



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Procesos fotoquímicos de oxidación para el tratamiento de sulfametoxazol en solución acuosa: integración con un reactor biológico SBBR

Óscar González Álvarez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Química

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

Laboratorio de Ingeniería de Procesos de Oxidación Avanzada

PROCESOS FOTOQUÍMICOS DE OXIDACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE SULFAMETOXAZOL EN SOLUCIÓN ACUOSA. INTEGRACIÓN CON UN REACTOR BIOLÓGICO SBBR

TESIS DOCTORAL

Óscar González Álvarez

Barcelona, Julio de 2009

Directores de la Tesis:

Dr. Santiago Esplugas Vidal

Universidad de Barcelona

Dra. Carme Sans Mazón

Universidad de Barcelona

“La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda”

Voltaire (1694-1778)

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento para el Dr. Santiago Esplugas y la Dra. Carme Sans por haberme ofrecido la oportunidad de realizar este trabajo en su grupo de investigación. A su vez, por haberme supervisado y apoyado durante todo este tiempo. Gracias también al resto de componentes del grupo de investigación.

Yo y mis directores mostramos nuestro agradecimiento a los organismos que han proporcionado los fondos necesarios para llevar a cabo esta tesis: Ministerio de Ciencia e Innovación de España y Departamento de Universidades, Investigación y Sociedad de la información (DURSI, Generalitat de Catalunya).

Me gustaría extender mi agradecimiento a quienes han hecho posible las estancias realizadas durante este período: Dr. Sixto Malato (Plataforma Solar de Almería-CIEMAT, Almería (España)) y Dra. Mirat D. Gurol ("Department of Civil and Environmental Engineering, San Diego State University", California (EEUU)). Gracias a los miembros de sus grupos de investigación por la cálida acogida brindada.

RESUMEN

Durante los últimos años, la escasez y la calidad del agua se han convertido en una de las mayores preocupaciones a nivel mundial. Cada día se contaminan grandes cantidades de agua, especialmente en los países desarrollados, ya sea por su uso doméstico o por su uso en actividades industriales. Restablecer la calidad de estas aguas residuales es una tarea esencial para evitar continuar contribuyendo a la contaminación del Medio Ambiente (MA) así como para posibilitar su reutilización, disminuyendo, de esta manera, el consumo de agua potable. Actualmente una gran preocupación rodea a los contaminantes emergentes (p.ej. hormonas y otros disruptores endocrinos, tensioactivos, compuestos perfluorados, productos farmacéuticos y de cuidado personal, etc.). Muchos de ellos no están, a día de hoy, regulados por las legislaciones sobre calidad de aguas, pero podrían estarlo en el futuro en función de las investigaciones acerca de su toxicidad y efectos potenciales sobre el MA y la salud humana.

Los fármacos de uso humano y veterinario se liberan al MA continuamente. Estos compuestos están diseñados para producir una actividad biológica en los seres humanos o animales. Como resultado, podrían existir efectos secundarios por determinar, pudiendo afectar incluso a los seres humanos. Ejemplos de sus impactos medioambientales adversos incluirían toxicidad aguda, desarrollo de cepas bacterianas resistentes, genotoxicidad y disrupción endocrina.

Entre los productos farmacéuticos, los que probablemente suscitan mayor preocupación en la actualidad, son los antibióticos. Existe el temor de que, como consecuencia de su uso extensivo, se desarrollen cepas bacterianas resistentes que hagan que los antibióticos que normalmente se usan en medicina humana, dejen de ser efectivos para el fin con el que fueron diseñados. Entre los antibióticos, se ha escogido el Sulfametoxazol (SMX) como compuesto modelo para la realización de esta tesis principalmente por dos motivos: i) no ser biodegradable y ii) ser el representante más conocido de uno de los grupos más ampliamente utilizados de antibióticos, las sulfonamidas. El SMX tiende a permanecer en la fase líquida y no se degrada en los tratamientos biológicos convencionales de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs). Por estos motivos, permanece durante largos periodos de tiempo en el MA.

Una vía importante a través de la cual el SMX alcanza el MA son los efluentes de las empresas de química fina farmacéutica. Su tratamiento en origen de manera efectiva y el de otros fármacos problemáticos de características similares, evitando su dilución y dispersión, podría ser una solución apropiada para mitigar sus efectos adversos sobre el MA. Los tratamientos que se llevan a cabo actualmente en las empresas de química fina no parecen garantizar una calidad adecuada de los efluentes de salida desde el punto de vista medioambiental. El objetivo del presente trabajo es proponer una tecnología de tratamiento alternativa y fiable para las aguas residuales generadas en una empresa productora de principios activos farmacéuticos, que garantice una calidad adecuada de éstas en función de la reutilización o destino que se les quiera

dar. Los experimentos han sido realizados con un agua residual sintética conteniendo el antibiótico SMX (200 mg L^{-1}). La tecnología propuesta consiste en la combinación de un Proceso de Oxidación Avanzada (POA) con un posterior tratamiento biológico en un Reactor Secuencial Discontinuo de *Biofilm* (SBBR). La estrategia pretende tanto destruir el compuesto farmacéutico como reducir al máximo las cantidades de carbono y nitrógeno presentes en la solución inicial de SMX.

Una comparativa realizada entre diferentes técnicas de oxidación química llevadas a cabo con diferentes fuentes de radiación (fotólisis, foto-Fenton y UV/ H_2O_2) ha permitido seleccionar al POA foto-Fenton como el más apropiado para eliminar la materia orgánica presente en la solución inicial estudiada. La duración reducida de los experimentos y la buena reproducibilidad de estos a escala planta piloto con luz solar, animan al uso de esta fuente de radiación para llevar a cabo la reacción.

Se ha realizado el estudio del efecto de diferentes dosis iniciales de H_2O_2 sobre las características finales de los efluentes obtenidos mediante la reacción foto-Fenton, desde el punto de vista químico y también biológico. Para dicho estudio se ha fijado la concentración inicial de Fe^{2+} en 10 mg L^{-1} y la temperatura en 25°C . El POA permite tanto eliminar con éxito el antibiótico en solución como mejorar la biocompatibilidad de la solución inicial. Para valorar esta mejora, se han realizado pruebas de inhibición, toxicidad y biodegradabilidad. A su vez, se ha propuesto un bioensayo llevado a cabo en reactores discontinuos aerobios de biomasa suspendida, con la intención de obtener información adicional que permita escoger más adecuadamente las condiciones de operación del pretratamiento teniendo en cuenta la posterior integración con el tratamiento biológico. Los tests confirman que un pretratamiento con 300 o 400 mg L^{-1} de peróxido permitiría obtener efluentes que garantizaran una eliminación global del carbono en solución de un 75% o superior al efectuar la integración con el tratamiento biológico.

Las características de los SBBRs los sitúan como unos reactores muy apropiados para el tratamiento de efluentes tan complicados como los que se generan en el sector de la química fina farmacéutica. Por esta razón se ha evaluado la combinación de los dos efluentes de foto-Fenton seleccionados (300 y 400 mg L^{-1} iniciales de H_2O_2) con un reactor biológico de estas características. Los datos experimentales revelan que una reacción de pretratamiento llevada a cabo con 300 mg L^{-1} de H_2O_2 combinada con 8 horas de tratamiento biológico en el SBBR, permite la eliminación de un 76% del Carbono Orgánico Total (COT) presente en la solución inicial de antibiótico. Por otra parte, la introducción de una etapa anóxica permite la desnitrificación de todo los NO_3^- generados durante el tratamiento químico-biológico. Es necesario aumentar la dosis de peróxido en el pretratamiento hasta alcanzar una concentración inicial de 400 mg L^{-1} para conseguir prácticamente la eliminación total del carbono y nitrógeno orgánicos presentes en la molécula original de antibiótico.

El buen rendimiento del proceso foto-Fenton y del SBBR permite presentar la combinación ensayada como una tecnología eficaz para el tratamiento de aguas contaminadas con compuestos farmacéuticos problemáticos como es el caso del antibiótico SMX.

ÍNDICE

LISTA DE PUBLICACIONES.....	3
SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Contaminación del agua.....	7
1.2. Marco legal.....	7
1.3. Contaminantes prioritarios y emergentes.....	9
1.3.1. Productos farmacéuticos. Antibióticos.....	9
1.3.2. Contaminante modelo: Sulfametoxazol (SMX).....	12
1.4. Preocupación por la presencia de productos farmacéuticos en el Medio Ambiente (MA).....	15
1.4.1. El caso concreto del Sulfametoxazol (SMX).....	16
1.4.2. Introducción de los fármacos en el ciclo del agua. Comportamiento del Sulfametoxazol (SMX) en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs).....	19
1.5. El agua y la industria.....	24
1.6. Problemática específica del sector de la química fina farmacéutica. El caso del Sulfametoxazol (SMX).....	25
2. TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS INDUSTRIALES.....	27
2.1. Tecnologías convencionales.....	27
2.1.1. Tratamientos para la eliminación de materia en suspensión o materia coloidal.....	28
2.1.2. Tratamientos para la eliminación de materia disuelta.....	28
2.1.3. Tratamientos biológicos.....	28
2.2. Tecnologías emergentes.....	29
2.2.1. Procesos de Oxidación Avanzada (POAs).....	29
2.2.1.1. <i>El Radical Hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)</i>	32
2.2.1.2. <i>Foto-Fenton</i>	33
2.2.1.3. <i>UV/H₂O₂</i>	35
3. OBJETO Y ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN.....	39
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
4.1. Técnicas analíticas y bioensayos estandarizados.....	42
4.1.2. Determinación del Carbono Orgánico Total (COT).....	42
4.1.3. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno a 5 días (DBO ₅).....	42
4.1.4. Test de inhibición con lodos activos.....	43
4.2. Bioensayos modificados.....	46
4.2.1. Test de biodegradabilidad a corto plazo.....	46
4.2.2. Test en reactores discontinuos aerobios de biomasa suspendida.....	47
4.3. Reactores de oxidación química.....	48
4.4. Reactor Secuencial Discontinuo de Biofilm (SBBR).....	49
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
5.1. Oxidación química de Sulfametoxazol (SMX) en solución.....	53

5.1.1. Diseño Centrado Compuesto (DCC) circunscrito	59
5.2. Test en reactores batch. Integración con el Reactor Secuencial Discontinuo de Biofilm (SBBR)	65
APÉNDICE I	67
APÉNDICE II	85
APÉNDICE III	93
APÉNDICE IV	101
APÉNDICE V	111
APÉNDICE VI	123
BIBLIOGRAFÍA	133

LISTA DE PUBLICACIONES

La presente tesis incluye las siguientes publicaciones científicas, referenciadas a lo largo del texto como Apéndices del I al VI:

- I. González O., Sans C., Esplugas S. and Malato S. (2009) Application of solar advanced oxidation processes to the degradation of the antibiotic Sulfamethoxazole. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8, 1032-1039.
- II. González O., Sans C. and Esplugas S. (2007) Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton. Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates. *J. Hazard. Mater.* 146, 459-464.
- III. Abellán M.N., González O., Bayarri B., Sans C. and Esplugas S. (2006) Photocatalysis and photo-Fenton applied to the degradation of sulfamethoxazole. In: Vogelpohl A., Sievers M. and Geißen (eds.) Proceedings of the 4th International Conference on Oxidation Technologies for Water and Wastewater Treatment. Special topic: Recalcitrant and Anthropogenic Micropollutants (Goslar). *CUTEK Serial Publication No_ 68* (ISBN 3-89720-860-1).
- IV. González O., Esplugas M., Sans C. and Esplugas S. (2008) Biodegradation of photo-Fenton pre-treated solutions of Sulfamethoxazole by aerobic communities. Molecular biology techniques applied to the determination of existing strains. *J. Adv. Oxid. Technol.* 11, 238-245.
- V. González O., Esplugas M., Sans C., Torres A. and Esplugas S. (2009) Performance of a Sequencing Batch Biofilm Reactor for the treatment of pre-oxidized Sulfamethoxazole solutions. *Water Res.* 43, 2149-2158.
- VI. González O., Esplugas M., Sans C. and Esplugas S. (2008) Combination of photo-Fenton and biological SBBR processes for Sulfamethoxazole remediation. *Water Sci. Technol.* 58, 1707-1713.

A continuación se comenta la contribución del autor de la tesis al contenido de las publicaciones (siempre bajo la supervisión y consejo de sus directores de tesis):

- I. El autor realizó los experimentos, cálculos, interpretación y discusión de resultados y escritura de la publicación. En esta ocasión, el último coautor citado en la publicación, también participó con recomendaciones y supervisando el manuscrito.
- II. El autor llevó a cabo todas las tareas descritas en el párrafo anterior.
- III. En esta ocasión, el autor de la tesis realizó los experimentos correspondientes al proceso foto-Fenton. La interpretación, discusión de resultados y escritura de la publicación se llevaron a cabo conjuntamente con la Dra. María N. Abellán.
- IV. Realización de las mismas tareas que en párrafo I para todo el contenido de la publicación, exceptuando los apartados de Técnicas de Biología Molecular y Microscopia Electrónica de Barrido, donde recibió la colaboración del doctorando Marc Esplugas.
- V. Un estudiante supervisado por el autor (Alicia Torres) contribuyó con su trabajo a la obtención de datos experimentales. El doctorando Marc Esplugas, participó en el desarrollo experimental de la etapa de desnitrificación en el SBBR. Los cálculos, discusión de resultados y tareas de escritura fueron llevadas a cabo por el autor.
- VI. El autor realizó los cálculos, interpretación y discusión de resultados, escritura de la publicación y realización parcial de los experimentos. Supervisó el trabajo de final de carrera de Alicia Torres, la cual contribuyó a la obtención de datos experimentales.

SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

[-]	Concentración de “-“
[-] ₀	Concentración de “-“ inicial
3CPC-R	Reactor solar UV-H ₂ O ₂ compuesto por CPCs
4CPC-R	Reactor solar foto-Fenton compuesto por CPCs
AO	<i>Anodic Oxidation</i> - Oxidación Anódica
BLB-R1	Reactor escala laboratorio de lámparas BLB sumergidas
BLB-R2	Reactor escala laboratorio de lámparas BLB exteriores
C _{ab/ad}	Concentración de fármaco en el lodo
C _{disuelto}	Concentración disuelta de fármaco
COD	Carbono Orgánico Disuelto
COT	Carbono Orgánico Total
CPC	<i>Compound Parabolic Collector</i> - Colector Parabólico Compuesto
CWAO	<i>Catalytic Wet Air Oxidation</i> - Oxidación Húmeda Catalítica
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DBO ₅	Demanda Bioquímica de Oxígeno a 5 días
DCC	Diseño Centrado Compuesto
DQO	Demanda Química de Oxígeno
EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
EFPIA	Federación Europea de la Industria Farmacéutica
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i> - Espectrofotometría de análisis por inyección de flujo
Fotólisis-R	Reactor para la evaluación de la fotólisis solar
GC	<i>Gas Chromatography</i> - Cromatografía Gaseosa
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromotography</i> - Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC)
HRT	<i>Hydraulic Retention Time</i> - Tiempo de Residencia Hidráulico
K ₁	Primera constante de desprotonación
K ₂	Segunda constante de desprotonación
k _{biol}	Constante cinética de degradación biológica
K _d	Constante de reparto sólido-líquido
K _{ow}	Constante de reparto octanol-agua
LC	<i>Liquid Chromatography</i> - Cromatografía Líquida
MA	Medio Ambiente
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
OD	Oxígeno Disuelto
OUR	<i>Oxygen Uptake Rate</i> - Velocidad de Consumo de Oxígeno
PCB	Policlorobifenilo
POA	Proceso de Oxidación Avanzada
SBBR	<i>Sequencing Batch Biofilm Reactor</i> - Reactor Secuencial Discontinuo de <i>Biofilm</i>
SBR	<i>Sequencing Batch Reactor</i> - Reactor Secuencial de Flujo Discontinuo
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> - Microscopía Electrónica de Barrido

SRT	<i>Sludge Retention Time</i> - Tiempo de Retención de los Lodos
SST	Sólidos Suspendidos Totales
SSVT	Sólidos Suspendidos Volátiles Totales
SWAO	<i>Supercritical Wet Air Oxidation</i> - Oxidación Húmeda Supercrítica
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
UE	Unión Europea
UV-R	Reactor escala laboratorio de lámparas de Hg de baja presión (254 nm)
WAO	<i>Wet Air Oxidation</i> - Oxidación Húmeda

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminación del agua

La contaminación podría ser definida como el exceso de cualquier sustancia inservible, dañina o tóxica que no estaba presente en el medio desde el principio [1]. La palabra “contaminante” se refiere a nuevas sustancias que se introducen en el medio o a sustancias cuya concentración en el medio ha aumentado significativamente de manera que sobrepasan la capacidad natural del ecosistema para asimilarlas.

El desarrollo tecnológico e industrial ha procurado a la humanidad prosperidad y bienestar, pero ha traído consigo un alarmante deterioro del Medio Ambiente (MA). Tras casi un siglo de importantes avances y progreso, la salud de nuestro planeta junto a la nuestra propia, se ven amenazadas. Actualmente, especialmente en los países desarrollados, se generan cantidades importantes de aguas residuales, cuyo vertido directo a los cauces naturales provoca un impacto considerable en el MA. La contaminación de las aguas es, por tanto, uno de los principales problemas a los que se enfrenta la sociedad actual.

1.2. Marco legal

En la directiva 91/271 CEE, del Tratamiento de Aguas Residuales Urbanas, se definen los distintos tipos de aguas residuales:

- Aguas residuales domésticas: Aquellas procedentes de zonas de vivienda y de servicios, generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas.
- Aguas residuales industriales: Todas las aguas residuales vertidas desde locales utilizados para efectuar cualquier actividad comercial o industrial, que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de escorrentía pluvial.
- Aguas urbanas: Las aguas residuales domésticas o la mezcla de las mismas con aguas residuales industriales y/o aguas de escorrentía pluvial.

Todas ellas habitualmente se recogen en un sistema colector y son enviadas mediante un emisario terrestre a una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR).

Las aguas procedentes de instalaciones industriales suelen contener grandes cantidades tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos. A diferencia de las aguas residuales domésticas, los efluentes industriales contienen con frecuencia sustancias que no se eliminan mediante tratamientos convencionales, bien por estar en concentraciones elevadas, o bien por su naturaleza química. Muchos de los compuestos orgánicos e inorgánicos que se han identificado en aguas residuales

industriales son objeto de regulación especial debido a su toxicidad o a sus efectos biológicos a largo plazo.

El control de la contaminación del agua producida por las actividades industriales comenzó con la aprobación por el Congreso de los Estados Unidos de la enmienda de 1972 a la *"Federal Water Pollution Control Act"*, que estableció un sistema nacional de descarga y eliminación de contaminantes. Las enmiendas de 1977 y 1987, conocidas como *"Clean Water Act"* y *"Water Quality Act"*, completan la regulación legal norteamericana. La tendencia en Europa y, por tanto en España, especialmente tras la promulgación de la Ley 16/2002 de prevención y control integrado de la contaminación, es reducir el vertido de algunos contaminantes específicos y emplear sistemas avanzados de tratamiento de aguas residuales "in situ". Entre las principales sustancias contaminantes, de acuerdo a la citada Ley 16/2002, que se tomarán obligatoriamente en consideración para fijar valores límite de emisiones a las aguas se encuentran:

- Compuestos órgano-halogenados y sustancias que puedan generarlos en el medio acuático.
- Sustancias y preparados cuyas propiedades cancerígenas o mutagénicas puedan afectar a la reproducción en el medio acuático.
- Hidrocarburos persistentes y sustancias orgánicas tóxicas persistentes y bioacumulables.
- Cianuros.
- Biocidas y productos fitosanitarios.
- Sustancias que ejercen una influencia desfavorable sobre el balance de oxígeno (computables mediante parámetros agregados tales como la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) y la Demanda Química de Oxígeno (DQO)).

Estos contaminantes proceden de industrias muy variadas. Su naturaleza, concentración o caudal de efluente, hacen que estas aguas residuales demanden un tratamiento antes de su vertido o reutilización.

Las leyes que regulan el vertido de aguas industriales a la red de saneamiento en las diferentes comunidades españolas establecen la necesidad de identificación de los vertidos y la definición de determinados parámetros de contaminación. Uno de estos parámetros es la ecotoxicidad (medida mediante un ensayo normalizado de bioluminiscencia, p. ej., Microtox®) que permite detectar compuestos tóxicos para los que no exista una normativa específica, como podría ocurrir con los contaminantes emergentes.

Por su parte, la Ley 11/2005 define el concepto de reutilización y determina los requisitos necesarios para llevar a cabo la actividad de utilización de aguas regeneradas y las exigencias de calidad precisas en cada caso. Según el Instituto Nacional de Estadística (INE), en España el volumen de agua residual recogido en 2003 fue de 3469 Hm³, de los que sólo se reutilizó un 4% (unos 170 Hm³). Se estima que España tiene un potencial de reciclado de 1300 Hm³, un orden de magnitud muy superior al actual.

1.3. Contaminantes prioritarios y emergentes

Desde los años 30, un gran número de sustancias han sido identificadas como peligrosas para la salud humana y medioambiental, por lo que su empleo ha sido prohibido o regulado a través de distintas legislaciones con el fin de reducir en lo posible la exposición a las mismas. Este es el caso de los llamados contaminantes prioritarios, entre los que se encuentran compuestos como: hidrocarburos aromáticos policíclicos, policlorobifenilos (PCBs), hidrocarburos clorados, nitrobenzenos, compuestos alifáticos halogenados, pesticidas, dioxinas, cianuros, sustancias inorgánicas, etc. Al margen de estos, existen otros contaminantes de los que, hasta la fecha, se conoce poco. Estos contaminantes, denominados globalmente como emergentes, incluyen productos de uso diario, tales como detergentes, fármacos, productos para el cuidado y la higiene personal, aditivos de gasolinas, plastificante, etc. Corresponden a contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales, cuya presencia en el MA no es necesariamente nueva, pero sí lo es la preocupación por las posibles consecuencias de la misma.

