman, K., Sorensen, D.L., Issa, L., Anderson, A.J., Sims, R.C. (2004). Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolates from soil. *Microb. Ecol.*, 48, pp. 230–238.

- Mosby's *Medical Dictionary*, 9th ed., Mosby-Elsevier, St. Louis - MO, 2013.
- Mozo, I., Stricot, M., Lesage, N., Spérandio, M. (2011). Fate of hazardous aromatic substances in membrane bioreactors. *Water Research*, 45, pp. 4551 – 4561.
- Mulcahy, D.M., Tuomi, P., Larsen, R.S. (2003). Differential mortality of male spectacled eiders (*Somateria fischeri*) and king eiders (*Somateria spectabilis*) subsequent to anesthesia with propofol, bupivacaine, and ketoprofen. *J. Avian Med. Surg.*, 1 (7) , pp. 117–123.
- Müller, B., Scheytt, T., Asbrand, M., de Casas, A.M. (2012). Pharmaceuticals as indicators of sewage-influenced groundwater. *Hydrogeol J*, 20, pp. 1117–29.
- Naidoo, V., Wolter, K., Cromarty, D., Diekmann, M., Duncan, N., Meharg, A.A., Taggart, M.A., Venter, L., Cuthbert, R. (2010). Toxicity of non-steroidal antiinflammatory drugs to Gyps vultures: a new threat from ketoprofen. *Biol. Lett.* 6, pp. 339–341.
- National Health and Medical Research Council/Environmental Protection and Heritage Council/ Natural Resource Management Ministerial Council, *Australian Guidelines for Water Recycling : Managing Health and Environmental Risks (Phase 2)- Augmentation of Drinking Water Supplies*, Canberra, 2008.
- Network of reference laboratories and related organisations for monitoring and bio-monitoring of emerging environmental substances. *NORMAN Prioritisation framework for emerging substances*. Norman Association, Verneuil en Halatt (Francia), 2013.
- Osorio, V., Marcé, R., Pérez, S., Ginebreda, A., Cortina, J.L., Barceló, D. (2012). Occurrence and modeling of pharmaceuticals on a sewage-impacted Mediterranean river and their dynamics under different hydrological conditions. *Science of the Total Environment*, 440, pp. 3-13.
- Park, S.Y., Yoon, J.C., Shin, K.S., Kim, E.H., Yim, S., Cho, Y.J., Sung, G.M., Lee, D.G., Kim, S.B., Lee, D.U., Woo, S.H., Koopman, B. (2007). Dominance of endospore-forming

- bacteria on a rotating activated bacillus contactor biofilm for advanced wastewater treatment. *J. Microbiol.*, 45 (2), pp. 113–121.
- Peng, X., Yu, Y., Tang, C., Tan, J., Huang, Q., Wang, Z. (2008). Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of the Total Environment*, 397, pp. 158–66.
  - Pham, T., Prolux, S. (1997). PCBs and PAHs in the Montreal Urban Community (Quebec, Canada) wastewater treatment plant and in the effluent plume in the St Lawrence River *Water Research*, 31, pp. 1887–1896.
  - Phan, H.V., Hai, F.I., Kang, J., Dam, H.K., Zhang, R., Price, W.E, Broeckmann, A., Nghiem, L.D. (2014). Simultaneous nitrification/denitrification and trace organic contaminant (TrOC) removal by an anoxic-aerobic membrane bioreactor (MBR). *Bioresource Technol.*, 165, pp. 96-104.
  - Pomiès, M., Choubert, J.M., Wisniewski, C., Coquery, M. (2013). Modelling of micropollutant removal in biological wastewater treatment: A review. *Sci. Total Environ.*, 443, pp. 733-748.
  - Postigo, C., López de Alda, M.J., Barceló, D., Ginebreda, A., Garrido, T., Fraile, J. (2010). Analysis and occurrence of selected medium to highly polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE Spain): an approach based on on-line solid phase extraction –liquid chromatography–electrospray– tandem mass spectrometry detection. *J. Hydrol.*, 383, pp. 83–92.

- Press-Kristensen, K., Ledin, A., Schmidt, J.E., Henze, M. (2007). Identifying model pollutants to investigate biodegradation of hazardous XOCs in WWTPs. *Science of the Total Environment*, 373, pp. 122-130.
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C. (2008). The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of the Total Environment*, 402, pp. 62-69.
- Quinn, B., Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R. (2011). Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere*, 84, pp. 657-663.
- Quintana, J.B., Weiss, S., Reemtsma, T. (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research*, 39, pp. 2654–2664.
- Radjenovic, J., Petrovic, M., Barceló, D. (2007). Análisis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, pp. 1365-1377.
- Radjenovic, J., Petrovic, M., Barceló, D. (2009). Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*, 43, pp. 831–841.
- Real Decreto 606/2003, de 23 de mayo de 2003, por el que se modifica el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos preliminar, I, IV, V, VI y VIII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. BOE nº 135.

- Real Decreto 849/1986, de 11 de abril de 1986, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los títulos preliminar I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. BOE nº 103.
- Real Decreto 907/2007, de 6 de julio de 2007, por el que se aprueba el Reglamento de la Planificación Hidrológica. BOE nº 162.
- Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre de 2007, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. BOE nº 294.
- Regnery, J., Püttmann, W. (2010). Occurrence and fate of organophosphorus flame retardants and plasticizers in urban and remote surface waters in Germany. *Water Research*, 44, pp. 4097–104.
- Reinstorf, F., Strauch, G., Schirmer, K., Gläser, H.R., Möder, M., Wennrich, R., Osenbrück, K., Schirmer, M. (2008). Mass fluxes and spatial trends of xenobiotics in the waters of the city of Halle, Germany. *Environ Pollut.*, 152, pp. 452–60.
- Rojas, J.C., Perez, J., Garralon, G., Plaza, F., Moreno, B., Gomez, M.A. (2011). Humic acids removal by aerated spiral-wound ultrafiltration membrane combined with coagulation-flocculation. *Desalination*, 266, pp. 128–133.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández Alba, A.R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, 44, pp. 578-588.
- Rozman, D., Hrkal, Z., Eckhardt, P., Novotná, E., Boukalová, Z. (2014). Pharmaceuticals in groundwaters: A case study of the psychiatric hospital at Horní Beřkovice, Czech Republic. *Environ. Earth Sci.*, 73, pp. 3775–3784.

- Rubio-Clemente, A., Torres-Palma, R. A., Peñuela, G. A. (2014). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review. *Science of the Total Environment*, 478, pp. 201 – 225.
- Ruff, M., Mueller, M.S., Loos, M., Singer, P. (2015). Quantitative target and systematic non-target analysis of polar organic micro-pollutants along the river Rhine using high-resolution massspectrometry e Identification of unknown sources and compounds. *Water Research*, 87, pp. 145-154.
- Ruhmland, S., Wick, A., Ternes, T.A., Barjenbruch, M. (2015). Fate of pharmaceuticals in subsurface flow constructed wetland and two ponds. *Ecological Engineering*, 80, pp. 125-139.
- Ruiz, L.M., Pérez, J., Gómez, M.A. (2014). Comparison of five wastewater COD fractionation methods for dynamic simulation of MBR systems. *J. Environ. Sci. Heal. A*. 49, pp. 1553-1563.
- Sadr, S.M.K., Saroj, D.P., Kouchaki, S., Ilemobade, A.A., Ouki, S.K. (2015). A group decision-making tool for the application of membrane technologies in different water reuse scenarios. *Journal of Environmental Management*, 156, pp. 97-108.
- Salgado, R., Marques, R., Noronha, J.P., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M.A.M. (2012). Assessing the removal of pharmaceutical and personal care products in a full-scale activated sludge plant. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 19, pp. 1818-1827.
- Salgot, M. (2008). Water reclamation, recycling and reuse: implementation issues. *Desalination*, 208, pp. 190-197.
- Salihoglu, N.K., Salihoglu, G., Tasmemir, Y., Cindoruk, S.S., Yolsal, D., Ogulmus, R., Karaca, G. (2010). Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons levels in sludges from



- municipal and industrial wastewater treatment plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, pp. 523–534.
- Sánchez-Ávila, J., Bonet, J., Velasco, G., Lacorte, S. (2009). Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PHAs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*, 407, pp. 4157-4167.
  - SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Islas-Flores, H., González-González, E.D., Cardoso-Vera, J.D., Jiménez-Vargas, J.M. (2015). NSAID-manufacturing plant effluent induces geno- and cytotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of the Total Environment*, 530–531, pp. 1–10.
  - Santos, J.L., Aparicio, I., Callejón, M., Alonso, E. (2009). Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *Journal of Hazardous Materials*, 164, pp. 1509 – 1516.
  - Santos, A.; Ma, W.; Judd, S. (2010). Membrane bioreactors: Two decades of research and implementation. *Desalination*, 273, pp. 148–154.
  - Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R.D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* ,68, pp. 141–150.  
DOI:10.1016/j.aquatox.2004.03.014
  - Sperandio, M. y Espinosa, M.C. (2008). Modelling an aerobic submerged membrane bioreactor with ASM models on a large range of sludge retention time. *Desalination*, 231, pp. 82-90

- Spongberg, A.L., Witter, J.D., Acuña, J., Vargas, J., Murillo, M., Umaña, G., Gómez, E., Pérez, G. (2011). Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters. *Water Research*, 45, pp. 6709–17.
- Stasinakis, A.S., Mermigka, S., Samaras, V.G., Farmaki, E., Thomaidis, N.S. (2012). Occurrence of endocrine disrupters and selected pharmaceuticals in Aisonas River (Greece) and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ Sci Pollut Res*, 19, pp.1574–83.
- State of California. *Wastewater Reclamation Criteria*, An Excerpt from the California Code of Regulations, Title 22, Division 4, Environmental Health, Dept. of Health Services, Sacramento, California, 1978.
- Straub, J.O., Stewart, K.M. (2007). Deterministic and probabilistic acute-based environmental risk assessment for naproxen for western Europe. *Environ Toxicol Chem.*, 26, pp. 795–805.
- Suarez, S., Lema, J.M., Omil, F. (2010) . Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Research*, 44, pp. 3214-3224.
- Swan, G.E., Cuthbert, R., Quevedo, M., Green, R.E., Pain, D.J., Bartels, P., Cunningham, A.A., Duncan, N., Meharg, A.A., Oaks, J.L., Parry-Jones, J., Shultz, S., Taggart, M.A., Verdoorn, G., Wolter, K. (2006). Toxicity of diclofenac to Gyps vultures. *Biology Letters*, 2, pp. 279–282.
- Sweetman, A.J., Jones, K.C., (2000) Declining PCB concentrations in the UK atmosphere: evidence and possible causes. *Environmental Science & Technology*, 34, pp. 863–869.

- Taggart, M.A., Cubbert, R., Das, D., Sashikumar, C., Pain, D. J. , Green, R.E.,Felter, Y. Shultz, S., Cunningham, A.A, Meharg,A.A. (2007). Diclofenac disposition in Indian cow and goat with reference to Gyps vulture population declines. *Environmental Pollution*, 147, pp. 60-65.
- J.L. Tambosi, R. Felix de Sena, M. Favier, W. Gebhardt H.J. Fosé H.F. Schröder, R.F. Peralta Muñoz Moreira,. (2010) . Removal of pharmaceuticals compounds in membrane bioreactor (MBR) applying submerged membranes. *Desalination*, 261, pp. 148-156.
- Teijon, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A.R. (2010). Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Science of the Total Environment*, 408, pp. 3584 – 3595.
- Ternes, T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32, pp. 3245–3260.
- Ternes, T.A. , Kreckel, P., Mueller, J. (1999). Behaviour and occurrence of estrogen in municipal sewage treatment plant. II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Total Environ.*, 225, pp. 91-99.
- Triebkorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.R., Schwaiger, J. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. PartII. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aqua. Toxicol.*, 68, pp. 151–166.
- Trinh, T., van den Akker, B., Coleman, H.M., Stuetz, R.M., Drewes, J.E., Le-Clech, P., Khan, S.T. (2016). Seasonal variations in fate and removal of trace organic chemical

- contaminants while operating a full-scale membrane bioreactor. *Sci. Total Environ.*, 550, 176–183.
- USEPA. *Quality Criteria for Water*. U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/440/5-86-001, Washington DC (EEUU), 1986.
  - USEPA. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Environmental Protection Agency. *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): update*. Atlanta (GA-EEUU), 1994.
  - USEPA. *Guidelines for Water Reuse*. U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/625/R-04/108, Cincinnati (OH-EEUU), 2004.
  - USEPA. *Method 1694 U.S. Environmental Protection Agency: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS*. USEPA, Washington, D.C., 2007.
  - USEPA. *Guidelines for Water Reuse*. United States Environmental Protection Agency, Report No. EPA/600/R-12/618, Washington, DC (EEUU), 2012.
  - Vieno, N.M. y Sillanpää, M. (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant – A review. *Environment International*, 69, pp. 28-39.
  - Vieno, N.M., Härkki, H., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2007). Occurrence of pharmaceuticals in river water and their elimination in a pilot-scale drinking water treatment plant. *Environ. Sci. Technol.*, 41, pp. 5077 – 5084.
  - Vieno, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research*, 41, pp. 1001–1012.
  - Vogelsang, C., Grung, M., Jantsch, T.G., Tollefsen, K.E., Liltved, H. (2006). Occurrence and removal of selected organic micropollutants at mechanical, chemical and advanced

wastewater treatment plants in Norway. *Water Research*, 40, pp. 3559-3570.

DOI:[10.1016/j.watres.2006.07.022](https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.07.022)

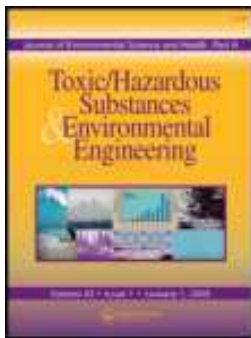
- Volkering, F. y Breure, A.M., Capítulo “Biodegradation and general aspects of Bioavailability” en *PAH: An Ecotoxicological Perspective*, Douben, P.E.T., Ed. Wiley, New York (EEUU), 2003.
- Vulliet, E., Cren-Olivé, C. (2011). Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environ Pollut*, 159, pp. 2929–34.
- Vulliet, E., Cren-Olivé, C., Grenier-Loustalot, M.F. (2011). Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environ Chem Lett*, 9, pp. 103–14.
- Warshawsky, D. (1999). Polycyclic aromatics hydrocarbons in carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, 107, pp. 317–319.
- Wild, S.R. y Jones, K.C. (1995) Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution*, 88, pp. 91-108.
- Winker, M., Clemens, J., Reich, M., Gulyas, H., Otterpohl, R. (2010). Ryegrass uptake of carbamazepine and ibuprofen applied by urine fertilization. *Science of the Total Environment*, 408, pp. 1902–1908.
- Wisniewski, C. (2007). Membrane bioreactor for water reuse. *Desalination*, 203, pp. 15-19.
- Wolman, A. (1965). The metabolism of Cities. *Scientific American*, 213, pp. 179–190.
- World Health Organization. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) en *Air quality guidelines for Europe*. Copenhagen Regional Office for Europe, 1987, pp. 105–117.
- World Health Organization. *Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and*

- aquaculture*, Tech. Bull. Ser. 77, WHO, Geneva, Switzerland, 1989.
- World Health Organization. *Guidelines for the safe use of the wastewater, excreta and grey water; vol. 2: Wastewater use in agriculture*. WHO, Geneva, Switzerland, 2006.
  - Yu, Z., Peldszus, S., Huck, P.M. (2008). Adsorption characteristics of selected pharmaceuticals and an endocrine disrupting compound—Naproxen, carbamazepine and nonylphenol—on activated carbon. *Water Research*, 42, pp. 2873–2882.
  - Zhang, Y., Geiben, S., Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies, review. *Chemosphere*, 73, pp. 1151 – 1161. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2008.07.086](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086).
  - Zhang, D.Q., Tan, S.K., Gersberg, R.M., Sadreddini, S., Zhu, J., Tuan, N.A. (2011). Removal of pharmaceutical compounds in tropical constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 37, pp. 460 – 464.
  - Zheng, X., Blais, J., Mercier, G., Bergeron, M., Drogui, P. (2007). PAH removal from spiked municipal wastewater sewage sludge using biological, chemical and electrochemical treatments. *Chemosphere*, 68, pp. 1143-1152.
  - Zhou, X. F., Dai, C. M., Zhang, Y. L., Surampalli, R.Y., Zhang, T.C. (2011). A preliminary study on the occurrence and behavior of carbamazepine (CBZ) in aquatic environment of Yangtze River Delta, China. *Environ. Monit. Assess.*, 173, pp. 45 – 53. DOI [10.1007/s10661-010-1369-8](https://doi.org/10.1007/s10661-010-1369-8).
  - Zorita, S., Martesson, L., Mathiasson, L. (2009). Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of the Total Environment*, 407, pp. 2760 – 2770.









## Carbamazepine behaviour and effects in an urban wastewater MBR working with high sludge and hydraulic retention time

Daniel María González-Pérez, Jorge Ignacio Pérez & Miguel Ángel Gómez Nieto

To cite this article: Daniel María González-Pérez, Jorge Ignacio Pérez & Miguel Ángel Gómez Nieto (2016) Carbamazepine behaviour and effects in an urban wastewater MBR working with high sludge and hydraulic retention time, Journal of Environmental Science and Health, Part A, 51:10, 855-860, DOI: [10.1080/10934529.2016.1181462](https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1181462)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2016.1181462>



Published online: 26 May 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 15



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

## Carbamazepine behaviour and effects in an urban wastewater MBR working with high sludge and hydraulic retention time

Daniel María González-Pérez, Jorge Ignacio Pérez, and Miguel Ángel Gómez Nieto

Technologies for Water Management and Treatment Research Group, Institute of Water Research and Department of Civil Engineering, University of Granada, Granada, Spain

### ABSTRACT

The behaviour and fate of carbamazepine (CBZ) in urban wastewater treatment by a membrane bioreactor (MBR) and its possible effects on the system's efficiency, and on mixed microbial communities, has been studied. The experimental microfiltration MBR system, with capacity to treat  $10.8 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$  of urban wastewater, operated with a pre-denitrification configuration with high sludge and hydraulic retention time. The CBZ concentration assayed was higher than in the usual urban wastewater, in order to provoke a strong biomass reaction. Influent, effluent, and all bioreactors of the MBR system were analysed in order to calculate a CBZ balance. Bench-scale experiments and respirometric analyses were performed, with and without the presence of CBZ, to evaluate its influence on the bacterial activity. The respirometric assays showed variations in the oxygen uptake rate (OUR) in the presence of CBZ. Negative effects were detected in the MBR bacterial community during the initial period of dosing. However, the effects were not permanent and the biomass spiked with CBZ had behaviour similar to that of the biomass without CBZ after a few hours. Biodegradation was not detected during the MBR treatment. The system showed an inefficient elimination of CBZ (less than 10%) with a high concentration in the effluent. The small percentage of CBZ removal was associated with the sludge retention and eliminated by the purge. All CBZ present in the influent was accounted for, and even an increase in the total amount of CBZ was registered in the permeate. During and after the experimental process, CBZ did not significantly affect the efficiency of the MBR system, and the quality of the effluent was not affected by the dosing of CBZ in terms of COD and nitrogen removal.

### ARTICLE HISTORY

Received 18 December 2015

### KEYWORDS

Carbamazepine; MBR; metabolites; wastewater

### Introduction

Pharmaceutical and personal-care products (PPCPs), which have been associated with negative effects in aquatic organisms and their habitats, are used extensively and therefore are frequently detected in the aquatic environment.<sup>[1]</sup> It is now well accepted that conventional wastewater treatment plants (WWTPs) are not designed to quantitatively remove micropollutants<sup>[2]</sup> and their effluents constitute a major pathway for human pharmaceuticals entering bodies of water.<sup>[3]</sup>

Carbamazepine (CBZ), an antiepileptic drug orally administered, is excreted through the faeces and urine in metabolized form.<sup>[3]</sup> This drug is a low degradable micropollutant, considered to be one of the most recalcitrant pharmaceuticals<sup>[4]</sup> present in WWTP influents worldwide, showing concentrations of  $0.04\text{--}4.4 \mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>[5–8]</sup> The low removal efficiency of CBZ during the wastewater treatment can be attributed to its physical-chemical properties<sup>[9,10]</sup> and its poor removal is explained by the sorption onto the available organic surfaces.<sup>[4,5]</sup>

Membrane bioreactors (MBR) constitute an emerging technology in wastewater treatment based on combining the biological activated sludge process with the solid/liquid physical separation by membrane, capable of producing directly reusable effluent.<sup>[11]</sup> Different configurations of the MBR system

may be used depending on the final water quality sought<sup>[12]</sup> and the MBR system can furthermore operate with high sludge retention time (SRT) or high hydraulic retention time (HRT),<sup>[11,13]</sup> which may allow the development of slow-growing bacterial and more diverse microbial communities capable of degrading specific organic compounds.<sup>[14]</sup> On the other hand, higher biomass concentration can be maintained in the system due to the higher SRT, so contact between organics surface and micropollutants is possible. Under these operational conditions, several PPCPs could be accumulated in the system.<sup>[15]</sup> However, high concentrations of PPCPs in the system may negatively affect the bacterial communities present in the activated sludge, causing possible changes in different bacterial populations in the system treatment capacity, and in effluent quality.<sup>[16]</sup>

The efficacy of MBRs in removing micropollutants is related to the system's ability to operate under non-conventional operational conditions such as high SRT and high HRT. Due to the characteristics of CBZ, a prolonged HRT by MBR was assayed in order to allow longer contact time between CBZ and sludge particles.<sup>[9,15,17]</sup> In this way, a high long HRT could perhaps assist the removal of CBZ by sorption onto the sludge particles and/or by bio-degradation.

Thus, the aim of this study was to evaluate the behaviour and fate of CBZ present in urban wastewater during the treatment in an experimental full-scale MBR working at SRT and HRT values higher than the usual values for real installations. In addition, the possible effects on the system's efficiency and on bacterial activity were monitored and analysed by respirometric methods.

## Materials and methods

### The pilot plant

A full-scale experimental installation with capacity to treat  $10.8 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$  was used for the study. The system consisted of an anoxic bioreactor ( $4 \text{ m}^3$ ), aerobic bioreactor ( $20 \text{ m}^3$ ) and membrane reactor ( $4 \text{ m}^3$ ), in which the sludge and permeate were separated, working with a pre-denitrification configuration (Fig. 1). The sludge was purged daily from the aerobic bioreactor in order to obtain 40 d of SRT. The operational HRT was 35 h for the whole installation.