Los principales procesos por los cuales estos nuevos compuestos xenobióticos (compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio) son la fotodegradación por radiación solar, la oxidación y reducción química y la biodegradación por microorganismos. Sin embargo, debido a su estructura inusual, algunos xenobióticos persisten mucho tiempo en la biosfera mostrándose recalcitrantes a la degradación y generando, por ello, una grave preocupación social. La razón fundamental de que muchos compuestos sintéticos no sean fácilmente biodegradables radica en la gran estabilidad de su estructura química. Muchos compuestos sintéticos tienen estructuras químicas distintas a las de compuestos naturales pero, incluso los que tienen estructuras similares a las naturales, suelen contener modificaciones que los hacen muy estables.

1.3.1. Productos farmacéuticos. Antibióticos

Los fármacos son elementos importantes e indispensables para la vida moderna. Se utilizan en la medicina humana y veterinaria, en agricultura y en acuicultura.

En general, se trata de un grupo de compuestos muy amplio por lo que respecta a su estructura molecular, propiedades fisicoquímicas y persistencia. En la actualidad, se están utilizando miles de principios activos para sintetizar un número mucho mayor de medicamentos. Tomando como ejemplo el ámbito de la Unión Europea (UE), se están consumiendo aproximadamente 3000 sustancias diferentes sólo en medicina humana, a las que hay que sumar un número muy importante de fármacos de uso veterinario. En la Tabla 1.3.1-1 se presenta la producción farmacéutica en la UE y otros países durante el año 2002. En cuanto a las perspectivas para los próximos años, se prevé un incremento en el consumo de medicamentos, principalmente debido al

envejecimiento paulatino de la población, aunque también a la mejora de la calidad de vida de la población en general.

Tabla 1.3.1-1. Producción de especialidades farmacéuticas y materias primas de uso humano y veterinario. En España, Noruega, Suiza y Turquía, sólo actividad uso humano (año 2002).

País	Producción farmacéutica (mill. €)	Producción per cápita (€)
Alemania	20671	250.59
Austria	1548	191.42
Bélgica	3814	369.11
Dinamarca	5334	992.19
España	8818	210.58
Finlandia	682	131.13
Francia	30438	511.68
Grecia	337	31.92
Holanda	5742	355.56
Irlanda	16605	4223.04
Italia	17508	301.89
Portugal	1469	141.69
Reino Unido	27144	458.27
Suecia	5249	588.12
TOTAL UE	145359	382.51
Noruega	579	127.59
Suiza	12913	1.771.33
Turquía	2069	30.16
TOTAL	160920	348.71

* Fuentes: "La industria farmacéutica en cifras, 2004 [2]" según la Federación Europea de la Industria Farmacéutica (EFPIA) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE).

Junto con las medidas de higiene y salubridad, los antibióticos suponen uno de los más importantes puntos de inflexión en la mortalidad en el siglo XX. Los antibióticos se desarrollan ante la necesidad de controlar las enfermedades infecciosas. Concretamente las enfermedades causadas por bacterias, por lo que también se les denomina "antimicrobianos". Los antibióticos se caracterizan por actuar sobre dichas células bacterianas (células procariotas), distintas a las células del hombre (células eucariotas), a las que se pretende eliminar en su totalidad. Históricamente, el tratamiento anti infeccioso moderno comienza con la síntesis de las sulfamidas (1936), ya que, hasta entonces, el tratamiento se basaba en la acción de iones metálicos. Estos actuaban indistintamente sin discriminar sobre las células procariotas y las eucariotas, siendo, por lo tanto, igual de dañinos para el propio organismo humano que para el microbio invasor. Es, con la aparición de la penicilina en los años veinte, cuando surge la incontenible explosión de los antibióticos. Los antibióticos se clasifican generalmente según el nivel estructural y la forma en que actúan. Según el nivel estructural donde actúan, los antibióticos suelen dividirse en:

- Inhibidores de la síntesis de la pared celular, efecto producido por penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos y monobactamos.

- Inhibidores de la membrana celular, como es el caso de la acción de la polimixina.
- Inhibidores de la síntesis proteica, como es el caso de aminoglucósidos, tetraciclinas, cloramfenicol, macrólidos.
- Actuando en el ADN o ARN como quinolonas, rifamicinas.
- Inhibidores competitivos de metabolitos o factores de crecimiento: sulfamidas.

Según su mecanismo de acción, los antibióticos suelen dividirse en:

- Bactericidas: provocan la muerte bacteriana, con lo que el proceso no es reversible.
- Bacteriostáticos: bloquean el desarrollo y multiplicación de las bacterias, pero no las eliminan, por lo que al retirar el antibiótico, las bacterias podrían reproducirse de nuevo.

En la siguiente tabla se exponen algunos de los grupos de antibióticos más frecuentemente usados en la clínica habitual:

Tabla 1.3.1-2. Grupos de antibióticos más frecuentemente utilizados en clínica habitual.

Grupo	Usos
Aminoglucósidos [3]	Infecciones graves
Beta-lactámicos [4]	Infecciones graves Infecciones nosocomiales Infecciones respiratorias (por ejemplo, neumonía) Profilaxis quirúrgica
Fenicoles [5]	Alternativa en abscesos cerebrales Alternativa en salmonelosis Meningitis
Glucopéptidos [6]	Alternativa de la profilaxis quirúrgica Infección de las prótesis Infección del corazón Infección del hueso
Macrólidos [7]	Enfermedades de transmisión sexual Infecciones respiratorias (por ejemplo, neumonía)
Quinolonas [8, 9]	Gonorrea Infección cutánea Infección del hueso Infecciones respiratorias (por ejemplo, neumonía) Infecciones urinarias
Rifamicinas	Brucelosis Meningitis TBC
Sulfonamidas [10]	Alternativa a la profilaxis de la meningitis Alternativa al tratamiento de la malaria

	Diarrea del viajero
	Infecciones respiratorias (por ejemplo, neumonía)
	Infecciones urinarias
	Toxoplasmosis
Tetraciclinas [11]	Alternativa del tratamiento de la malaria
	Alternativa en infecciones respiratorias
	Brucelosis
	Cólera
	Diarrea del viajero
	Fiebre Q
	Gonorrea
	Sífilis
	Tifus

Debido a su efectividad y alcance, los antibióticos son uno de los grupos de medicamentos más utilizados en la práctica clínica habitual tanto en atención primaria como en el medio hospitalario [12]. Además de en los tratamientos de infecciones humanas, se utilizan también en medicina veterinaria.

El consumo de antibióticos se cifra en cantidades similares a las de los pesticidas en los países de la UE. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se producen $28 \cdot 10^6$ kg de antibióticos en el mundo anualmente (7700 kg día^{-1}). Aproximadamente el 52% son consumidos por seres humanos. Actualmente, más de 100 compañías farmacéuticas están trabajando en alrededor de 250 medicamentos destinados a las enfermedades infecciosas, de los cuales un 12.5% son antibióticos. La UE es la mayor consumidora de antibióticos, alcanzando casi la mitad de la producción. Según la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, España es el segundo país de la UE en consumo de antibióticos por detrás de Francia a pesar de que el uso de estos medicamentos se ha reducido en la última década. Se estima que el consumo diario en España está alrededor de unos 330 kg.

1.3.2. Contaminante modelo: Sulfametoxazol (SMX)

En la sección 1.4.1. se detallan los motivos por los cuales este antibiótico ha sido escogido como sustancia modelo para preparar el agua residual sintética con la que se han llevado a cabo los experimentos en este estudio. A continuación se presenta información detallada a cerca del Sulfametoxazol (SMX) y de la familia de antimicrobianos a la cual pertenece. Las sulfonamidas (Figura 1.3.2-1), además de utilizarse para el tratamiento de las infecciones en humanos descritas en la Tabla 1.3.1-2, son uno de los grupos de antibióticos más utilizados en veterinaria en la UE, debido a su bajo coste y a que tienen un amplio espectro de acción para prevenir o tratar infecciones bacterianas agudas y crónicas [13]. En el caso del ganado, se emplean tanto en la prevención y el tratamiento de infecciones como en la mejora del pienso en pequeñas dosis.

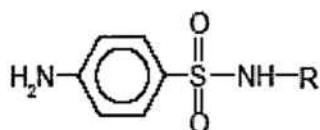


Figura 1.3.2-1. Estructura de las sulfonamidas.

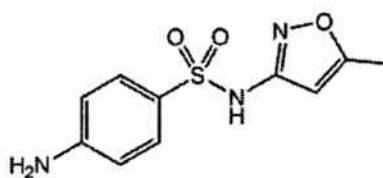


Figura 1.3.2-2. Estructura del Sulfametoxazol (SMX).

Estos antibióticos se caracterizan por contener el grupo sulfonamida ($-\text{SO}_2\text{NH}-$) donde el azufre está unido directamente a un anillo de benceno con un grupo amino en posición para ($p\text{-NH}_2$). El grupo sulfonamida no es esencial en la actividad, sino que es el hecho de estar unido al benceno lo que le concede su carácter antimicrobiano. El grupo amino es también fundamental en su actividad antibacteriana.

Dentro del grupo de las sulfonamidas se encuentra el SMX (Figura 1.3.2-2). Es en el tratamiento de enfermedades infecciosas como bronquitis e infecciones del tracto urinario en humanos donde el SMX es más utilizado [14]. Las formulaciones médicas combinan normalmente el SMX con trimetoprim para aumentar su efecto ya que el trimetoprim presenta acción sinérgica con las sulfonamidas.

El SMX es sólido a temperatura ambiente (polvo cristalino blanco o casi blanco). Es ligeramente soluble en agua, pero es soluble en acetona 1 a 3 y soluble en una reducida cantidad en etanol 96%. Se disuelve también en soluciones diluidas de hidróxido de sodio y en ácidos diluidos [15]. En la Tabla 1.3.2-1 se muestran algunas de las propiedades fisicoquímicas documentadas sobre el compuesto:

Tabla 1.3.2-1. Propiedades fisicoquímicas del antibiótico SMX.

Propiedad	Valores
Densidad ^a	1.4895 kg L ⁻¹
Temperatura de fusión ^b	166-169 °C
Temperatura de evaporación ^c	482.1±55.0 °C
pK _{a1} (25 °C) ^c	1.39±0.10
pK _{a2} (25 °C) ^c	5.81±0.50
Presión de vapor (25 °C) ^c	2.49E-7 Pa
Solubilidad (pH 5; 25 °C) ^c	480 mg L ⁻¹
Log K _{ow} ^d	0.89
Peso molecular	253.28 g mol ⁻¹

^a [16] (Nalini (1980))

^b (Hoja de datos de seguridad del proveedor (Sigma-Alcrich))

^c [17] (ACD)

^d [18] (HSDB)

Previo a la realización de experimentos, y con el objetivo de encontrar la manera adecuada de manipular y conservar las soluciones del fármaco así como de prever posibles problemas durante la realización de experimentos, se realizaron una serie de

pruebas como son: estabilidad en diferentes condiciones, arrastre por borbotado de aire, volatilidad, solubilidad y adsorción en un soporte de origen volcánico (utilizado en un reactor biológico en el desarrollo experimental). Todas las pruebas se realizaron sobre soluciones de 200 mg L⁻¹ de SMX. A continuación se apuntan las conclusiones sobre los resultados obtenidos:

- Las soluciones de SMX deben conservarse a temperatura ambiente (la solubilidad se reduce considerablemente a temperaturas reducidas) y protegidas de la luz (el antibiótico sufre fotólisis al exponerlo a la radiación solar).
- No hay pérdidas por desabsorción con aire sobre las soluciones de SMX.
- El SMX muestra estabilidad y no presenta volatilidad a temperaturas elevadas (70 °C).
- El SMX en solución es estable en todo el rango de pH.
- El antibiótico presenta una solubilidad experimental de 263.5 mg L⁻¹ a pH libre (\approx 4.6) y a 25 °C. Ésta aumenta de manera considerable con la temperatura.

Los estudios de toxicidad documentados hasta el momento, llevados a cabo con diferentes organismos revelan la gran dificultad a la hora de establecer un criterio para determinar la toxicidad para una determinada sustancia. En la Tabla 1.3.2-2 se muestran los valores de concentraciones efectivas y dosis letales encontrados para el SMX.

Tabla 1.3.2-2. Concentraciones tóxicas determinadas para el SMX.

Tipo de organismo	Nombre	Toxicidad	Test
Bacteria ^a	Vibrio fischeri	93 mg L ⁻¹	15 min EC50
Fitoplancton ^b	Cyanobacteria Synechococcus leopoliensis	0.0268 mg L ⁻¹	96 h EC50
Fitoplancton ^b	Diatomea Cyclotella meneghiniana	2.4 mg L ⁻¹	96 h EC50
Alga ^b	Alga Pseudokichneriella subcapitata	0.146 mg L ⁻¹	96 h EC50
Crustáceo ^b	Pulga de agua Daphnia magna	> 10 mg L ⁻¹	48 h EC50
Mamífero ^c	Ratón	2300 mg kg ⁻¹	LD50
Micro-invertebrado ^d	Hydra attenuata	> 100 mg L ⁻¹	EC50

^a [19] (González et al. (2007))

^b [20] (Ferrari et al. (2004))

^c [18] (HSDB)

^d [21] (Quinn et al. (2008))

1.4. Preocupación por la presencia de productos farmacéuticos en el Medio Ambiente (MA)

Los fármacos de uso humano y veterinario se liberan al MA continuamente como resultado de procesos de fabricación, desecho de productos caducados o no utilizados (no tratados y depositados en vertederos como si se tratase de residuos convencionales) y excreciones. Los compuestos farmacéuticos están diseñados para producir una actividad biológica en los seres humanos o animales. Como resultado, podrían existir efectos secundarios que no están todavía claros, pudiendo afectar incluso a los seres humanos [22]. Por este motivo y, aunque hasta los años 90 no se le había dado todavía demasiada importancia a la aparición, destino o efectos adversos de los fármacos en el MA tras su uso tradicional [23], durante los últimos años, todos estos factores están siendo motivo de gran preocupación. Ejemplos de sus impactos medioambientales adversos incluirían toxicidad aguda, desarrollo de cepas bacterianas resistentes, genotoxicidad y disrupción endocrina [24, 25]. El hecho de que estos contaminantes presenten una baja biodegradabilidad y de que se sean biológicamente activos los convierten en agentes contaminantes de gran importancia. Además, muchos de ellos son bioacumulativos.

Merecen especial atención, debido a sus efectos sobre los organismos, los que siguen a continuación: agentes citostáticos, medicamentos inmunodepresivos, antibióticos, desinfectantes, hormonas y cualquier sustancia que presente actividad disruptora endocrina [25].

En función de sus propiedades fisicoquímicas, estas sustancias o sus metabolitos bioactivos acaban en aguas (estaciones de depuración de aguas residuales, ríos, lagos y, más raramente, aguas subterráneas [24, 26, 27, 28, 29]), suelos y sedimentos, donde pueden acumularse e inducir efectos adversos sobre los organismos terrestres y acuáticos. En comparación con el medio acuático, los suelos y los sedimentos prácticamente no han sido investigados [30]. Los compuestos farmacéuticos llegan incluso a los suministros de agua potable y a incorporarse a la cadena alimentaria, lo que ha elevado el grado de preocupación. Consecuentemente, se ha incrementado la investigación relacionada con la evaluación de riesgos con el propósito de valorar su posible impacto sobre el ecosistema e incluso sobre la salud humana [31, 32, 33].

La introducción de fármacos en el MA es función de la combinación de diversos factores: las cantidades fabricadas, las dosis administradas, la eficiencia en la excreción del compuesto original y sus metabolitos, la capacidad de adsorción/desorción en suelos y la descomposición metabólica en los tratamientos de aguas. Aunque las cantidades de fármacos introducidas en el MA podrían parecer reducidas y, pese a que algunos de ellos no presenten una elevada persistencia, su vertido y descarga continuadas podrían causar, a corto-medio plazo, efectos adversos sobre los organismos terrestres y acuáticos. Tales efectos podrían pasar desapercibidos debido a su lenta acumulación, hasta el momento en que sean ya irreversibles.

Entre otros efectos, se ha observado por ejemplo, un preocupante incremento en resistencia bacteriana debido al creciente uso de estiércol y lodos activos de

depuradora en agricultura. Otras consecuencias de la presencia de fármacos están relacionadas con la disrupción endocrina: casos de imposex (presencia de ejemplares hembra con un pene milimétrico) en la *Nucella lapillus* (tipo de caracola) en más de 50 puntos estudiados en Galicia. También han aparecido carpas macho con ovarios en el río Ebro y salmonetes afectados en zonas contaminadas de la costa mediterránea.

Conocer el impacto de este tipo de contaminación química sobre la salud humana es muy complicado y, actualmente, se dispone todavía de muy poca información sobre los potenciales efectos de los productos farmacéuticos en el MA. Sin embargo, ejemplos como los citados arriba sirven como indicadores de su existencia.

De todos los contaminantes orgánicos emergentes, los que probablemente suscitan mayor preocupación en la actualidad, son los antibióticos. Existe el temor de que, como consecuencia de su uso extensivo, se desarrollen cepas bacterianas resistentes que hagan que los antibióticos que normalmente se usan en medicina humana, dejen de ser efectivos para el fin con el que fueron diseñados [30]. La aparición de resistencias a los antibióticos afecta sobre todo a enfermedades cuya incidencia va en aumento, como la diarrea bacteriana, la gonorrea, el paludismo, la neumonía o la tuberculosis. Estas circunstancias ya obligan a veces a iniciar tratamientos con un antibiótico diferente al utilizado habitualmente. Además de aumentar la resistencia en las bacterias expuestas a ellos, se podrían producir cambios irreversibles a largo plazo en el genoma de los microorganismos, por lo que esta resistencia sería transferida a las futuras generaciones de bacterias [34, 35, 36, 37].

Se está haciendo un esfuerzo considerable en el desarrollo de tecnologías que permitan cuantificar y evaluar la presencia, propiedades químicas y degradabilidad de estos compuestos en aguas. Los métodos analíticos se basan en la cromatografía avanzada gaseosa o líquida (GC o LC) acoplada a la espectrofotometría de masas (MS/MS). Son, por lo tanto, costosos, laboriosos y requieren de una elevada experiencia. Estos métodos han sido principalmente aplicados a aguas residuales [26, 38, 39, 40], pero también a aguas superficiales y subterráneas [41, 42].

1.4.1. El caso concreto del Sulfametoxazol (SMX)

Como ya se ha mencionado anteriormente, los antibióticos constituyen un riesgo para el MA. El SMX ha sido elegido entre los antibióticos como sustancia modelo para este estudio principalmente por dos motivos: el primero, por representar a uno de los grupos más importantes de antibióticos usados en terapias humana y veterinaria (tras las penicilinas y las cefalosporinas, las sulfonamidas son los antibióticos más utilizados); y el segundo, por su patente carácter biorecalcitrante. El SMX, junto con el trimetoprim, fueron los únicos que probaron ser estables durante los 28 días que duró el test de biodegradabilidad *Closed Bottle Test* (Método OCDE 301 D) [43]. Al-Ahmad et al. (2001) [44] también informaron sobre la nula biodegradación sufrida por el antibiótico en el test *Closed Bottle Test* en 40 días. Su carácter no biodegradable ya había sido evaluado por Richardson y Bowron en 1985, que lo clasificaron como “no biodegradable” [45]. Otros autores han evaluado

también el tiempo de vida media medioambiental del fármaco en diferentes circunstancias: $t_{1/2} \geq 365$ días [46] y $t_{1/2} = 19.0 \pm 1.2$ días (ecosistema artificial simulando un estanque de agua dulce) [47].

El SMX destaca por encontrarse en mayor concentración en los efluentes de las EDARs estudiadas en países europeos. El porcentaje de degradación en las EDAR es bajo [48]. El gran número de publicaciones relacionadas con su detección en diferentes medios y con su eliminación (uno de los 5 fármacos más estudiados [49]) es signo evidente de la gran preocupación que despierta el compuesto en cuestión.

Por otro lado, el uso extendido de sulfonamidas en explotaciones ganaderas y piscifactorías sin un apropiado periodo de abstinencia conduce a la acumulación de éstas en carne, huevos, leche y pescado. Existe riesgo de desarrollo de resistencia a estos antimicrobianos en las bacterias patógenas presentes en este tipo de alimentos y también riesgo de desarrollo del mismo tipo de resistencia en humanos. El uso incontrolado de estos fármacos podría ser una de las posibles causas de la inefectividad de los tratamientos en humanos.

También existe cierta preocupación por las reacciones alérgicas que podrían provocar los alimentos en determinados individuos. Por estos motivos, las concentraciones límite legales para sulfonamidas en la UE y en EEUU se fijaron en $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ en tejidos comestibles animales y en $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en leche [50, 51]. Aunque no existe todavía legislación a nivel europeo, la ley suiza fija también un valor máximo residual para sulfonamidas totales en la miel de las abejas: $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ [52].

Por lo que respecta a las aguas, las normativas sobre su calidad no cubren actualmente un gran número de contaminantes emergentes entre los que podemos encontrar a los antibióticos. Estos contaminantes podrían ser candidatos a ser regulados en el futuro, en función de la investigación en torno a su toxicidad y a sus potenciales efectos sobre el MA y la salud humana.

Como se ha comentado anteriormente, en función de sus propiedades fisicoquímicas, los productos farmacéuticos pueden ser más susceptibles o menos de acabar en el medio acuático. Por su solubilidad en agua y por su baja constante de reparto sólido-líquido (K_d), las sulfonamidas son potenciales contaminantes de las aguas subterráneas y superficiales [53]. A continuación se presenta la Tabla 1.4.1-1, que recopila datos sobre concentraciones de SMX encontradas en aguas en diferentes países. Como se puede observar, pese a que se han realizado también análisis en aguas superficiales y subterráneas, la mayoría de los datos provienen de estudios realizados en EDARs. Diferentes sulfonamidas y, entre ellas, el SMX han sido también detectadas en aguas residuales de explotaciones ganaderas [54].

Tabla 1.4.1-1. Concentraciones de SMX detectadas en diferentes medios acuáticos.