The membrane reactor was equipped with hydrophilicized micro-filtration (MF) flat-sheet (FS) membranes (Kubota, Japan), working with a constant permeate flow rate ( $Q = 0.42 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ ) and a flow rate between the bioreactors of  $4Q$ . The membranes with nominal porosity of  $0.4 \mu\text{m}$  were made of chlorine polyethylene (PE). The system was fed with real urban wastewater which passed through a 1-mm brush screen. Influent, effluent, purge flow, and operational parameters such as dissolved oxygen (DO), pH, temperature, and transmembrane pressure (TMP) were continuously monitored. Table 1 summarizes the main characteristics of the MBR's sludge analysed.

### Experimental procedures

For a CBZ balance, the influent of the MBR system was spiked with CBZ (Sigma-Aldrich. CAS number 298-46-4) and samples were taken from the influent, effluent, purge, and activated sludge from the different reactors. Daily composite samples were taken from each point using a reversible-flow peristaltic pump; samples were stored under refrigerated conditions ( $4^\circ\text{C}$ ) in previously rinsed 5-L dark glass bottles with Teflon caps. The analysis took place within 48 h.

Before, during, and after the spiking with CBZ, the performance of the MBR treatment was evaluated by the analysis of TSS and VSS concentration in the reactors, and the oxygen requirements and effluent quality (COD and total nitrogen) were monitored to evaluate the effects of the CBZ concentration on MBR treatment performance.

### Respirometric assays and microbiological analysis

Respirometric analyses were made in the absence and presence of CBZ, in order to evaluate the influence of CBZ in the bacterial activity. The oxygen uptake rate (OUR) was monitored under endogenous and exogenous conditions with ethanol as the substrate. To ensure an endogenous state of activated sludge, fresh sludge samples were taken from the aerobic bioreactors of the experimental installation and kept aerated for 24 h before the respirometric analyses were performed. Afterwards, the activated sludge was fed into the respirometer (Surcis BMT, Spain), where the DO concentration was measured continuously inside the reactor and recorded online every 2 sec. The respirometer worked

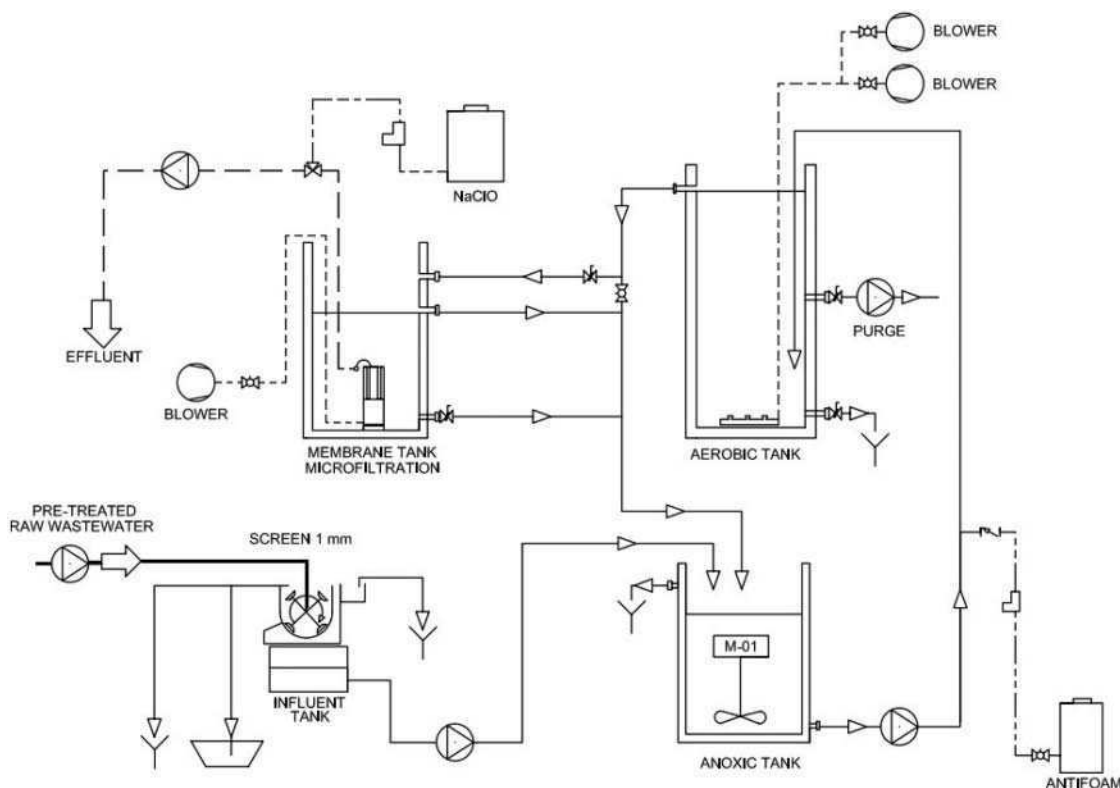


Figure 1. Schematic diagram of the experimental MBR installation.

**Table 1.** Characterization of the activated sludge from the MBR during the experimental period, the previous 6 months and the next month after the spiking period.

Characteristics	Before (180 days)	Spiking period	After (30 days)
Activated sludge			
TSS (g L <sup>-1</sup> )	5.6–10.0 (7.6)	6.3–7.1 (6.8)	6.1–7.8 (7.0)
VSS (g L <sup>-1</sup> )	4.6–6.6 (5.6)	4.8–5.4 (5.2)	4.7–6.0 (5.4)
Effluent quality			
COD (mg O <sub>2</sub> /L)	10.4–71.5 (20.8)	11.5–26.5 (22.5)	11.5–41.5 (22.4)
BOD <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)	0.0–9.0 (1.5)	0.0–3.0 (1.6)	0.0–4.0 (1.4)
N <sub>T</sub> (mg N/L)	13.2–30.7 (17.5)	17.2–26.5 (22.1)	16.4–31.5 (21.0)

in OUR static operation mode. All the experiments were conducted under conditions of controlled temperature (20°C) using a water cooler connected to the respirometer. The pH was also kept constant in the range of 7.0 to 8.0. The experiments were carried out with and without 10 µg L<sup>-1</sup> of CBZ.

Assays to determine the dynamic respiration rate (Rs) of the activated sludge were proposed without CBZ and with different concentrations of CBZ: 1, 10, and 100 µg L<sup>-1</sup>. The DO baseline was fixed using an endogenous respiration-activated sludge, and after adding a certain amount of substrate (sodium acetate and ammonium chloride) the respiration rate of the sludge was calculated. Using the same sludge sample, it was fed with the substrate and CBZ to analyse microorganism activity.

Agar basalt salt medium (A-BSM)<sup>[18]</sup> was used to determine the presence of culturable microorganisms capable of degrading CBZ in the activated sludge. Also, 1 mL of anoxic or aerobic activated sludge was diluted in sterile distilled water, followed by serial dilutions. Then, 1 mL of each dilution was spread onto a Petri dish containing A-BSM medium without a carbon source. The plates were airbrushed with a solution of CBZ [1 mg mL<sup>-1</sup> in hexane/acetone (1/1)] and the inoculated plates were kept at 20°C in the dark and colony growth was measured for a period of 6 weeks.

### Analytical methods

The analytical procedure of CBZ was based on EPA method 1694 by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS/MS).<sup>[19]</sup> CBZ was extracted from the sludge and the wastewater samples using a Spark Holland SPE-HLB system (Solid Phase Extraction—Hydrophilic Lipophilic Balance). SPE-HLB equipped with a Prospekt 2 unit and Oasis SPE-HLB cartridges was on line with a Midas auto-sampler (Spark Holland BV, The Netherlands). Five-millilitre samples were filtered, solid and liquid phases were treated, and the compounds were extracted independently, whereupon they were combined before being passed through the HPLC MS/MS. Analytical determination was performed on an Agilent Series 1200 HPLC MS/MS system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an Agilent 6410 triple quadrupole mass spectrometer fitted with an ESI MS source. Separations were carried out with an Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (50 mm × 4.5 mm i.d., 1.8 µm particle size). Extractions were performed at pH 2 and with positive electro-spray ionisation (ESI +) mode.

COD was measured using the COD closed reflux micro-method with potassium dichromate, and BOD<sub>5</sub> was determined

using the manometric method.<sup>[20]</sup> TSS in activated sludge was calculated with a gravimetric method using 0.45-µm filters, dried at 105°C and the fixed and VSS ignited at 550°C.<sup>[20]</sup> For total nitrogen quantification, 50 mL of an unfiltered diluted sample (1/10) was oxidised at 120°C for 30 min in the presence of boric acid, sodium hydroxide, and potassium peroxodisulphate. The result of the oxidation was analysed with Merck Spectroquant analytical kits for nitrate (Kit No: 1.14773.0001).

The data compiled were analysed with the statistical program STATGRAPHICS Plus 3.0 for Windows. The least significant differences test (LSD test) was used to measure the homogeneity of the data during the different periods analysed. An ANOVA test assessed the homogeneity of the variance with a significance level of 5% ( $P < 0.05$ ).

## Results and discussion

### MBR performance

The full-scale MBR system in the study was in continuous operation for 530 days at high SRT and HRT, and thus had reached steady-state conditions (three times the SRT). Influent characteristics were similar during the research period, with a mean COD value of 1,200 ± 395 mg O<sub>2</sub>/L.

The performance of MBR was analysed before, during, and after spiking with CBZ. TSS in activated sludge varies between a minimum value of 5.6 g L<sup>-1</sup> and a maximum of 10 g L<sup>-1</sup> with no statistically significant differences between the periods analysed ( $P$ -value = 0.2211). Behaviour similar to that of VSS was observed in the reactors, representing 75% of TSS (Table 1).

The effluent quality of organic matter was constant. COD effluent concentration ranged from 10.5 to 71.5 mg O<sub>2</sub>/L (Table 1), with no statistically significant differences ( $P$  value = 0.0960) with respect to the period analysed. The COD removal rate for the entire period was over 98%, and biodegradable organic matter represented about 7% of the total COD, according to BOD<sub>5</sub> analyses. Thus, the influence of CBZ addition to the influent was not detected despite the different effluent COD concentration (Table 1). The soluble fraction of the COD was composed of biodegradable and non-biodegradable compounds. According to the SRT, the biodegradable compounds must have been completely degraded in the MBR process,<sup>[11]</sup> which was observed in the BOD<sub>5</sub> effluent concentration (Table 1) without a significant influence of the added CBZ. Non-biodegradable compounds can be retained by the membrane due to their molecular weight<sup>[21]</sup> or by biomass biosorption,<sup>[13]</sup> while the rest passes easily through the system.

The medium value of total nitrogen influent concentration for the period analysed was 73.9 ± 28.7 mg N/L, composed mainly of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. High nitrifying activity was expected in the MBR system, according to the SRT. However, the total nitrogen concentration in the effluent ranged from 13.2 to 31.5 mg N/L (Table 1), composed mainly of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> with no statistically significant differences ( $P$  value = 0.2831) with respect to the period analysed. The nitrogen removal of the system was over 70% because nitrate removal was limited in the experimental system because of recirculation.<sup>[11]</sup>

## Respirometric assays and microbiological analysis

### Dynamic respiration rate assays

The assays proposed to evaluate the potential acute toxicity of the CBZ, using the dynamic respiration rate ( $\text{mgO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) of the activated sludge, showed that sludge without CBZ presented an oxygen consumption rate similar to that observed in the activated sludge spiked with CBZ. The situation was similar with the different concentrations of CBZ. Due to the high concentrations of spiked CBZ, the absence of negative effects on the microbiological activity indicates that the microorganism did not use the CBZ as a substrate because of its low biodegradation.<sup>[7]</sup> These results suggest that it is necessary to evaluate the toxic effects for longer exposures to CBZ.

### OUR assays

The OUR assays showed a change over time in the effects on the activated sludge by the addition of CBZ at a concentration of  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. 2). At the beginning ( $t = 0$  h), both sludges presented similar OURs, indicating that CBZ was not yet available for the microorganism. This fact agreed with the low bioavailability showed during the dynamic respiration ratio test.

After 3 h, a decrease was found in both endogenous respirations but the spiked sludge kept OURs, which were 1.5-fold higher than those observed in the non-spiked sludge. This behaviour was observed at 6 h and at 12 h after the addition of CBZ, although after 24 h the oxygen requirements in the spiked sludge were similar to those measured in the non-spiked one. Even after 24 h, the activated sludge without CBZ presented slightly higher OURs. Therefore the presence of CBZ indicated no permanent effects on biomass respiration.

Increases in the endogenous respiration of the activated sludge, after the addition of micropollutants, have been found by

other authors,<sup>[14,22]</sup> reporting a recovery to the oxygen requirements a few hours after this increase. Henriques et al.<sup>[22]</sup> explained this behaviour in the presence of 2,4-dinitrophenol by the metabolic adaptations which were adopted by the cells in order to become accustomed to the presence of the pollutant. Aubenneau et al.<sup>[14]</sup> agreed with these observations, and with those made by Kraigher et al.<sup>[23]</sup> who reported diversity changes in the bacterial community in the presence of micropollutants which could explain the different oxygen requirements. However, Aubenneau et al.<sup>[14]</sup> and Henriques et al.<sup>[22]</sup> observed that the OUR increased immediately after the addition of the micropollutants. The fact that the effects of CBZ were not noticeable at the beginning of the assays appear to be related to pollutant physical-chemical properties which bring to CBZ low water solubility and low bioavailability,<sup>[24]</sup> and these properties apparently sustain the availability of CBZ for the microorganism.

### Microbiological analysis

After 6 weeks of incubation the cultures from the activated MBR sludge to determine the presence of microorganisms capable of degrading CBZ showed no sign of growing, in agreement with the difficult biodegradation of CBZ.<sup>[4]</sup> Thus, the biodegradation process could not be expected to be found during the MBR treatment, this being consistent with studies of other authors working with different MBR systems.<sup>[6,9]</sup>

### Behaviour of CBZ in the MBR system with high SRT and HRT

Clara et al.<sup>[6]</sup> and Kim et al.<sup>[7]</sup> working with pilot-scale MBRs showed that CBZ was not removed during the MBR treatment. These results are in line with work reported by Radjenovic et al.<sup>[17]</sup> operating with ultrafiltration and microfiltration MBRs at the pilot

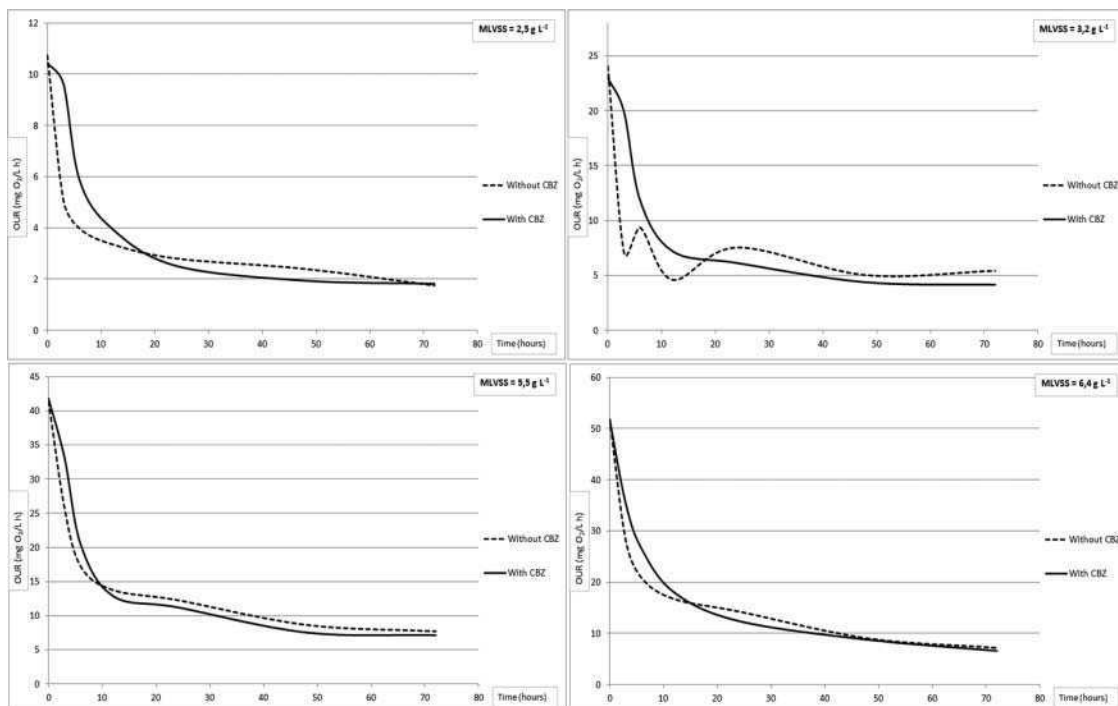


Figure 2. Oxygen uptake rate (OUR) of different endogenous activated sludges from MBR with (—) and without (---) CBZ ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

**Table 2.** CBZ concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) in the different stages of the MBR treatment.

Influent	Max.	11.38
	Min.	1.34
	Mean	6.19
Anoxic reactor	Max.	10.42
	Min.	2.66
	Mean	5.72
Aerobic reactor	Max.	6.19
	Min.	3.84
	Mean	5.29
Membrane reactor	Max.	13.50
	Min.	3.63
	Mean	7.69
Effluent	Max.	9.69
	Min.	3.65
	Mean	6.50

scale. This poor removal of CBZ was due partly to its hydrophilic nature ( $\log K_{ow} < 2.5$ ) and chemical stability;<sup>[10]</sup> these make CBZ a persistent micropollutant which is non-degradable in real MBR WWTPs. However, Bernhard et al.<sup>[9]</sup> reported working at lab scale of 13% CBZ removal in a microfiltration-MBR system with a high STR ( $>400$  d). The system assayed with high SRT and HRT failed to remove CBZ throughout the MBR treatment. The small percentage of CBZ removal from the wastewater by the purge, around 3.16% of total entry amount of CBZ, was associated with the retention by sludge (Table 2).

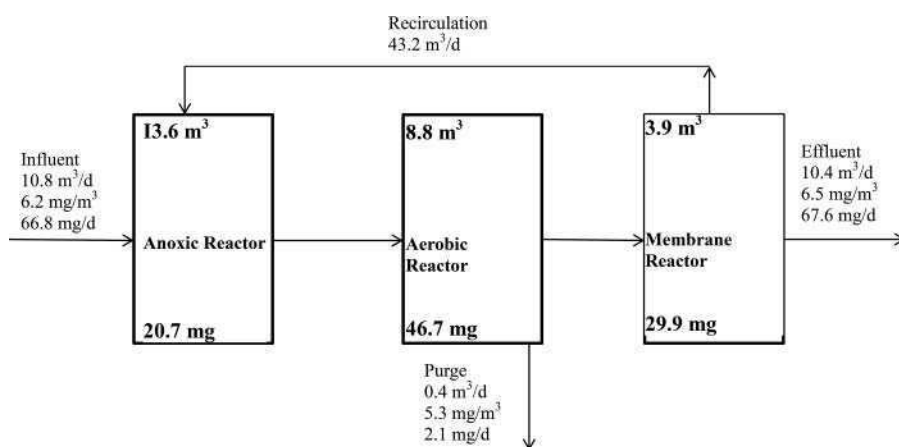
The total amount of CBZ present in the effluent during a day (67.6 mg) was slightly larger than the total daily amount of CBZ entering in the system (66.8 mg). If the amount of CBZ which left the system by the purge (2.1 mg) was considered, the balance of CBZ in the system looked like not being accountable, and it seemed to indicate that more CBZ was leaving the system than entering it (Fig. 3). Several authors have described this increase in CBZ concentration during the biological treatment process. Kim et al.<sup>[7]</sup> reported that the CBZ concentrations measured in the effluents of two different MBRs were greater than the CBZ concentrations measured in the influents, and similar results had previously been noted by Castiglioni et al.<sup>[25]</sup> and Clara et al.<sup>[6]</sup> during MBR treatment.

Zhou et al.<sup>[10]</sup> found the same increase in CBZ concentration, suggesting that it was most likely related to the enzymatic cleavage of the conjugate of CBZ metabolites, as shown by Vieno et al.<sup>[8]</sup> The CBZ present in the raw

wastwaters is mainly unmetabolised CBZ excreted in human urine and faeces, representing around 29% of CBZ intake by oral administration,<sup>[3]</sup> while the rest of the CBZ consumed is transformed and excreted as different metabolic products. The main metabolites are 10,11-dihydro-10,11-epoxycarbamazepine and trans-10,11-dihydro-10,11-dihydrocarbamazepine, which account for a large part of the oral dosage, i.e. over 30%.<sup>[3,10]</sup> Some of these metabolites can result in a conjugated form and be excreted mainly as glucuronide conjugates,<sup>[26]</sup> and enter with wastewater into the WWTPs. Ternes<sup>[27]</sup> reported that activated sludge had been found to have glucuronidase activity and thus the cleavage of the glucuronic acid moiety was possible in the wastewater-treatment process. Thus, these CBZ glucuronides and other conjugated metabolites are likely cleaved and transformed in the free forms by enzymatic processes during wastewater treatment.<sup>[28]</sup> Vieno et al.<sup>[8]</sup> on analysing CBZ glucuronide conjugates by LC MS/MS using three mass transitions for CBZ-N-glucuronide found peaks for the mass transitions at about 2.5 min shorter than that corresponding to CBZ in the chromatograms of the influent samples, but these peaks were not found in the effluent samples even though the samples were more concentrated than the influent samples. The peaks were probably due to the glucuronide conjugate of CBZ present in the influent but not in the effluent. These results show that the cleavage of glucuronic acid from CBZ-glucuronide was possible working with high SRT and HRT.

The higher portion of CBZ present in the influent was added in an unmetabolised form, thus the amount of conjugates of CBZ metabolites susceptible to being transformed was proportionally lower than in other studies, which were present in the raw wastewater used for the experiment. The increase in CBZ observed during the MBR treatment ( $<4.3\%$ ) was substantially lower than that found by other authors, who have reported increases of greater than 100% and even close to 200%, compared to the influent concentration.<sup>[8,29]</sup>

The MBR permeates have been demonstrated to be suitable for reuse of treated water based on diverse reuse guidelines.<sup>[12]</sup> Although the MBR systems showed better performance in the removal of some micropollutants than the conventional activated sludge (CAS) treatments,<sup>[18,29]</sup> MBR treatment was not capable of removing CBZ despite working at high SRT and

**Figure 3.** Summarized balance of CBZ in MBR during the experimental period; the results for one average day are shown.