[SMX] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Punto de análisis	Localización	Notas	Referencia
0.001	Ríos	Japón	Media de 2 ríos	[55]
0.003	Aguas superficiales agrícolas	Sur de Ontario - (Canadá)	Concentración media	[56]
0.010	Salida EDAR	Italia		[57]
0.020	Salida EDAR	Suecia		[57]
0.020	Entrada EDAR	Kallby - Suecia		[58]

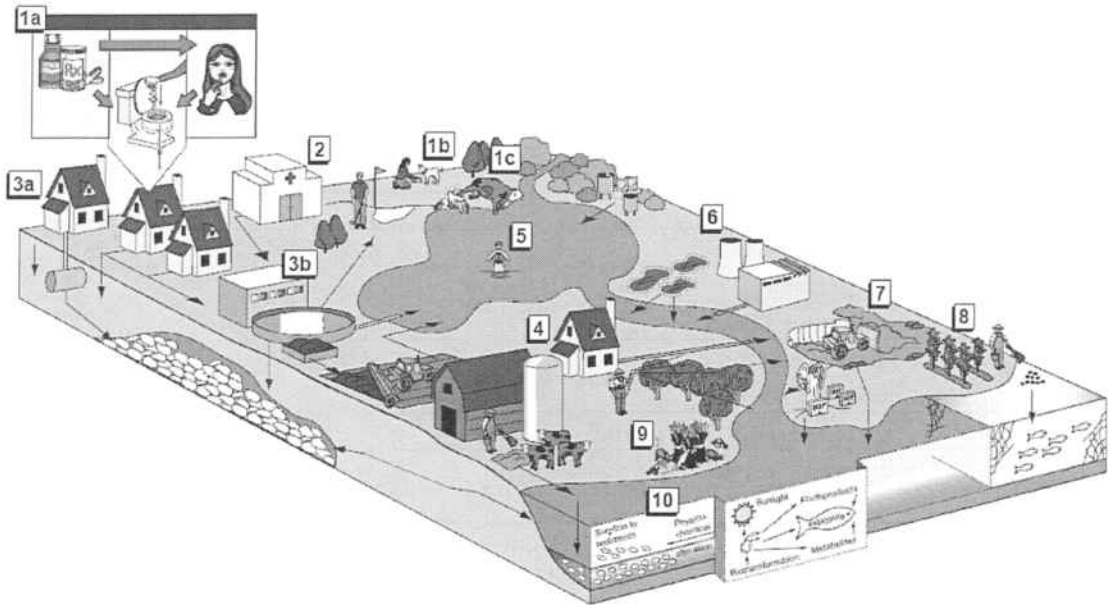
0.024	Salida EDAR	Japón		[55]
0.027	Entrada EDAR	Japón		[55]
0.030	Salida EDAR	Italia		[57]
0.050	Agua residuales urbanas			[59]
0.059	Salida estación para reutilización		Concentración máxima	[60]
0.063	Riachuelos	Iowa - EEUU	Concentración máxima con caudales bajos	[61]
0.070	Salida EDAR	Francia		[57]
0.070	Salida EDAR	Kallby - Suecia		[58]
0.090	Salida EDAR	Francia		[57]
0.090	Salida EDAR	Grecia		[57]
0.127	Salidas EDARs	Italia	Media de 9 plantas	[62]
0.220	Aguas subterráneas	Washington - EEUU		[34]
0.250	Entrada clarificador secundario EDAR	Galicia - España		[63]
0.250	Salida clarificador secundario EDAR	Galicia - España		[63]
0.270	Salida EDAR			[64]
0.280	Efluente secundario EDAR	Suiza	Concentración media	[65]
0.290	Efluente terciario EDAR	Suiza	Concentración media	[65]
0.300	Río	Nuevo Méjico - EEUU	Río Grande	[66]
0.310	Salida EDAR	Albuquerque - Nuevo Méjico - EEUU		[66]
0.310	Entrada EDAR			[64]
0.343	Efluente primario EDAR	Zurich - Suiza		[67]
0.344	Efluente secundario EDAR	Zurich - Suiza		[67]
0.352	Efluente terciario EDAR	Zurich - Suiza		[67]
0.352	Efluente secundario EDAR	St. Gall - Suiza		[67]
0.352	Efluente terciario EDAR	St. Gall - Suiza		[67]
0.390	Entrada EDAR	Albuquerque - Nuevo Méjico - EEUU		[66]
0.400	Salida hospital	Albuquerque - Nuevo Méjico - EEUU		[66]
0.400	Entrada EDAR	Portales - Nuevo Méjico - EEUU		[66]

0.430	Entrada EDAR	Suiza	Concentración media	[65]
0.430	Efluente primario EDAR	Suiza	Concentración media	[65]
0.470	Entrada clarificador primario EDAR	Galicia - España		[63]
0.475	Entrada EDAR	Cataluña - España	Concentración media	[68]
0.480	Aguas superficiales			[69]
0.570	Entrada EDAR			[65]
0.580	Entrada desarenador EDAR	Galicia - España		[63]
0.580	Entrada reactor biológico EDAR	Galicia - España		[63]
0.600	Entrada EDAR	Galicia - España		[68]
0.641	Efluente primario EDAR	St. Gall - Suiza		[67]
0.800	Salida hospital	Albuquerque - Nuevo Méjico - EEUU		[66]
0.860	Efluente terciario EDAR			[65]
0.871	Salidas EDARs	Canadá	Concentración máxima de 8 EDARs	[70]
1.000	Río	Reino Unido		[46]
1.000	Entrada EDAR	Hagerman - Nuevo Méjico - EEUU		[66]
1.020	Río	Steele - Ohio - EEUU	Río Cuyahoga	[34]
1.300	Salida hospital	Suecia		[71]
1.900	Riachuelos		Concentración máxima de 139	[72]
2.100	Salida hospital	Albuquerque - Nuevo Méjico - EEUU		[66]
99.000	Salida EDAR		Concentración máxima	[73]

1.4.2. Introducción de los fármacos en el ciclo del agua. Comportamiento del Sulfametoxazol (SMX) en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs)

Existen tres rutas principales a través de las cuales los productos farmacéuticos y sus metabolitos se incorporan al ciclo del agua: los vertidos de las industrias farmacéuticas, las excreciones y los desechos de fármacos excedentes a nivel doméstico y hospitalario (a través del sistema de alcantarillado) y las excreciones de ganado tratado con fármacos. Todas ellas contribuyen al aumento de la cantidad de

fármacos en el MA [22]. En la Figura 1.4.2-1 se muestra un esquema donde aparecen los orígenes y destinos de los productos farmacéuticos.



	<ul style="list-style-type: none"> · Uso en humanos (1a) y mascotas (1b): Excreción metabólica (fármaco no metabolizado original, conjugados del fármaco original y metabolitos bioactivos), sudor y vómitos
1	<ul style="list-style-type: none"> · Desecho de medicamentos no utilizados o caducados a través del sistema de saneamiento · Fugas subterráneas del sistema de alcantarillado · Desecho de cadáveres de animales sacrificados que sirven de alimento a los animales carroñeros (1c)
2	<ul style="list-style-type: none"> · Emisión de aguas procedentes de hospitales, tratados o no tratados, a los sistemas de saneamiento domésticos; también desechos de farmacias, médicos
3	<ul style="list-style-type: none"> · Vertido a fosas sépticas privadas (3a) · Efluentes tratados provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas que se vierten a aguas superficiales, se reinyectan en acuíferos o se reutilizan para riego o usos domésticos (3b) · Vertidos directos a aguas superficiales de aguas sin tratar debido a episodios tormentosos o fallos en el sistema de depuración · Transferencia de sólidos residuales ("biosólidos") al campo (p. ej., fertilización de tierras)
4	<ul style="list-style-type: none"> · Vertido directo de aguas residuales domésticas a aguas superficiales · Emisiones provenientes de la agricultura: pulverizaciones en plantaciones de árboles (p. ej., antibióticos) · Excrementos de granjas
5	<ul style="list-style-type: none"> · Vertidos directos a aguas abiertas a través de actividades de nado, baño o higiene.
6	<ul style="list-style-type: none"> · Vertido de efluentes regulados de las industrias productoras · Vertidos o desechos de laboratorios clandestinos y uso de fármacos ilícito
7	<ul style="list-style-type: none"> · Depósito en vertederos de basuras domésticas, residuos hospitalarios y otros residuos peligrosos · Lixiviados de cementerios y vertederos mal diseñados
8	<ul style="list-style-type: none"> · Liberación directa a aguas abiertas desde piscifactorías (alimentos con fármacos y excrementos resultantes) · Potencial liberación futura desde cultivos para la producción de fármacos (granjas moleculares)
9	<ul style="list-style-type: none"> · Liberación de fármacos usados como pesticidas (doble uso)
	<p>Transporte y destino final en el medio:</p> <ul style="list-style-type: none"> · La mayoría de productos farmacéuticos finalmente transportados desde dominio terrestre a dominio acuático · Fototransformación (reacciones directas e indirectas con luz UV)
10	<ul style="list-style-type: none"> · Alteración fisicoquímica, degradación y mineralización final · Volatilización (principalmente fragancias y determinados analgésicos) · Algún consumo por parte de las plantas · Partículas respirables que contienen fármacos adsorbidos

Figura 1.4.2-1. Origen y destino de los productos farmacéuticos en el MA (adaptado de [74]).

A priori se podría pensar que la problemática está resuelta por lo que respecta a las aguas que van a ser tratadas en las EDARs. Sin embargo, estas estaciones depuradoras equipadas con tratamientos convencionales de lodos activos que han sido diseñadas para llevar a cabo la eliminación de Carbono (C) y Nitrógeno (N) así como para

controlar la contaminación microbiana, no resuelven eficazmente el problema de la presencia de estos compuestos farmacéuticos contaminantes [53, 75].

Durante el tratamiento de las aguas, los productos farmacéuticos que llegan a las EDARs sufren una distribución entre la fracción soluble y la sólida, que incluye los lodos primarios y secundarios. Muchos de los compuestos farmacéuticos presentes en la fracción soluble no son completamente eliminados durante el proceso y, por lo tanto, son liberados al MA con el efluente de salida. La parte que se absorbe/adsorbe en los lodos, que puede constituir una ruta importante para este tipo de contaminantes [76], también pasa a liberarse al MA (en el caso de no ser degradados) con la salida de los lodos excedentes. Algunas publicaciones certifican la presencia de fármacos en los lodos procedentes de las estaciones de depuración [77, 78, 79]. Es importante tener información acerca de las proporciones de reparto entre la fase líquida y la sólida para conocer realmente el proceso de eliminación de los fármacos en estas situaciones, en el caso de que éste exista.

Una buena aproximación comúnmente empleada para determinar la fracción de un producto que se absorbe/adsorbe en los lodos es el uso la constante de reparto sólido-líquido (K_d , en $L \cdot kg^{-1}$), definida como la relación entre las concentraciones en las fases sólida y líquida en condiciones de equilibrio (Ec. 1).

$$K_d = \frac{C_{ab/ad}}{SST \cdot C_{disuelto}} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde $C_{ab/ad}$ es la concentración de fármaco en el lodo ($\mu g \cdot L^{-1}$), $C_{disuelto}$ la concentración disuelta del compuesto ($\mu g \cdot L^{-1}$) y SST la concentración de Sólidos Suspendidos Totales ($kg \cdot L^{-1}$). Este coeficiente tiene en cuenta los siguientes mecanismos [76]:

- *Absorción*, que se refiere a las interacciones de los grupos alifáticos y aromáticos de un compuesto con la membrana lipofílica celular del microorganismo y con las fracciones lipídicas del lodo. Está relacionada con la lipofilicidad de la sustancia, caracterizada por la constante de reparto octanol-agua (K_{ow}).
- *Adsorción*, que se refiere a la adherencia física o atracción entre iones y moléculas con la superficie de otra molécula. Está relacionada con las interacciones electrostáticas de los grupos cargados positivamente de los compuestos con las superficies cargadas negativamente de los microorganismos, y, por lo tanto, relacionada con la tendencia de una sustancia a ionizarse o disociarse en fase acuosa que viene caracterizada por su constante de disociación. En general, las moléculas cargadas negativamente no se adsorberán mientras que, la adsorción de sustancias cargadas positivamente, estará más favorecida debido a interacciones del tipo *Van der Waals*.

Existe una evidente escasez y contrariedad de información entorno a las concentraciones de fármacos detectados en los lodos, debido, probablemente, a las

dificultades inherentes asociadas a los análisis de muestras. La constante K_a parece una herramienta útil para predecir la distribución de los compuestos entre fases. Sin embargo, se necesita una determinación precisa de estos coeficientes ya que desviaciones relativamente pequeñas en sus valores pueden conducir a conclusiones dispares sobre los mecanismos de eliminación responsables de la eliminación de un compuesto concreto [80].

Por lo que respecta al caso concreto del antibiótico estudiado, el estado del arte apunta lo siguiente:

- La cantidad de SMX que se absorbe/adsorbe en los lodos del tratamiento primario de las EDARs puede considerarse no relevante ya que su $K_{d,primario}$ presenta un valor bajo (400 L kg^{-1}) [81].
- La constante de reparto para lodos secundarios, $K_{d,secundario}$, también presenta valores bajos (260 L kg^{-1}) que permiten considerar despreciable tanto la cantidad de antibiótico eliminada con el exceso de lodos como la cantidad absorbida/adsorbida que se marcha con el efluente del clarificador secundario. Por lo tanto, la transformación del SMX puede ser evaluada simplemente comparando la concentración en el afluente y el efluente [81, 65, 82].

Una vez descartada la eliminación de SMX de las aguas en las EDARs por efectos de absorción/adsorción en los sólidos, es necesario estudiar la degradación biológica del mismo. Se han determinado constantes cinéticas de degradación biológica (k_{biol} ; $\text{L g}_{sólidos}^{-1} \text{ d}^{-1}$) para diferentes fármacos, hormonas y productos de cuidado e higiene personal. Como se puede observar en la Figura 1.4.2-2, los valores determinados son muy diversos dependiendo de la sustancia en cuestión. Los estudios llevados a cabo por Joss et al. (2006) [82] proponen diferentes eliminaciones biológicas en función de los valores de k_{biol} :

- $k_{biol} < 0.1$: eliminación por degradación no sustancial (< 20%)
- $0.1 < k_{biol} < 10$: eliminación parcial (entre un 20 y un 90%)
- $k_{biol} > 10$: eliminación mayor al 90% por degradación biológica.

Algunos de los valores presentados para k_{biol} difieren de otros encontrados en la literatura. Los motivos de tales variaciones podrían ser explicados por: i) concentraciones experimentales más elevadas, ii) tipo de lodo (edad, composición del agua residual, diversidad de la actividad y proporción activa de la biomasa, tamaño del flóculo) o iii) diferente manipulación de los lodos antes de la determinación (conservación, alimentación sintética...).

Ciñéndose a los valores mostrados en la Figura 1.4.2-2, a priori, de los 35 compuestos que aparecen en la tabla, 17 de ellos no sufrirían una transformación biológica considerable, según los rangos descritos para los diferentes valores de k_{biol} . Cabe destacar que entre estos compuestos aparecen las sulfonamidas. Concretamente para

el caso del antibiótico SMX, tanto éste ($k_{\text{biol}} \approx 0.1$) como otros estudios [63, 65, 81] presentan una muy baja eliminación del antibiótico por degradación biológica en las EDARs.

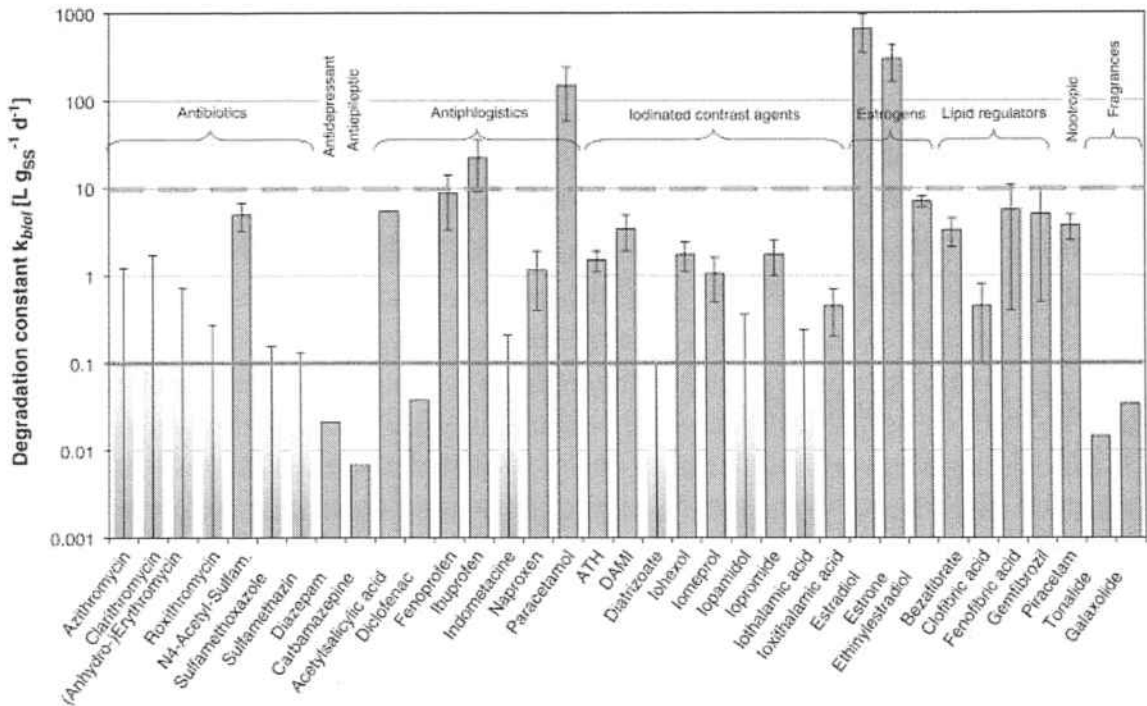


Figura 1.4.2-2. Constantes cinéticas de degradación para 35 fármacos, hormonas y productos de cuidado e higiene personal, observadas en lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas. Son valores medios determinados con diferentes tipos de lodos (lodos activos convencionales y de biorreactores de membrana). Las barras de error indican un intervalo de confianza del 95%. Para las sustancias representadas por columnas con fundido grisáceo sólo fue posible la determinación del límite superior de k_{biol} (barra de error superior) por problemas de resolución (adaptado de [82]).

Cuando se habla de eliminación biológica de SMX, se debe prestar especial atención a la presencia del metabolito humano mayoritario del SMX: el N4-acetilsulfametoxazol. Aproximadamente el 50% de las dosis de SMX ingerida se excreta en forma de su metabolito mayoritario, mientras que sólo el 15% del SMX se excreta en su forma original [65]. Dicho metabolito no se absorbe/adsorbe en los lodos [65], sin embargo, su k_{biol} presenta valores mucho más elevados (Figura 1.4.2-2), por lo que desaparece rápidamente en los tratamientos biológicos (sobre todo para edades de lodo bajas) [65, 81, 82]. Lo realmente importante de este hecho es que todo indica que el metabolito se degrada biológicamente retransformándose en el antibiótico original. Por esta razón, son muchas las publicaciones que tratan al compuesto original y a su metabolito en conjunto cuando se refieren a su eliminación. En este caso, se reportan eliminaciones conjuntas cercanas al 50% [65, 81].

También hay que prestar atención a la posible formación y destrucción de conjugados. Se especula con que procesos desconocidos de conjugación del SMX durante el contacto con lodos activos, y su posterior desconjugación, podrían ser los causantes de inexplicables variaciones en la concentración a lo largo del proceso

biológico. Cabe también la posibilidad de que determinados conjugados que no son detectados en un punto determinado del proceso, se retransformen en el compuesto original durante el tratamiento biológico. Este parece ser un problema común para las sulfonamidas durante su seguimiento en procesos biológicos [82].

Las pequeñas cantidades de antibiótico que pudiesen ser eliminadas de la corriente acuosa por quedar absorbidas/adsorbidas en los lodos del tratamiento secundario, parecen no ser un problema relevante puesto que son completamente eliminadas en la digestión anaerobia de los lodos. En los casos estudiados se observó una eliminación total del antibiótico independientemente de la temperatura de trabajo (digestión termofílica o mesofílica) y del Tiempo de Retención de los Lodos (SRT) en el proceso de digestión [83, 65, 84, 85].

1.5. El agua y la industria

El 59% del consumo total de agua en los países desarrollados se destina a uso industrial, el 30% a consumo agrícola y un 11% a gasto doméstico, según se constata en el primer informe de Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos del mundo, Agua para todos, agua para la vida (marzo 2003). En 2025, el consumo anual de agua destinada a uso industrial alcanzará los 1.170 km³, cifra que en 1995 se situaba en 752 km³. El sector productor no sólo es el que más gasta, también es el que más contamina. Más de un 80% de los desechos peligrosos del mundo se producen en los países industrializados, mientras que en las naciones en vías de desarrollo un 70% de los residuos que se generan en las fábricas se vierten al agua sin ningún tipo de tratamiento previo, contaminando así los recursos hídricos disponibles.

El agua es tanto un derecho como una responsabilidad, y tiene valor económico, social y ambiental. Cada ciudadano, cada empresa, ha de tomar conciencia de que el agua dulce de calidad es un recurso natural, cada vez más escaso tanto a nivel superficial como subterráneo, necesario no sólo para el desarrollo económico, sino imprescindible como soporte de cualquier forma de vida en la naturaleza. No cabe duda de que la industria es motor de crecimiento económico y, por lo tanto, clave del progreso social. Sin embargo, demasiado a menudo la necesidad de maximizar el proceso productivo excluye de la planificación la tercera pata del progreso, la protección del MA.

El adecuado tratamiento de las aguas residuales industriales y su posterior reutilización para múltiples usos contribuye a un consumo sostenible del agua y a la regeneración ambiental del dominio público hidráulico y marítimo y de sus ecosistemas.

La Agenda 21, surgida de las conversaciones de Río 92, concluye en el capítulo 30 que las políticas y operaciones comerciales e industriales pueden desempeñar un papel decisivo en la conservación medioambiental y el mantenimiento de los recursos si se incrementa la eficacia de los procesos de producción y se adoptan tecnologías y procedimientos limpios, reduciendo al mínimo, e incluso evitando, los desechos.

En el ámbito europeo, la Directiva 2000 incorpora la calidad como objetivo de la política general del agua, lo que supone un impulso para las técnicas y tecnologías - presentes y futuras, gracias a la investigación- encaminadas a que el agua retorne a la Tierra, una vez utilizada, en condiciones que no sólo permitan la supervivencia, sino la regeneración de algunos de nuestros ecosistemas.

1.6. Problemática específica del sector de la química fina farmacéutica. El caso del Sulfametoxazol (SMX)

Como se apuntó en la sección 1.4.1., los motivos que llevaron a la elección del antibiótico SMX como contaminante modelo para la realización de esta tesis fueron el hecho de ser catalogado como no biodegradable y el de ser el representante más conocido de uno de los grupos más ampliamente utilizados de antibióticos.

Un palpable secretismo rodea a la efectividad de los sistemas de tratamiento de aguas residuales generadas en las empresas del sector de la química fina farmacéutica. La diversidad y características de los compuestos presentes en dichas aguas residuales hacen que el tratamiento de las mismas se presente como una tarea complicada. La legislación sobre calidad de aguas fija valores máximos de vertido para diferentes parámetros pero en ningún momento establece concentraciones máximas específicas para compuestos a priori peligrosos como podrían ser los antibióticos. Esto permite que las empresas farmacéuticas puedan verter sus aguas sin incumplir la legislación vigente, pero conteniendo todavía elevadas cantidades de productos potencialmente peligrosos para el MA.

Los tratamientos biológicos, que son actualmente los más eficientes para la eliminación de C, N y agentes patógenos de las aguas residuales, no parecen ser los más apropiados cuando, en las aguas a tratar, aparecen compuestos como los antibióticos, que han sido precisamente diseñados para acabar con la vida de las bacterias o para frenar su desarrollo. Los efectos de mezclado y dilución de las aguas residuales en las empresas del sector permiten que las concentraciones de antibióticos a la entrada del proceso de depuración sean relativamente bajas, lo que facilita que los posibles efectos tóxicos e inhibidores de estos, no afecten de manera plausible, en muchas ocasiones, a los microorganismos involucrados en el proceso. Sin embargo, los problemas ocasionados por concentraciones variables o puntualmente elevadas en los tratamientos biológicos, son sobradamente conocidos, pese al desmentido de las empresas productoras. Concentraciones de entrada puntualmente elevadas podrían malograr fácilmente la biomasa de los tratamientos biológicos conduciendo al mal funcionamiento del sistema de depuración y a gastos adicionales de recuperación de la instalación.

Las características de estos contaminantes hacen que estos no sean eliminados con garantías en muchos de los actuales tratamientos que se llevan a cabo en origen, incluso cuando se utilizan tecnologías costosas como la nanofiltración y la ósmosis inversa. Tampoco serán eliminados posteriormente en los tratamientos convencionales de las EDARs ya que estos no son eficientes en la degradación de productos farmacéuticos.

Estos contaminantes emergentes podrían ser candidatos a ser regulados en un futuro, por lo que parece interesante comenzar a plantear soluciones alternativas de tratamiento para aquellos compuestos que sean potencialmente más problemáticos. Este sería el caso de la molécula elegida, el SMX. Este contaminante tiende a permanecer en la fase líquida facilitando su dispersión y no se degrada en los tratamientos biológicos convencionales de las EDARs. Por estos motivos, permanecerá durante largos periodos de tiempo en el MA.

El tratamiento en origen de estos fármacos, de manera efectiva y evitando su dilución, mitigaría los efectos adversos sobre el MA. En el apartado 3. de este trabajo se expone la estrategia propuesta con esta finalidad.

2. TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS INDUSTRIALES

En este apartado se recogen diversas técnicas de tratamiento de aguas residuales industriales. Éstas se han clasificado en tratamientos convencionales y emergentes.

Los tratamientos a los que se deben someter los efluentes tienen que garantizar la eliminación o recuperación del compuesto orgánico en el grado requerido por la legislación que regula el vertido del efluente o para garantizar las condiciones mínimas del proceso en el caso de reutilización o recirculación de la corriente para uso interno. El nivel máximo admisible de contaminante puede conseguirse mediante la utilización de diversas técnicas tanto destructivas como no destructivas (no alteran la estructura química del contaminante). La aplicación de una técnica no destructiva se entiende como una etapa previa de concentración antes de abordar su destrucción química, ya que estos tratamientos no eliminan el problema de la contaminación sino que sólo lo trasladan a otro medio. Por lo que respecta a las técnicas destructivas, el carácter oxidable de la materia orgánica hace que la transformación consista, en último extremo, aunque no necesariamente, en la mineralización o conversión a dióxido de carbono y agua. En muchos casos, el objetivo de los procesos de oxidación no es la mineralización completa, con conversión del carbono orgánico a dióxido de carbono, sino la transformación de los contaminantes en sustancias biodegradables que no originen problemas de inhibición de biomasa en tratamientos biológicos convencionales o que permitan la descarga sin originar problemas de ecotoxicidad.

La aplicación de un método destructivo u otro depende fundamentalmente de la concentración del contaminante y del caudal de efluente. Determinadas técnicas como la incineración y algunos tratamientos de oxidación, son utilizables sólo cuando la concentración de compuestos orgánicos es elevada, mientras que otras, como la adsorción y los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs), son útiles en efluentes con baja concentración de contaminante [86].

2.1. Tecnologías convencionales

Son muchas las técnicas de tratamiento con larga tradición que no han dejado de ser imprescindibles a la hora de tratar aguas industriales. Se presentan a continuación una clasificación basada en la forma en que los contaminantes pueden encontrarse en el agua: como materia en suspensión, materia coloidal o materia disuelta.

2.1.1. Tratamientos para la eliminación de materia en suspensión o materia coloidal

La materia en suspensión puede ser de muy diversa índole, desde partículas de varios centímetros y muy densas (normalmente inorgánicas), hasta suspensiones coloidales muy estables y con tamaños de partícula de hasta unos pocos nanómetros (normalmente de naturaleza orgánica). Las operaciones para eliminar este tipo de contaminación de aguas suelen ser las primeras en efectuarse, dado que la presencia de partículas en suspensión suele ser indeseable en muchos otros procesos de tratamiento.

La eliminación de esta materia en suspensión se suele hacer mediante operaciones mecánicas. Sin embargo, en muchos casos, y para favorecer esa separación, se utilizan aditivos químicos, denominándose en este caso tratamientos químico-físicos. Entre los métodos mecánicos encontramos los siguientes: desbaste, sedimentación, filtración y flotación. En aguas industriales, la materia en suspensión suele estar formada por partículas de muy pequeño tamaño (10^{-6} - 10^{-9} m), constituyendo suspensiones coloidales estables debido, en muchas ocasiones, a interacciones eléctricas entre las partículas. En estos casos, un tratamiento mecánico clásico resulta inviable. La adición o formación "*in situ*" de ciertos reactivos químicos que desestabilicen la suspensión coloidal y favorezcan la floculación de las partículas (coagulación-floculación y electrocoagulación). De esta forma, la materia en suspensión tiene unas características mucho más adecuadas para su eliminación mecánica, según las operaciones mencionadas arriba.

2.1.2. Tratamientos para la eliminación de materia disuelta

Dentro de este apartado encontramos técnicas como la precipitación, los procesos electroquímicos de oxidación-reducción, el intercambio iónico, la adsorción (carbón activado, zeolitas, arcillas, biopolímeros...) y la desinfección (Cl_2 , hipoclorito sódico, ClO_2 ...)

Algunos de estos tratamientos están siendo desplazados, especialmente en el caso de las aguas industriales, por otros más avanzados y emergentes, como son los POAs y las operaciones con membrana.

2.1.3. Tratamientos biológicos

Constituyen una serie de importantes procesos de tratamiento que tienen en común la utilización de microorganismos (entre las que destacan las bacterias) para llevar a cabo la eliminación de componentes indeseables del agua, aprovechando la actividad metabólica de los mismos sobre esos componentes. La aplicación tradicional consiste en la eliminación de materia orgánica biodegradable, tanto soluble como coloidal, así como la eliminación de compuestos que contienen elementos nutrientes (N y P). Es uno de los tratamientos más habituales en buena parte de las aguas industriales.

En la mayor parte de los casos, la materia orgánica constituye la fuente de energía y de carbono que necesitan los microorganismos para su crecimiento. Además,

también es necesaria la presencia de nutrientes, que contengan los elementos esenciales para el crecimiento, especialmente los compuestos que contengan N y P. En el metabolismo bacteriano juega un papel fundamental el elemento aceptor de electrones en los procesos de oxidación de la materia orgánica. Atendiendo a cual es dicho aceptor de electrones distinguimos tres casos: sistemas aerobios (O_2), anaerobios (CO_2 o la propia materia orgánica) y anóxicos (NO_3^-).

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, existe una gran variedad de formas de operar, dependiendo de las características del agua, así como de la carga orgánica a tratar.

2.2. Tecnologías emergentes

Las podemos dividir en tecnologías de oxidación y tecnologías de membrana. A su vez, las tecnologías de oxidación se podrían dividir en dos categorías: i) procesos de oxidación directa, que utilizan oxígeno como agente oxidante e incluyen la incineración, la oxidación húmeda (WAO), la oxidación húmeda catalítica (CWAO) la supercrítica (SWAO) y la oxidación anódica (AO) o electroquímica; y ii) POAs.

En esta clasificación se va a reservar la denominación de avanzados para los procesos basados específicamente en la promoción de radicales hidroxilo. Muy frecuentemente los procesos de oxidación húmeda se incluyen dentro de los POAs ya que la química del proceso transcurre por vía radicalaria y los radicales hidroxilo podrían estar entre los agentes oxidantes indirectos formados a partir del Oxígeno.

La incineración resulta una técnica costosa además de impopular en el tratamiento de efluentes líquidos. Los procesos de oxidación húmeda precisan de instalaciones costosas debido a las condiciones de trabajo (T y P elevadas) y a la fuerte incidencia de la corrosión. Además, tienen la limitación de que requieren concentraciones elevadas de materia orgánica en el medio de reacción. Ya que han constituido gran parte del objeto de estudio de este trabajo, los POAs se tratan en un capítulo por separado.

Por lo que respecta a las membranas, éstas son barreras físicas semipermeables que separan dos fases, impidiendo su íntimo contacto y restringiendo el movimiento de las moléculas a través de ella de forma selectiva. Este hecho permite la separación de las sustancias contaminantes del agua, generando un efluente acuoso depurado. La rápida expansión, a partir de 1960, de la utilización de membranas en procesos de separación a escala industrial ha sido propiciada por dos hechos: la fabricación de membranas con capacidad para proporcionar elevados flujos de permeado y la fabricación de dispositivos compactos, baratos y fácilmente intercambiables donde disponer grandes superficies de membrana.

2.2.1. Procesos de Oxidación Avanzada (POAs)

Los POAs se definen como aquellos procesos de oxidación que implican la generación y uso de radicales hidroxilo ($\cdot OH$) para atacar, de manera eficiente,

compuestos orgánicos solubles o dispersos. En la literatura se pueden encontrar diferentes definiciones como las que siguen a continuación:

- “Procesos que involucran la generación de radicales hidroxilo en cantidad suficiente como para producir la purificación del agua” [87].
- “Técnicas alternativas para catalizar la producción de radicales hidroxilo” [88].
- “Procesos de tratamiento de agua llevados a cabo a temperatura y presión ambiente basados en la generación de radicales hidroxilo para iniciar la destrucción oxidativa de compuestos orgánicos” [89].
- “Métodos de oxidación en fase acuosa en el mecanismo de los cuales intervienen especies altamente reactivas tales como los radicales hidroxilo que conducen a la destrucción de los contaminantes objetivo” [49].
- “Procesos de oxidación aplicados a la degradación de compuestos contaminantes presentes en aire, suelo o agua basados en la presencia y reactividad del radical hidroxilo generado en condiciones normales o subcríticas de presión y temperatura con o sin catalizador y/o energía reactiva (electroquímica, UV-Vis o ultrasonidos)” [90].

Se trata de una familia de métodos que utilizan la elevada capacidad oxidante de los radicales hidroxilo y que se diferencian entre sí en la forma en la que los generan. Una consecuencia de la elevada reactividad de la especie oxidante es que los POAs se caracterizan también por su baja selectividad; pero lo que en un proceso de producción podría considerarse una desventaja, es sin embargo una característica deseable en el caso de la eliminación de contaminantes de aguas residuales. En la Figura 2.2.1-1 se presenta una relación completa de los POAs existentes.

Por otro lado, la Figura 2.2.1-2 indica los rangos de aplicación sugeridos para los diferentes POAs. Muestra las zonas donde las diferentes tecnologías son más efectivas según los autores. Los límites de utilización que establece la figura deben ser exclusivamente tomados como guía ya que cada caso debe ser analizado particularmente.

Las tecnologías de oxidación química que se han utilizado en el presente trabajo (foto-Fenton y UV/H₂O₂) fueron correctamente seleccionadas según los criterios de la figura, ya que se pretenden aplicar al tratamiento de aguas de lavado o proceso de la industria farmacéutica (el producto final se obtiene por precipitación en medio acuoso [91]), donde el contaminante se encontrará relativamente concentrado y donde las cantidades de agua involucradas serán moderadas.

Condiciones de P y T / Catalizador / Agente oxidante / Fuente reactiva de energía / Denominación

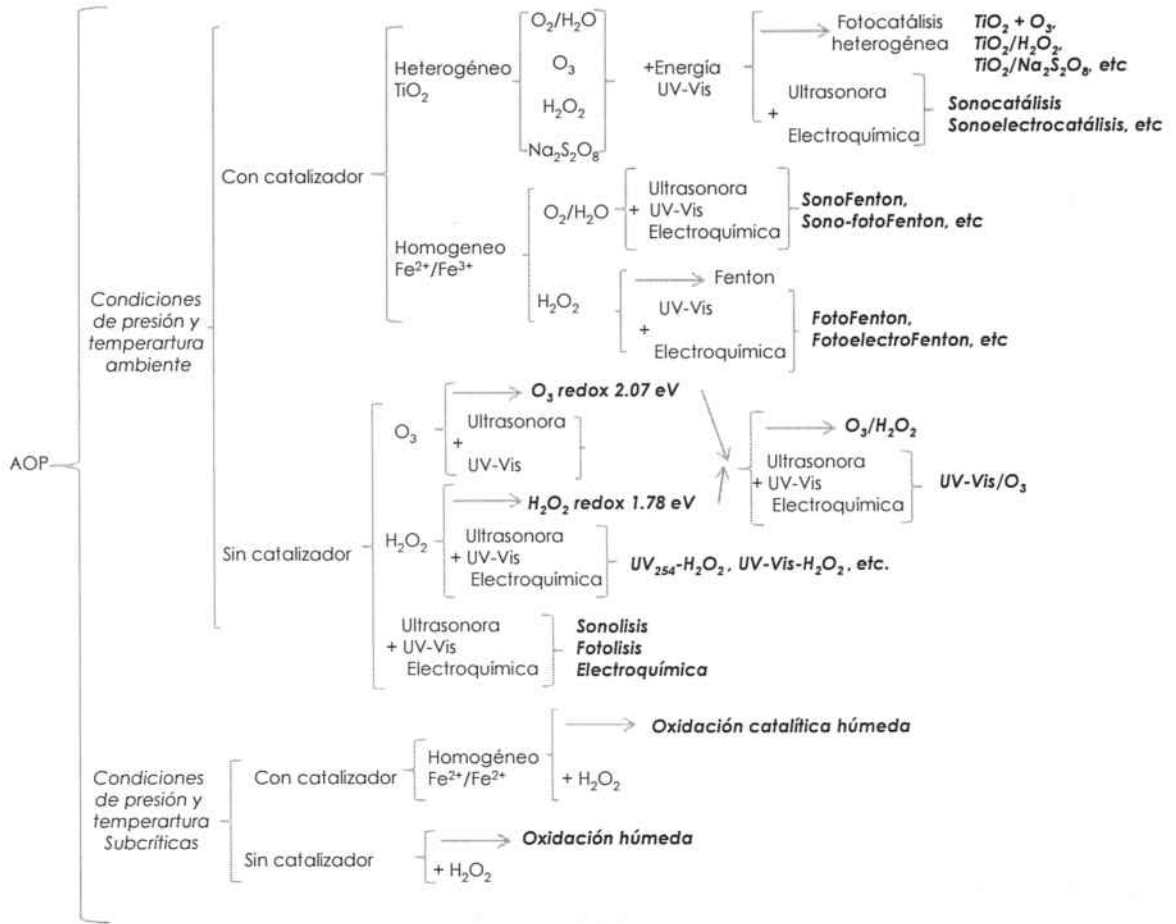


Figura 2.2.1-1. Clasificación de los POAs según las condiciones de P y T, presencia o no de catalizador, agente oxidante, fuente reactiva de energía y varias denominaciones comúnmente aplicadas (adaptado de Méndez-Arriaga (2009) [90]).

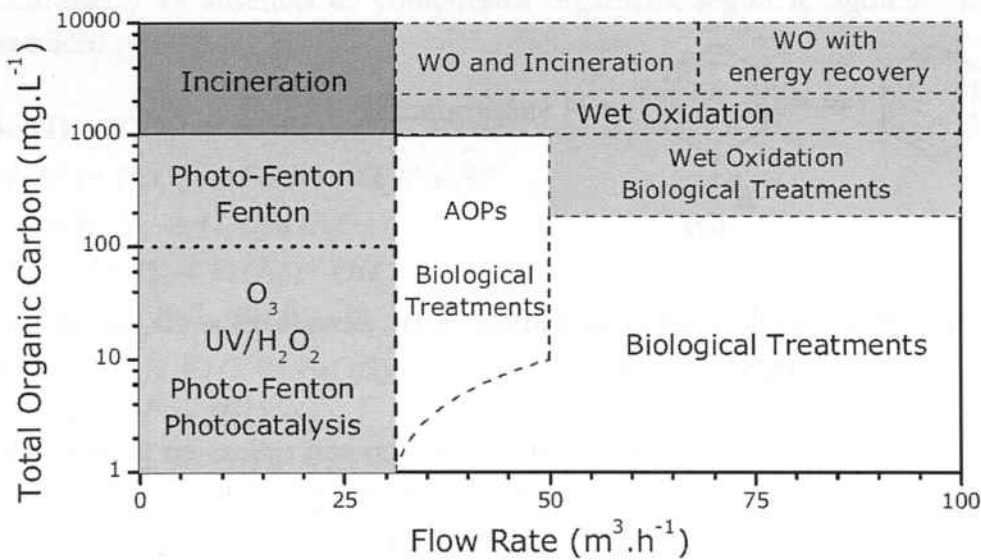


Figura 2.2.1-2. Rangos de aplicación para diferentes POAs. Adaptado de Hancock (1999) [92] y García-Molina (2006) [93].

En la literatura se pueden encontrar algunos trabajos que tratan la oxidación del antibiótico SMX mediante diferentes POAs: ozonización, proceso foto-Fenton y fotocátalisis (TiO_2) [94, 95, 96, 97, 98, 99]. Andreozzi et al. (2004) [100] aplicaron tres POAs: ozonización, UV/ H_2O_2 y fotocátalisis a mezclas de productos farmacéuticos que incluían SMX entre otros, concluyendo que la ozonización condujo a los mejores resultados por lo que a la eliminación de la toxicidad global de la mezcla se refiere. Existen también referencias que tratan la degradación del SMX utilizando otras técnicas: oxidación con K_2FeO_4 [101], reacciones con HOCl/OCl^- [102] y fotólisis directa en soluciones ácidas [103].

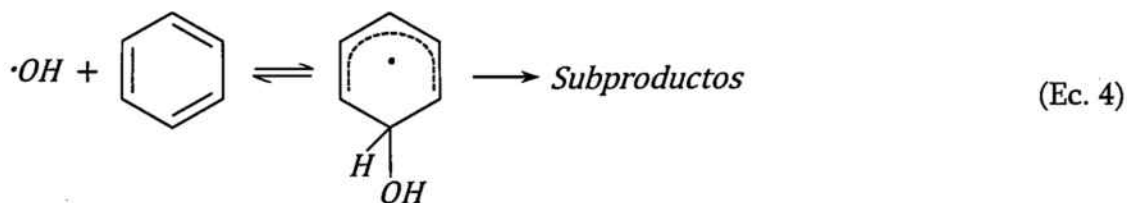
2.2.1.1. El Radical Hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

El radical hidroxilo es una especie de tiempo de vida corto, inferior a 70 ns en agua [104], que reacciona de manera prácticamente instantánea en el mismo momento de la generación. El radical $\cdot\text{OH}$ es la segunda especie oxidante con mayor potencial redox (2.80 eV), tan sólo por debajo del flúor. Actúan de manera no selectiva sobre los compuestos orgánicos y, según Pignatello et al. (2006) [105], de tres maneras diferentes:

- Por abstracción de un átomo de H proveniente de enlaces C-H, N-H u O-H, formando agua:



- Por adición electrófila del radical a un doble enlace C=C o a un anillo aromático (es decir, por hidroxilación):



- Por transferencia electrónica al radical $\cdot\text{OH}$, aunque esta vía se da muy raramente con compuestos orgánicos.

Las reacciones por abstracción de átomos de hidrógeno son típicas en presencia de alcanos o alcoholes, mientras que la hidroxilación es más probable con alquenos y compuestos aromáticos. Las moléculas aromáticas que contienen grupos activantes donadores de electrones (como -OH, -NH₂, etc.) reaccionan más rápidamente que las que tienen grupos desactivantes aceptores (como -NO₂, -COOH, etc.) [106]. Normalmente, los sustituyentes activantes orientan la entrada del radical hidroxilo

en las posiciones *orto* y *para*, mientras que los sustituyentes desactivantes orientan el ataque en *meta*. El ataque sucesivo de los radicales sobre el anillo aromático lo fragiliza y produce su apertura dando pie a la formación de compuestos alifáticos insaturados (ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos como ácido fumárico, maléico, etc.). La formación de subproductos intermedios depende de muchos factores, como la cantidad de $\cdot\text{OH}$ generados, la presencia de otros radicales, la cantidad de agentes secuestrantes (*scavengers*), la concentración del contaminante u oxígeno presentes, etc. Los compuestos de degradación formados reaccionan consecutivamente dando lugar a la formación de compuestos de cadena cada vez más corta como ácidos alifáticos así como CO_2 , agua o sales inorgánicas.

Finalmente y ya que los procesos de oxidación utilizados involucran el uso de H_2O_2 , parece interesante comentar que los radicales $\cdot\text{OH}$ generados en elevadas concentraciones dimerizarán rápidamente para generar de nuevo peróxido de hidrógeno, y que, un exceso de H_2O_2 provocaría también la formación de radicales hidroperóxido ($\text{HO}_2\cdot$) al reaccionar con los propios radicales hidroxilo, lo cual es contraproducente por la muy inferior reactividad de estos y su aparente baja contribución a la degradación oxidativa de sustratos orgánicos [107].