HRT. To eliminate some persistent micropollutants, such as CBZ, additional physical and/or chemical treatments by the MBR system must be applied. Nevertheless, the presence of CBZ or other persistent micropollutants in permeates, and their potential effects on the environment and human health, should be considered for future guidelines.

## Conclusion

After the spiking of the MBR wastewater treatment system with CBZ, the subsequent screening and the respirometric assays, the following conclusions can be drawn.

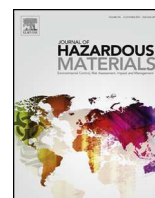
- (1) The real MBR system working with high SRT and HRT showed an inefficient elimination of CBZ. The small percentage of CBZ removal was always associated with the elimination by the purge.
- (2) According to OUR experiments, the presence of CBZ slightly alters the microbiological activity of the activated sludge from a MBR working with high SRT and HRT.
- (3) The presence of high CBZ concentrations in the influent to the MBR system operated with high HRT and SRT did not affect the organic or nitrogen removal capacity of the system.

## Funding

The present study has been financed by the Spanish Ministry of the Environment and Rural and Marine Media through the Secretariat-General for Rural and Water Media (094/RN08/03.1).

## References

- [1] Ruhmland, S.; Wick, A.; Ternes, T.A.; Barjenbruch, M. Fate of pharmaceuticals in subsurface flow constructed wetland and two ponds. *Ecol. Eng.* **2015**, *80*, 125–139.
- [2] Binelli, A.; Magni, S.; Soave, C.; Marazzi, F.; Zuccato, E.; Castiglioni, S.; Parolini, M.; Mezzanotte, V. The biofiltration process by the bivalve *D. polymorpha* for the removal of some pharmaceuticals and drugs of abuse from civil wastewaters. *Ecol. Eng.* **2014**, *71*, 710–721.
- [3] Zhang, Y.; Geiben, S.; Gal, C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies, review. *Chemosphere* **2008**, *73*, 1151–1161.
- [4] Zhang, D.Q.; Tan, S.K.; Gersberg, R.; Sadreddini, S.; Zhu, J.; Tuan, N. A. Removal of pharmaceutical compounds in tropical constructed wetlands. *Ecol. Eng.* **2011**, *37*, 460–464.
- [5] Carranza-Díaz, O.; Schultze-Nobre, L.; Moeder, M.; Nivala, J.; Kuschik, P.; Koester, H. Removal of selected organic micropollutants in planted and unplanted pilot-scale horizontal flow constructed wetlands under conditions of high organic load. *Ecol. Eng.* **2014**, *71*, 234–245.
- [6] Clara, M.; Strenn, B.; Gans, O.; Martinez, E.; Kreuzinger, N.; Kroiss, H. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Res.* **2005**, *39*, 4797–4807.
- [7] Kim, S.D.; Cho, J.; Kim, I.S.; Vanderford, B.J.; Snyder, S.A. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korea surface, drinking and waste water. *Water Res.* **2007**, *41*, 1013–1021.
- [8] Vieno, N.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Res.* **2007**, *41*, 1001–1012.
- [9] Bernhard, M.; Müller, J.; Knepper, T.P. Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: Comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. *Water Res.* **2006**, *40*, 3419–3428.
- [10] Zhou, X.F.; Dai, C.M.; Zhang, Y.L.; Surampalli, R.Y.; Zhang, T.C. A preliminary study on the occurrence and behavior of carbamazepine (CBZ) in aquatic environment of Yangtze River Delta, China. *Environ. Monit. Assess.* **2011**, *173*, 45–53.
- [11] Arévalo, J.; Ruiz, L.M.; Parada-Albarracín, J.A.; González-Pérez, D. M.; Pérez, J.; Moreno, B.; Gómez, M.A. Wastewater reuse after treatment by MBR. Microfiltration or ultrafiltration? *Desalination* **2012**, *299*, 22–27.
- [12] González-Pérez, D.M.; Garralón, G.; Plaza, F.; Pérez, J.; Moreno, B.; Gómez, M.A. Removal of low concentration of phenanthrene, fluoranthene and pyrene from urban wastewater by membrane bioreactors technology. *J. Environ. Sci. Heal. A.* **2012**, *47*, 2190–2197.
- [13] Santos, A.; Ma, W.; Judd, S. Membrane bioreactors: Two decades of research and implementation. *Desalination* **2010**, *273*, 148–154.
- [14] Aubenneau, M.; Tahar, A.; Casellas, C.; Wisniewski, C. Membrane bioreactor for pharmaceutically active compounds removal: Effects of carbamazepine on mixed microbial communities implied in the treatment. *Process Biochem.* **2010**, *45*, 1826–1831.
- [15] Maeng, S.K.; Choi, B.G.; Lee, K.T.; Song, K.G. Influences of solid retention time, nitrification and microbial activity on the attenuation of pharmaceuticals and estrogens in membrane bioreactors. *Water Res.* **2013**, *47*, 3151–3162.
- [16] Ahmed, F.N.; Lan, C.Q. Treatment of landfill leachate using membrane bioreactors: A review. *Desalination* **2012**, *287*, 41–54.
- [17] Radjenovic, J.; Petrovic, M.; Barceló, D. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Res.* **2009**, *43*, 831–841.
- [18] Miller, C.; Hall, K.; Liang, Y.N.; Nieman, K.; Sorensen, D.L.; Issa, L.; Anderson, A.J.; Sims, R.C. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolates from soil. *Microb. Ecol.* **2004**, *48*, 230–238.
- [19] U.S. Environmental Protection Agency. *Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS*. US E.P.A.: Washington, D.C., 2007.
- [20] APHA, AWWA, and WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd Ed.; American Public Health Association: Washington, D.C., 2012.
- [21] Rojas, J.C.; Pérez, J.; Garralón, G.; Plaza, F.; Moreno, B.; Gómez, M.A. Humic acids removal by aerated spiral-wound ultrafiltration membrane combined with coagulation-flocculation. *Desalination* **2011**, *266*, 128–133.
- [22] Henriques, I.D.S.; Holbrook, R.D.; Kelly II, R.T.; Love, N.G. The impact of flocs size on respiration inhibition by soluble toxicants—a comparative investigation. *Water Res.* **2005**, *39*, 2559–2568.
- [23] Kraigher, B.; Kosjek, T.; Heath, E.; Kompare, B.; Mandic-Mulec, I. Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. *Water Res.* **2008**, *42*, 4578–88.
- [24] Al-Rifai, J.H.; Khabbaz, H.; Schäfer, A.I. Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in water recycling process using osmosis systems. *Sep. Purif. Technol.* **2011**, *77*, 60–67.
- [25] Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Fanilli, R.; Pomati, F.; Calamari, D.; Zuccato, E. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 357–363.
- [26] Maggs, J.L.; Pirmohamed, M.; Kitteringham, N.R.; Park, B.K. Characterization of the metabolites of carbamazepine in patient urine by liquid chromatography/mass spectrometry. *Drug Metabol. Dispos.* **1997**, *25*, 275–280.
- [27] Ternes, T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* **1998**, *32*, 3245–3260.
- [28] Miao, X.S.; Yang, J.J.; Metcalfe, C.D. Carbamazepine and its metabolites in wastewater and in biosolids in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 7469–7475.
- [29] Clara, M.; Strenn, B.; Kreuzinger, N. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: Investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res.* **2004**, *38*, 947–954.



# Behaviour of the main nonsteroidal anti-inflammatory drugs in a membrane bioreactor treating urban wastewater at high hydraulic- and sludge-retention time



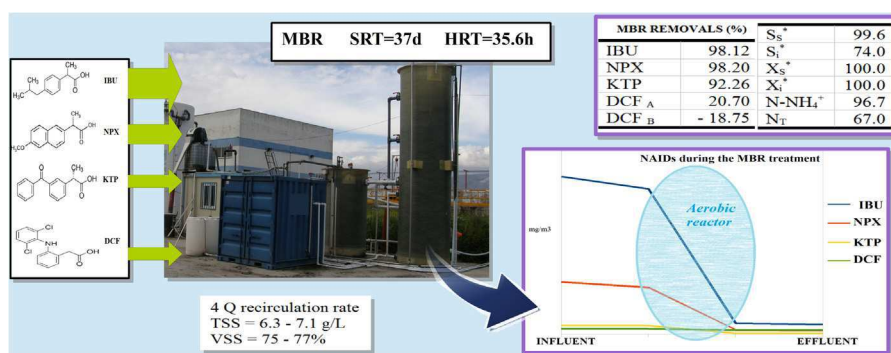
D.M. González-Pérez, J.I. Pérez, M.A. Gómez\*

Technologies for Water Management and Treatment Research Group (TEP-239), University of Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18071, Granada, Spain

## HIGHLIGHTS

- Aerobic transformation of NSAIDs is predominant in MBR working with high SRT and HRT.
- Anoxic transformation of NSAIDs in MBR working with high SRT and HRT is irrelevant.
- Diclofenac accumulates in activated sludge of MBR working with high SRT and HRT.
- MBR diclofenac accumulation working with high SRT and HRT results in negative removal.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 22 December 2016  
 Received in revised form 21 April 2017  
 Accepted 22 April 2017  
 Available online 26 April 2017

### Keywords:

MBR  
 NSAIDs  
 Aerobic bioreactor  
 Diclofenac

## ABSTRACT

The behaviour and removal efficiency of ibuprofen (IBU), diclofenac (DCF), ketoprofen (KPF), and naproxen (NPX) during the real urban wastewater treatment by an experimental full-scale MBR working at high sludge and hydraulic retention time (SRT, HRT) were determined. The MBR worked in denitrification/nitrification conformation at 35.4 h of HRT ( $Q=0.45\text{ m}^3/\text{h}$ ), 37 d of SRT and a recirculation flow rate of 4Q. The experiments were made under steady-state conditions, reaching a biodegradable organic matter removal higher than 99.5%. The MBR system showed similar removal capacity for IBU, NPX, and KTP (>95%), whose main transformation occurred in the aerobic reactor with a low contribution from the anoxic reactor. The system worked with complete nitrification, also achieving an effective retention of the unbiodegradable organic matter due to recirculation. DCF removal was low with negative removal yields for several samplings. Both removal and increase transformation of DCF also occurred in the aerobic reactor, this not being observed in the anoxic one. DCF tends to accumulate in the system and to be recirculated. Thus, during the sampling in which DCF influent concentration decreases, removal yields turn negative. The increase of DCF concentration in the aerobic bioreactor also contributes to the negative removal yields.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author at: Department of Civil Engineering, Campus de Fuentenueva s/n, University of Granada, 18071, Granada, Spain.  
 E-mail address: [mgomez@ugr.es](mailto:mgomez@ugr.es) (M.A. Gómez).

## 1. Introduction

Over the last few decades, micropollutants such as pharmaceutically active compounds (PhACs) have been used extensively and a wide range of them have been detected in raw sewage, wastewater-



treatment plants (WWTPs) effluents, surface and groundwater with concentrations commonly ranging from a few ng/L to several  $\mu\text{g/L}$  [1]. Due to the characteristics of these compounds, their removal by conventional sewage-treatment technologies such as activated-sludge processes is often incomplete [2]. For these reasons they are reported as ubiquitously present in the effluents of wastewater-treatment plants. Today it is well accepted that conventional wastewater-treatment plants are not designed to quantitatively remove micropollutants [3] and their effluents constitute an important pathway for human and animal pharmaceuticals entering water bodies [2].

The elimination of PhACs can occur through various mechanisms in the activated-sludge process, mainly by biodegradation, sorption or volatilization [4]. Activated sludge is designed to substantially degrade the organic compounds by microbial metabolism, which vary depending on operating conditions such as sludge-retention time (SRT), hydraulic-retention time (HRT), and temperature. Previous studies have shown that higher SRTs increase the removal efficiency of PhACs due to the presence of slower-growing species and the increase of microbial diversity [5]. On the other hand, longer HRTs involve longer contact time between activated sludge and organic compounds, and thus better removal efficiency [6,7].

Sorption onto sludge, referring to hydrophobic or electrostatic interactions with the biomass, is a common mechanism whose effectiveness depends on the physicochemical properties of the compounds and the biomass concentration [8]. Adsorption to sludge of hydrophilic compounds is limited [3], and consequently their removal by sorption processes is inefficient and can impede the biodegradation of these compounds too [9].

Volatilization to air can occur by surface volatilization or air stripping, which depends essentially on the physicochemical properties of the micropollutants and on the operating conditions of the process such as aeration, agitation, temperature or atmospheric pressure [4]. Compounds with low molecular weight can be released directly into the atmosphere from activated sludge by air stripping [10].

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which are among the most widely used therapeutic agents worldwide, include more than 100 compounds and are known to be largely used throughout the world as inflammatory and pain killers [3]. Large amounts of NSAIDs are consumed, increasing the industrial production at a rate of 12% per year [3]. Thus, a large amount of these PhACs or metabolites are released into environment continuously.

One of the most globally consumed and studied NSAIDs is Ibuprofen (IBU), (RS)-2-(4-(2-methylpropyl) phenyl) propanoic acid. This compound can be found at significant concentrations ranging from 3.7 to 603.0  $\mu\text{g/L}$  [11], not only in wastewater but also in drinking-water sources [1]. Biodegradation is the main pathways for the removal of IBU in wastewater-treatment plants, achieving nearly full removal of the pollutant [12]. Other propionic acid derivatives widely consumed by humans and animals are naproxen (NPX), (+)-(S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl) propanoic acid, and ketoprofen (KPF), (RS)-2-(3-benzoylphenyl) propanoic acid. Due to their high hydrophilicity their elimination depends mainly on chemical or biological process, but removal by conventional wastewater treatment gives very dissimilar results [3].

One of the NSAIDs with a reportedly lower removal capacity by conventional wastewater-treatment plant is diclofenac (DCF), 2-[2-(2,6-dichlorophenyl)-aminophenyl] ethanoic acid. It is a derivative of anthranilic acid commonly used in ambulatory care and it is one of the most frequently detected NSAIDs in water, having one of the highest acute toxicity rates [13]. Moreover, DCF has been included in the first watch list of substances for European Union-wide monitoring in the field of water policy [14].

Understanding the fate of NSAIDs through activated sludge includes the knowledge of the influence not only of the operation conditions of the process but also of the physicochemical properties of the compounds with respect to the main removal mechanisms [4].

Membrane bioreactors (MBR) combine the biological degradation process by activated sludge with a solid/liquid separation process by membrane filtration [15]. The MBR system can operate with high SRTs and high HRTs, which may allow the development of more diverse slow-growing microbial communities capable of biodegrading specific organic compounds [5]. A high SRT causes high biomass retention in the activated sludge, so a higher contact between biomass and micropollutants is possible, increasing the adsorption of hydrophobic compounds and thereby improving the retention capacity of several micropollutants [16]. Given these characteristics, MBR systems offer a good alternative to improve the removal of micropollutants such as NSAIDs.

In view of this, the aim of this study was to determine the behaviour and removal efficiency of IBU, DCF, KPF, and NPX present in real urban wastewater during treatment in a full-scale experimental MBR working at high SRT and HRT values. For this purpose, the considered NSAIDs were measured in the influents and effluents as well as through the reactors, and mass balances on the system were calculated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. The pilot-plant description and operating conditions

An experimental full-scale MBR facility (Fig. 1) was used for the study. The system was composed of an anoxic bioreactor (3.6 m<sup>3</sup>), aerobic bioreactor (8.8 m<sup>3</sup>) and membrane reactor (3.5 m<sup>3</sup>), working in pre-denitrification mode. The membrane reactor was equipped with hydrophilicized micro-filtration flat-sheet membranes (0.4  $\mu\text{m}$  nominal pore size) made of chlorine polyethylene.

The facility was located at the urban wastewater treatment plant (WWTP) in Granada (Granada-Sur, Spain). The raw urban wastewater was obtained from the WWTP's pretreatment system composed of a 3 mm brush screen and an aerated grid chamber to remove rubbish, sand and oils. Before entering the facility, the pretreated urban wastewater influent passes through a sieve brush (1 mm) to remove particles that can clog up the membranes.

The experimental full-scale MBR worked with a constant permeate flow rate of  $Q=0.45\text{ m}^3/\text{h}$  by vacuum (35.4 h of HRT) and a flow rate between the bioreactors of 4Q. A constant sludge purge was carried out from the aerobic bioreactor for 37 d of SRT and activated-sludge dissolved oxygen concentration was maintained in the range of 0.6–1.5 mgO<sub>2</sub>/L in the aerobic bioreactor by means of two blowers (total flow 50 Nm<sup>3</sup>/h). The membranes were also aerated (40 Nm<sup>3</sup>/h) in order to retard membrane fouling. Running conditions involved a 9-min production phase followed by 1 min of relaxation phase. A NaClO dosage was provided for chemical membrane cleaning which was activated semiannually or transmembrane pressure (TMP) became excessively high ( $<-0.17\text{ bar}$ ).

### 2.2. Experimental procedure

The start-up of the experimental facility was achieved with an initial inoculum of biomass obtained from a conventional activated sludge wastewater-treatment plant. After inoculation the facility was operated continuously for 18 months, so the facility can be considered to have worked under steady-state conditions.

The experimentation phase spanned four weeks (February to March). During this period, 24-h composite samples were taken

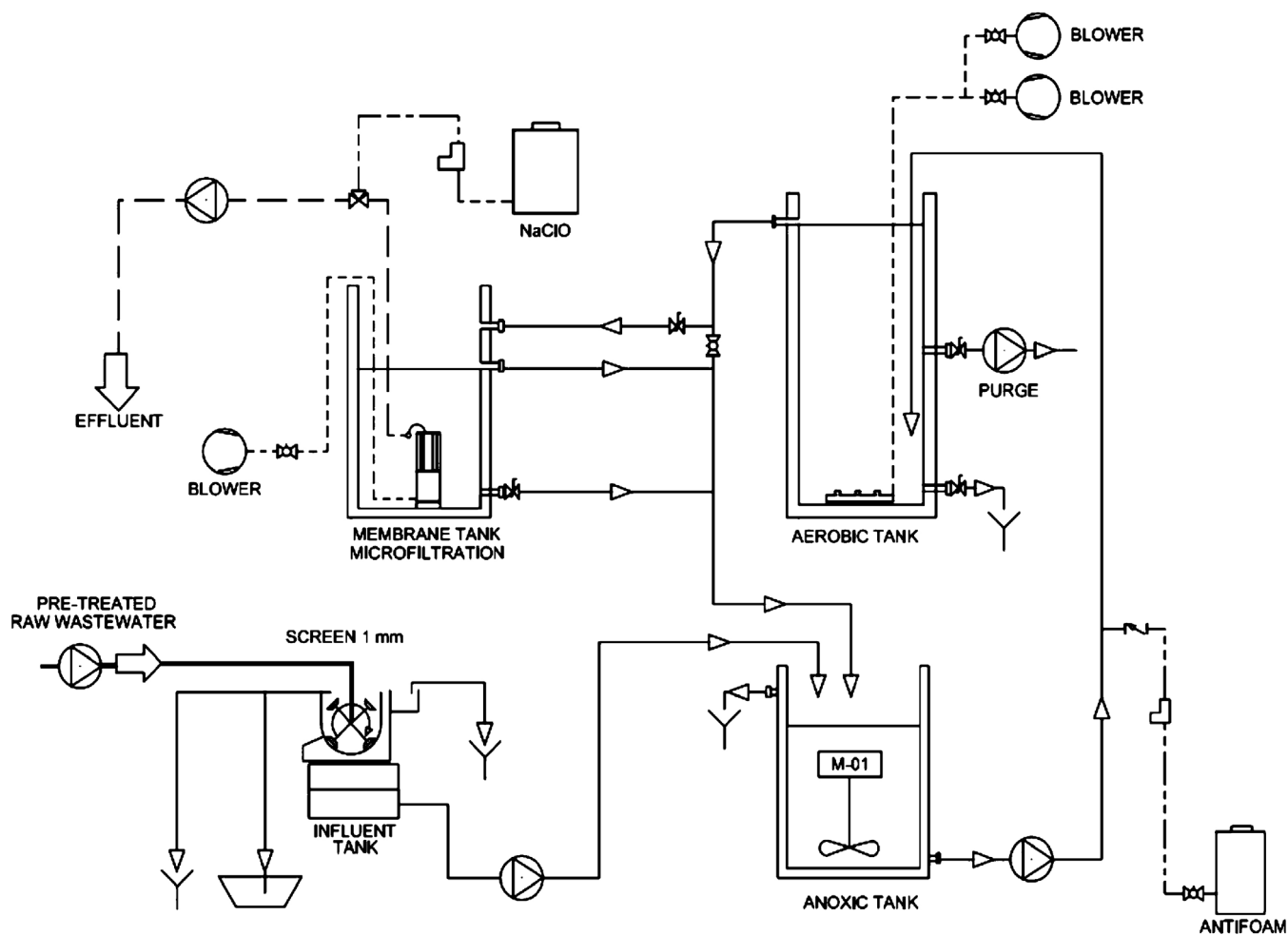


Fig. 1. Layout of full-scale experimental MBR.

**Table 1**  
LOQs–LODs for studied NSAIDs (ng/L).

	Raw wastewater and activated sludge	Treated wastewater
IBU	4.0–2.0	4.0–1.8
NPX	5.0–2.0	1.0–0.5
KTP	40.0–25.0	30.0–20.0
DCF	2.0–1.0	0.05–0.02

daily from the influent, effluent, purge, and activated sludge of each reactor. Samples were taken from each point by combining 24 grab samples collected every hour by a reversible-flow peristaltic pump to prevent the accumulation of the sample in the collector pipe. Throughout the sampling period, samples were stored under refrigerated conditions (4 °C) in 5-L dark previously rinsed glass bottles with teflon caps. All physico-chemical analyses were conducted in triplicate, immediately on the day following sample collection. For micropollutants analyses, three replicates of each sample were frozen in glass bottles (1 L) and conserved until the analyses time. Prior to analytical determination the samples were thawed at room temperature.