2.2.1.2. Foto-Fenton

El proceso foto-Fenton es un método eficiente para el tratamiento de aguas residuales [108]. Se sabe que este proceso mejora la eficiencia de la reacción de Fenton (Ec. 5), también llamada *dark-Fenton*, a través de la interacción de la luz con el reactivo de Fenton. Por lo tanto, el proceso foto-Fenton se basa, principalmente, en el mecanismo de Fenton, acompañado por otra serie de reacciones en las cuales interviene la luz. Es importante destacar que el mecanismo de reacción de Fenton está todavía actualmente bajo discusión. El propuesto por Barb et al. (1949, 1951) [109, 110, 111] consiste en la descomposición del H_2O_2 , en solución ácida, en la oscuridad y en ausencia de compuestos orgánicos, según la siguiente secuencia de reacción:



Es importante destacar que los radicales hidroxilo se producen según las Ecs. 5 y 12 y que la reacción que describe la Ec. 6 es algunos órdenes de magnitud más lenta que la Ec. 5. La revisión de Pignatello et al. (2006) [105] muestra con detalle información

sobre las bases de la química de la reacción Fenton así como de su aplicación al tratamiento de aguas residuales.

La reacción Fenton se acelera de manera muy significativa mediante el uso de radiación (UV y Visible). La reacción foto-Fenton conduce generalmente a velocidades de degradación y mineralización más elevadas que la clásica reacción de Fenton, ya que la producción de radicales hidroxilo se ve significativamente aumentada bajo condiciones de iluminación gracias a la fotoreducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} según la Ec. 13:



De esta forma, el ión ferroso se recicla continuamente gracias a la radiación evitando su agotamiento durante el proceso de oxidación [112]. Adicionalmente Pignatello et al. (1999) [113] presentaron la formación de complejos de Fe^{3+} (p. ej., $Fe(OH)^{2+}$), predominantemente en condiciones ácidas, los cuales absorben en el rango UV-Visible (entre 180 y 410 nm) y actúan como fuente adicional de radicales hidroxilo según se presenta a continuación:



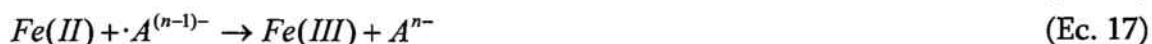
Finalmente, la revisión de Pignatello et al. (2006) [105] amplía el límite superior de longitud de onda útil en el proceso foto-Fenton hasta 500 nm, alegando que la fotólisis de algunos complejos de Fe^{3+} con ligandos orgánicos es eficiente hasta esta longitud de onda.

Es importante puntualizar en este momento que el reconocimiento de los radicales hidroxilo como intermedios activos en los mecanismos de Fenton y foto-Fenton no está universalmente admitido e incluso han surgido dudas acerca de su existencia. Interpretaciones modernas asumen que otros intermedios oxidantes como los complejos férricos de alta valencia (Fe^{4+}) se forman durante la oxidación del Fe^{2+} [114, 113]. La existencia de complejos metálicos cargados inusualmente (Fe^{5+} , Fe^{6+}) fue también probada por Rush y Bielski (1986) [115].

Dentro de los aspectos que pueden influir sobre la eficiencia o velocidad de degradación en el proceso foto-Fenton destacan las dosis de Fe^{2+} y de H_2O_2 , el pH, la temperatura y los aniones inorgánicos.

Fe y H_2O_2 : de acuerdo con los mecanismos hay reacciones adversas donde participan estas especies. Por lo tanto, un exceso de estos reactivos podría causar un contraproducente aumento de sus cinéticas. Por ejemplo, un exceso de H_2O_2 produciría una deceleración de algunos órdenes de magnitud en el proceso debido a la rápida oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} , el cual predominaría en el medio. También podría aumentar la formación de radicales hidroperoxilo según la Ec. 7, los cuales parecen no contribuir eficazmente a la degradación oxidativa de substratos orgánicos. Algunos autores afirman que la relación molar peróxido/Fe empleada en

tratamientos de aguas se sitúa entre 100 y 1000 [105]. Otro parámetro que podría tener una influencia negativa sobre el proceso es el pH [116]. Generalmente se acepta un pH óptimo de 2.8 para la reacción foto-Fenton [117]. A este pH aproximadamente la mitad del Fe^{3+} está presente como ión Fe^{3+} y la otra mitad como complejo $Fe(OH)^{2+}$, que son las especies fotoactivas. Por debajo de este pH, la concentración de $Fe(OH)^{2+}$ se reduce y por encima, el Fe^{3+} precipita en forma de oxihidróxidos. Se ha partido de este valor óptimo de pH en todos los experimentos realizados. Obviamente la temperatura afecta la cinética de la reacción, pero dependiendo del mecanismo, podría afectar o no a la eficiencia global del proceso ya que podría acelerar en mayor grado las reacciones adversas en comparación con las positivas. Lee y Yoon (2004) [118] observaron una dependencia en la velocidad de producción de radicales hidroxilo mientras que Freitas et al. (2005) [119] no encontraron una influencia significativa. Por lo que respecta a los aniones inorgánicos, especies como Cl^- , SO_4^{2-} , $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$, etc., podrían producir efectos significativos en las velocidades globales de reacción del proceso Fenton. Los aniones podrían básicamente producir 4 efectos diferentes: reacciones de complejación con cationes ferrosos o férricos; reacciones de precipitación que conducen a una disminución del Fe^{3+} disuelto activo; efecto *scavenging* de radicales hidroxilos y formación de radicales inorgánicos menos reactivos; y reacciones de oxidación que involucren estos radicales inorgánicos [120]. Los supuestos efectos *scavenging* de las especies aniónicas se muestran mediante las Ecs. 16 y 17.



donde Fe^{2+} y Fe^{3+} representan a todas las especies ferrosas y férricas respectivamente, A^{n-} es un anión inorgánico y $\cdot A^{(n-1)-}$ es un radical inorgánico. Es un efecto a tener en cuenta ya que el contenido en sales inorgánicas, especialmente en NaCl, es elevado en diferentes tipos de aguas residuales, como p. ej., las generadas durante la manufacturación de pesticidas, herbicidas, colorantes y productos farmacéuticos [121].

El proceso foto-Fenton ha sido empleado en el tratamiento de aguas contaminadas con diferentes compuestos orgánicos, p. ej., aguas residuales con colorantes, aguas del blanqueado de la pasta de papel, efluentes de la agricultura, aguas conteniendo tensoactivos, etc. Por lo que respecta a la degradación de compuestos farmacéuticos, se pueden encontrar en la literatura algunas publicaciones. Algunos ejemplos de compuestos farmacéuticos degradados mediante Fenton y foto-Fenton son: amsacrina, azatioprina, asparginasa, tiotepa, diclofenac, penicilina, α -metil-fenilglicina, metronidazol, paracetamol, biguanidas, guanidina, etc. [49].

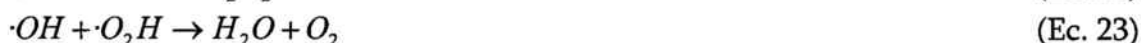
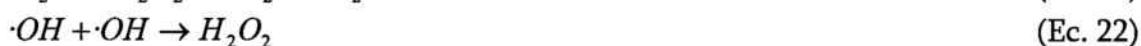
2.2.1.3. UV/H₂O₂

El mecanismo más comúnmente aceptado para la fotólisis del H₂O₂ es su ruptura homolítica con un rendimiento cuántico de dos radicales $\cdot OH$ por cada fotón de

radiación absorbido [107] según la Ec. 18. La energía de disociación para romper un enlace O-O es de 213 kJ mol⁻¹, lo que implica el uso de radiación de longitud de onda baja (200-280 nm) para que el proceso sea eficiente. Sin embargo, y como se presenta en la publicación del Apéndice I, la eficiencia del proceso UV/H₂O₂ llevado a cabo con luz solar (longitudes de onda superiores) no debe ser menospreciada.



La velocidad de la fotólisis del peróxido de hidrógeno depende del pH y aumenta con la alcalinidad del medio, muy probablemente debido al mayor valor del coeficiente molar de absorción del anión peróxido ($\epsilon_{HO_2^-} = 240 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) respecto al del peróxido de hidrógeno ($\epsilon_{H_2O_2} = 18.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 253.7 nm. Sin embargo, se sabe que el H₂O₂ desproporciona con una velocidad máxima a un pH igual a su pK_a (11.6) según la Ec. 19. De igual manera que en el proceso foto-Fenton, la eficiencia del proceso puede disminuir debido a la presencia de especies secuestrantes de radicales hidroxilo: H₂O₂, CO₃²⁻, HCO₃²⁻, NaCl, etc. Tras la reacción de iniciación (Ec. 18), el mecanismo de reacción que describe la fotólisis del H₂O₂ en agua pura sigue con las reacciones de propagación 20 y 21, y finaliza con las reacciones de terminación 22, 23 y 24 [87].



Pese a que el proceso UV/H₂O₂ presenta la flexibilidad de poder utilizarse en un rango de pH mucho más amplio en comparación con el proceso foto-Fenton y pese a que permite la obtención de un par de radicales $\cdot OH$ por cada molécula de H₂O₂, también presenta una gran desventaja: la baja absorción de la radiación de 254 nm (lámparas estándar) de por el peróxido de hidrógeno, sobre todo en los casos en los que los mismos sustratos orgánicos pueden actuar como filtros interiores de la radiación. Sin embargo, se puede aumentar la velocidad de formación de radicales utilizando lámparas de arco de Hg dopadas con Xe, que presentan una emisión elevada entre 210 y 240 nm, donde el coeficiente de absorción molar del H₂O₂ es más elevado.

A lo largo de las últimas décadas se han publicado un gran número artículos acerca del proceso UV/H₂O₂ utilizado como método para degradar contaminantes orgánicos en medio acuoso (aguas subterráneas y aguas residuales industriales) [107]. Durante los últimos años, se han llevado a cabo estudios sobre la oxidación de aguas que contenían compuestos farmacéuticos como ácido clofibrico, paracetamol, penicilina, carbamazepina, diclofenaco, metronidazol, naproxeno, iohexol, carbamazepina,

ketoprofeno, ciprofloxacino, ibuprofeno, 17β -estradiol, etc., a través del proceso UV/H₂O₂. Se han tratado efluentes farmacéuticos y aguas de proceso y también se realizaron experimentos con matrices de agua destilada, desionizada o natural [49].

3. OBJETO Y ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN

El tratamiento y reutilización de aguas residuales urbanas e industriales es una opción que viene tomando importancia en zonas de recursos hídricos escasos, lo que obliga a la mejora de las tecnologías de tratamiento. Las aguas residuales industriales tienen entre sus características habituales la presencia de contaminantes orgánicos resistentes a la degradación química convencional y tóxicos para el desarrollo de la actividad de los microorganismos en tratamientos biológicos. Concretamente, el sector químico-farmacéutico es uno de los sectores que más problemas suscita desde el punto de vista de la depuración, sobre todo por su complejidad y por los vertidos tóxicos que generan y que dificultan los tratamientos.

El objetivo del presente trabajo es proponer una tecnología de tratamiento alternativa y fiable para las aguas residuales generadas en una empresa de química fina farmacéutica, que garantice una calidad adecuada de éstas en función de la reutilización o destino que se les quiera dar. Se persigue la destrucción total de estos contaminantes en el lugar donde son generados, evitando su dispersión, y minimizando la problemática de su presencia en los diferentes medios. El sistema de tratamiento propuesto consta de una etapa química de pretratamiento y de una posterior etapa de tratamiento biológico.

Las elevadas concentraciones de compuestos orgánicos en los efluentes de este tipo de empresas facilitan que la estrategia de combinación sea una opción técnica y económicamente viable [49]. La tecnología podría ser aplicable a mezclas de diferentes aguas de proceso o lavado, conteniendo compuestos diversos, siempre siguiendo una serie de criterios que conducirían hacia una solución eficiente y económicamente atractiva:

- Selección de los compuestos farmacéuticos potencialmente más problemáticos.
- Estudio de sus propiedades en busca de las problemáticas a eliminar, p. ej., efecto inhibitorio, toxicidad, baja biodegradabilidad, etc.
- Mezcla de compuestos compatibles desde el punto de vista del pretratamiento, p. ej., para conseguir un pH adecuado que minimice la adición de reactivos para conseguir las condiciones de reacción adecuadas.
- Posibilidad de adición de etapas de concentración para alcanzar condiciones de trabajo adecuadas (p. ej., concentración mediante el uso de membranas).

Por lo tanto, sería imprescindible la segregación y estudio detallado de las distintas corrientes que generan los procesos de fabricación, para establecer un diseño concreto, estableciendo protocolos de compatibilidad que permitan optimizar el tratamiento desde un punto de vista económico.

La obtención de información fidedigna a cerca de concentraciones reales en las diferentes corrientes de los procesos de producción de las empresas del sector es complicada. Por este motivo, la investigación se centrará en el tratamiento de una

hipotética agua residual conteniendo exclusivamente 200 mg L⁻¹ del antibiótico SMX.

Los POAs implican costes relativamente elevados en comparación con los tratamientos biológicos. Sin embargo, al hablar de contaminantes no biodegradables y tóxicos, el uso de estos procesos avanzados se vuelve indispensable. Una opción económicamente interesante para tratar aguas que contienen compuestos no biodegradables o tóxicos es el acoplamiento de POAs con tratamientos biológicos. La combinación de POAs como pretratamiento para mejorar la biodegradabilidad y reducir la toxicidad, con un postratamiento biológico, ha ganado interés durante los últimos años [122]. Esta propuesta es relativamente sencilla y se basa en que i) el proceso biológico es más económico y más medioambientalmente correcto que cualquier otro tratamiento destructivo y, ii) la mineralización completa mediante POAs implica costes de tratamiento excesivos ya que los productos finales altamente oxidados que se forman durante la oxidación química suelen ser refractarios a la oxidación total por vía química. Sin embargo, estos productos finales que están típicamente representados por ácidos carboxílicos de cadena corta, pueden ser fácilmente degradados biológicamente. Con el acoplamiento se busca tanto eliminar el SMX como eliminar el C y el N presentes en la solución inicial de SMX.

A la primera etapa nos referiremos como etapa química de pretratamiento. Su finalidad es la de garantizar la compatibilidad del efluente resultante con la posterior etapa biológica. El efecto beneficioso de la preoxidación sobre las propiedades biológicas ya fue demostrado por Gotvain et al. (2007) [123] y por Kajitvichyanukul y Suntronvipart (2005) [124], quienes estudiaron respectivamente el tratamiento de un efluente de una empresa de reguladores de tensión arterial mediante oxidación húmeda (WAO) y de aguas residuales hospitalarias mediante foto-Fenton. El foto-Fenton también ha demostrado ser una tecnología prometedora utilizada para aumentar la biodegradabilidad de aguas que contienen otro tipo de especies no biodegradables como, por ejemplo, pesticidas [125].

En este trabajo, se han estudiado dos POAs diferentes (UV/H₂O₂ y foto-Fenton). Uno de ellos, junto con unas determinadas condiciones de reacción, ha sido seleccionado para llevar a cabo la integración con la etapa biológica. Los POAs seleccionados para este estudio involucran el uso de luz. Por este motivo, tras la realización de experimentos utilizando lámparas como fuente de radiación, se han llevado a cabo estudios sobre el funcionamiento de ambos procesos con radiación solar, con el objetivo de valorar la posibilidad del escalado (buscando la reducción de costes en el proceso).

Con la finalidad de valorar la efectividad de la etapa de pretratamiento desde un punto de vista biológico, se ha seguido la toxicidad aguda mediante el ensayo Microtox®, la biodegradabilidad mediante la ratio de biodegradabilidad DBO₅/DQO y el efecto inhibitor de las soluciones sobre los lodos activos a través de un Test de Inhibición (Método OCDE 209). Sin embargo, ya que la información que estos parámetros proporcionan es limitada, ha sido necesario el desarrollo de un test adicional de biocompatibilidad: el test en reactores discontinuos aerobios de biomasa suspendida (apartado 4.2.2.). La información adicional facilitada por este ensayo

permite prever más correctamente el comportamiento real que tendría un reactor biológico alimentado con los efluentes analizados.

La segunda etapa o etapa de tratamiento biológico consiste en el procesado de los efluentes seleccionados resultantes del pretratamiento químico en un SBBR. En el apartado 4.4. se comentan las ventajas que llevaron a elegir un reactor SBBR para este cometido. La finalidad es la eliminación del C restante en solución y también del N, que puede encontrarse formando parte de compuestos orgánicos o bien como iones inorgánicos. Los objetivos fijados para esta etapa de tratamiento biológico son los siguientes:

- Optimizar al máximo el Tiempo de Residencia Hidráulico (HRT) en el SBBR para la etapa aerobia donde tendrá lugar la degradación del C y también el proceso de nitrificación.
- Integrar una etapa anóxica de desnitrificación para eliminar los NO_3^- generados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Técnicas analíticas y bioensayos estandarizados

La Tabla 4.1-1 presenta un resumen de las técnicas analíticas y pruebas biológicas más empleadas a lo largo de la realización de esta tesis. También remite al lector, si procede, hacia una descripción más detallada. En los apartados que siguen a continuación se presentan algunas imágenes y aclaraciones sobre algunos de los métodos presentados en la tabla.

4.1.2. Determinación del Carbono Orgánico Total (COT)

Según la manera habitual de trabajar en el dispositivo de análisis, filtrando las muestras antes de la inyección, cabe el imaginar que al hablar de COT en esta memoria se está haciendo referencia exclusivamente al Carbono Orgánico Disuelto (COD). Sin embargo, en este caso particular, todas las medidas de COT realizadas son realmente medidas sobre el contenido total de carbono orgánico ya que todas las muestras han sido inyectadas sin filtrado previo y bajo una agitación que garantiza su homogeneidad. El carbono inorgánico presente en las muestras en forma de CO_2 disuelto y HCO_3^- ha sido eliminado mediante acidificación y borboteo de aire sintético antes del análisis.

4.1.3. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno a 5 días (DBO_5)



Figura 4.1.3-1. Dispositivo OxiTop®.

Buscando optimizar la reproducibilidad del bioensayo, se han llevado a cabo las adaptaciones necesarias en el método para substituir el inóculo comúnmente utilizado (lodos activos aerobios) por una siembra liofilizada suministrada por Cole-Parmer (5466-00 B.O.D. Capsules). La siembra precisa ser activada mediante rehidratación con aireación continuada. La Figura 4.1.3-1 muestra una imagen del sistema

OxiTop® de WTW utilizado en el análisis. La reproducibilidad de las medidas se ha visto mejorada considerablemente tras la modificación.

4.1.4. Test de inhibición con lodos activos

Siguiendo la norma descrita en el Método OCDE 209 se realizó el montaje de la instalación que se presenta en la Figura 4.1.4-1. Durante la realización de los análisis se observó un punto crítico: garantizar la correcta suspensión de la biomasa en el interior de los recipientes. La suspensión se consigue mediante la aireación llevada a cabo con difusores y, ésta, fácilmente puede conducir hacia la formación de espumas con la consecuente pérdida de biomasa. Una disminución en la concentración de microorganismos influye drásticamente sobre las cinéticas de consumo de OD. Por este motivo es importante que el montaje disponga de los dispositivos necesarios para controlar perfectamente, de manera individual, la aireación en cada una de las botellas.

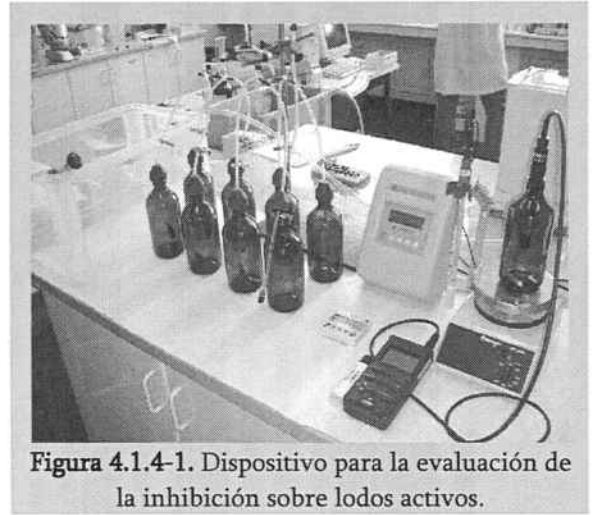


Figura 4.1.4-1. Dispositivo para la evaluación de la inhibición sobre lodos activos.

Tabla 4.1-1. Sumario de las técnicas analíticas y bioensayos estandarizados más utilizados durante la realización del trabajo.

PARÁMETRO	TÉCNICA / DISPOSITIVO	MARCA	REFERENCIA
[SMX]	Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)	Waters®	Apéndice II: "2.1. Experimental device and procedure"
COT	Analizador de COT	Shimadzu TOC-VCSN	
DOO	Colorimetría		Apéndice II: "2.1. Experimental device and procedure"
N _{total}	Kits para espectrofotómetro	Hach Test N Tube™ Vials. Persulfate Digestion Method	
[NO ₃]	Kits para espectrofotómetro Electrodo de nitratos Cromatografía iónica ^a	Hach Permachem® Reagents. NitraVer® 5 Symphony, VWR Waters®/Kontron®	
	Kits para espectrofotómetro	Hach Test N Tube™ High Range Ammonia	
[NH ₄ ⁺]	Electrodo de amonio y electrodo de referencia Espectrofotometría de análisis por inyección de flujo (FLA)	Symphony, VWR Ismatec Asia	
[SO ₄ ²⁻]	Cromatografía iónica ^a	Waters®/Kontron®	
[H ₂ O ₂]	Tiras indicativas Determinación por volumetría yodométrica ^b	Macherey-Nagel. Quantofix® test sticks	
	Colorimetría ^c		
Medidas de absorbancia /	Espectrofotómetro UV/Vis	Perkin Elmer Lambda 20	
Determinación de	Espectrofotómetro Vis	Hach DR 2500	
espectros	Espectrofotometría Vis	Thermo Spectronic Genesys 20	
OD	Sonda Sonda Sonda	Crison Oxi 330i Symphony, VWR Orion Model 97-08	
DBO ₅	Método respirométrico	WTW OxiTop®	Apéndice II: "2.1. Experimental device and procedure"

Tabla 4.1-1. Sumario de las técnicas analíticas y bioensayos estandarizados más utilizados durante la realización del trabajo.

PARÁMETRO	TÉCNICA / DISPOSITIVO	MARCA	REFERENCIA
Toxicidad Agua	Medida de la disminución de luminosidad de <i>Vibrio fischeri</i>	Microtox [®] toxicity test, Azur Environmental	Apéndice II: "2.2. Microtox [®] test"
Test de Inhibición	Test de inhibición con lodos activos		Apéndice II: "2.3. Activated sludge inhibition test"
Visualización de microorganismos	Microscopia de escaneo electrónico		Apéndice V: "2.5. Scanning electron microscopy (SEM)"
Determinación de comunidades bacterianas	Técnicas de biología molecular		Apéndice IV: "Molecular Biology Techniques"
Medidas de radiación	Actinometría (oxálico-uranilo)		[126]
	Radiómetro (254 nm)	UVX radiometer UVP (UVX-25 sensor)	
	Radiómetro (360 nm)	UVX radiometer UVP (UVX-36 sensor)	
	Radiómetro (300-400 nm)	KIPP&ZONEN modelo CUV3	
SST	Filtrado y secado ^d		
SSVT	Filtrado, secado y calcinación ^e		

^a Cromatógrafo iónico: provisto de detector de conductividad Waters 432 y detector UV/Vis Kontron 332 (bajas concentraciones de NO₃). Columna Waters IC-PAK ANIONS de resina de polimetacrilato con grupo funcional de amonio cuaternario. Fase móvil: ácido bórico, gluconato sódico, acetomitrilo y glicerina (2 mL min⁻¹). Necesario filtrar las muestras (0.45 µm) y eliminar la materia orgánica procesando las muestras con una resina SEP-PAK C-18 de Waters.

^b Yodometría: la substancia oxidante (H₂O₂) se mezcla con un exceso de yoduro (I⁻). Por oxidación, se forma una determinada cantidad de yodo, que se compleja con el yoduro en exceso dando lugar a tri-yoduro (I₃⁻). Finalmente, este I₃⁻ se valora por volumetría con una solución estándar de tiosulfato, usando almidón como indicador.

^c Medida del Fe disuelto: Método ISO 6332. El catión Fe²⁺ forma un complejo coloreado con 1,10-fenantrolina. La absorción de este complejo medida a 510 nm es proporcional a la concentración del catión ferroso. La cantidad de Fe total se puede medir tras la reducción del catión férrico a Fe²⁺ con ácido ascórbico. Consecuentemente, la concentración de Fe³⁺ puede determinarse por diferencia.

^d SST: Según el protocolo Standard Methods 2540D [127], una muestra bien homogeneizada se filtra a través de un filtro estándar previamente pesado. El residuo filtrado se seca hasta peso constante a una temperatura entre 103 y 105 °C. El incremento de peso del filtro representa los sólidos suspendidos totales.

^e SSVT: Según el protocolo Standard Methods 2540E [127], el residuo generado en la determinación de los SST se calcina hasta peso constante a 550 °C. La pérdida de peso corresponde a la fracción volátil de sólidos. La determinación ofrece una aproximación de la cantidad de materia orgánica presente en la fracción sólida del agua residual, lodos activos o residuos industriales.

4.2. Bioensayos modificados

Por la peculiaridad de los ensayos que se describen a continuación, se ha decidido crear un apartado especial donde son descritos con mayor detalle y donde se adjuntan algunas figuras ilustrativas del diseño de las instalaciones donde se llevan a cabo.

Algunos estudios han evaluado la combinación de pretratamientos químicos con procesos biológicos midiendo los cambios en la ratio de biodegradabilidad (ensayada como DBO₅/DQO) y en la toxicidad, provocados por la oxidación química. También se han llevado a cabo pruebas respirométricas [128], ensayos de inhibición con lodos activos [129], medidas de ATP intracelular, etc. Pero, lo cierto es que, aunque este tipo de ensayos proporcionan información útil con respecto al efecto del pretratamiento químico, las pruebas integrando realmente la etapa química y biológica son, a menudo, necesarias para obtener datos adicionales y más realistas [49].

Centrándose p.ej. en el análisis de DBO₅, hay que decir que la información sobre biodegradabilidad que aporta es limitada y no permite prever correctamente el comportamiento real que tendría un reactor biológico alimentado con el sustrato analizado. Hay que tener en cuenta que es un ensayo de reproducibilidad complicada y que genera resultados de difícil interpretación. Esto es seguramente debido a la gran variabilidad de parámetros como, p. ej., el "Yield" de los microorganismos (función del sustrato y del tipo de microorganismos), que mide la cantidad de DQO oxidada que pasa a formar parte de nuevas células. La experiencia acumulada revela que el análisis más comúnmente utilizado de biodegradabilidad genera expectativas de biodegradación inferiores a las que se obtienen realmente a posteriori en los reactores biológicos.

Por este motivo, los análisis citados al inicio de este apartado, deben ser complementados con otro tipo de pruebas más cercanas a la integración real de los procesos. Con este objetivo se ha desarrollado el test que se describe en el apartado 4.2.2., que permite la obtención de información adicional más útil y realista.

4.2.1. Test de biodegradabilidad a corto plazo

La finalidad del test de biodegradabilidad a corto plazo es poder establecer relaciones sencillas con otros bioensayos de mayor duración para predecir, mediante un análisis rápido, la calidad de un efluente desde el punto de vista de biocompatibilidad con un tratamiento biológico. Los resultados indican que se puede establecer una relación entre la biodegradabilidad a corto plazo y la DBO₅, sin embargo, este tipo de relaciones dependen en exceso del tipo de sustrato. En consecuencia, sólo serían aplicables a un tipo determinado de aguas, conteniendo unos contaminantes determinados y, siendo oxidadas a través de procesos similares (léase procesos que implican el uso de radicales ·OH). Dicha situación se expone en la publicación del Apéndice I.

El test consiste en la medida de la Velocidad de Consumo de Oxígeno (OUR) por parte de biomasa utilizando el dispositivo que se muestra en la Figura 4.2.1-1. En él se realizan medidas de la concentración de Oxígeno a través de sondas *Orion Model 97-08* en botellas de DBO de 300 mL. Se ha utilizado una concentración de biomasa (procedente del lodo aerobio de una EDAR de San Diego (California)) adecuada para consumir todo el Oxígeno disponible en aproximadamente 25 minutos. La conservación de los lodos a una temperatura aproximada de 5 °C y su reactivación mediante oxigenación (1 hora) y calentamiento hasta la temperatura de realización de las medidas (20 °C), garantizó la reproducibilidad de los experimentos durante 15 días. En el correspondiente apartado de la publicación del Apéndice I se detalla información sobre el procedimiento experimental y preparación de las muestras.

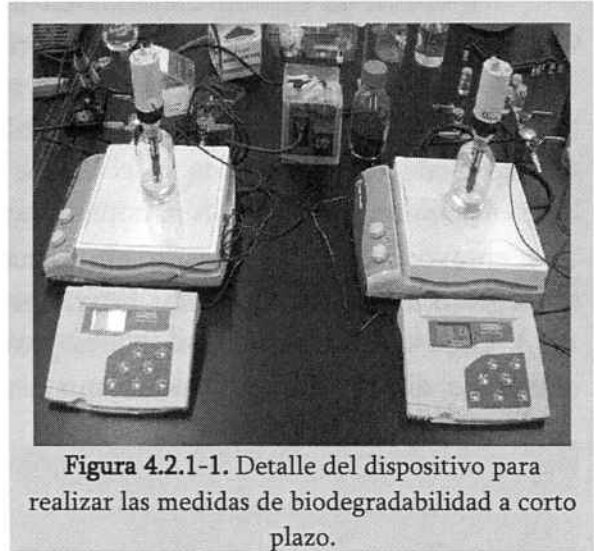


Figura 4.2.1-1. Detalle del dispositivo para realizar las medidas de biodegradabilidad a corto plazo.

4.2.2. Test en reactores discontinuos aerobios de biomasa suspendida

Este bioensayo ha sido diseñado para ser utilizado como paso previo a la integración de la etapa de oxidación química con el SBBR ya que completa la información facilitada por otros parámetros de biocompatibilidad como los citados arriba: toxicidad, ratio de biodegradabilidad DBO₅/DQO, inhibición sobre lodos activos, etc. El test desarrollado permite:

- Tener datos fiables sobre las diferentes fracciones de materia orgánica presentes en los efluentes en función del grado de pretratamiento. El test permite distinguir entre tres tipos diferentes de fracciones desde el punto de vista de la biodegradabilidad: i) rápidamente biodegradable, ii) biodegradable (necesidad de TRH más elevados) y iii) recalcitrante a la biodegradación. Una adecuada concentración, diversidad y actividad de los lodos activos garantizan unos resultados extrapolables al comportamiento de un reactor biológico real. En consecuencia, el test permitirá, con muchas garantías, decidir sobre el grado de pretratamiento necesario para conseguir un valor de COT determinado a la salida del tratamiento biológico.
- Observar si la biomasa convencional utilizada sufre algún impacto por toxicidad al ser expuesta a la parte biorecalcitrante de los diferentes efluentes y a la solución inicial de antibiótico.
- Cuantificar la persistencia de las diferentes concentraciones de antibiótico que acompañan a los efluentes en contacto con lodos activos convencionales no aclimatados.

- Observar cambios en el comportamiento de los microorganismos al suprimir la presencia de algunos nutrientes. En el caso particular que nos incumbe, observar si existen mejorías en la degradación biológica de los compuestos orgánicos que contienen N al suprimir el nutriente NH_4Cl .
- Observar efectos de aclimatación a los diferentes sustratos.
- Observar también efectos de inhibición sobre otros sustratos fácilmente biodegradables.

Los ensayos se han realizado en 6 matraces Erlenmeyer de 1 L de capacidad protegidos de la luz para evitar interferencias (p. ej., fotólisis, proliferación de algas, etc.). Cada uno de los reactores está provisto de agitación y suficiente aireación (a través de difusores cerámicos) como para garantizar la correcta suspensión de la

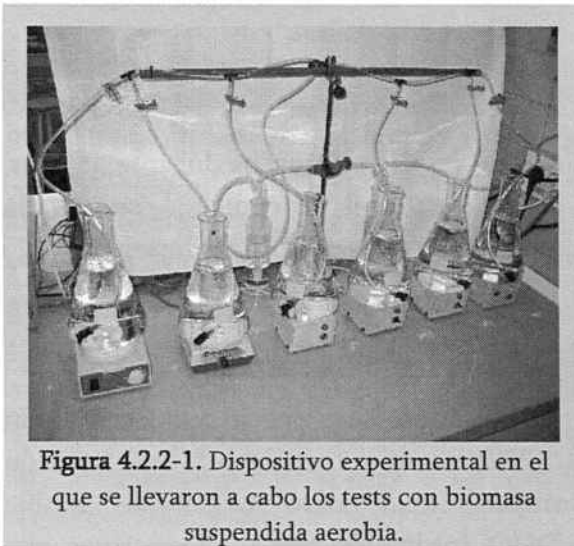


Figura 4.2.2-1. Dispositivo experimental en el que se llevaron a cabo los tests con biomasa suspendida aerobia.

biomasa (lodos aerobios del tratamiento secundario de una EDAR de Gavá (Barcelona)) y una concentración de Oxígeno Disuelto (OD) superior a 6 mg L^{-1} respectivamente. Se ha trabajado a temperatura ambiente y ajustando el pH alrededor de 7 cuando ha sido necesario. Se ha caracterizado el comportamiento de los reactores cargados con diferentes efluentes (diferentes grado de pretratamiento mediante foto-Fenton) y con la solución inicial de fármaco a través del

seguimiento de la concentración de SMX, COT y Sólidos Suspendidos Volátiles Totales (SSVT). La Figura 4.2.2-1 muestra el detalle de los reactores. Para obtener información detallada sobre los nutrientes utilizados y el procedimiento experimental se puede consultar el apartado “*Experimental Devices and Procedures*” del Apéndice IV.

4.3. Reactores de oxidación química

Sigue a continuación una sencilla descripción de las instalaciones en las que se han llevado a cabo los experimentos de oxidación química junto con los acrónimos asignados:

- **BLB-R1:** Reactor escala laboratorio de lámparas BLB sumergidas. Una detallada descripción del reactor se presenta en el apartado “*Experimental device and procedure*” de la publicación del Apéndice II.
- **BLB-R2:** Reactor escala laboratorio de lámparas BLB exteriores. La descripción del reactor se encuentra en el apartado “*Experimental systems*” de la publicación del Apéndice I bajo el acrónimo de BLB-R.

- UV-R: Reactor escala laboratorio de lámparas de Hg de baja presión (254 nm). Se utiliza la misma instalación que en el BLB-R2 intercambiando las lámparas. Para más información se puede consultar el mismo apéndice.
- Fotólisis-R: Reactor para la evaluación de la fotólisis solar. Aparece descrito en el mismo apartado que el reactor BLB-R2 bajo el acrónimo Beaker-R.
- 4CPC-R: Reactor solar foto-Fenton compuesto por Colectores Parabólicos Compuestos (CPCs). Información detallada a cerca de la instalación planta piloto aparece en el apartado "*Experimental systems*" de la publicación del Apéndice I.
- 3CPC-R: Reactor solar UV-H₂O₂ compuesto por CPCs. La descripción del sistema de reacción aparece también en la publicación del Apéndice I.

4.4. Reactor Secuencial Discontinuo de Biofilm (SBBR)

Los reactores biológicos presentan muchas ventajas dentro del sector químico-farmacéutico como, el bajo coste de tratamiento unido a la estabilidad del sistema, pero, como ya se ha mencionado con anterioridad, tienen la desventaja de verse afectados por los tóxicos. Dentro de los tratamientos biológicos, los que ofrecen más réditos, son los procesos que se realizan en discontinuo, por su flexibilidad, estabilidad, alto rendimiento y su capacidad de amortiguamiento ante cargas y caudales elevados [130]. Una correcta descripción de un SBBR requiere una previa explicación del funcionamiento de un Reactor Secuencial de Flujo Discontinuo (SBR).

Los SBR son reactores de lodos activos con la peculiaridad de que la forma de operación es en *batch* (llenado-vaciado). El proceso sigue la secuencia de operaciones descrita en la Figura 4.4-1. Aunque podría parecer lo contrario, los SBR son históricamente previos a los reactores continuos [131]. A principios del siglo XX se abandonaron los reactores discontinuos porque la automatización no estaba desarrollada y la regulación del proceso era costosa. Es en los años sesenta cuando vuelve el interés por los reactores del tipo SBR, propiciado principalmente por el desarrollo de la electrónica y los avances en regulación automática.

El llenado puede subdividirse en distintas etapas, anaeróbica, anóxica o aerobia según lo que queramos conseguir: nitrificación, desnitrificación, eliminación de fósforo, selección de bacterias no filamentosas o minimización de la producción de lodos o consumo de energía. El tipo de llenado periódico del SBR permite seleccionar las bacterias con mayor capacidad de floculación y degradación de la materia orgánica. Se tiene, por lo tanto, un perfecto control para evitar la formación de organismos filamentosos. La fase de reacción puede ser dividida en una etapa aerobia y una etapa anóxica en función de las necesidades de tratamiento. Ambos procesos pueden ser alternados, según la estrategia del ciclo, pasando por ciclos aerobios para nitrificar y anóxicos para desnitrificar. También es posible, manteniendo bajos niveles de oxígeno, conseguir nitrificaciones-desnitrificaciones simultáneas. La instalación de oxímetros permite la armonización entre un máximo rendimiento y un bajo consumo energético. Una etapa de sedimentación sin agitación ni aireación

precede a la etapa de descarga del efluente clarificado. Parte del material puede ser purgado para controlar la edad de los lodos y el tamaño de la población de microorganismos si es necesario. El resto se retiene en el interior del reactor a la espera del siguiente afluente.

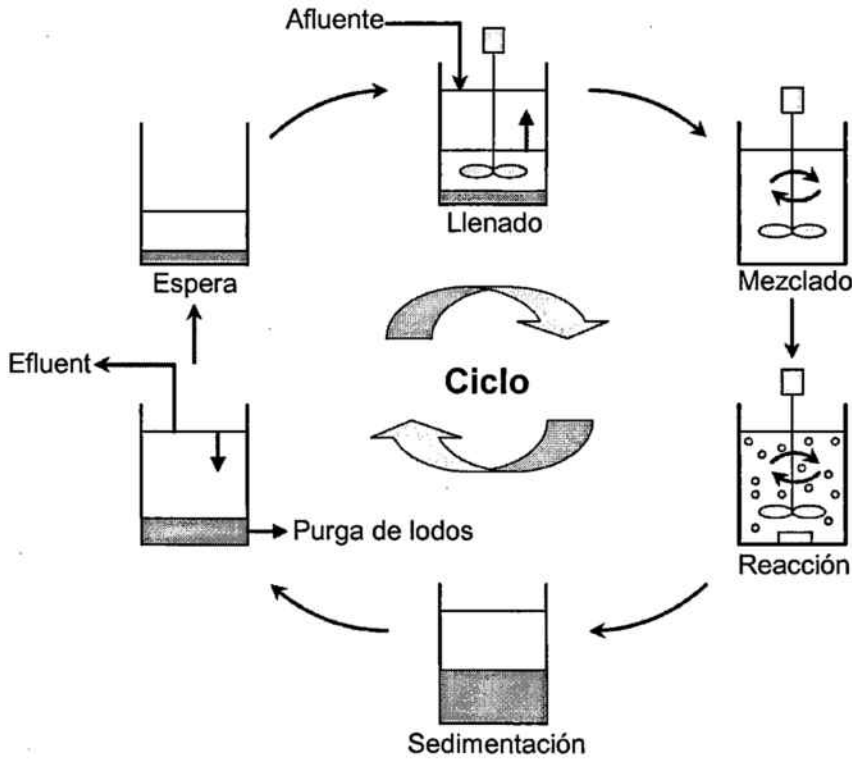


Figura 4.4-1. Representación esquemática de la secuencia de etapas en un SBR.

La principal ventaja que resume a todas las demás que se enumeran a continuación es la de su flexibilidad, ya que gracias al control de los tiempos de las fases que componen el ciclo de depuración, se tienen distintas configuraciones del reactor y distintas formas de controlarlo de una manera sencilla e intuitiva, pudiendo atacar distintos problemas (puntas de caudal, puntas de contaminación) sin que el sistema se separe de la estabilidad, al contrario de lo que ocurre en los sistemas en continuo, donde cualquier variación convierte el sistema en inestable.

- Bajo requerimiento de espacio. Sólo se emplea un tanque para todas las operaciones de los procesos.
- Mayor rendimiento obtenido para un mismo volumen en comparación con un reactor en continuo.
- Menores costes de mantenimiento, eléctricos y de reactivos. Simplicidad de los equipos.
- Minimización del arrastre de sólidos debido a la gran eficacia de la decantación estática en un gran reactor.
- Control de bacterias filamentosas, que provocan flotaciones indeseadas de los lodos.

- Posibilidad de cumplir las normativas más exigentes en cuanto a la eliminación biológica de N y P. Estos dos parámetros son los que suelen dar más problemas cuando se trabaja con tecnologías convencionales.
- Capacidad para la adaptación de los microorganismos a efluentes con elevado contenido en sales.
- El mismo reactor puede actuar como homogeneizador ante grandes variaciones en los vertidos.
- No es necesario implementar clarificadores externos.
- Exclusión de materias floculantes en el efluente ya que la extracción se produce por debajo del nivel de flotación.
- Alta estabilidad del sistema en comparación con otras opciones de depuración biológica.

Debido a estas ventajas, las aplicaciones industriales de los SBRs en la depuración de aguas residuales son muy variadas, siendo particularmente interesante el tratamiento de corrientes de bajo caudal. Se han descrito aplicaciones con éxito para aguas residuales municipales, industria vinícola y destilerías, aguas procedentes de lixiviados de vertederos, industrias de curtidos, aguas residuales hipersalinas, industria papelera, industria láctea, aguas residuales de matadero e industria ganadera porcina, entre otras [132, 133, 134, 135, 136, 137]. Las aplicaciones más novedosas son las relacionadas con aguas residuales de la industria textil, de la industria azucarera y de la industria química. Algunos estudios demuestran que los procesos biológicos discontinuos como el SBR presentan algunas ventajas por lo que respecta a la degradación de compuestos xenobióticos. La operación periódica impone un estrés selectivo que puede seleccionar una distinguida población capaz de degradar compuestos problemáticos [138].

Entre los SBRs, se pueden distinguir diferentes configuraciones de operación: suspendidos, fijos, combinados e, incluso, de lecho fluidizado. El SBR con biomasa fija recibe el nombre de SBBR y esta biomasa se denomina comúnmente *biofilm*. En este tipo de reactores, como los microorganismos se encuentran fijados sobre un soporte, a priori, no es necesaria la etapa de sedimentación anteriormente descrita en los SBRs. Además, la agitación mecánica es normalmente substituida por una recirculación del líquido dentro del reactor. Los microorganismos se pueden inmovilizar formando *biofilms* o biopelículas alrededor de partículas sólidas como p. ej., cualquier estructura porosa [139]. Se pueden escoger tanto materiales sintéticos (materiales poliméricos en forma de anillos Raschig o rejillas, esferas de vidrio, etc.) como naturales (minerales porosos diversos). Debido a la naturaleza de los soportes, se podría dar un fenómeno indeseado de adsorción durante los primeros ciclos de funcionamiento [140]. En el caso particular de este estudio, el material de soporte seleccionado son piedras volcánicas. En la publicación del Apéndice V se presentan los motivos de su elección y se evalúa el efecto de adsorción para diferentes efluentes.

Es estos sistemas de *biofilm*, se consiguen concentraciones de biomasa más elevadas de lo habitual que permiten incrementar la actividad del bioreactor [141, 142]. Los

biofilms presentan tiempos de residencia muy elevados para la biomasa, razón que los hace particularmente adecuados cuando el tratamiento requiere un crecimiento lento de los microorganismos o cuando la concentración del agua a tratar es demasiado pequeña como para soportar el crecimiento de flóculos de lodos activos [143, 144]. No es necesario decir que estos sistemas de biomasa soportada son particularmente útiles cuando es importante evitar la pérdida por arrastre de biomasa de crecimiento lento con capacidades metabólicas especiales [145].