The experimental facility was equipped for continuous measurement of temperature, dissolved oxygen, and pH of activated sludge (Endress & Hauser). Electromagnetic flow meters (Rosemount) were used to monitor influent, permeate, and purge flux and the recirculation of activated sludge between tanks. TMP and tank level were also measured continuously by means of pressure

**Table 2**  
Operational variables and parameters of the MBR during the experimental period.

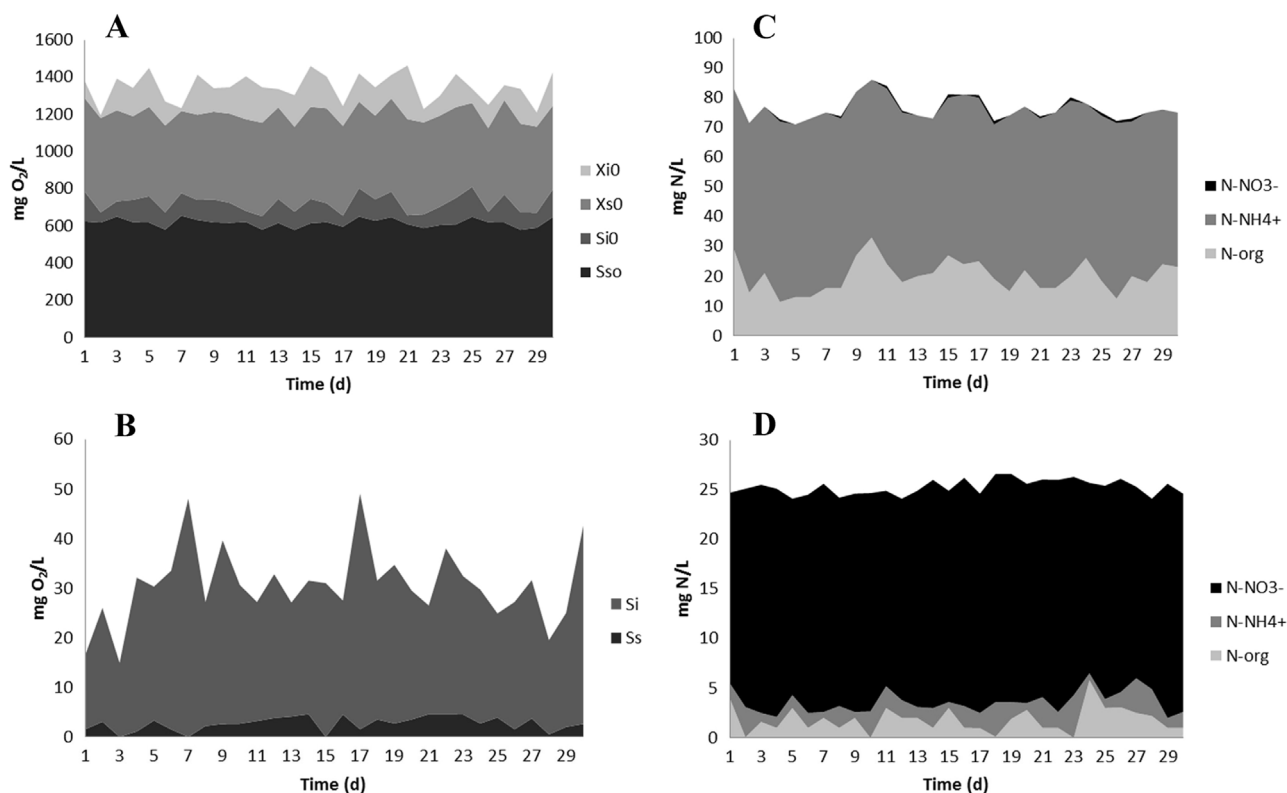
Variable or Parameter	Units	Values
SRT	d	37
HRT	h	35.6
Activated Sludge Temperature	°C	17.4–19.0
Organic loading	Kg COD/m <sup>3</sup> d	0.83–0.98
F:M ratio	Kg BOD <sub>5</sub> /Kg TSS d	0.066–0.079
TMP	-bar	0.088–0.096
TSS	g/L	6.3–7.1
VSS	%	75–77

transducers. Every second, the control systems provided data output which was continuously measured and registered in a database.

All influent and effluent samples were analysed for total (TSS) and volatile (VSS) suspended solids, total and filterable (0.45 μm) biochemical oxygen demand at five days (BOD<sub>5</sub>), total and filterable (0.45 μm) chemical oxygen demand (COD), NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and total nitrogen. Activated-sludge samples were analysed for TSS and VSS. The total concentrations of the selected NSAIDs were determined in influent, effluent, purge, and activated-sludge samples in order to determine the mass balance of each substance in the experimental MBR.

### 2.3. Analytical methods

TSS were analysed by vacuum filtration, drying at 105 °C, and gravimetric determination, using 0.45 μm filters, while VSS were



**Fig. 2.** Influent and effluent characteristics during the experimental period: Influent COD (A), Effluent COD (B), Influent nitrogen (C), Effluent nitrogen (D). Chemical oxygen demand fractionation:  $S_S$ : Soluble biodegradable;  $S_i$ : Soluble unbiodegradable;  $X_S$ : Particulate biodegradable;  $X_i$ : Particulate unbiodegradable.

analysed by incineration at 550 °C according to Standard Methods [17]. COD was measured by acid oxidation with  $K_2Cr_2O_7$  using the closed reflux micro method [17]. Potassium hydrogen phthalate (Sigma) was used as a standard for spectrophotometric determination at  $\lambda = 600$  nm.  $BOD_5$  was determined by the manometric method [17], incubating the sample in darkness at 20 °C for 5 days. Allylthiourea was added to inhibit nitrification. The physicochemical method described by Ruiz et al. [18] was applied to obtain the main COD fractions of influent and effluent ( $S_S$ : soluble biodegradable;  $S_i$ : soluble unbiodegradable;  $X_S$ : particulate biodegradable;  $X_i$ : particulate unbiodegradable). To apply this method, ultimate  $BOD$  was calculated using the manometric method for 30 days with a nitrification inhibitor allylthiourea.

$NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  and  $NO_2^-$  were measured using ion selective electrodes (Orion 9307BNWP, 9512BNWP and Crison 96-64 nitrite Electrode). Electrode slopes were automatically determined using a standard of known concentration. The total nitrogen was determined by oxidizing 50 mL of unfiltered diluted sample (1/10) at 120 °C for 30 min in the presence of boric acid, sodium hydroxide, and potassium peroxodisulphate. The result of the oxidation was analysed using Merck-Spectroquant analytical kits for  $NO_3^-$  (Kit No: 1.14773.0001).

The analytical procedure of NSAIDs was based on EPA method 1694 by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC–MS/MS) [19]. The compounds were extracted from the sludge and the wastewater samples using a Spark Holland SPE-HLB system (Solid Phase Extraction–Hydrophilic Lipophilic Balance). SPE-HLB equipped with a Prospekt 2 unit and Oasis SPE-HLB cartridges was on line with a Midas autosampler (Spark Holland BV, The Netherlands). Samples of 5 mL were filtered, solid and liquid phases were treated, and the compounds were extracted independently, whereupon they were combined before being passed through the HPLC MS/MS. Analytical determination

was performed on an Agilent Series 1200 HPLC MS/MS system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an Agilent 6410 triple quadrupole mass spectrometer fitted with an ESI MS source. Separations were carried out with an Agilent ZORBAX Eclipse XDBC18 column (50 mm  $\times$  4.5 mm i.d., 1.8 mm particle size). Extractions were performed at pH 2 and with positive electrospray ionisation (ESI+) mode. Table 1 shows the limits of quantification (LOQs) and limits of detection (LODs).

#### 2.4. Statistical analysis

Data obtained by continuous measurements were treated by the specific software Active Factory 9.2 (Wanderware) in order to remove mistakes during the measurement and to obtain daily mean values. The data compiled were analysed by computer-assisted statistics, using the SPSS software package (IBM-SPSS v22). The least significant differences test (LSD test) was used to measure the homogeneity of the data. An ANOVA test assessed the homogeneity of the variance with a significance level of 5% ( $P < 0.05$ ). The mass balances were achieved daily and the homogeneity of data obtained from the mass balances throughout the study was tested by ANOVA and LSD test. Samples in which non-homogeneous data were detected were removed from the study. For DCF studies two very different behaviours were observed with positive and negative removal yields which were studied separately.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. MBR performance

Over the four weeks of the NSAID analyses the experimental facility was in the work phase with high SRT and HRT values, which were fixed by the production of permeate and purge of the

**Table 3**  
Concentration of the selected NSAIDs ( $\mu\text{g/L}$ ) in the influent of the MBR system during the experimental period, compared with previous studies (Luo et al., 2014).

NSAID	Mean	SD	Minimum	Maximum	Literature
IBU	<b>33.21</b>	14.74	12.56	66.40	0.01–603.00
NPX	<b>5.57</b>	1.71	2.88	8.73	0.01–52.90
KPF	<b>0.39</b>	0.17	0.15	0.67	0.01–8.56
DCF	<b>0.23</b>	0.16	0.03	0.58	0.01–94.20

sludge. During this period, no alterations occurred in the process and the SRT and HRT values established remained constant. The temperature of the activated sludge and the organic loading underwent slight variations that affected the values of the F:M ratio and the activated-sludge TSS and VSS concentrations (Table 2). Despite these variations, the F:M values remained consistently below 0.1 kg BOD<sub>5</sub>/Kg TSS d. The TMP varied slightly, without showing an upward trend, with values far below the maximum limits of safety for the membrane (Table 2).

Influent characteristics were similar during the research period, with a mean COD value of  $1345 \pm 77$  mg O<sub>2</sub>/L (Fig. 2). Influent COD fractionation showed that readily ( $S_5$ ) and slowly ( $X_5$ ) biodegradable COD fractions accounted for 45.8% and 35.6% of the total influent COD, respectively. In contrast, non-biodegradable fractions represented 18.6%, with a soluble fraction of 7.9%. Statistically significant differences were observed between daily samples for every COD fraction except for  $S_{50}$ , which remain almost constant during the studied period.

The variability of the particulate fraction concentration in influent did not affect to the effectiveness in eliminating the organic matter, with a retention of 100% for the particulate fraction. A high capacity of eliminating biodegradable filterable organic matter ( $S_5$ ) was observed with mean performance values of 99.6%, while the retention capacity of the non-biodegradable filterable organic matter ( $S_1$ ) was also significant, with mean values of 74%.

The high SRT value allowed practically all of the biodegradable organic compounds provided with the influent to be transformed in the biological process [20]. The particulate fractions, more slowly biodegradable, were retained by the effectiveness of the membrane, also permitting their complete biotransformation in an MBR system. Only the non-biodegradable filterable fraction can leave the system [21], although 26% of that provided by the influent due to the existing recirculation does so. The high SRT value causes certain more specialized or slow-growing microorganism groups to develop, while the high HRT allows more contact time between compounds that are less biodegradable and microorganisms capable of transforming them [1]. The fractionation of COD based on physicochemical analyses using the analysis of BOD<sub>5</sub> and passage through 0.45- $\mu\text{m}$  filters can be considered as non-biodegradable filterable compounds that for their chemical nature are slowly biodegradable [18] and that under fixed operational conditions for the MBR system can be biotransformed.

Other mechanisms can explain the capacity of MBR systems to retain part of the non-biodegradable filterable fraction, such as sorption over biomass by different pathways [8], which would be strengthened the higher the biomass concentration in the system. Another retention mechanism to consider in MBR systems is the effect exerted by the membrane, which depends on the cut-off molecular weight of the membrane or on its physico-chemical properties, while sorption phenomena could also occur [6].

Influent nitrogen concentrations were very constant during the research period, with a mean total nitrogen ( $N_T$ ) value of  $76.4 \pm 4.1$  mg N/L (Fig. 2) with not statistical significant differences between daily samples. Ammonium and organic nitrogen ( $N_{\text{org}}$ ) concentrations represent the 73% and 26% of the total influent nitrogen respectively with a 1% of nitrate. The nitrogen-eliminating

**Table 4**  
Concentration of the selected NSAIDs ( $\mu\text{g/L}$ ) in the effluent of the MBR system during the experimental period and removal efficiencies (%).

NSAID	Mean	SD	Minimum	Maximum	Removal (%)	Range
IBU	<b>0.62</b>	0.27	0.50	1.11	98.12	96.01–98.60
NPX	<b>0.09</b>	0.07	0.01	0.16	98.20	96.52–99.81
KPF	<b>&lt;0.03</b>	0.00	< LOQ	< LOQ	92.26*	80.00–95.52*
DCF	<b>0.20</b>	0.04	0.16	0.27	20.70	(–18.75)–53.40

capacity reached a mean of 67%, with a scant presence of ammonium at the outflow, although with mean nitrate values in the effluent of 21.7 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L.

The concentration of influent N required for incorporation into sludge mass is equal to the N content of the mass of sludge purged daily. If 0.1% of VSS is assumed to be N [22], a removed concentration of influent N between 18.0 and 21.5 mg N/L could then be expected according to VSS concentration in activated sludge. Taking into account N removal by sludge purge and effluent organic nitrogen and ammonium concentration, a maximum nitrified N of 54.8–51.5 mg N/L could be expected. So, a medium nitrification rate of 94% was obtained under the experimental conditions. According to nitrate effluent concentrations, a medium denitrification rate between 58 and 61% was obtained in our experimental system.

High nitrifying activity was expected in the experimental full-scale MBR system, due to the SRT with only the fraction of non-bioavailable ammonium being found in the effluent [22]. The performance in eliminating nitrogen from the system depends on the limitation in the denitrification due to the degree of recirculation established between the membrane bioreactor and the anoxic one and probably also by the drag of residual oxygen through recirculation [22].

### 3.2. Occurrence and removal of the selected NSAIDs in the MBR system

The analyses made on the influent during the study period revealed the presence of significant concentrations of the four NSAIDs studied in all the MBR influent samples (Table 3). IBU was the most abundant while DCF presented lower concentrations, maintaining the differences in concentrations between them cited by other authors [1].

IBU is usually detected in urban wastewaters despite its scant excretion after human consumption. However, the significant use of this compound leads it to be detected in concentrations that can surpass 600  $\mu\text{g/L}$  in urban wastewaters, with great seasonal variations [11]. The other NSAID significantly present in wastewaters was NPX, which reach mean concentrations of 5.57  $\mu\text{g/L}$ , while the concentrations of KPF and DCF have been the least significant, invariably lower than 1  $\mu\text{g/L}$ . All the concentrations detected in the influents analysed during the study period were within the ranges described by other authors [1,3,11,23]. Statistically significant differences between samples concentrations were observed for all NSAID analysed which were more significant for DCF with variations in concentrations recorded from one day to the next of almost 70%.

Mean concentrations of the NSAIDs in effluent of the investigated full-scale MBR are summarized in Table 4. KPF concentrations were under the LOQ in all effluent samples, whereas the rest of the NSAIDs analysed were detected in all samples of the effluents. Except for DCF, the NSAID concentration in the effluent can be considered to depend on the concentration in the influent, and thus values were higher in IBU and lower in KPF.

Of the four compounds studied, only DCF has been included in the first watch list of substances for European Union-wide monitoring in the field of water policy [14], and there are no specific limits

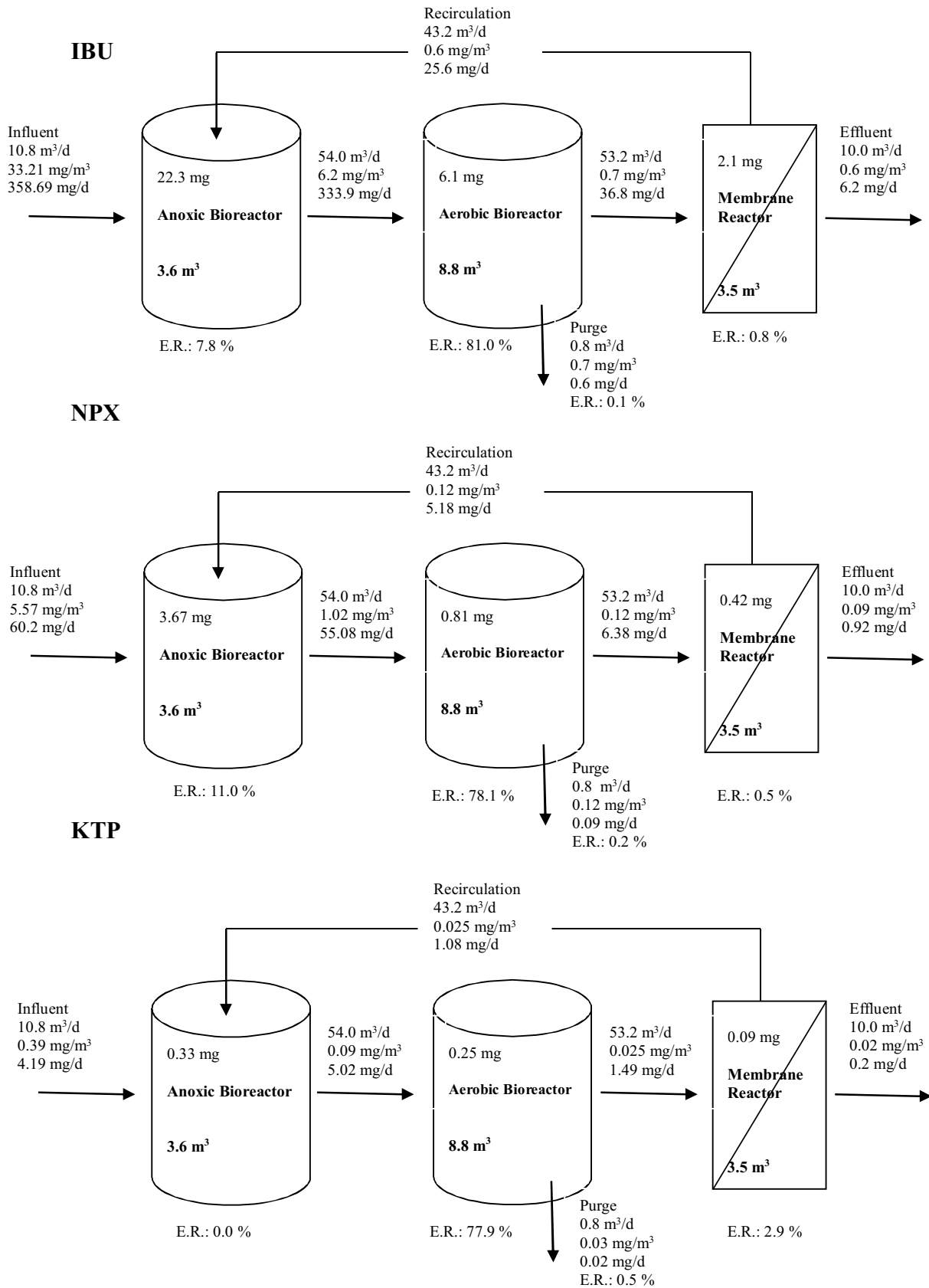


Fig. 3. Summarized balance for IBU, NPX and KPF in MBR during the experimental period; the results for one average day are shown. E.R. (Elimination rate%).

established in the EU. For comparison, the Australian Guidelines for Water Recycling [24] can be used, where the maximum concentration of NSAIDs found in effluents of the MBR experimental system are several orders of magnitude lower than the values established in the Australian regulation, and thus there is a low risk of health problems generated by the dumping of effluents from the experimental MBR system with high values of SRT and HRT in reference to NSAIDs analysed. Nevertheless, the presence of these compounds in effluents obligate an evaluation of the potential environmental risks on public health, especially for the most recalcitrant compounds.

Three of the NSAIDs analysed were efficiently removed. IBU was almost entirely eliminated (98%) with removal efficiency similar to those found by other authors during MBR processes [1,25,26] and higher than those observed in CASPs by other researchers working with influents at similar concentrations [11,23]. NPX removal efficiency was similar or slightly higher than the best removal efficiency values previously reported in MBR systems [25,26], although when compared to the work achieved by Martín et al. [23] in CASPs the yields found have been significantly higher. In consideration of the detection limit for KTP, it can be assumed that the average removal of KTP for the experimental MBR were at least between 80 and 95% depending on the influent concentration. Thus, the removal efficiency was consistently high compared with the effectiveness found for other MBR treatment [25] and similar to that reported by Trinh et al. [26].

IBU, NPX, and KTP are hydrophilic compounds, so their removal by adsorption to biomass can be considered negligible [26]. Several studies have attributed the high removal effectiveness in MBR of these compounds to biodegradation [1,27]. Fernández-Fontaina et al. [28] determined the biodegradation kinetic constants of several NSAIDs working with MBR systems, finding the highest values for IBU, and also highlighting NPX as a highly biodegradable compound. Similar results were reported by Joss et al. [29] working with MBR and CASP systems, registering similar values of biodegradation kinetic constants in both types of facilities. KTP has been considered a highly biodegradable compound [27].

The high biodegradability of these compounds causes the greater or lesser effectiveness in elimination to depend on the operational variables of the biological treatment, one of the most influential being SRT [12,16]. High values of SRT give rise to the development of a more diverse microbial community and favour the proliferation of slow-growth bacteria, some of which may be involved in the biodegradation of micropollutants [5]. Martín et al. [23] found real CASP to be highly effective in eliminating IBU, although significantly lower than that reached in the experimental MBR system, this being more limited by NPX and KTP. The main difference between CASP and MBR may be the SRT value, as it is not common to work with a CASP system at values of around 37 d such as those used in the experimental MBR. This influence of SRT in the elimination of KTP and NPX was observed by Tambosi et al. [6] after increasing the elimination capacity of both compounds on lengthening the SRT from 15 to 30 d. In this sense, Maeng et al. [16] demonstrated the importance of biological degradation in the effectiveness of eliminating compounds such as IBU and especially for NPX and KTP, appreciating a direct relation between the increase in SRT and the improved elimination of these compounds.

The HRT also plays a major role in the transformation of biodegradable compounds, especially in those that are slowly biodegradable [9,12]. The increases in HRT imply a longer contact time with the compound and the microorganisms capable of transforming it, and therefore their association with high SRT values that allow the presence of slow-growth microorganisms would enable greater biological elimination. Fernández-Fontaina et al. [28] find no limitations in the biodegradation effectiveness for IBU and NPX despite reducing the HRT values from 4.6 d to 1.0 d, working with SRT values >10 d, while Kruglova et al. [7] observed

a high elimination capacity in MBR systems working at low temperature with a HRT of 8.5 h. Because of the high biodegradability of these compounds, the negative effect of the descent in the HRT goes unnoticed, with other variables being more limiting, such as SRT.

DCF, as opposed to the previous substances, was resistant to MBR treatment, demonstrating that DCF was only partially removed by the MBR (21%). This low removal is not surprising, as biodegradation of DCF has been found to be slow or non-existing [27,28,30] and it has been identified as a rather persistent compound through the biological treatment process [30]. Other researchers have noted similar behaviour in MBR and CASP [1,16,26], whereas authors such as Radjenovic et al. [25] found elimination percentages of DCF higher than 60% in MBR systems, considering biodegradation as the main elimination mechanism. Thus, there is notable controversy in the literature concerning the performance of DCF in activated-sludge systems, added to the circumstance that, during the research, the DCF concentration was higher than its respective influent concentration in 40% of the effluent samples. Therefore, removal effectiveness of DCF was negative on 40% of the days studied. By contrast the maximum removal registered was 53.4% (Table 4), exhibiting a wide range of variability in DCF removal. A similar result has been reported by Vieno and Sillanpaa [30].