La descripción matemática y modelado de este tipo de reactores es mucho más complicada que en el caso de reactores de biomasa suspendida, ya que tanto el contenido orgánico como la biomasa tienen que ser medidos en dos fases: la líquida y la sólida [146]. El modelado completo del reactor de *biofilm* no es uno de los objetivos de este trabajo, sin embargo, algunos conceptos básicos de un modelo para lodos activos convencionales han sido utilizados puntualmente con el objetivo de resolver balances de N en el SBBR.

El seguimiento de parámetros como COT, DQO, OD, $[\text{NO}_3^-]$ y $[\text{NH}_4^+]$ ha permitido una buena caracterización y control del reactor como se reporta en la publicación del Apéndice V.

Cuando se trabaja con *biofilms*, la capa interior de microorganismos está protegida y es capaz de tolerar cambios de pH, temperatura [147] e, incluso, concentraciones elevadas de sustancias tóxicas [148, 147]. Esta característica se presenta como una gran ventaja sobre otros tipos de configuraciones, y sitúa al SBBR como una tecnología importante para el tratamiento de contaminantes orgánicos tóxicos y biorecalcitrantes. En este tipo de sistemas de *biofilm*, la materia orgánica que no se degrada rápidamente, puede ser absorbida/adsorbida por el *biofilm* para ser luego periódicamente eliminada por desorción y posterior biodegradación [149].

Por todas estas razones se ha escogido este tipo de reactor para llevar a cabo la integración propuesta en este estudio. Un posible error en la etapa biológica podría permitir el paso de sustancias no biodegradables o incluso tóxicas al reactor biológico. Aunque no se produjese fallo alguno, también podrían llegar a él compuestos intermedios no adecuados. Si la etapa biológica consistiera en un reactor biológico convencional, estos compuestos podrían causar la desestabilización del sistema e incluso daños irreversibles que conllevaran a la muerte de los microorganismos. Por lo tanto, la tecnología biológica convencional no ofrece garantías de éxito cuando se trata de este tipo de efluentes [150, 151].

Como se ha observado, las características de los SBBRs los sitúan como muy apropiados para el tratamiento de efluentes tan complejos (sustancias refractarias, sales inorgánicas, compuestos orgánicos tóxicos, etc.) y cambiantes (tanto en el tipo de efluente como en la carga orgánica contenida) [152] como los que se generan en el sector de la química fina.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados y conclusiones más relevantes de la investigación llevada a cabo, haciendo alusión a las publicaciones presentadas en el apartado LISTA DE PUBLICACIONES y adjuntadas en los Apéndices correspondientes.

5.1. Oxidación química de Sulfametoxazol (SMX) en solución

Como se ha comentado anteriormente, los POAs estudiados durante la realización de este trabajo para llevar a cabo la oxidación química de la solución sintética de SMX han sido el foto-Fenton y el UV/H₂O₂. El agua residual sintética ha sido una solución de 200 mg L⁻¹ de SMX (Carbono Orgánico Total (COT) = 94.5 mgC L⁻¹, DQO = 290 mgO₂ L⁻¹ y N total = 33.2 mgN L⁻¹). Las condiciones de reacción, las fuentes de luz y los reactores utilizados han sido muy diversos. Con la finalidad de proporcionar una rápida y fácilmente inteligible visión de los experimentos realizados, la Tabla 5.1-1 resume las condiciones de reacción en los diferentes POAs ensayados en las diferentes instalaciones. Para su constitución han sido seleccionados los experimentos más representativos y que han permitido llegar a las conclusiones más interesantes. Se muestran también en la sinopsis algunos experimentos complementarios de fotólisis con las diferentes fuentes de radiación utilizadas, de *dark-Fenton* (sin luz) y otros utilizando exclusivamente H₂O₂ o la combinación de éste con Fe²⁺. Para el correcto entendimiento de los valores de la radiación involucrada y los tiempos de reacción en los diferentes experimentos es conveniente consultar el apartado "*Accumulated Energy*" del Apéndice I.

Como se puede observar en la tabla resumen, siempre se ha trabajado con una concentración de catión ferroso de 10 mg L⁻¹ en los procesos en los cuales esta especie está involucrada. Esta concentración de Fe²⁺ ha sido seleccionada basándose en el efecto positivo del catión sobre la cinética de la reacción y en la actual normativa que aplica en los términos de todos los municipios comprendidos en el ámbito territorial definido por el artículo 3c de la Ley 7/1987, del 4 de abril. A través de dicha normativa se establecen y regulan actuaciones públicas especiales en la conurbación de Barcelona y en la comarcas comprendidas dentro de su zona de influencia directa: Reglamento metropolitano de vertido de aguas municipales (aprobación definitiva CM 3/06/2004: BOP Núm. 142 14/06/2004). Por otro lado, siempre que la instalación lo ha permitido, las reacciones se han llevado a cabo a una temperatura constante de 25 °C.

En la Tabla 5.1-2 se presentan las eliminaciones de COT y DQO alcanzadas así como otras características de los efluentes obtenidos para cada uno de los experimentos descritos.

Tabla 5.1-1. Sinopsis de experimentos de oxidación química realizados en las diferentes instalaciones. Detalle de las condiciones de reacción.

Experimento	Reactor	Fuente de radiación	[H ₂ O ₂] (mg L ⁻¹)	[Fe ²⁺] (mg L ⁻¹)	Energía involucrada por unidad de volumen	Tiempo de reacción (min)	T _{inicial} - T _{final}	pH _{inicial}
Blanco 1			-	-	23.1	120		
Blanco 2			-	10	23.1	120		
Blanco 3		a	400	-	-	120		
Blanco 4			400	-	23.1	120		
1			50	10	9.8	24		
2			100	10	12.2	30		
3			200	10	19.4	48		
4			250	10	19.0	55		
5			300	10	26.8	67		
6	BLB-R1	BLB	350	10	26.3	71	25.0	2.8
7			400	10	37.7	88		
8			450	10	34.9	93		
9			500	10	50.0	130		
10			550	10	58.1	150		
11			750	10	94.5	252		
12			1000	10	116.2	325		
Renton 1		a	200	10	-	148		
Renton 2		a	200	30	-	13		
Renton 3		a	400	10	-	>6500		
Renton 4		a	400	30	-	>1400		
13			50		0.9	36	23.5 - 26.3	
14			100		1.1	42	23.0 - 26.5	
15	BLB-R2	BLB	200	10	1.5	57	23.0 - 28.0	2.8
16			300		1.9	72	23.0 - 29.0	
17			400		2.5	94	23.0 - 30.5	
Blanco 5			-	-	53.3	470	42.0 - 41.5	
19			50	-	21.5	190	44.0 - 41.5	
20	UV-R	254 nm	100	-	49.9	440	42.0 - 43.0	4.6 (libre)
21			200	-	43.1	380	42.0 - 41.0	
22			250	-	33.8	298	42.0 - 41.5	

Tabla 5.1-1. Sinopsis de experimentos de oxidación química realizados en las diferentes instalaciones. Detalle de las condiciones de reacción.

Experimento	Reactor	Fuente de radiación	[H ₂ O ₂] (mg L ⁻¹)	[Fe ²⁺] (mg L ⁻¹)	Energía involucrada por unidad de volumen (kJ L ⁻¹)	Tiempo de reacción (min)	T _{inicial} - T _{final}	pH _{inicial}
Blanco 6 23	Fotólisis-R	SOL	300	-	53.3	470	25.6 - 26.4	2.8
			50	-	19.0	50	24.3 - 27.6	2.79
			100	-	5.5	18	27.6 - 28.1	2.70
			150	-	12.1	41	28.1 - 27.3	2.63
			200	-	18.7	63	27.3 - 27.4	2.55
			250	-	25.2	85	27.4 - 27.0	2.53
			300	10	30.8	105	27.0 - 26.3	2.51
			350	-	39.3	133	26.3 - 25.3	2.54
			400	-	49.2	167	25.3 - 24.1	2.53
			450	-	68.2	231	24.8 - 25.0	2.56
24 (Alícuotas)	4CPC-R	SOL	500	-	93.4	443	25.0 - 25.9	2.58
			550	-	130.7	585	25.9 - 24.0	2.57
			250 ^b	-	172.5	655	34.9 - 41.8	4.6 (libre)
			250 ^b	-	38.9	655	34.9 - 41.8	4.6 (libre)
25	3CPC-R	SOL	250 ^b	-	38.9	655	34.9 - 41.8	4.6 (libre)

^a: Sin radiación

^b: sólo se consumió un 55%

Tabla 5.1-2. Sinopsis de los resultados obtenidos para los experimentos presentados en la Tabla 5.1-1 del apartado 5.1.

Experimento	Reactor	[H ₂ O ₂] (mg L ⁻¹)	ACOT (%)	ADDO (%)	[SMX] _{final} (mg L ⁻¹)	[NO ₃ ⁻ -N] _{final} (mg L ⁻¹)	[NH ₄ ⁺ -N] _{final} (mg L ⁻¹)	[SO ₄ ²⁻] _{final} (mg L ⁻¹)	DBO ₅ /DQO
Blanco 1		-	-	n.d.	200.0	n.d.	n.d.		n.d.
Blanco 2		-	-	n.d.	190.7	n.d.	n.d.		n.d.
Blanco 3		400	-	n.d.	200.0	n.d.	n.d.		n.d.
Blanco 4		400	4.7	n.d.	191.0	n.d.	n.d.		n.d.
1		50	2.4	12.0	40.4	0.1	3.7		0.04
2		100	5.2	23.4	4.9	0.1	5.2		0.09
3		200	14.6	34.0	5.2	0.1	7.2		0.14
4		250	18.1	46.2	1.9	0.1	8.2		0.16
5		300	31.4	55.3	1.2	0.2	8.9		0.18
6		350	43.8	67.8	1.4	0.3	9.2		0.24
7	BLB-R1	400	51.3	73.5	0.2	0.6	10.4	n.d.	0.26
8		450	63	80.6	-	1.3	10.9		0.30
9		500	75.9	87.6	-	1.8	13.2		0.45
10		550	71.4	87.9	-	2.4	13.4		0.37
11		750	73.1	90.5	-	2.9	13.2		0.34
12		1000	79.9	92.5	-	3.4	13.4		0.38
Fenton 1		200	13	41.1	2.6				0.15
Fenton 2		200	14.6	42.0	1.3				0.15
Fenton 3		400	34.5	64.1	0.7	n.d.	n.d.		0.28
Fenton 4		400	36.7	71.7	0				0.36
13		50	5.8	17.7	29.4	n.d.	n.d.	n.d.	0.04
14		100	5.3	29.4	5.6	n.d.	n.d.	n.d.	0.09
15	BLB-R2	200	16.6	46.5	2.2	n.d.	n.d.	n.d.	0.16
16		300	35.4	65.4	0.9	n.d.	n.d.	n.d.	0.23
17		400	56.4	82.2	-	n.d.	n.d.	n.d.	0.38
Blanco 5		-	9.2	31.9	0.1	-	8.8	62.2	0.06 ^c
19		50	5.4	23	0.6	-	4.9	48.6	0.04 ^c
20	UV-R	100	39.6	61.9	-	0.2	10.6	67.2	0.16 ^c
21		200	62.3	79.1	-	0.5	11.2	66.9	0.24 ^c
22		250	59.9	79.3	-	n.d.	11.2	68.2	0.13 ^c

Tabla 5.1-2. Sinopsis de los resultados obtenidos para los experimentos presentados en la Tabla 5.1-1 del apartado 5.1.

Experimento	Reactor	[H ₂ O ₂] (mg L ⁻¹)	ACOT (%)	ΔDQO (%)	[SMX] _{final} (mg L ⁻¹)	[NO ₃ ⁻ -N] _{final} (mg L ⁻¹)	[NH ₄ ⁺ -N] _{final} (mg L ⁻¹)	[SO ₄ ²⁻] _{final} (mg L ⁻¹)	DBO ₅ /DQO
Blanco 6	Fotólisis-R	-	7.82	23.3	156.1	0.3	1.9	11.9	n.d.
23		300	34.6	68.3	2.3	0.3	10.0	71.7	0.29
		50	4.7	13.7	38.2	0.0	3.2	13.5	0.03
		100	10.2	31.7	3.2	0.1	5.5	30.0	0.11
		150	19.3	n.d.	1.6	0.1	6.8	40.6	n.d.
		200	29.2	55.8	1.5	0.1	7.9	48.1	0.21
		250	42.2	75.4	1.3	0.2	8.6	56.7	0.27
24 (Alicuotas)	4CPC-R	300	55.0	82.1	1.0	0.2	9.7	60.9	0.40
		350	68.3	n.d.	0.3	0.5	11.6	62.8	0.25
		400	77.3	88.7	-	0.8	13.5	67.4	0.34
		450	82.7	93.5	-	1.1	15.3	71.9	0.33
		500	84.7	94.5	-	1.4	15.7	74.1	0.22
		550	86.9	95.9	-	1.6	16.4	76.0	0.05
25	3CPC-R	250 ^a	12.8	24.6	20.8	0.2	4.7	36.1	n.d.

n.d.: no determinado

^a: BOD₅ estimada según el apartado "Short-term biodegradability tests" en Apéndice I.

Para decidir sobre el proceso químico más adecuado para llevar a cabo el tratamiento de la solución de SMX, se ha realizado una comparativa entre diferentes procesos de oxidación química que incluyen experimentos de: i) fotólisis con las diferentes fuentes de radiación utilizadas, ii) foto-Fenton a escala laboratorio (lámparas BLB) y a escala planta piloto (luz solar) y iii) UV/H₂O₂ también a escala laboratorio (lámparas 254 nm) y a escala planta piloto con luz solar.

La publicación del Apéndice I analiza todos estos procesos con el objetivo de comparar su eficiencia en el tratamiento del agua que nos incumbe. Aunque la comparación de los diferentes procesos es difícil debido a la heterogeneidad de los factores involucrados (técnicas de oxidación diferentes, sistemas de reacción diferentes y diferentes fuentes de radiación), se ha establecido el siguiente criterio: comparar las características de cada uno de los efluentes resultantes así como las eliminaciones de COT y DQO obtenidas una vez finalizadas las reacciones (consumo total del H₂O₂). La importancia de la radiación queda también plasmada en la publicación a través de la presentación de las radiaciones involucradas en cada uno de los experimentos llevados a cabo. La conclusión más importante que se desprende del artículo es que el foto-Fenton es el POA más apropiado para eliminar la materia orgánica presente en la solución inicial estudiada. Además, la reducida duración de los experimentos y la buena reproducibilidad de estos a escala planta piloto, anima al uso de la luz solar para llevar a cabo la reacción.

Un estudio con mayor profundidad sobre la reacción photo-Fenton en el reactor a escala laboratorio BLB-R1 se reporta en la publicación del Apéndice II. En los experimentos realizados en este caso, se trabaja siempre con la misma concentración inicial de Fe²⁺ y a la misma temperatura. Se estudia el efecto de diferentes dosis iniciales de H₂O₂ sobre las características finales de los efluentes obtenidos, desde el punto de vista químico y también biológico. Los experimentos realizados permiten tanto eliminar con éxito el antibiótico en solución como mejorar la biodegradabilidad de la solución inicial. El efecto inhibitor sobre lodos activos que presenta la solución inicial de antibiótico desaparece en los efluentes resultantes para cualquiera de las dosis de peróxido de hidrógeno ensayadas. El hecho de que el SMX desaparezca por completo para una concentración inicial de peróxido de 300 mg L⁻¹ junto con los resultados de los análisis de toxicidad aguda y los valores alcanzados por la ratio de biodegradabilidad, sugieren que una concentración entre 300 y 400 mg L⁻¹ de peróxido podría ser la adecuada a la hora de llevar a cabo una combinación de este POA con un proceso biológico.

Complementariamente, la publicación del Apéndice III presenta un estudio comparativo entre experimentos de foto-Fenton y experimentos fotocatalíticos con TiO₂ para degradar SMX en solución. En él, se han estudiado las velocidades de degradación del SMX en función de la energía acumulada que ha entrado en los sistemas de reacción por unidad de volumen tratado. Para ello se han utilizado constantes cinéticas de pseudo-primer orden para el contaminante y para el COT. Como conclusiones más significativas, cabe destacar que el proceso fotocatalítico también es capaz de destruir el SMX, pero requiere una cantidad de radiación mucho mayor que el proceso foto-Fenton. Por otro lado, aunque el proceso foto-Fenton

reduce considerablemente el tiempo necesario para degradar el antibiótico, la reducción de COT conseguida para una misma eliminación de SMX, es inferior.

5.1.1. Diseño Centrado Compuesto (DCC) circunscrito

Con la intención de estudiar el comportamiento del POA más profundamente estudiado (foto-Fenton) en el reactor BLB-R1, bajo otras condiciones de reacción diferentes a las descritas en la Tabla 5.1-1, se llevaron a cabo, simultáneamente, otra serie de ensayos, basándose en un diseño de experimentos. Si dicho diseño permite describir el comportamiento de un sistema minimizando el número de experimentos a realizar a escala laboratorio, se presume que podría ser también útil para optimizar trabajo a la hora de estudiar el comportamiento de efluentes reales más complejos y tomar decisiones sobre las condiciones de reacción necesarias para llevar a cabo su pretratamiento. El diseño de experimentos pretende averiguar cómo los cambios en las variables de entrada (factores) a un sistema influyen en las variables de salida del mismo y si es posible hallar una forma de predecir teóricamente dicha salida, sin necesidad de acudir de nuevo a la experimentación. Se introducen cambios conocidos en el sistema y se analiza el resultado que estos producen. A partir de este análisis, se puede establecer un modelo matemático que define el sistema y permite prever su comportamiento ante cambios en lo sucesivo. Con este diseño de experimentos se pretenden desarrollar modelos empíricos válidos para unos rangos determinados de las variables estudiadas. Para que el modelo empírico presente la máxima robustez, necesita partir de la información de un sistema de experimentos bien diseñado. A través de él han de poder determinarse qué factores son los de mayor influencia en la respuesta y qué valores de dichas variables influyentes hacen que la respuesta se sitúe cerca de un valor óptimo. Los puntos básicos a seguir al enfrentarse a un diseño de experimentos son los siguientes:

- Planteamiento del problema
- Selección de la variable de respuesta a estudiar
- Selección de los factores y el intervalo de variación de sus valores
- Elección del diseño de experimentos
- Realización del plan de experimentos
- Análisis estadístico de los resultados
- Conclusiones y modelo empírico

Una vez quedan definidos los tres primeros puntos, la elección del diseño de experimentos es sencilla. Se basa en las características del sistema y el interés por parte del investigador de optimizar recursos reduciendo al máximo el número de experimentos imprescindibles. Una de las estrategias más utilizadas por su simplicidad en el caso de un sistema multivariable es el diseño factorial, que se utiliza cuando es conveniente estudiar el efecto sobre la respuesta de varios factores simultáneamente, teniendo en cuenta tanto el efecto individual como las interacciones que puedan darse entre ellos. En nuestro caso, el diseño escogido

recibe el nombre de Diseño Centrado Compuesto (DCC) circunscrito. El punto de partida de este diseño en un diseño factorial, y se completa con los denominados puntos estrella que se pueden observar en la Figura 5.1.1-1.

El diseño es rotatable, robusto y presenta una buena precisión dentro del espacio de diseño. Los diferentes valores de los factores y de las variables respuesta generan las denominadas superficies de respuesta, las cuales permiten averiguar las condiciones óptimas para un sistema determinado. El método fue introducido por Box y Wilson en 1951 [153]. Cada uno de los factores se estudia a 5 niveles diferentes, y el punto central se ensaya, por lo menos por triplicado, para evaluar el error. Los niveles son las diferentes posiciones en las que cada uno de los factores es analizado. La superficie de respuesta puede ser matemáticamente descrita mediante una función cuadrática multivariable (Ec. 25), que caracteriza los efectos de cada variable y sus interacciones.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (\text{Ec. 25})$$

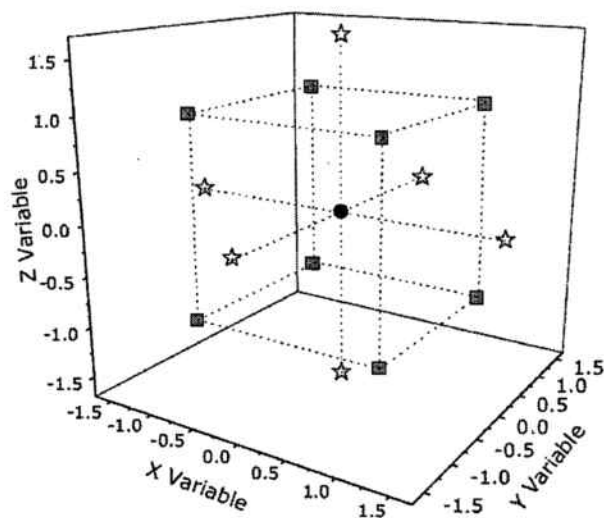


Figura 5.1.1-1. Niveles para un DCC de 3 variables.

realizado respectivamente mediante el programa STATGRAPHICS Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., USA). Las variables de entrada o factores así como los rangos de estudio escogidos en este análisis se muestran en la Tabla 5.1.1-1.

Tabla 5.1.1-1. Límites para las variables del DCC.

	Temperatura (°C)	[Fe ²⁺] ₀ (mg L ⁻¹)	[H ₂ O ₂] ₀ (mg L ⁻¹)
Inferior	17	3	65
Superior	45	10	250

La Tabla 5.1.1-2 muestra las condiciones experimentales iniciales para las reacciones ensayadas así como los resultados obtenidos para las diferentes variables respuesta.

En la ecuación, y es la respuesta (p. ej.: ΔCOT , tiempo de reacción, ratio de biodegradabilidad obtenido, etc.), b_i son los efectos de las variables i , b_{ij} son las interacciones de las variables i y j y x_i son las variables de entrada o factores (T , $[\text{Fe}^{2+}]_0$ y $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$). Las superficies de respuesta y el tratamiento estadístico de los resultados experimentales se han obtenido y se han

Algunos de los experimentos mostrados no son estrictamente necesarios para realizar el análisis. Se trata de algunas reacciones y réplicas adicionales.

Tabla 5.1.1-2. Condiciones experimentales iniciales y resultados obtenidos en los experimentos del DCC.