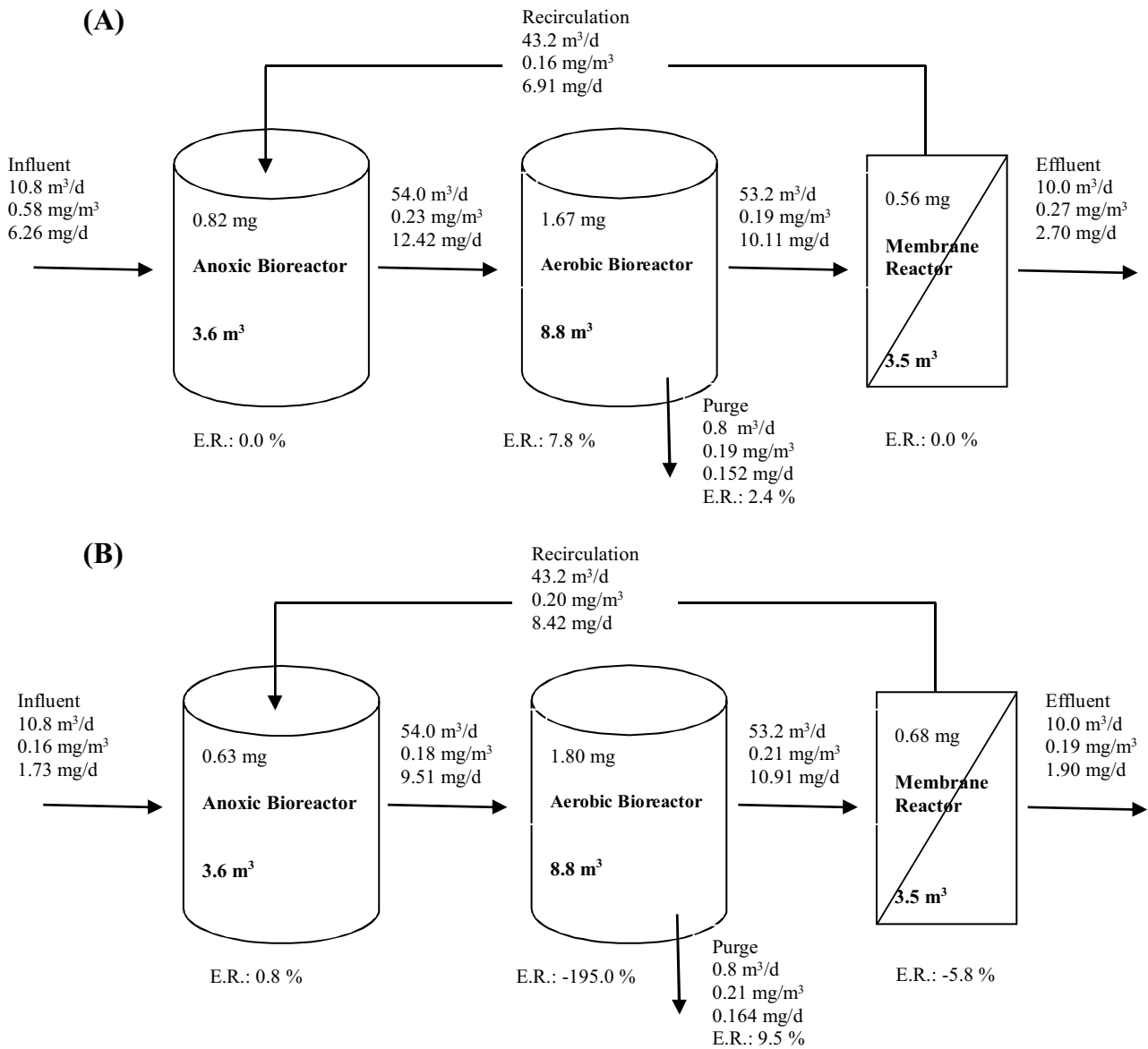
Our results show the high capacity of MBR system to removal NSAIDs such as IBU, NPX and KTP working with high SRT and HRT values. However, another alternatives are necessary for removal more recalcitrant NSAIDs such as DCF. In spite of the high yields achieved for most of the NSAIDs analysed, it is necessary to emphasize that biotransformation of NSAIDs by oxidative transformation results in the generation of others compounds such as hydroxyl and carboxyl derivate [6] whose environmental and public health effects are unknown, which can be discharged into the environment. Further efforts are needed to know the generation of derivatives from oxidative transformation of NSAIDs and their environmental effects, in order to establish the real effectiveness of MBR in the safe removal of NSAIDs.

### 3.3. Mass balances

According to the behaviour of the experimental MBR system of the NSAIDs analysed, we can differentiate two distinct groups. On the one hand are the IBU, NPX, and KTP, which have been described as highly biodegradable or very biodegradable [27,28]. On the other hand is the DCF, considered poorly biodegradable in activated-sludge systems [28] and for which elimination performance has been found to be positive as well as negative, its behaviour differing with respect to the rest [27,28,30].

Fig. 3 represent a mean mass balance obtained from a set of statistically homogeneous data of the more biodegradable compounds, which reflect a similar trend for the three compounds selected, especially for IBU and NPX, while the behaviour of KTP presented certain differences with respect to the others, although following the same pattern. The most significant elimination of these compounds occurred in the aerated reactor, this being more significant for IBU (81%) and somewhat less so for KTP (77.9%). Apart from the quantities of NSAIDs that remain inside the facility, the other point where the degree of elimination was notable was in the anoxic reactor, this reaching 11% for NPX, somewhat lower for IBU (7.8%) and hardly significant for KTP.

The elimination performance of these compounds, especially in the aerated reactor, appears to be linked to the different biodegradability of the compound in the activated sludge, which has been described as greater for IBU than for NPX [28]. No comparative data are available in the literature for KTP. Quintana et al. [31] observed that the KTP could be used by the microorganisms present



**Fig. 4.** Summarized balance for DCF in MBR during the experimental period with the higher removal yield (A) and negative removal yield (B). E.R. (Elimination rate%).

in the activated sludge as a carbon source in the absence of other biodegradable compounds, while this did not happen in the case of IBU or NPX. However, in the presence of other biodegradable compounds, KTP was not biodegradable by microorganisms of the activated sludge, whereas for IBU and NPX co-metabolic degradation was appreciable. This may explain the differences in the elimination of these compounds, registering high performance values for all of them, given the high SRT values used in the MBR system, which, under a low deficit of easily biodegradable substances, could cause metabolisable substances such as KTP to be significantly degraded.

The anoxic reactor of the experimental facility represents an HRT of some 2.6-fold lower than for the aerated reactor, which would not account for the differences in performance found between reactors, especially for the KTP, and thus the aerobic pathway can be considered the most effective for eliminating these compounds that are notable for their high biodegradability. The removal capacity of these compounds by aerobic pathway was not

only conditioned by the greater or lesser biodegradability, but also by the concentration of the NSAIDs in the waste water. The higher removal rate was observed for IBU with a rate of 6.6 mg IBU/Kg VSS d, whereas for NPX the medium removal rate obtained was 1.1 mg NPX/Kg VSS d, a capacity 6 times lower, equivalent to the difference of concentration in the influent. For KTP the removal rate obtained was 0.07 mg KTP/Kg VSS d, also equivalent to the different concentration in the influent.

Phan et al. [32] observed that an important prerequisite to anoxic biodegradation of NSAIDs were internal recirculation between the aerobic to anoxic bioreactors, in absence of which a low contribution of the anoxic phase in the elimination of NSAIDs was expected. As reported previously, one of the great problems in the effectiveness of the denitrification in the anoxic reactors is the drag of residual oxygen through recirculation [22]. However, this drag may be related to the effectiveness of the anoxic process in the elimination of certain compounds such as IBU, NPX, and KTP. Phan et al. [32] observed that the incorporation of an internal cir-

ulation system between the aerated and anoxic reactor in an MBR facility with simultaneous nitrification/denitrification boosted the elimination of the anoxic reactor in relation to compounds such as IBU, NPX, and KTP, without this increasing the overall performance of the facility. During these studies, it was also found that the internal recirculation raised the oxidation reduction potential values, presumably for the drag of compounds such as oxygen, the presence of which may have caused the greater elimination of NSAIDs in the anoxic reactor. The experimental facility used in this study had recirculation between the tank membranes and the anoxic reactor of 4-fold the intake flow, this not being done from the aerated reactor. This negatively influenced the denitrification results, probably for the drag of residual oxygen, affecting the biotransformation of certain NSAIDs on facilitating their aerobic metabolism in the first reactor of the system, where the NSAID concentrations were more significant. Given that in this reactor the presence of biodegradable organic compounds is high, the removal of NSAIDs were reached for co-metabolisable substances, being lower for KTP, described by Quintana et al. [31] as non-metabolisable in the presence of other biodegradable compounds.

The balances undertaken on the target compounds reveal that the output of the NSAIDs by purging the system was insignificant (Fig. 3). These results confirm that NSAID biomass does not accumulate and thus is not responsible for the elimination of these compounds. The NSAIDs analysed have been described as hydrophilic compounds [3,25,26], and therefore their elimination by sorption in MBR is ineffective despite the high concentration of suspended solids in bioreactors due to the high SRT.

An insignificant elimination capacity was found in membrane tank with regard to the NSAIDs studied. Despite the HRT of this tank and to have sufficient oxygen for biological elimination, the percentages of disappearance of NSAIDs were lower than 3%. These low values may be attributable to the low NSAID concentrations found in this reactor, which in the case of KTP were under LOQ, although IBU and NPK were appreciable. The concentrations in the incoming and outgoing activated sludge in this reactor were quite similar, and thus most of the NSAIDs in this reactor were dragged to the anoxic reactor through the recirculation or left the system in the effluent. Another mechanism described as responsible for the removal of pharmaceutical compounds in MBR is retention by the membranes [6], but according to the molecular weight cut-off value of the membrane and the molecular weight of the NSAIDs analysed, the physical retention by the membrane is unlikely. Sorption onto the membranes was also limited due to the low membrane surface area and the hydrophilic character of the analysed NSAIDs.

Fig. 4 shows the daily mean mass balances obtained from a set of statistically homogeneous data of, reflecting two contrary situations, positive and negative removal yields. On the one hand, the samples in which positive values were reached in eliminating DCF by the MBR system, registering maximum removal yields of 53.4%, and on the other, the samples in which the values were significantly negative. Only in the aerobic bioreactor was there a reduction in the quantities of DCF provided, which were observable primarily in the samplings with positive elimination performance, although the degree of elimination was not very high. Fernández-Fontaina et al. [28] labelled DCF as hardly biodegradable, thus confirming the recalcitrant character of this compound in MBR systems. Similar results were described by other authors working with conventional activated sludge or MBR systems [7,27,30]. Operational conditions such as activated-sludge temperature, SRT or HRT affected the biological degradation of DCF, this probably being the reason for the great discrepancy in the literature data concerning the removal of DCF in wastewater-treatment plants [25,27,30]. The results of DCF mass balances confirm these observations and add one more element to the discrepancy caused by the negative yields observed in

several samples, which have been reported by other researchers [33,34].

Zorita et al. [33], finding negative DCF removal in CASP, suggested that this was due to deconjugation of glucuronide or sulphate conjugates of DCF. Similar conclusions were reached by Lee et al. [34] conjecturing that abiotic and microbiological hydrolysis occurs in activated sludge, increasing the presence of DCF. Of the DCF consumed by humans, less than 1% is excreted as unmetabolised form and over 11% is excreted metabolised as taurine, glucuronide or sulphate conjugates [30]. These DCF conjugated metabolites are likely to be cleaved and transformed into the free form by enzymatic processes during wastewater treatment [34]. In samplings with negative yields, the increment in the DCF concentration was especially significant in the aerated tank and hardly appreciable in the anoxic and membrane reactors, and thus given that this transformation of DCF metabolites occurs in the unmetabolised form, it occurs mainly in the aerated tank.

This behaviour has been proposed for other PhACs. Ternes et al. [35] observed a similar behaviour for different estrogens due to glucuronidase activity of the aerobic activated sludge, and Gonzalez-Perez et al. [36] also found an increase in carbamazepine concentration in the same MBR system, proposing the enzymatic cleavage of the conjugate of metabolites as a source and suggesting the glucuronidase activity in this MBR due to the high SRT and HRT.

With respect to the anoxic reactor, no significant variation was appreciated between the quantities of DCF that entered and left the system, both in the samplings with positive performance as well as negative. Suarez et al. [5] found that the DCF did not biologically degrade under anoxic conditions, biodegradation being more accentuated under nitrifying conditions. These conditions are improbable in the anoxic reactor of the experimental facility, despite the possible dragging of residual oxygen.

The elimination of DCF was not appreciable, either, in the membrane reactor despite that, as opposed to other NSAIDs assayed, high DCF concentrations are added to this reactor, which coincide with outlet values. This reactor maintains aerobic conditions, although the OD concentration decreases, since the air is supplied by coarse bubbling in order to control membrane clogging. These conditions could affect the availability of OD for certain groups of microorganisms involved in the transformation of DCF, making its biological transformation negligible for this reactor.

The highest HRT of the aerobic reactor and the greatest availability of OD can favour the biodegradation of this recalcitrant compound, as well as the development of significant nitrifying activity, which has been related to the increase in the biodegradation of DCF [30]. However, the biological elimination of this compound has been almost negligible. To achieve greater biodegradation of the DCF, Vieno and Sillanpää [30] suggested the use of MBR systems that work with SRT values higher than 150 d and HRT higher than 3 days, values far beyond those tested in the present study and that could compromise the viability of the MBR system, both technically and economically, given the size of the facility and the energy consumption spent primarily on aeration [37].

DCF, like the other NSAIDs analysed, is a hydrophilic compound with a  $\text{Log}_{\text{Kow}}$  value similar to that of IBU [3]. According to these characteristics DCF sorption to biomass can be considered insignificant [26]. However, the recalcitrant character of this compound in MBR systems, the possible transformation of metabolised forms in unmetabolised form, the high biomass concentration in the MBR systems due to the high SRT and the high HRT, can lead to increased DCF retention in MBR systems by sorption. Radjenovic et al. [25] reported greater adsorption capacity of MBR sludge for DCF with respect to CASP, maybe due to the characteristics and high concentration of the biomass.

The greater accumulation of DCF in the MBR system causes the percentage of this compound that leaves the system through the



purge to be greater than that observed for the rest of the NSAIDs analysed. However, the low flow of purge established by the high SRT values causes this outflow of DCF of the system to be scant with respect to the inflow. The main path of exit for DCF not transformed in the MBR system was the effluent, caused mainly by the recalcitrant and hydrophilic characteristics of DCF.

Together with the possible increase in the DCF concentration by the transformation of metabolisable forms [33,34], the accumulation in the system was another of the possible causes that the performance values of the MBR system were negative [7]. The balances made to the DCF showed that, through recirculation (4Q) between the membrane tank and the anoxic reactor, significant quantities of DCF return to the beginning of the system.

This recirculation, indispensable for the MBR system [15], together with the fluctuations in the DCF concentrations in the influent (For which statistically significant differences between samples concentration were detected) and the high HRT, may be responsible for part of the negative yields of this system for this substance. Thus, after a period with a high supply of DCF to the MBR system, this accumulated in the biomass, being returned to anoxic tank by the recirculation. If the DCF concentration in the influent descended after a period with high values, it began to drag through the effluent part of the accumulated biomass that has been recirculated, making the concentrations at the outflow greater than those at the inflow. Regardless of this trend, caused by characteristics of MBR systems, the effluents of the systems that work with high SRT and HRT values, in accordance with the viable technical and economic characteristics register significant concentrations of DCF provided to the environment. The effects caused by the release of this compound in the environment and the inclusion in the first watch list of substances for European Union-wide monitoring in the field of water policy [14], makes it necessary to look for new alternatives for treatment so that substances such as DCF become recalcitrant.

#### 4. Conclusions

A full-scale experimental MBR system working in denitrification/nitrification conformation with high SRT and HRT (37.0 d and 35.6 h, respectively) showed high efficiency in eliminating IBU, NPX, and KTP from urban wastewater, with performance levels higher than 95%. However, a low removal rate of DCF was observed with negative removal yields for several samplings.

The elimination values for the NSAIDs assayed depended on the greater or lesser capacity of biotransformation on the part of the microorganisms of the activated sludge, being more significant for co-metabolisable compounds, so that the final concentrations of these compounds in the effluents will depend both on their concentration in the influent as well as their biodegradability.

Given the low biodegradation and hydrophilic nature of DCF, under the operating conditions of the MBR system tested, the compound tended to accumulate in the system and recirculate. However, on the contrary of what was noted for the non-biodegradable organic matter, for the DCF, negative elimination values were appreciated, mainly during the samplings in which their concentration decreased in the influent. The weak adsorption and the increase in the concentration observed in the aerated reactor also contributed to negative yields.

The main transformation of the biodegradable compounds such as IBU, NPX, and KTP in MBR systems, working under denitrification/nitrification conditions with high SRT and HRT, occurred in the aerated reactor while the contribution of the anoxic reactor was irrelevant.

For hydrophilic compounds that were poorly biodegradable with DCF, it was also in the aerated reactor where the most sig-

nificant transformation occurred both in the elimination as well as in the appearance of the compound.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of the Environment and Rural and Marine Media through the Secretariat-General for Rural and Water Media (094/RN08/03.1). The authors would also like to express their more sincere thanks to the CADAGUA R&D department for its collaboration.

#### 2. References

- [1] Y. Luo, W. Guo, H.H. Ngo, L.D. Nghiem, F.I. Hai, J. Zhang, S. Liang, X. Wang, A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment, *Sci. Total Environ.* 473–474 (2014) 619–641.
- [2] R. Rosal, A. Rodríguez, J.A. Perdigón-Melón, A. Petre, E. García-Calvo, M.J. Gómez, A. Agüera, A.R. Fernández Alba, Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation, *Water Res.* 44 (2010) 578–588.
- [3] L. Feng, E. van Hullebusch, M.A. Rodrigo, G. Esposito, M.A. Oturan, Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review, *Chem. Eng. J.* 228 (2013) 944–964.
- [4] M. Pomiès, J.M. Choubert, C. Wisniewski, M. Coquery, Modelling of micropollutant removal in biological wastewater treatment: a review, *Sci. Total Environ.* 443 (2013) 733–748.
- [5] S. Suarez, J.M. Lema, F. Omil, Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions, *Water Res.* 44 (2010) 3214–3224.
- [6] J.L. Tambosi, R. Felix de Sena, M. Favier, W. Gebhardt, H.J. Fosé, H.F. Schröder, R.F. Peralta Muñiz Moreira, Removal of pharmaceuticals compounds in membrane bioreactor (MBR) applying submerged membranes, *Desalination* 261 (2010) 148–156.
- [7] A. Kruglova, M. Kråkström, M. Riska, A. Mikola, P. Rantanen, R. Vahala, L. Kronberg, Comparative study of emerging micropollutants removal by aerobic activated sludge of large laboratory-scale membrane bioreactors and sequencing batch reactors under low-temperature conditions, *Bioresour. Technol.* 214 (2016) 81–88.
- [8] M. Carballa, F. Omil, J.M. Lema, Removal of cosmetics ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment, *Water Res.* 39 (2005) 4790–4796.
- [9] N. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland, *Water Res.* 41 (2007) 1001–1012.
- [10] D.M. González-Pérez, G. Garralón, F. Plaza, J. Pérez, B. Moreno, M.A. Gómez, Removal of low concentration of phenanthrene: fluoranthene and pyrene from urban wastewater by membrane bioreactors technology, *J. Environ. Sci. Health A* 47 (2012) 2190–2197.
- [11] J.L. Santos, I. Aparicio, M. Callejón, E. Alonso, Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain), *J. Hazard. Mater.* 164 (2009) 1509–1516.
- [12] E. Fernandez-Fontaina, F. Omil, J.M. Lema, M. Carballa, Influence of nitrifying conditions on the biodegradation and sorption of emerging micropollutants, *Water Res.* 46 (2012) 5434–5444.
- [13] K. Fent, A.A. Weston, D. Carminada, Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122–159.
- [14] Official Journal of European Union. Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 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 the Council. L78/40 24/3/2015.
- [15] S. Judd, *The MBR Book: Principles and Applications of Membrane Bioreactors for Water and Wastewater Treatment*, second ed., Elsevier Ltd., Oxford, 2011.
- [16] S.K. Maeng, B.G. Choi, K.T. Lee, K.G. Song, Influences of solid retention time: nitrification and microbial activity on the attenuation of pharmaceuticals and estrogens in membrane bioreactors, *Water Res.* 47 (2013) 3151–3162.
- [17] APHA, AWWA, W.E.F. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed., American Public Health Association, Washington D.C., 2012.
- [18] L.M. Ruiz, J. Pérez, M.A. Gómez, Comparison of five wastewater COD fractionation methods for dynamic simulation of MBR systems, *J. Environ. Sci. Health A* 49 (2014) 1553–1563.
- [19] U.S. Environmental Protection Agency. Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. US E.P.A. Washington, D.C. 2007.
- [20] A. Massé, M. Spérandio, C. Cabassud, Comparison of sludge characteristics and performance of a submerged membrane bioreactor and an activated sludge process at high solids retention time, *Water Res.* 40 (2006) 2405–2415.
- [21] M. Spérandio, M.C. Espinosa, Modelling an aerobic submerged membrane bioreactor with ASM models on a large range of sludge retention time, *Desalination* 231 (2008) 82–90.

- [22] J. Arévalo, L.M. Ruiz, J. Pérez, M.A. Gómez, Effect of temperature on membrane bioreactor performance working with high hydraulic and sludge retention time, *Biochem. Eng. J.* 88 (2014) 42–49.
- [23] J. Martín, D. Camacho-Muñoz, J.L. Santos, I. Aparicios, E. Alonso, 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.* 239–240 (239) (2012) 40–.
- [24] National Health and Medical Research Council/Environmental Protection and Heritage Council/Natural Resource Management Ministerial Council, Australian Guidelines for Water Recycling: Managing Health and Environmental Risks (Phase 2)- Augmentation of Drinking Water Supplies in Canberra, 2008.
- [25] J. Radjenovic, M. Petrovic, D. Barceló, Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment, *Water Res.* 43 (2009) 831–841.
- [26] T. Trinh, B. van den Akker, H.M. Coleman, R.M. Stuetz, J.E. Drewes, P. Le-Clech, S.T. Khan, Seasonal variations in fate and removal of trace organic chemical contaminants while operating a full-scale membrane bioreactor, *Sci. Total Environ.* 550 (2016) 176–183.
- [27] R. Salgado, R. Marques, J.P. Noronha, G. Carvalho, A. Oehmen, M.A.M. Reis, Assessing the removal of pharmaceutical and personal care products in a full-scale activated sludge plant, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19 (2012) (2012) 1818–1827.
- [28] E. Fernandez-Fontaina, I. Pinho, M. Carballa, F. Omil, J.M. Lema, Biodegradation kinetic constants and sorption coefficients of micropollutants in membrane bioreactors, *Biodegradation* 24 (2013) 165–177.
- [29] A. Joss, S. Zabcynsky, A. Göbel, B. Hoffmann, D. Löffler, C.S. Mc Ardell, T.A. Ternes, A. Thomsen, H. Siegrist, Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme, *Water Res.* 40 (2006) 1686–1696.
- [30] N.M. Vieno, M. Sillanpaa, Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant – a review, *Environ. Sci. Technol.* 69 (2014) 28–39.
- [31] J.B. Quintana, S. Weiss, T. Reemtsma, Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor, *Water Res.* 39 (2005) 2654–2664.
- [32] H.V. Phan, F.I. Hai, J. Kang, H.K. Dam, R. Zhang, W.E. Price, A. Broeckmann, L.D. Nghiem, Simultaneous nitrification/denitrification and trace organic contaminant (TrOC) removal by an anoxic-aerobic membrane bioreactor (MBR), *Bioresour. Technol.* 165 (2014) 96–104.
- [33] S. Zorita, L. Måtensson, L. Mathiasson, Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 2760–2770.
- [34] H.J. Lee, E. Lee, S.H. Yoon, H.R. Chang, K. Kim, J.H. Kwon, Enzymatic and microbial transformation assays for the evaluation of the environmental fate of diclofenac and its metabolites, *Chemosphere* 87 (2012) 969–974.
- [35] T.A. Ternes, P. Kreckel, J. Mueller, Behaviour and occurrence of estrogen in municipal sewage treatment plant. II. Aerobic batch experiments with activated sludge, *Sci. Total Environ.* 225 (1999) 91–99.
- [36] D.M. González-Pérez, J. Pérez, M.A. Gómez, Carbamazepine behaviour and effects in an urban wastewater MBR working with high sludge and hydraulic retention time, *J. Environ. Sci. Health A* 51 (2016) 855–860.
- [37] G. Fernández-Álvarez, J. Pérez, M.A. Gómez, Optimization of reactor depth in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment, *J. Environ. Eng. ASC.* 140 (2014) 1–7 (04014019).



## Wastewater polycyclic aromatic hydrocarbons removal by membrane bioreactor

D. González<sup>a</sup>, L.M. Ruiz<sup>a</sup>, G. Garralón<sup>b</sup>, F. Plaza<sup>b</sup>, J. Arévalo<sup>a</sup>, J. Parada<sup>a</sup>,  
J. Pérez<sup>a</sup>, B. Moreno<sup>a</sup>, Migual Ángel Gómez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Technologies for Water Management and Treatment Research Group, Institute of Water Research and Department of Civil Engineering, University of Granada, 18071 Granada, Spain

Tel. +34 676 734 592; emails: aljibe@correo.ugr.es, mgomezn@ugr.es

<sup>b</sup>Department of Research and Development, CADAGUA S.A., Gran Vía 45, 7<sup>a</sup>, 48011 Bilbao, Spain

Received 20 October 2010; Accepted 15 February 2011

### ABSTRACT

The capacity of removal polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by membrane bioreactor (MBR) has been studied. The study has been developed at pilot scale using a pre-denitrifying MBR and several stages have been checked at bench-scale. Concentration of PAHs was determined by gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS) with twister and a balance on the MBR system was achieved. The system was feeded with raw wastewater which contains usually pyrene, phenanthrene and fluoranthene at low concentration (<0.3 ppb). Treated wastewater concentration was under detection limits for all detected PAHs and sludge accumulation was not observed. Under operational MBR conditions, several removal mechanisms and different removal rates for each compound are presented along the treatment process. Bench-scale experiments reveal that PAHs removal is mainly due to sorption and air stripping, however the volatilization and biodegradation present a questionable insignificant contribution. Toxicity by PAHs during MBR treatment can not be expected due to the low bio-available for the microorganisms mainly as a result of the high removal by air stripping.

**Keywords:** Polycyclic aromatic hydrocarbon; Wastewater; Phenanthrene; Fluoranthene; MBR; Pyrene

### 1. Introduction

The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are hydrophobic organic compounds with two or more fused aromatic rings with a relatively low solubility in water and a high octanol/water partition coefficient ( $K_{ow}$ ). These substances are originated from pyrolysis of organic compounds under temperature conditions ranging from 500°C to 900°C specially by incomplete combustion during industrial and other human activities, such as processes of coal and crude oil, combustion of natural gas or wood, combustion of refuse, vehicle

traffic, cooking and tobacco smoking, as well as natural processes such as carbonization [1,2].

Wastewater levels of PAHs depend on the industrial effluents added to the domestic and runoff discharges [2,3]. PAHs in domestic wastewater varied from 0.005 to 14.3 g l<sup>-1</sup> and in mixed urban wastewater from 2.7 to 26.4 g l<sup>-1</sup> [4]. A predominance of low molecular weight compounds was observed in urban wastewater where phenanthrene (PHE), naphthalene, fluoranthene (FLT) and pyrene are usually the most abundant compounds [2].

Several PAHs are considered as widespread environmental pollutants, hazardous to ecosystems and a human health risk due to its carcinogenic and mutagenic properties close to its persistence and lipophilicity [5,6].

\*Corresponding author.

Because of this, some PAHs are included in priority pollutants lists compiled by USEPA and European Union with the objective of reducing the release of these compounds to the environment [7].

The occurrence and fate of PAHs during wastewater treatment plant by conventional activated sludge has been studied previously [3]. Treated wastewaters show lower levels of PAHs as a result of the removal through different processes. As consequence of their physico-chemical properties, PAHs are mainly removed from wastewaters by sorption to the sludge [8]. Others mechanisms such as volatilisation, advection, biotransformation/biodegradation or air-stripping must be taken into account as wastewater PAHs removal related to the influent characteristics in WWTP, the process design and operating conditions of the system [3,9]. Anoxic reactors with stirring, sorption, volatilisation and biotransformation can be considered as mechanisms of PAHs removal whereas in aerobic reactor may be removed through sorption, volatilisation, air stripping and biotransformation/biodegradation [9–11].

Submerged membrane bioreactor (MBR) is an alternative membrane application in wastewater treatment. This technology combines the biological activated sludge process with solid/liquid physical separation by membrane, avoiding the need for a previous sedimentation step. In this way, a new system has evolved which merges the first, the second and the third treatment phases, allowing the construction of more compact plants capable of producing directly reusable effluent [12]. In such, system different configurations may be used in function of the final water quality. So, PAHs removal mechanisms in MBR can defer with respect to conventional activated sludge.

The objective of the present study aimed to know the main mechanisms concerning to PAHs removal from urban wastewater by MBR technology. For this purpose, PAHs were determined in raw and treated wastewater by a pilot scale MBR and several stages of the process were checked at lab-scale including respirometric assays to know the potential toxicity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Pilot plant study

A first stage of the study was achieved at pilot-scale by a pre-denitrifying MBR located in the Granada urban wastewater treatment plant (Spain). The MBR consisted of an external membrane system (ZeeWeed 500 membranes) equipped with polyvinylidene fluoride (PVDF) outside-inside hollow fibres with an average pore size of 0.04  $\mu\text{m}$  (Fig. 1).

Raw wastewater (previously pretreated) passed through a brush screen (1 mm) and was put into anoxic reactor. Activated sludge of anoxic reactor was pumped to aerobic reactor which fed membrane tank. The membrane

tank concentrate returned as overflow to the anoxic reactor and permeate ( $F = 0.8 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ ) passed to the backwashing tank. A constant purge of  $1.05 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$  was achieved in order to obtain 25 d of sludge retention time. The operational hydraulic retention time was 35 h.

Samples were taken daily from influent, effluent and purge during a week. This was facilitated by automatic sampling devices located at the corresponding pipes. A portion of the sample was collected in a brown glass bottle (100 ml), which was filled completely and hermetically sealed. Persistent organic pollutants (POPs) were analysed in all samples.

### 2.2. Lab-scale study

Bench-scale bioreactors operated in parallel were used for several assays. The volume of the reactors were 10 l; all of them have a stirring system. Furthermore, two of them present air injection system and were filled with activated sludge from the pilot-plant aerobic reactor. The other bench-bioreactors were filled with activated sludge from the anoxic reactor.

The reactors were spiked with different amounts of pyrene, PHE and/or FLT, in order to obtain high PAHs concentrations. For the PAHs fate and behavior determination after 24 h, the doped activated sludge was separated into solid and liquid phase by decantation using a 250 ml test-tube. Both phases were used for PAHs extraction and analysis. The samples were manually collected.

In order to determinate the possible toxicity of the PAH and the potential sludge biodegradation capability, the activity of the biomass and the oxygen consumption rate were evaluated using a respirometer. Cyclic and dynamic configurations were used for different assays. The cyclic configuration was used with the oxygen uptake rate (OUR) assays for determining the response during a long time exposition. A dynamic configuration was used with the Rs (Dynamic Respiration Rate) assays for determining the possible acute toxicity.

### 2.3. Analytical determination of PAHs

All the samples were collected in brown glass bottle (100 ml), which was filled completely and hermetically sealed. PAHs were analysed in all samples. PAHs were extracted from sludge and wastewater samples using a stir bar sorptive extraction method (SBSE), called twister. PAHs were quantified using liquid–liquid extraction gas chromatographic/mass spectrometric method [13].

### 2.4. Isolation of PAH-degrading microorganism

Microorganism strains in the pilot-plant sludge were grown in basal salt medium (BSM) (0.1 ml of anoxic or

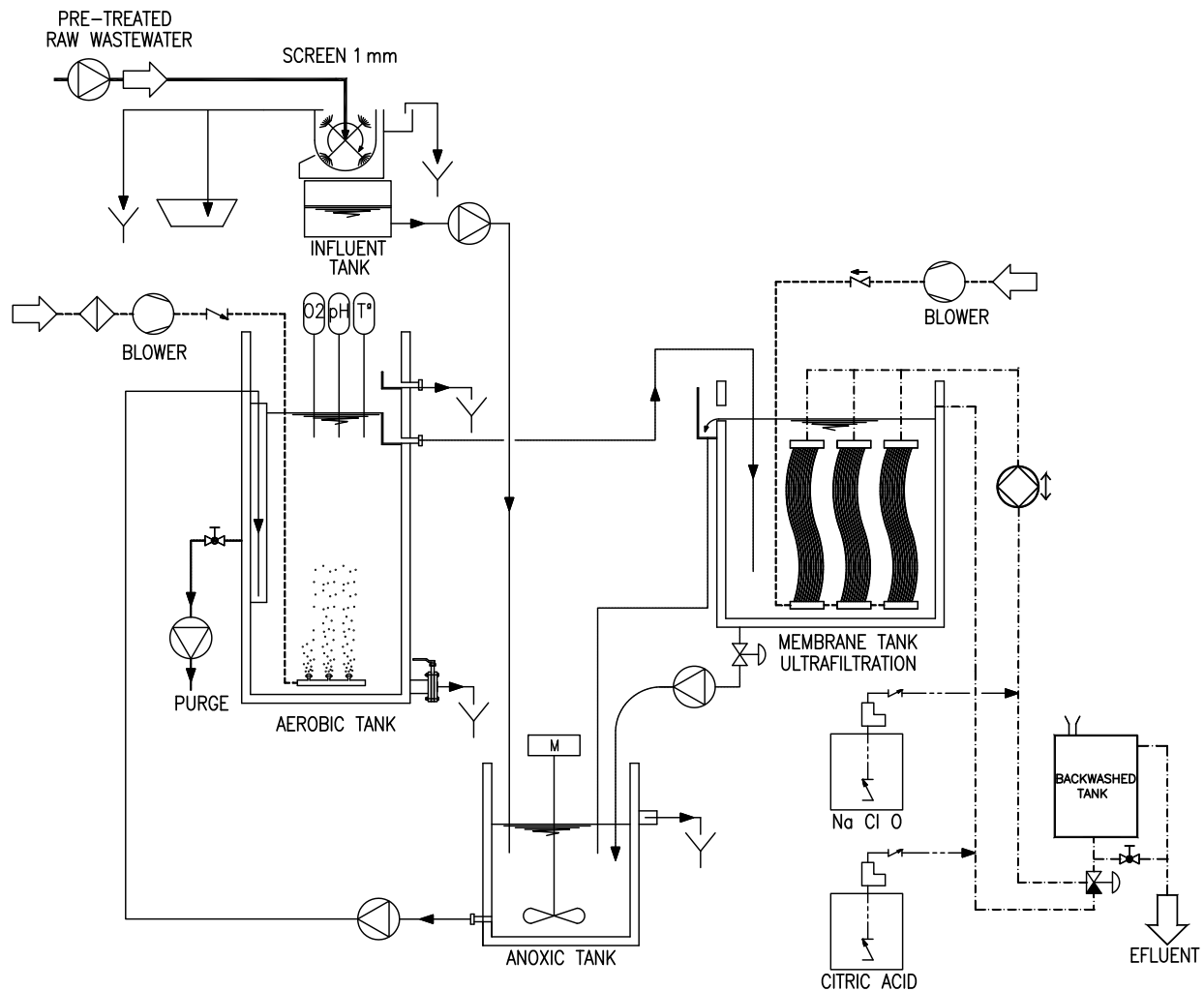


Fig. 1. Layout of pilot plant.

aerobic sludge per 20 ml of basal salt medium) to which solution of acetone and pyrene at a level of  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  were added like aerosol on the top. A BSM formula was adapted from [14]. The culture dishes were incubated at  $20^\circ\text{C}$  in the dark and colony growth was checked during a month.

### 3. Results and discussions

Several POPs occurrence in Granada wastewater were analyzed, and only some PAHs were found (Table 1). So, the behaviour and possible fate of PAHs into the MBR was studied.

The low PAHs concentration for Granada urban wastewater could be expected due to the low industrial wastewater discharges. Pyrene, fluoranthene and phenanthrene were the main PAHs analysed, a predominance of low molecular weight compounds just as Blanchard et al. [2] observed for urban wastewater.

Table 1  
POPs ( $\text{g l}^{-1}$ ) occurrence in MBR pilot scale plant

Pollutant	Raw wastewater	Effluent	Purge
Triazines	<0.02	<0.02	<0.02
Organophosphorade compounds	<0.03	<0.03	<0.03
Organochlorine compounds	<0.05	<0.05	<0.05
Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)	0.48	<0.05	<0.05
Phenanthrene	0.09	<0.05	<0.05
Fluoranthene	0.11	<0.05	<0.05
Pyrene	0.28	<0.05	<0.05
Other PAHs	<0.5	<0.5	<0.5
Polychlorinated Biphenyls (PCBs)	<0.05	<0.05	<0.05

After MBR treatment effluent PAHs concentration under the detection limit was observed. A high efficiency at removing PAHs was observed for MBR technology. So, sorption, volatilisation, air stripping or biotransformation/biodegradation mechanisms were occurred [9,11]. PAHs were not detected in purge samples at which sorption was not significant mechanisms for PAHs removal.

After a month of incubation, the cultures achieved with the aim to know the presence of PAH-degrading micro-organism developed a transparent halo on the pyrene–acetone top cake. The positive cultures were achieved for activated sludge from aerobic and anoxic bioreactor. The colonies were developed by fungi and its number was small with one or two colony only in a few Petri dishes. These results show the possibility of biotransformation/biodegradation mechanisms for PAHs removal during MBR treatment. However, the significance of these mechanisms was not prominent according to [10].

Bench scale experiment revealed that PHE presence after 24 h under aerated conditions is lower than 85% with respect to non aerated sludge (Fig. 2). Sediment phase shows a higher concentration than liquid phase for activated sludge from aerated and non aerated bioreactor. Just as showed for naphthalene during secondary treatment, PHE was dragged up by air stripping, an important removal mechanism for the lower molecular weight PAHs [3,9].

A similar behaviour was observed for FLT which was dragged up mainly from sediment phase. However, a higher concentration in the liquid phase was observed (Fig. 2). This may be due to the higher molecular weight and other different physico-chemical properties which gave rise to a lower removal. The presence of FLT in the aerated bioreactor was 50% lower than in the non aerated bioreactor a higher rate than the observed by Manoli and Samara [3].

Significant differences are probed between the air injected and the non-aired bench-scale reactor. This indicates the important role of the aeration improving

the air-stripping like the main removal way. Experimental removals of individual PAHs ranged between 0% and 86% were observed in the sediment phase, and between 50% and 100% in the liquid phase. The PAH removal efficiency from wastewater and sludge varies with the properties of different PAHs. Low molecular weight PAH (phenanthrene) was more easily removed than larger molecule (fluoranthene). Volatilisation was an important mechanism during non aerated treatment, but its total contribution to PAHs removal was not significant respect to air stripping.

A 0.4 mg l<sup>-1</sup> of pyrene was spiked on activated sludge which was stirred and aerated during 24 h. Pyrene was mainly distributed between liquid phase (1/3) and sediment phase (2/3). Liquid phase pyrene was easily removed during the first 12 h. However, the sediment phase had presented pyrene after 24 h, with a 50% removal over initial concentration (Fig. 3). Again, pyrene was mainly dragged up by air stripping, but physico-chemical properties gave rise to a lower removal from sediment.

During conventional wastewater treatment plant, forceful relationship is observed between removal

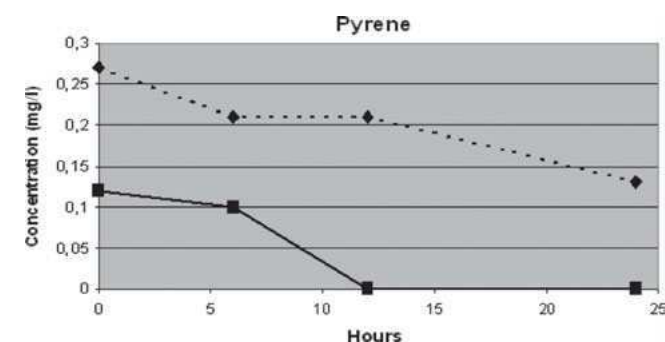
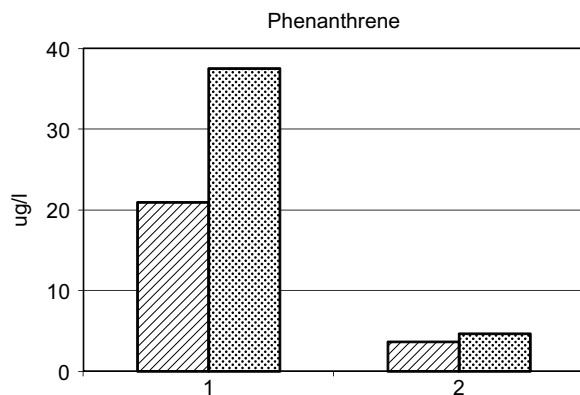


Fig. 3. Pyrene concentration: Evolution of the concentration in the sediment (◆) and liquid phase (■) during the stirring and air injection process.

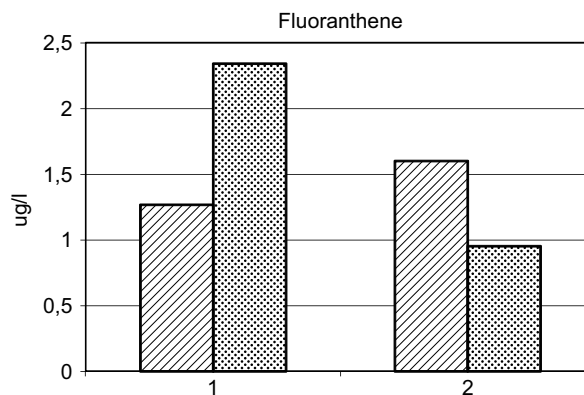


Fig. 2. Activated sludge phenanthrene and fluoranthene concentration after 24 h: (1) Stirred bioreactor; (2) stirred and aerated bioreactor. Liquid phase (crossed bars) and sediment phase (black bars).

efficiency from the solid phase and  $\log K_{ow}$  of PAHs suggesting that high molecular weight PAHs are principally removed through sorption to sludge particle and later removal during the separation solid–liquid phases [3]. However, by MBR system sorption to sludge particle remove PAHs from liquid phase and air stripping during aerated treatment drag up PAHs to the atmosphere.

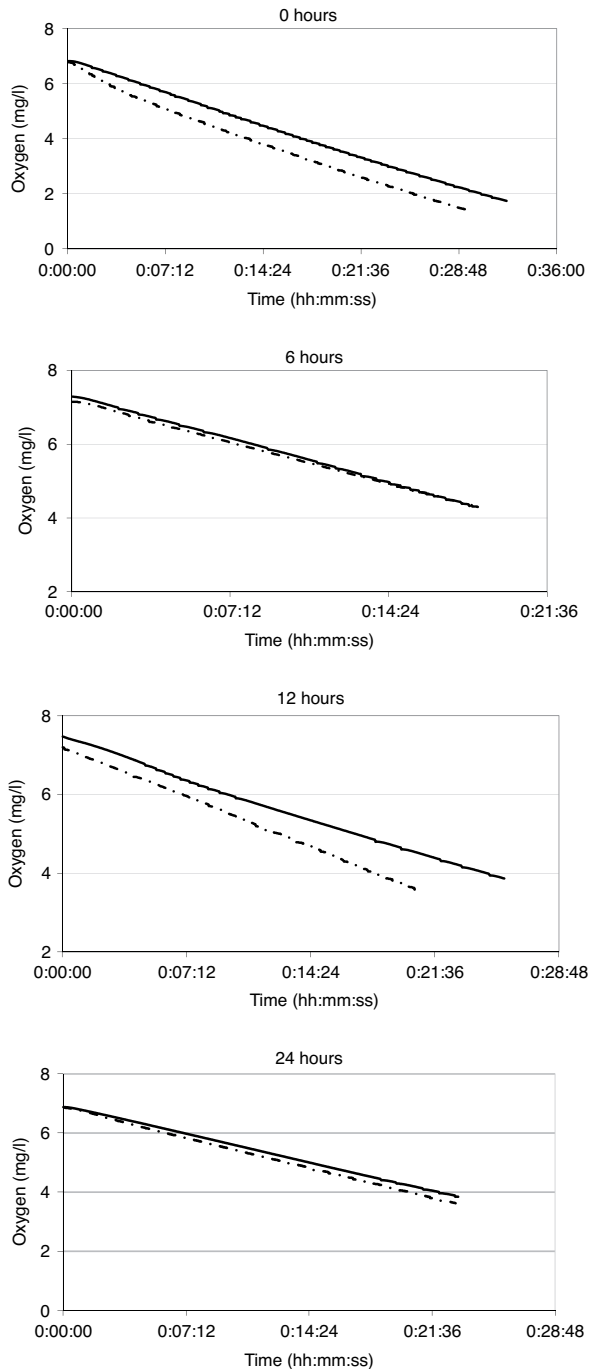


Fig. 4. Oxygen consumption rate: OUR respirometry assays. Raw (full line) and spiked sludge (broken line) (0.04 mg pyrene l<sup>-1</sup>).

Fig. 4 shows the results of the respirometric assays using the OUR into the sludge without air injection. Similar slopes for the raw and the spiked sludge samples were obtained, which suggest that toxicity was not detected with a pyrene concentration of 0.04 mg l<sup>-1</sup>.

Fig. 5 illustrates the responses of the sludge with different amounts of pyrene (0.04–0.8 mg l<sup>-1</sup>). The dynamic respiration rates (mgO<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) were calculated with the respirometric assays. At first, the raw sludge from the pilot plant was induced to the endogenesis. Then, the respiration rate of the sludge was calculated measuring the consumption after the addition of carbon substrate (200 mg sodium acetate l<sup>-1</sup>). Using the same sludge sample again, it was feed with the substrate and pyrene. The different oxygen consumption rate between the raw and the spiked sludge showed a very similar respiration rates, therefore, the pyrene did not present toxicity for the sludge with concentration below 0.8 mg l<sup>-1</sup>.

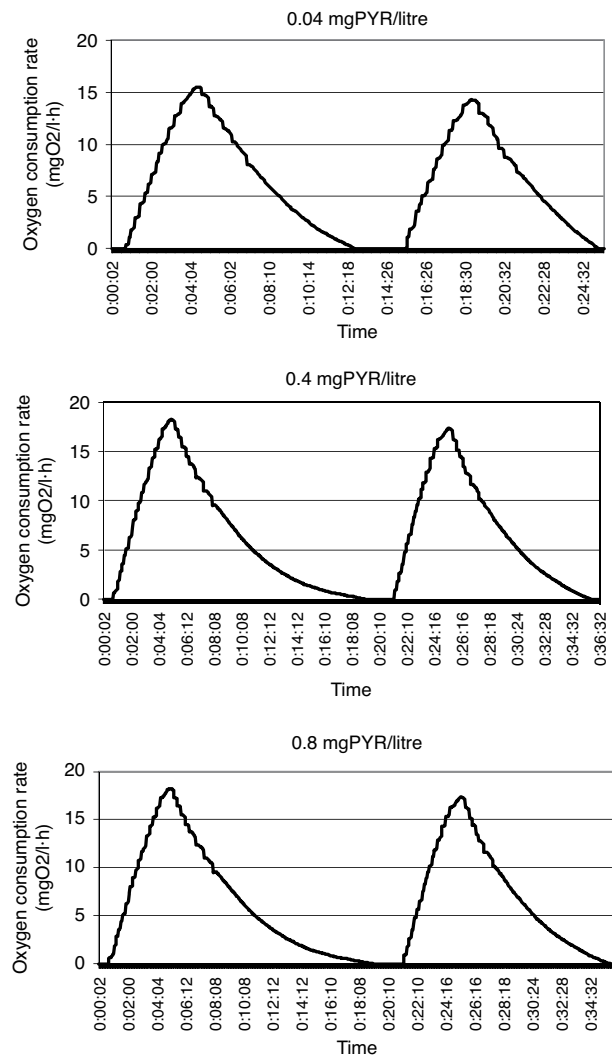


Fig. 5. Oxygen consumption rates with different pyrene concentration: (a) 0.04 mg l<sup>-1</sup>, (b) 0.4 mg l<sup>-1</sup> and (c) 0.8 mg l<sup>-1</sup>.

The non-toxicity showed by the sludge with pyrene concentration below 0.8 mg l<sup>-1</sup>. and the similar response when that concentration was increased indicate that the pyrene has not been bio-available for the microorganism during the assays. It is due to the hydrophobic property of pyrene, its tendency to concentrating adsorbed to the sludge and mainly to air stripping.

#### 4. Conclusions

The PAH removal efficiency from wastewater by MBR technology varies with the properties of different PAHs. Low molecular weight PAH (phenanthrene) was more easily removed than larger molecule (fluoranthene). High molecular weight PAHs were principally removed through sorption to sludge particle and later removal to the atmosphere from liquid and sediment phase by air stripping during aerated treatment. The high significance of air stripping limits biodegradation and volatilization mechanisms.

Toxicity by PAHs during MBR treatment can not be expected due to the low bio-available for the microorganism mainly due to high removal by air stripping.

#### Acknowledgements

The present work has been financed by the Spanish Ministry of the Environment and Rural Media and Marine through the Secretariat-General for Rural Media and Water (094/RN08/03.1).

#### References

- [1] USEPA. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): update. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public Health Services, 1994.
- [2] M. Blanchard, M.J. Teil, D. Ollivon, L. Legenti and M. Chevreuil, Polycyclic Aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in wastewater and sewage sludges from the Paris area (France), *Environ. Res.*, 95 (2004) 184–197.
- [3] E. Manoli and C. Samara, The removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in the wastewater treatment process: experimental calculations and model prediction. *Environ. Pollut.*, 151 (2008) 477–485.
- [4] J. Sánchez-Ávila, J. Bonet, G. Velasco and S. Lacorte, Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PHAs in an industrial sewage grid discharging to a municipal wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.*, 407 (2009) 4157–4167.
- [5] M. Blanchard, M.J. Teil, A.M. Carru, D. Ollivon, B. Garban, A. Chesterikoff and M. Chevreuil, PCB and PHA impacts on cytochrome P-450 dependent oxidases in roach (*Rutilus rutilus*) from the Seine river (France), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37 (1999) 242–250.
- [6] A.J. Sweetman and K.C. Jones, Declining PCB concentrations in the UK atmosphere: evidence and possible causes, *Environ. Sci. Technol.*, 34 (2000) 863–869.
- [7] E. Manoli and C. Samara, Occurrence and mass balance of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Thessaloniki sewage treatment plant, *J. Environ. Qual.*, 28 (1999) 176–187.
- [8] F. Busetti, A. Heitz, M. Cuomo, S. Badoer and P. Traverso, Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and soil samples from an Italian wastewater treatment plant, *J. Chromatogr.*, 1102 (2006) 104–115.
- [9] G. Byrns, The fate of xenobiotic organic compounds in wastewater treatment plant, *Water Res.*, 35 (2001) 2523–2533.
- [10] A.K. Haritash and C.P. Kaushik, Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.*, 169 (2009) 1–15.
- [11] A. Katsoyiannis and C. Samara, Persistent organic pollutants (POPs) in the conventional activated sludge treatment process: fate and mass balance. *Environ. Res.*, 97 (2005) 245–257.
- [12] C. Wisniewski, Membrane bioreactor for water reuse, *Desalination*, 203 (2007): 15–19.
- [13] APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 1989.
- [14] C. Miller, K. Hall, Y.N. Liang, K. Nieman, D.L. Sorensen, B. Issa, A.J. Anderson and R.C. Sims, Isolation and characterization of Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolates from soil. *Microb. Ecol.*, 48 (2004) 230–238.

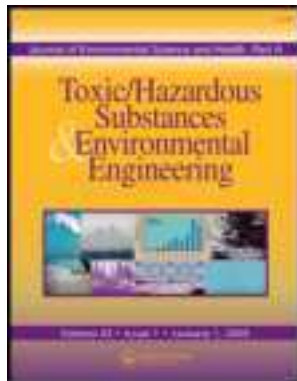


This article was downloaded by: [Miguel A. Gómez]

On: 31 August 2012, At: 03:57

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/lesa20>

### Removal of low concentrations of phenanthrene, fluoranthene and pyrene from urban wastewater by membrane bioreactors technology

Daniel M. González-Pérez <sup>a</sup>, Gloria Garralón <sup>b</sup>, Fidel Plaza <sup>b</sup>, Jorge I. Pérez <sup>a</sup>, Begoña Moreno <sup>a</sup> & Miguel A. Gómez <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Technologies for Water Management and Treatment Research Group, Institute of Water Research and Department of Civil Engineering, University of Granada, Granada, Spain

<sup>b</sup> Department of Research and Development, Cadagua S.A., Bilbao, Spain

Version of record first published: 30 Aug 2012

**To cite this article:** Daniel M. González-Pérez, Gloria Garralón, Fidel Plaza, Jorge I. Pérez, Begoña Moreno & Miguel A. Gómez (2012): Removal of low concentrations of phenanthrene, fluoranthene and pyrene from urban wastewater by membrane bioreactors technology, *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 47:14, 2190-2197

**To link to this article:** <http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2012.707496>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae, and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand, or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

# Removal of low concentrations of phenanthrene, fluoranthene and pyrene from urban wastewater by membrane bioreactors technology

DANIEL M. GONZÁLEZ-PÉREZ<sup>1</sup>, GLORIA GARRALÓN<sup>2</sup>, FIDEL PLAZA<sup>2</sup>, JORGE I. PÉREZ<sup>1</sup>, BEGOÑA MORENO<sup>1</sup> and MIGUEL A. GÓMEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Technologies for Water Management and Treatment Research Group, Institute of Water Research and Department of Civil Engineering, University of Granada, Granada, Spain

<sup>2</sup>Department of Research and Development, Cadagua S.A., Bilbao, Spain

The fate and removal of phenanthrene (*Phen*), fluoranthene (*F*) and pyrene (*Py*) in urban wastewater treatment by membrane bioreactor (MBR) with low influent polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) concentration were studied. A full experimental ultrafiltration MBR with a pre-denitrification configuration and capacity to treat 20 m<sup>3</sup>/d was employed. The system was operated with real urban wastewater, to which a concentration of PAHs was added. A constant purge was achieved in order to obtain 12 d of sludge retention time and the hydraulic retention time was 34 h. Concentration of PAHs was determined by Gas Chromatography and Mass Spectrometry with Twister, and mass balance on the MBR system were calculated. Data were supplemented by respirometric analyses, isolation of PAHs degrading microorganisms and bench-scale experiments. All effluent samples presented concentrations of PAHs, with removal levels of 91% and 92% for *F* and *Py* respectively, while for *Phen* performance did not surpass 82%. In spite of the high hydrophobicity of the tested compounds, their accumulation in the biomass was scarce and the sludge presented a low PAH concentration. The experiments reveal that PAHs removal is mainly due to air stripping, with biodegradation and adsorption making an insignificant contribution.

**Keywords:** Wastewater, PAHs, MBR, air-stripping.

## Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are widespread environmental pollutants formed during the incomplete combustion of organic materials, which may enter to a wastewater treatment plant either as part of an industrial discharge, or as a component of domestic effluent drainage and urban runoff, including fossil fuel spillages and atmospheric deposition.<sup>[1,2]</sup> Recorded levels of PAH concentration in raw urban wastewater vary from 0.01 to 27.7 µg/L, with predominance of low molecular weight compounds such as phenanthrene (*Phen*), fluoranthene (*F*) and pyrene (*Py*).<sup>[1,2]</sup>

Chemically, PAHs are a group of compounds with two or more fused benzene rings which due to their high hydrophobicity and stable chemical structure are progressively less

soluble in water and less volatile. Due to their carcinogenic and/or mutagenic toxicity and phytotoxic effects,<sup>[3]</sup> several PAHs have been identified by the US EPA and the EU as priority pollutants for reducing the release of these compounds into the environment.<sup>[4]</sup>

Usually PAHs entering the wastewater treatment plants are notably adsorbed onto particulate organic matters due to their hydrophobic nature, and are therefore effectively removed during sedimentation of wastewater and efficiently relocated in sludge.<sup>[5]</sup> On the other hand, biotransformation/biodegradation is considered the major PAH degradation process<sup>[6]</sup> and have been described in conventional activated-sludge processes (CASP) and membrane bioreactors (MBRs) applied to wastewater treatment.<sup>[7]</sup>

Other mechanisms such as volatilisation, advection, chemical degradation or air-stripping must be taken into account as contributing to PAH removal, depending on the characteristics of the wastewater, process design and system operating conditions.<sup>[4,8,9]</sup> Due to these removal mechanisms, high efficiency (92%) of CASP for removing PAHs has been observed,<sup>[2]</sup> while removal levels in chemical treatment range from 61% to 78%.<sup>[10]</sup>

Address correspondence to Miguel A. Gómez, Department of Civil Engineering, Campus de Fuentenueva s/n, University of Granada, 18071, Granada, Spain; E-mail: mgomez@ugr.es

Received January 16, 2012.

MBR combines the biological activated sludge process with solid/liquid physical separation by membrane, avoiding the need for a previous sedimentation step. In this way, a new system has evolved, which merges the second and third treatment phases, allowing the construction of more compact plants capable of producing directly reusable effluent.<sup>[1]</sup> This technology is expected to enhance the removal of xenobiotics compounds produced by industrial activities<sup>[12]</sup> and it has been selected for wastewater treatment due to this capacity.<sup>[13]</sup> However, PAH removal capacity in MBR has been observed to be similar from CASP,<sup>[7]</sup> in spite of the fact that different removal mechanisms can be expected due to the different operational characteristics with respect to CASP or PAHs wastewater composition.

In view of the foregoing this investigation was undertaken to determine the main mechanisms involved in PAHs removal from urban wastewater with low PAHs concentration by MBR technology. For this purpose, PAHs were measured in the influents and effluents generated by a full-

scale experimental MBR operating with real urban wastewater spiked with *Phen*, *F* and *Py*, and mass balances on the MBR system were calculated.

## Materials and methods

### Pilot plants and operating conditions

A full-scale experimental installation was used for the study. The system consisted of an anoxic bioreactor, aerobic bioreactor and membrane reactor, in which the sludge and the permeate were separated. Sludge purge was obtained on a daily basis from the aerobic bioreactor (Fig. 1). The installation was fed with pre-treated urban wastewater from Granada Wastewater Treatment Plant (without rubbish, sand and oils).

The membrane reactor was equipped with hollow fibre submerged ultrafiltration membranes (0.034  $\mu\text{m}$  nominal

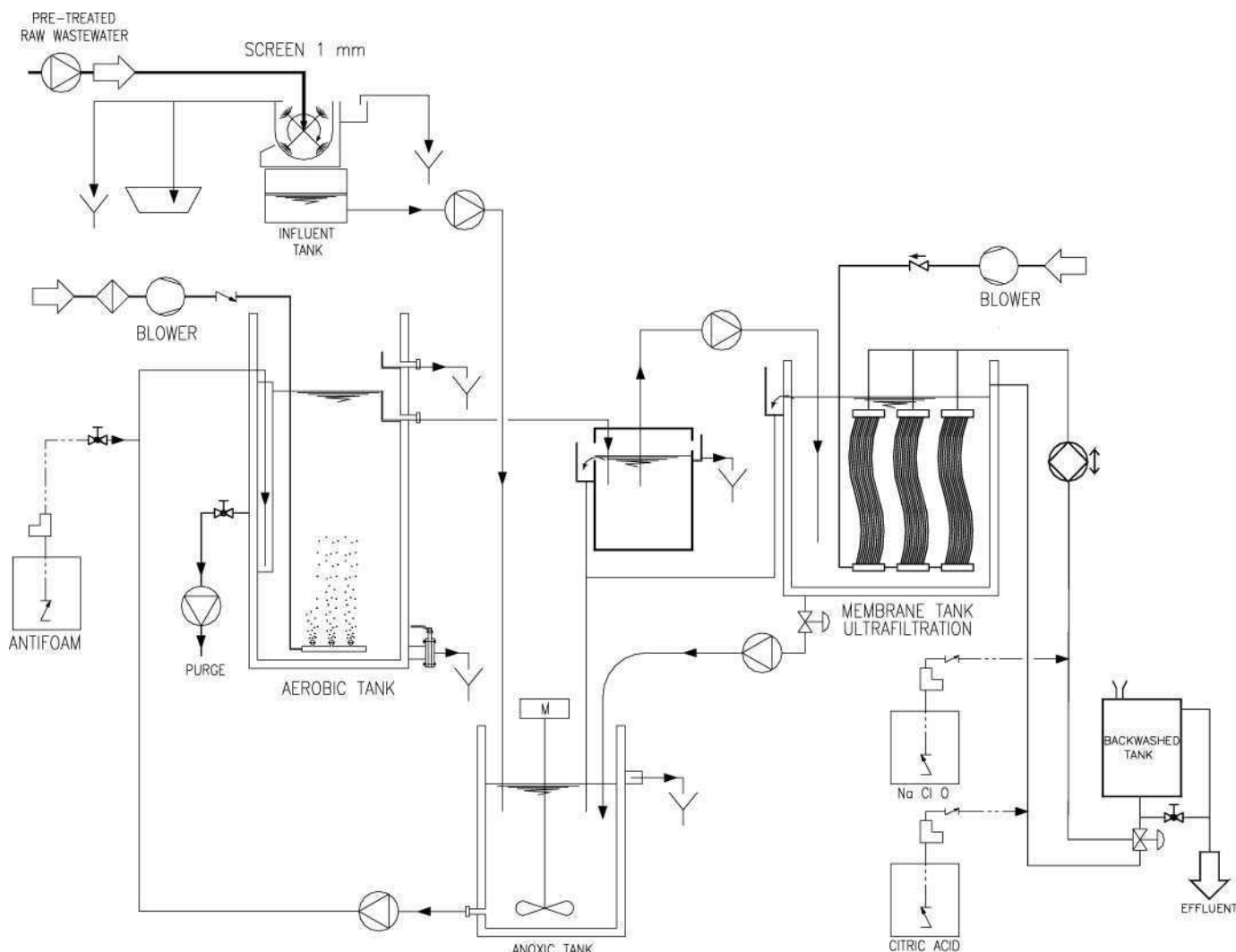


Fig. 1. Layout of full-scale experimental MBR.

pore size) made of polyvinylidene fluoride (PVDF). Dissolved oxygen (DO) concentration was maintained between 0.5 to 1.6 mg/L in the aerobic bioreactor by means of a blower (Flow 92 Nm<sup>3</sup>/h). The membrane reactor was also aerated by a blower (Flow 30 Nm<sup>3</sup>/h) to remove solids from the membrane and to control fouling. Running conditions involved a 5-min production phase followed by 30 s of backwashing (1.5 m<sup>3</sup>/h). Chemical cleaning was carried out weekly using NaClO (100 mg/L). A constant purge of 2.4 m<sup>3</sup>/d was achieved in order to obtain 12 d of sludge retention time (SRT). The capacity to treatment of the system was 0.8 m<sup>3</sup>/h. So, the operational hydraulic retention time (HRT) was 34 h for the whole installation. The flow rate between bioreactors was seven times the influent flow rate. So, the HRT for each reactor was 1.1 h for anoxic reactor, 3.5 h for aerobic reactor and 0.35 h for membrane reactor.

### Experimental methodology

Prior to experimentation, the system was sampled weekly for a period of one month to determine the presence of PAHs in the wastewater and the behavior of the system with regard to the PAHs. Samples were taken of the influent, effluent and purge from the system and microbiological analyses of the activated sludge were carried out, together with respirometric analyses to evaluate the toxicity or biodegradability of the *Py*. Bench-scale experiments were also undertaken.

After this period, tests were performed in order to calculate a mass balance of the PAHs entering the experimental system. For this, the influent was spiked with a concentrated solution of *Py*, *Phen* and *F* (obtained from a sludge thermochemical process), in order to achieve high PAH concentrations. During this period, samples were taken of the influent, effluent, purge and activated sludge from the different reactors.

Twenty-four h composite samples were obtained from each point by combining 24 grab samples collected every hour. This was achieved by means of a reversible flow peristaltic pump to prevent accumulation of the sample in the collector pipe. The pump was activated for a period of 5 min every hour. Throughout the sampling period, samples were stored in refrigerated conditions (4°C) in 5 L dark glass bottles with Teflon caps, previously rinsed with solvent. Analysis took place immediately on the day following sample collection.

### Microbiological analysis

The presence of microorganisms capable of degrading *Py* was determined by monitoring microbial growth in basal salt medium (BSM) as described by Miller et al.<sup>[14]</sup> 1 mL of anoxic or aerobic activated sludge was diluted in sterile distilled water, followed by serial dilution. 1 mL of each di-

lution was spread onto a Petri dish containing Agar-BSM medium without carbon source. The plates were airbrushed with a solution of *Py* (1 mg/mL in hexane/acetone (1:1)) until an opaque layer had formed on the surface. The inoculated plates were placed in an incubator at 20°C in the dark and colony growth was measured for a period of one month.

### Respirometric assays

Before PAHs were added to the influent to obtain the mass balances, the toxic effect of these compounds was evaluated through respirometric assays in the absence and presence of *Py*. Fresh sludge samples were taken from the aerobic bioreactors of the experimental plant and kept aerated for 24 h before respirometric analysis to ensure an endogenous state. After this, the activated sludge was fed into the respirometer (SURCIS), where DO concentration was measured continuously inside the reactor and recorded online every 2 s. All experiments were conducted under conditions of controlled temperature (20°C) using a water cooler connected to the respirometer. pH was also kept in the range of 7.0–8.0. Oxygen uptake rate (OUR) experiments using endogenous biomass were carried out without and with 40 µg/L of *Py*.

### Bench-scale experiment

With a view to confirming the data obtained from the experimental plant, a bench-scale experiment was carried out. This consisted of two 10-L capacity glass flasks with a stirring system. One flask was equipped with an air injection system and both were filled with activated sludge from the experimental plant. Then, 1 mL of PAH concentrate containing *Py*, *Phen* and *F* was added to the activated sludge. After the concentrate was mixed through stirring, an initial sample was taken. The concentrate was left in repose and a further sample was taken after 24 h. Five replicates of the bench-scale experiment were carried out, analysing the content of *Phen*, *F* and *Py* in both the stirred sample and the settled biomass.

### Analysis conditions

PAHs were extracted from sludge and wastewater samples using a Stir Bar Sorptive Extraction Method (SBSE), and the determination of PAHs was performed using a gas chromatograph/mass spectrometer (GC/MS).

Analytes were extracted from 100 mL flask samples with 0.1 ppb benzo(a)pyrene D12 and pyrene D10 internal standard. A twister was placed in the flask and stirred (900 rpm) for 17 h at room temperature. The twister was removed, patted dry, transferred into a glass desorption tube and desorbed in the Thermal Desorption Unit (Gerstel TDU).

A Gerstel MultiPurpose Sampler MPS 2L automatically transferred the TDU liner from its tray to the TDU.

The GC system employed was an Agilent HP 6890 coupled to an Agilent HP 5973 N MS. The GC system was equipped with a polydimethylsiloxane column. Helium was used as the carrier gas and a flow of 2.1 mL/min was achieved. Temperature profile started at 70°C and stopped at 280°C. The detection limit of the method was 0.01 µg/L for the studied PAHs.

## Results and discussion

### Experiment without PAHs addition

The total concentration of detected PAHs in raw wastewater from Granada (Spain) ranged from the highest level of 0.48 µg/L to the minimum level below detection limit (0.01 µg/L). Values were low compared to reported levels in raw wastewater of other cities. For instance, in the Paris area, PAHs varied from 0.2 to 5.2 µg/L.<sup>[1]</sup> Reported levels in the Venice area varied from 1.12 to 4.62 µg/L<sup>[5]</sup> and in the Mataró area from 0.009 to 5.05 µg/L.<sup>[2]</sup> Low PAH concentration might be expected due to the low industrial wastewater discharge and to the reduced contribution of urban run-off due to scarce rainfall during the research period. *Py*, *Phen* and *F* were the main PAHs analysed. This predominance of low molecular weight compounds is in line with observations by Blanchar et al.<sup>[1]</sup> for urban wastewater. Approximately 55.5% of all detected PAHs corresponded to *Py*, 25.5% were *F* and the remaining 19% were *Phen*.

After experimental MBR treatment, PAH concentration observed in the effluent was below the detection limit, showing the high efficiency of the MBR system. However, PAHs concentration in the purge of activated sludge was also below the detection limit. Accordingly, sorption may be discounted as a significant mechanism for PAH removal in our experimental conditions, in spite of the hydrophobic nature of the detected PAHs.

### Microbiological analysis

After a month of incubation, the cultures for determining the presence of PAH-degrading microorganisms developed a transparent halo on the *Py* top cake. One or two colonies (a medium value of 1.3 cfu/mL of activated sludge) were observed in a few Petri dishes inoculated with undiluted activated sludge from the aerobic and anoxic bioreactors. The morphological aspect of all isolated colonies was corresponding with fungi and bacteria colonies were not isolated. This confirmed the presence of a low number of culturable pyrene-degrading microorganisms in the activated sludge of our installation. However, others no culturable *Py* degrading microorganisms could be present in the activated sludge, since microbial diversity is higher than the cultivable microorganisms.<sup>[15]</sup>

Biotransformation/biodegradation has been described as the major degradation process of PAHs<sup>[6]</sup> and several microorganisms capable of degrading PAHs have been isolated from wastewater.<sup>[16]</sup> Biotransformation/biodegradation mechanisms for *Py* removal may be possible during studied MBR treatment. However, the activated sludge from MBR treating wastewater with low concentration of PAHs would not expect to have sufficient concentration of PAH degrading microorganisms, as it is observed by cultures for determining the presence of PAH-degrading microorganisms. So, the significance of these mechanisms can be limited.

### Respirometric assays

Figure 2 shows the results for OUR evolution over time calculated by respirometric assays with and without *Py*. Similar values for the raw and the pyrene-spiked activated sludge samples were obtained, with no statistically significant differences between assays ( $p = 0.6075$ ). This suggests that toxicity was not detected with a *Py* concentration of 40 µg/L.

In view of the results obtained, it seems *a priori* that the activated sludge in the experimental installation was not altered as a result of adding PAHs in the assayed concentration, and that the metabolic activity of the microorganisms involved in the purifying process was consequently unaffected. This null effect of *Py* is indicative of low bioavailability, since the applied dose did not produce toxic effects, even though it was higher than usual in the experimental system. Moreover, the dose was not metabolized by the microorganisms, with OUR values similar to those obtained in the blank experiment. The hydrophobic nature of *Py* prompts it to associate with the biomass<sup>[5]</sup> in spite of its marked solubility in water (120–180 µg/L). However, in the blank assays undertaken in the experimental installation, biomass accumulation of PAHs was not observed meaning that others mechanisms cause the low bioavailability.

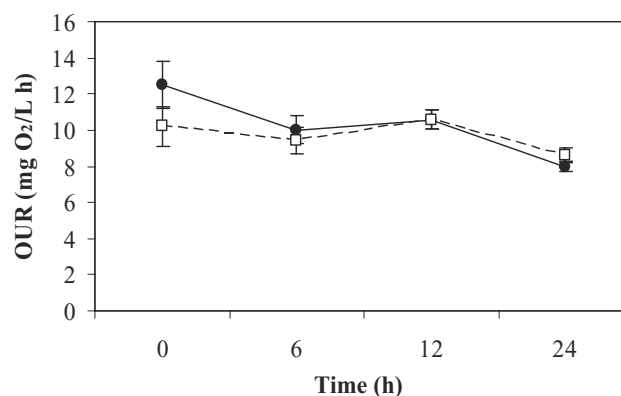


Fig. 2. OUR evolution over time without (●) and with (□) pyrene (40 µg/L).

**Table 1.** PHA concentrations ( $\mu\text{g/L}$ ) in the stages of the MBR treatment.

		<i>Phenanthrene</i>	<i>Fluoranthene</i>	<i>Pyrene</i>
Influent	Max.	17.0	3.6	3.1
	Min.	12.1	2.0	2.3
	Mean	13.8	2.7	2.8
Anoxic reactor	Max.	6.4	0.80	0.80
	Min.	4.1	0.65	0.70
	Mean	4.8	0.72	0.76
Aerobic reactor	Max.	6.0	0.68	0.64
	Min.	2.4	0.30	0.40
	Mean	3.8	0.51	0.56
Membrane reactor	Max.	5.0	0.52	0.50
	Min.	2.2	0.26	0.35
	Mean	3.1	0.39	0.44
Effluent	Max.	2.6	0.48	0.40
	Min.	2.0	0.10	0.10
	Mean	2.5	0.25	0.23

### Mass balances

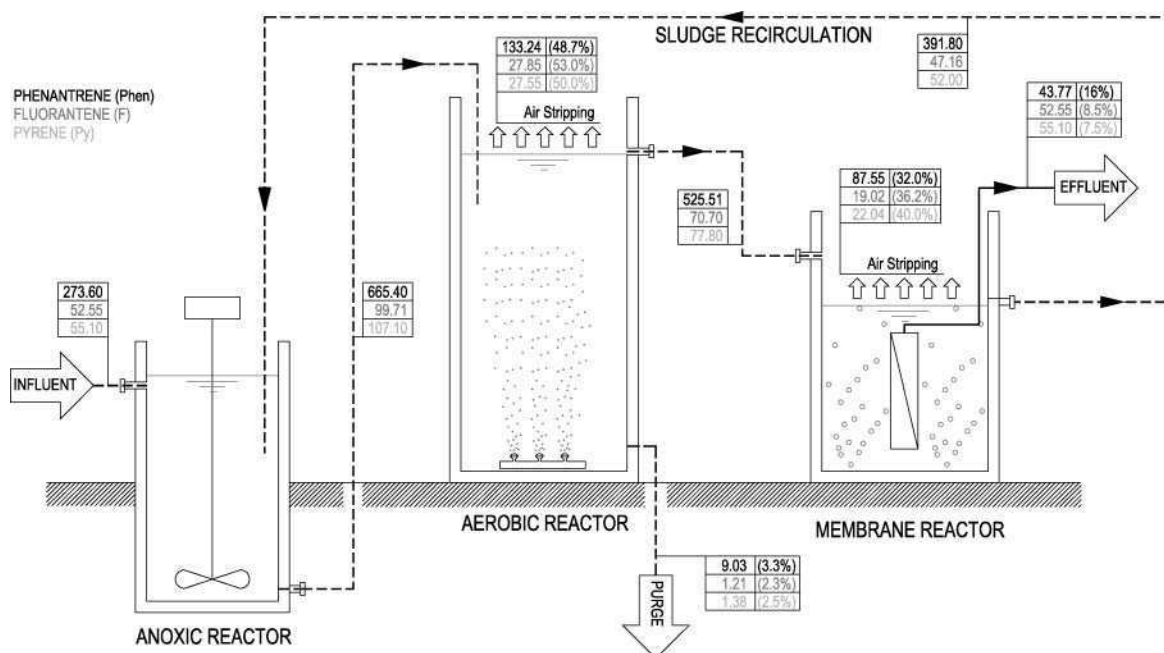
Table 1 shows concentrations of *Phen*, *F* and *Py* in the different samples taken from the MBR system. As may be seen, on adding the PAH concentration to the wastewater, *Phen* presented the greatest concentration with a mean value of  $13.8 \mu\text{g/L}$ , while the other two compounds presented similar concentrations, with means of  $2.7 \mu\text{g/L}$  and  $2.8 \mu\text{g/L}$  for *F* and *Py* respectively.

Then, 100% of the samples taken contained the three added compounds, demonstrating that total elimination through MBR treatment was not achieved, which is usual

in CASP<sup>[9]</sup> and other MBR systems.<sup>[7]</sup> Elimination values of between 91% and 92% were achieved for *F* and *Py* respectively, yet performance for *Phen* did not surpass 82%. One of the principal differences in the physicochemical properties of these three compounds is their solubility in water, which is greater in *Phen* (Table 2), owing to its lower hydrophobicity compared to *F* and *Py*. As a result, during the solid/liquid separation phase in an MBR system, the more soluble compounds achieve lower elimination values since they pass through the ultrafiltration membrane easily.

PAHs tend to adsorb on particulate organic matter due to their lipolytic and hydrophobic nature (Table 2). So, the performance levels achieved by the three compounds are predictable, and their accumulation in the biomass may be expected.<sup>[17]</sup> Such accumulation would indicate that the principal elimination route for these substances is the sludge purge. Nevertheless, the balances undertaken on the added compounds reveal that only 2.5%–3.3% of added compounds were eliminated from the system by means of sludge purge (Fig. 3). This indicates a PAH concentration of  $0.87 \text{ mg/KgTSS}$ , a value considerably below those observed in CASP treating wastewater with influent PAH concentrations far lower than those in our experiments.<sup>[9]</sup> The observed concentration is approximately two thirds of that observed by Fatone et al.<sup>[7]</sup> in MBR systems with an influent PAH concentration 30 times lower.

Biodegradation may be discounted as a means of eliminating these compounds from our experimental system, due to the low bioavailability observed in the OUR assays and the low presence of culturable *Py* degrading microorganisms. These results suggest that PAH accumulation in the biomass does not take place, in spite of their

**Fig. 3.** Daily balances for PAHs (phenanthrene, fluoranthene and pyrene) in MBR system (values in mg/d).

**Table 2.** Physicochemical data of assayed PAHs.<sup>[6,8]</sup>

Compound	Molecular weight	Vapour pressure (Pa at 25°C)	Solubility (mg/L)	Log $K_{ow}$ *
Fluoranthene	202	0.02	0.25	5.22
Pyrene	202	0.00033	0.132	5.2
Phenanthrene	178	0.0012	1–2	4.57

\*Log  $K_{ow}$  (Log Octanol-Water Partitioning Coefficient).

physicochemical properties and biodegradation is not possible in our system, forcing us to consider other mechanisms as responsible for the elimination of these compounds.

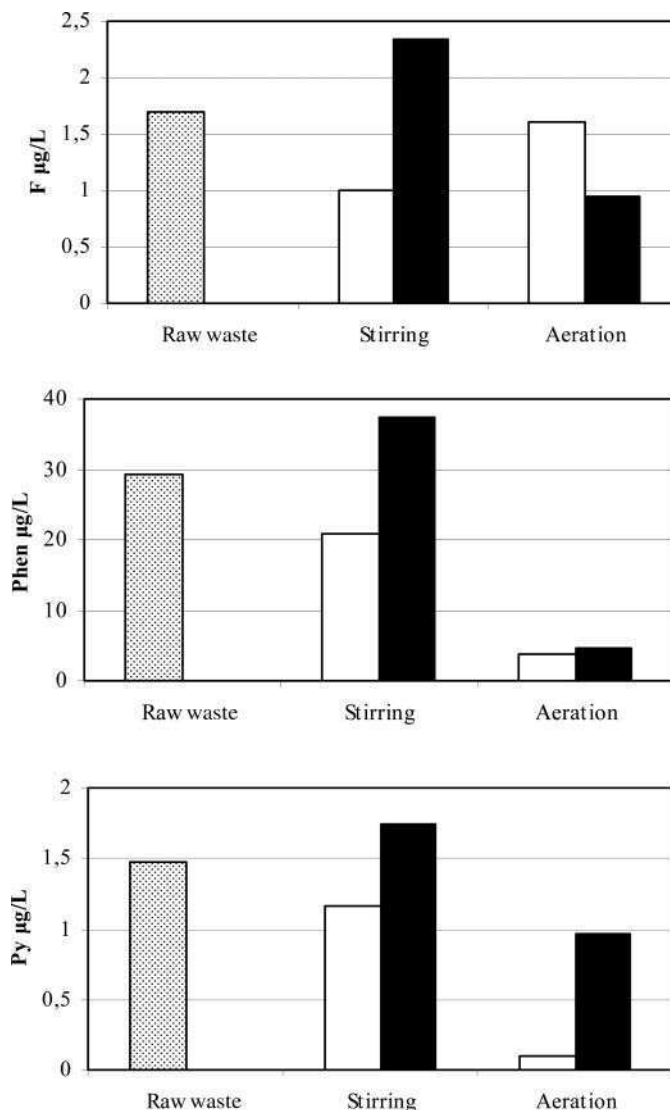
Mass balances (Fig. 3) shown that PAH elimination did not take place in the anoxic reactor where stirring only was applied to maintain the activated sludge in suspension. Resulting output measures are equivalent to the quantities in the influent together with those from the recirculation of sludge from the membrane reactor. The balance for the anoxic reactor shows a good match between input and output, indicating that PAH elimination was not achieved. The only possible mechanism for PAH elimination for the anoxic reactor in the experimental system would be volatilization or biodegradation, both of which may be excluded in the light of the balances obtained, as may be expected in view of the low volatility of these compounds and the scarcity of microorganisms capable of degrading *Py*.

By contrast, the balance performed on the aerobic reactor reveals a significant elimination of all the assayed PAHs, in the range of 50% of the total compounds added to the influent, with greater values for *F* and lower values for *Phen*. The aerobic reactor is equipped with a fine bubble pulsation aeration system which creates considerable turbulence, thus causing the air stripping, which would seem to be the principal mechanism for the elimination of PAHs in the aerobic reactor.

Balances carried out on the membrane reactor demonstrate a considerable removal of PAHs, in the range of 35% of the total PAHs added to the influent, again suggesting a substantial loss through air stripping. The membrane reactor is equipped with a coarse bubble aeration system which creates greater turbulence than that achieved in the aerobic reactor. However, the HRT was only 20 min as compared to 3.5 h in the aerobic reactor, which would explain the greater losses of PAHs in the aerobic reactor.

### Bench-scale experiment

With a view to confirming the results of the mass balances, a series of bench-scale experiments were carried out for the three PAHs assayed. In one experiment, non-turbulent stirring was applied for 24 h to a 10-L volume of activated sludge spiked with PAHs. A slight loss of PAHs was observed, with a greater accumulation in the resulting sediment after agitation was stopped (Fig. 4), as might be expected given the physicochemical properties of these



**Fig. 4.** Concentration of phenanthrene (Phen), fluoranthene (F) and pyrene (Py) in activated sludge after 24 h of stirring or aeration. Liquid phase (white bars) and sediment phase (black bars).

compounds.<sup>[17]</sup> However, application of aeration for 24 h resulted in a considerable loss. This would indicate that intense stripping of these compounds takes place, given the low presence of microorganisms capable of degrading *Py* in the activated sludge.

Most researchers agree that PAHs elimination in wastewater treatment systems is principally motivated by their lipophilic and hydrophobic nature,<sup>[8,9,10,17]</sup> causing them to associate with the biomass and to be eliminated principally through the removal of sludge. However, in our MBR system purge of the biomass is carried out from an aerobic reactor in which intense turbulence is maintained through aeration, without previous sedimentation. These circumstances make it difficult for the PAHs to pass to the biomass and, therefore, limit PAH elimination through this mechanism, although it is predominant in conventional systems

where solid/liquid separation is carried out through sedimentation.

Byrns et al.<sup>[8]</sup> observed that a higher SRT in conventional systems permitted greater contact time between the PAHs and the biomass, with the result that the biotransformation and biodegradation was greater and smaller concentrations appeared in the effluents. However, in our system PAHs were not observed to accumulate in the biomass, but rather to be removed through air stripping. This would make it difficult for elimination through biotransformation and biodegradation to take place, unless the influent contained sufficient concentrations to permit the development of microorganisms capable of acting on this type of compound. Fatone et al.<sup>[18]</sup> using an MBR system equipped with an automatic alternate-cycles process which reduced the periods of aeration, observed lower performance values for the elimination of *Phen*, *F* and *Py* compared with our system. Such diminished aeration would in turn reduce the air stripping, and may well be the cause of lower PAH elimination in MBR systems with low PAHs loading, as well as fomenting alternative elimination routes.

## Conclusions

Mass balances on three PAHs, phenanthrene, fluoranthene and pyrene, in an MBR were calculated. The system was equipped with ultrafiltration membranes and usually worked with low PAHs loading. Data obtained from the mass balances were corroborated through small laboratory-scale assays. The following conclusions were reached:

- i. MBR systems present high efficiency in the elimination of phenanthrene, fluoranthene and pyrene from urban wastewater, with performance levels in the range of 90%. Levels are lower for compounds with greater solubility in water, which are more easily carried away in the effluent.
- ii. Activated sludge purged from an aerobic reactor in which turbulence is maintained through aeration contains a low concentration of PAHs, and does not act as the principal removal mechanism of these compounds from MBR systems with low PAHs loading, equipped with direct purge system from an aerated reactor.
- iii. The principal elimination route for PAHs in MBR systems with low PAHs loading is air stripping, which reduces the accumulation of PAHs in the biomass and limits the establishment of microorganisms capable of biodegrading or biotransforming these compounds, most of which are released directly into the atmosphere.

## Acknowledgments

The present study has been financed by the Spanish Ministry of the Environment and Rural and Marine Media

through the Secretariat-General for Rural and Water Media (094/RN08/03.1). The report was translated from Spanish by Julian Bourne of the Department of Translation and Interpreting, University of Granada.

## References

- [1] Blanchard, M.; Teil, M.J.; Ollivon, D.; Legenti, L.; Chevreuil, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in wastewaters and sewage sludges from the Paris area (France). *Environ. Res.* **2004**, *95*, 184–197.
- [2] Sánchez-Ávila, J.; Bonet, J.; Velasco, G.; Lacorte, S. Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PHAs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 4157–4167.
- [3] Warshawsky, D. Polycyclic aromatic hydrocarbons in carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **1999**, *107*, 317–319.
- [4] Manoli, E.; Samara, C. The removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the wastewater treatment process: Experimental calculations and model predictions. *Environ. Poll.* **2008**, *151*, 477–485.
- [5] Busetti, F.; Heitz, A.; Cuomo, M.; Badoer, S.; Traverso, P. Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *J. Chromatogr.* **2006**, *1102*, 104–115.
- [6] Haritash, A.K.; Kaushik, C.P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PHAs): A review. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *169*, 1–15.
- [7] Fatone, F.; Di Fabio, S.; Bolzonella, D.; Cecchi, F. Fate of aromatic hydrocarbons in Italian municipal wastewater systems: An overview of wastewater treatment using conventional activated-sludge processes (CASP) and membrane bioreactors (MBRs). *Water Res.* **2011**, *45*, 93–104.
- [8] Byrns, G. The fate of xenobiotic organic compounds in wastewater treatment plants. *Water Res.* **2001**, *35*, 2523–2533.
- [9] Manoli, E.; Samara, C. Occurrence and mass balance of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Thessaloniki sewage treatment plant. *J. Environ. Qual.* **1999**, *28*, 176–187.
- [10] Vogelsang, C.; Grung, M.; Jantsch, T.G.; Tollefsen, K.E.; Liltved, H. Occurrence and removal of selected organic micropollutants at mechanical, chemical and advanced wastewater treatment plants in Norway. *Water Res.* **2006**, *40*, 3559–3570.
- [11] Arévalo, J.; Garralón, G.; Plaza, F.; Moreno, B.; Pérez, J.; Gómez, M.A. Wastewater reuse after treatment by tertiary ultrafiltration and a membrane bioreactor (MBR): a comparative study. *Desalination.* **2009**, *243*, 32–41.
- [12] Lesjean, B.; Ferre, V.; Vonghia, E.; Moeslang, H. Market and desing considerations of the 37 largest MBR plants in Europe. *Desalination Water Treat.* **2009**, *6*, 227–233.
- [13] Lesjean, B.; Huisjes, E.H. Survey of the European MBR market: trends and perspectives. *Desalination.* **2008**, *231*, 71–81.
- [14] Miller, C.; Hall, K.; Liang, Y.N.; Nieman, K.; Sorensen, D.L.; Issa, L.; Anderson, A.J.; Sims, R.C. Isolation and characterization of Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolates from soil. *Microb. Ecol.* **2004**, *48*, 230–238.
- [15] Park, S.Y.; Yoon, J.C.; Shin, K.S.; Kim, E.H.; Yim, S.; Cho, Y.J.; Sung, G.M.; Lee, D.G.; Kim, S.B.; Lee, D.U.; Woo, S.H.; Koopman, B. Dominance of endospore-forming bacteria on a rotating activated bacillus contactor biofilm for advanced wastewater treatment. *J. Microbiol.* **2007**, *45*(2), 113–121.
- [16] Meyer, S.; Moser, R.; Neef, A.; Stahl, U.; Kämpfer, P. Differential detection of key enzymes of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiol.* **1999**, *145*(7), 1731–1741.



- [17] Salihoglu, N.K.; Salihoglu, G.; Tasdemir, Y.; Cindoruk, S.S.; Yolsal, D.; Ogulmus, R.; Karaca, G. Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons levels in sludges from municipal and industrial wastewater treatment plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2010**, *58*, 523–534.
- [18] Fatone, F.; Bolzonella, D.; Battistoni, P.; Cecchi, F. Removal of nutrients and micropollutants treating low loaded wastewater in a membrane bioreactor operating the automatic alternate-cycles process. *Desalination.* **2005**, *183*, 395–405.