Temperatura (°C)	[Fe ²⁺] ₀ (mg L ⁻¹)	[H ₂ O ₂] ₀ (mg L ⁻¹)	ΔTOC (%)	DBO ₅ (mgO ₂ L ⁻¹)	DBO ₅ /DQO	Tiempo (min)
32	6.5	157.5	11.4	28	0.14	40.0
46	3.0	65.0	3.7	16	0.07	26.0
32	6.5	157.5	10.4	28	0.15	43.0
32	6.5	157.5	10.5	28	0.14	43.0
46	10.0	250.0	20.2	30	0.20	16.0
17	3.0	65.0	4.6	17	0.07	178.0
32	6.5	157.5	5.9	29	0.15	42.0
55	6.5	157.5	6.8	28	0.15	11.5
55	6.5	157.5	10.0	29	0.15	11.5
45	10.0	65.0	4.2	16	0.06	5.5
31	6.5	5.0	1.4	2	0.01	4.5
30	6.5	1.9	0.0	0	0.00	0.8
17	10.0	250.0	20.2	26	0.18	91.5
7	6.5	157.5	11.1	26	0.13	365.0
32	6.5	313.0	32.3	29	0.24	72.5
32	6.5	157.5	10.3	26	0.14	42.5
32	6.5	157.5	9.0	27	0.14	44.0
31	12.4	157.5	7.4	26	0.13	17.3
17	10.0	65.0	6.5	17	0.07	60.0
32	0.6	157.5	17.6	31	0.18	1210.0
17	3.0	250.0	30.0	25	0.18	450.0
46	3.0	250.0	24.3	31	0.22	95.5

El tratamiento estadístico de los datos mediante el programa STATGRAPHICS Plus 5.1 ha permitido conocer qué factores o interacciones entre ellos tienen un efecto más significativo sobre las variables respuesta estudiadas. Para saber qué parámetros pueden ser descartados en el modelo cuadrático, se realiza el llamado test ANOVA (análisis de varianzas). Éste permite comparar la varianza del modelo con la varianza de los errores residuales. Si las varianzas son suficientemente diferentes, los parámetros tenidos en cuenta son significativos e influyen en el modelo. Para medir esta diferencia, se utiliza el estadístico P-valor. Cuanto más por debajo de 0.05 esté, más influencia tiene el parámetro sobre el modelo. El descarte de dichos parámetros también puede ser valorado gráficamente a través del llamado gráfico de Pareto estandarizado. Los parámetros con efectos estandarizados por debajo del límite fijado por el programa estadístico pueden ser eliminados del modelo cuadrático empírico. En la Figura 5.1.1-2 se muestran los efectos no descartados según dicho gráfico junto

con la superficie de respuesta obtenida para la eliminación de COT para una concentración inicial de H₂O₂ de 120 mg L⁻¹.

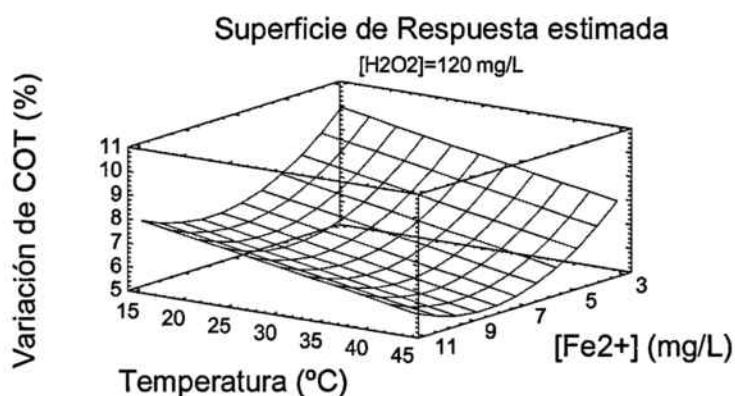


Gráfico de Pareto estandarizado para variación de COT

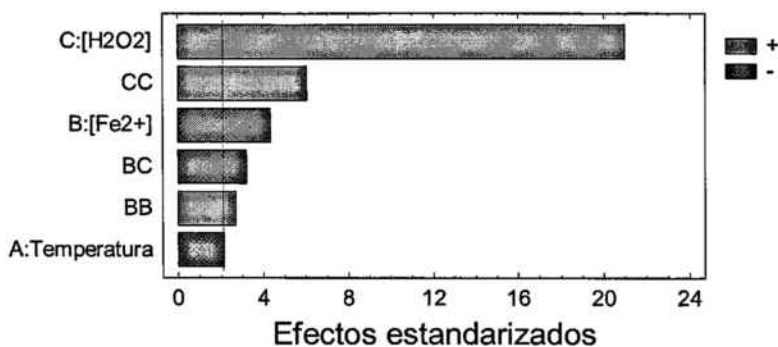


Figura 5.1.1-2. Superficie de respuesta estimada para la variación de COT para [H₂O₂]₀=120 mg L⁻¹. Efectos estandarizados según el Gráfico de Pareto.

Las superficies de respuesta obtenidas para todas las concentraciones de peróxido de hidrógeno presentan tendencias similares. Según el modelo, se obtendría la eliminación máxima de COT (47.5%) cuando la temperatura y la concentración de catión ferroso tomaran los valores mínimos de los rangos estudiados (7 °C y 0.6 mg L⁻¹ respectivamente) y la concentración de peróxido su valor máximo (313 mg L⁻¹). El gráfico de superficie de respuesta muestra también mejores eliminaciones de COT cuando se trabaja a temperatura baja para cualquier concentración de Fe²⁺. Por otro lado, a una temperatura determinada, interesa trabajar con concentraciones elevadas o bajas de catión ferroso. El modelo cuadrático empírico que describe el comportamiento se muestra a continuación:

$$\Delta\text{COT} = 4.96 - 6.77 \cdot 10^{-2} \cdot T - 9.3 \cdot 10^{-1} \cdot [\text{Fe}^{2+}]_0 + 4.94 \cdot 10^{-2} \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]_0 + 1.01 \cdot 10^{-2} \cdot [\text{Fe}^{2+}]_0^2 - 6.3 \cdot 10^{-3} \cdot [\text{Fe}^{2+}]_0 \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]_0 + 2.991 \cdot 10^{-4} \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]_0^2 \quad (\text{Ec. 26})$$

De forma análoga, a Figura 5.1.1-3 muestra la superficie de respuesta obtenida para la variación de la DQO. Se muestra la respuesta para una concentración inicial de H₂O₂

de 120 mg L⁻¹ aunque se mantienen las mismas tendencias para todo el rango de concentraciones estudiado.

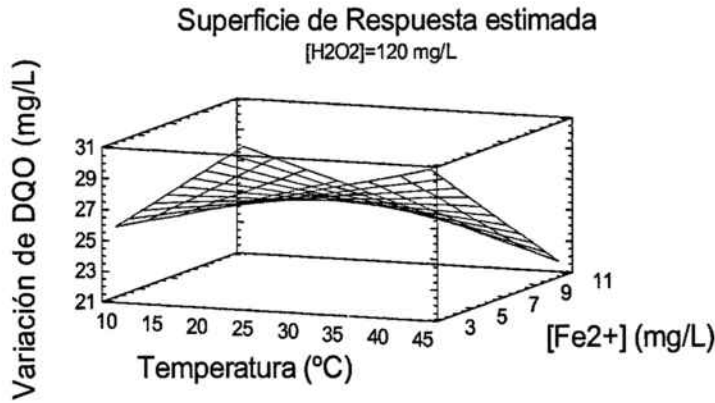


Figura 5.1.1-3. Superficie de respuesta estimada para la variación de DQO para [H₂O₂]₀=120 mg L⁻¹.

El análisis proporciona una eliminación máxima de DQO de un 67.6% cuando, dentro de los rangos estudiados, la temperatura y la concentración de peróxido de hidrógeno se hacen máximas y la concentración de Fe mínima. Si se busca una eliminación de DQO elevada, a temperaturas bajas se requieren concentraciones de Fe²⁺ elevadas mientras que a temperaturas elevadas se requieren concentraciones bajas. En este caso, la Ec. 27 presenta el ajuste cuadrático obtenido.

$$\Delta DQO = -4.57 + 2.58 \cdot 10^{-1} \cdot T + 6.68 \cdot 10^{-1} \cdot [Fe^{2+}]_0 + 2.48 \cdot 10^{-1} \cdot [H_2O_2]_0 - 3.97 \cdot 10^{-2} \cdot T \cdot [Fe^{2+}]_0 - 1.912 \cdot 10^{-4} \cdot [H_2O_2]_0^2 \quad (\text{Ec. 27})$$

Otra variable de respuesta estudiada que merece la pena presentar es la ratio de biodegradabilidad DBO₅/DQO. La Figura 5.1.1-4 muestra su superficie de respuesta para una concentración de peróxido de 120 mg L⁻¹ aunque, como en los casos anteriores, el comportamiento se mantiene para el resto de concentraciones. De igual forma que en el caso anterior, el valor máximo de este parámetro se obtiene para valores de temperatura y concentración de peróxido máximos y para una concentración de Fe²⁺ mínima. Según el modelo empírico que se muestra en la Ec. 28, este valor óptimo para el espacio estudiado es 0.28. En este caso, pese a que las tendencias se mantienen para todo el rango de [H₂O₂]₀ estudiado, se observan diferencias significativas en las contribuciones de la T y el Fe²⁺ en función de la concentración de peróxido analizada.

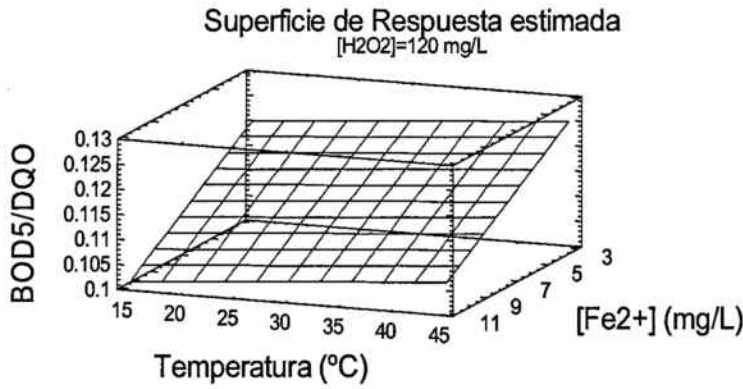


Figura 5.1.1-4. Superficie de respuesta estimada para la ratio DBO₅/DQO para [H₂O₂]₀=120 mg L⁻¹.

$$\text{DBO}_5/\text{DQO} = 3.77 \cdot 10^{-2} - 6.38 \cdot 10^{-4} \cdot T - 2.37 \cdot 10^{-3} \cdot [\text{Fe}^{2+}]_0 + 8.62 \cdot 10^{-4} \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]_0 + 6.65 \cdot 10^{-6} \cdot T \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]_0 - 1.11 \cdot 10^{-6} \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]_0^2 \quad (\text{Ec. 28})$$

Para finalizar con la discusión del diseño de experimentos y para valorar la eficacia de esta herramienta a la hora de predecir el comportamiento de otras reacciones llevadas a cabo en la misma instalación, se presenta la Tabla comparativa 5.1.1-3. En ella se compararán las eliminaciones y las ratios de biodegradabilidad obtenidas en los los experimentos reales 1, 2, 3, 4 y 5 (ver Tabla 5.1-1 en el apartado 5.1.) con los valores estimados a través de los modelos empíricos generados.

Tabla 5.1.1-3. Comparativa de los valores reales con los estimados mediante los modelos cuadráticos empíricos.

[H ₂ O ₂] (mg L ⁻¹)	Reales			Estimados			Errores relativos (%)		
	ΔCOT (%)	ΔDQO (%)	DBO ₅ /DQO	ΔCOT (%)	ΔDQO (%)	DBO ₅ /DQO	ΔCOT	ΔDQO	DBO ₅ /DQO
50	2.4	12.0	0.04	4.2	10.6	0.05	73.3	12.1	16.7
100	5.2	23.4	0.09	5.7	21.5	0.09	10.3	8.0	0.4
200	14.6	34.0	0.14	13.4	40.6	0.16	8.4	19.4	16.9
250	18.1	46.2	0.16	19.4	48.7	0.19	7.4	5.4	16.0
300	31.4	55.3	0.18	27.0	55.8	0.21	14.1	0.9	12.9

La Figura 5.1.1-5 grafica los valores tabulados con el objetivo de facilitar la comparación. Los modelos parecen describir la reacción de manera aceptable. Es importante resaltar que los experimentos con 50 y 300 mg L⁻¹ de H₂O₂ ya se encontrarían fuera del rango de estudio escogido para el diseño experimental.

Se puede concluir que los modelos obtenidos a través del diseño experimental describen de manera acertada el comportamiento del sistema y, por lo tanto, se presupone que esta herramienta también podría conducir a previsiones aceptables en un hipotético caso de estudio de aguas residuales reales.

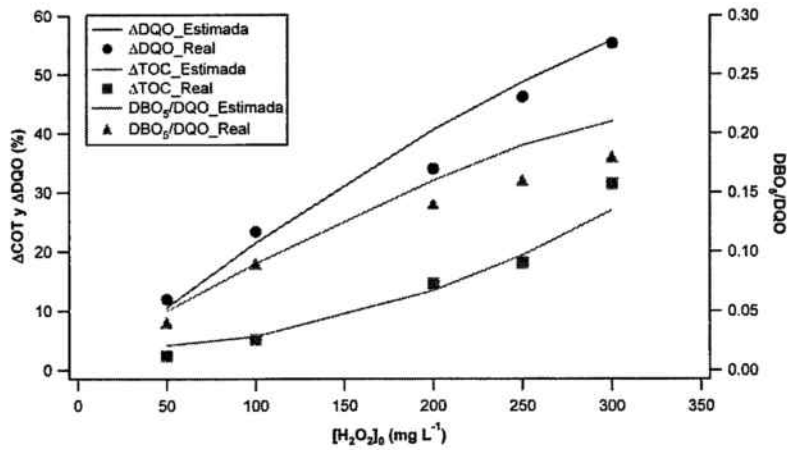


Figura 5.1.1-5. Valores reales y estimados de las eliminaciones de COT y DQO y ratios de biodegradabilidad de los efluentes para los experimentos 1, 2, 3, 4 y 5.

5.2. Test en reactores batch. Integración con el Reactor Secuencial Discontinuo de Biofilm (SBBR)

Como se comenta en los apartados 4.2. y 4.2.2., la información que aportan los análisis de compatibilidad biológica citados en el apartado 5.1. es limitada y no permite prever correctamente el comportamiento real que tendría un reactor biológico alimentado con los efluentes analizados. Por toda la información adicional que el test en reactores discontinuos aerobios de biomasa suspendida aporta, se decide someter a análisis varios de los efluentes de la reacción foto-Fenton (BLB-R1). Concretamente los efluentes seleccionados son los resultantes del tratamiento con 50, 100, 200 y 400 mg L⁻¹ iniciales de H₂O₂. También se carga un reactor con la solución inicial de antibiótico. La publicación del Apéndice IV recoge el seguimiento realizado en los 5 reactores. Los test realizados en los reactores *batch* muestran que el COT global eliminado (pretratamiento químico + tratamiento biológico) es directamente proporcional a la cantidad de peróxido utilizada en la etapa de pretratamiento. Las buenas eliminaciones conseguidas (o previstas en el caso de una concentración inicial de peróxido de 300 mg L⁻¹) confirman que un pretratamiento con 300 o 400 mg L⁻¹ de peróxido permitirá obtener unos efluentes que garanticen una eliminación global del C en solución de un 75% o superior al efectuar la integración con el tratamiento biológico. Son, por lo tanto, estos dos efluentes, los escogidos para realizar el estudio en el reactor SBBR.

En la publicación de Apéndice V se evalúa la combinación de los citados 2 efluentes de la reacción foto-Fenton con un reactor SBBR. Los datos experimentales revelan que una reacción foto-Fenton de pretratamiento llevada a cabo con 300 mg L⁻¹ de H₂O₂ combinada con 8 horas de tratamiento biológico en el SBBR, permiten la eliminación de un 76% del COT presente en la solución inicial de antibiótico. La introducción de una etapa anóxica permite la desnitrificación de todo los NO₃⁻ generados durante el tratamiento químico-biológico. Es necesario aumentar la dosis de peróxido en el pretratamiento hasta alcanzar una concentración de 400 mg L⁻¹ para conseguir prácticamente la eliminación total del C y N orgánicos presentes en la

molécula original de antibiótico. El buen rendimiento del SBBR permite presentar la combinación ensayada como una tecnología eficaz para el tratamiento de aguas contaminadas con compuestos farmacéuticos problemáticos como es el caso del antibiótico SMX.

Para concluir con el tratamiento biológico, sería adecuado resaltar que (ver publicaciones de los Apéndices IV y V), las técnicas de biología molecular han permitido identificar diferentes tipos de bacterias directamente relacionadas con los procesos involucrados en la degradación biológica de los compuestos presentes en el SBBR. Asimismo, la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) ha hecho posible la visualización de los microorganismos que constituyen el *biofilm*. La Figura 5.2-1 muestra algunas de las diferentes imágenes obtenidas.

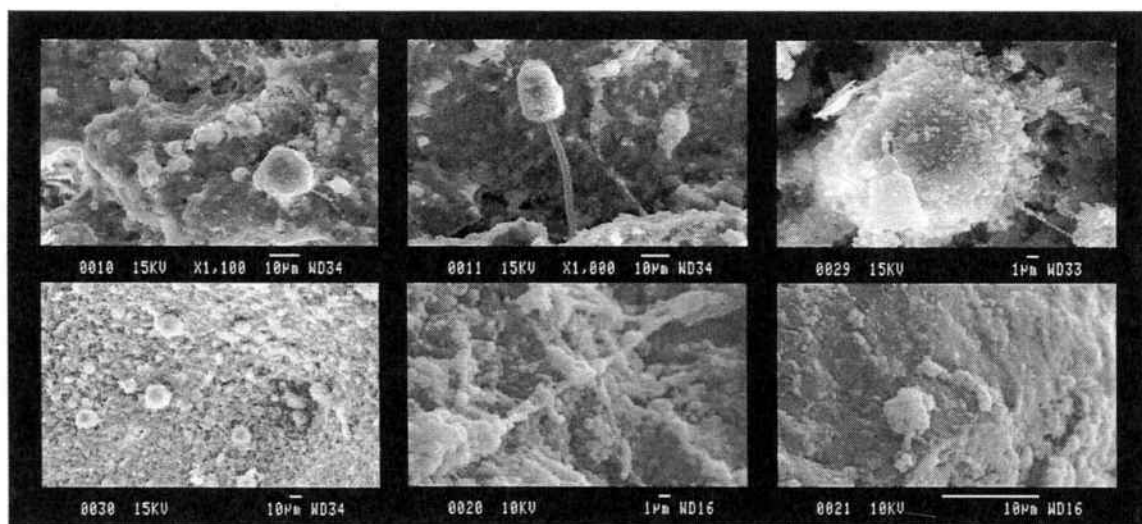


Figura 5.2-1. Detalle de diferentes microorganismos fotografiados en la superficie de una roca volcánica del SBBR.

APÉNDICE I

Application of solar advanced oxidation processes to the degradation of the antibiotic Sulfamethoxazole

El artículo ha sido publicado en *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 8 (2009), pp. 1032-1039.

Application of solar advanced oxidation processes to the degradation of the antibiotic sulfamethoxazole†

O. González*^a, C. Sans^a, S. Esplugas^a and S. Malato^b

^aChemical Engineering Department, University of Barcelona, Martí i Franquès 1 (08028), Barcelona, Spain. E-mail: ogonzalez@angel.qui.ub.es

^bPlataforma Solar de Almería-CIEMAT, Carretera Senés km 4 (04200), Almería, Spain

Received 17th December 2008, Accepted 18th May 2009

First published on the web 3rd June 2009

This work deals with the treatment of highly concentrated sulfamethoxazole (SMX) solutions by some advanced oxidation processes (AOPs) that have not been studied until now. The antibiotic has been subjected to oxidation by photolysis, UV/H₂O₂ and photo-Fenton using both artificial light and sunlight as radiation sources depending on the installation scale. SMX, total organic carbon (TOC) and chemical oxygen demand (COD), as well as the generation of NH₄⁺, NO₃⁻ and SO₄²⁻, were followed. SMX photolytic degradation efficiency followed the ranking: 254 nm lamps > sunlight > black–light blue (BLB) lamps (negligible for the latter). The highest eliminations were obtained by means of UV/H₂O₂ reaction in a lab-scale reactor (254 nm lamps) with an initial H₂O₂ concentration of 200 mg L⁻¹: ΔTOC = 62.3%; ΔCOD = 79.1% (more than 6 h). Similar removals were achieved with a lab-scale photo-Fenton reactor (BLB lamps) but using 400 mg L⁻¹ of oxidant (94 min). The use of solar light appeared to be an interesting option since satisfactory results were obtained in the solar-based photo-Fenton experiments compared to the lab-scale ones, and also since a significant improvement with respect to the solar photolysis was achieved when performing the UV/H₂O₂ reaction with sunlight. Finally, some of the resultant effluents from different reactions were subjected to a short-term biodegradability test in order to estimate their quality from a biological point of view.

Introduction

Frequent occurrences of trace xenobiotic organic contaminants such as pharmaceuticals, pesticides, and personal care products in sewage effluent and the aquatic environment have raised concerns about their potential impact on the environment and public health. Examples of the adverse environmental impacts caused by organic pollutants include acute toxicity, development of resistance in bacteria, genotoxicity, and endocrine disruption.^{1,2} Pharmaceutical compounds are designed to produce a biological effect in human beings or animals and their possible side-effects on aquatic ecosystems is still not clear. Wastewater treatment plants (WWTPs) equipped with an activated sludge process can effectively accomplish carbon and nitrogen removal, as well as microbial pollution control. However, these plants have not been specifically designed to remove these polluting pharmaceutical compounds efficiently.^{3,4}

Antibiotics are an important group of pharmaceuticals in today's medicine. In addition to the treatment of human infections, they are also used in veterinary medicine. Of all emerging contaminants, they are probably the biggest worry because they may cause long-term and irreversible change to a microorganism's genome, making them resistant in their presence, even at low concentrations.²⁻⁷ Sulfonamides are the fifth most-used chemotherapeutics in veterinary practice within the EU, because of their inexpensiveness and wide spectrum of activity, to prevent or treat acute and chronic bacterial infections. They are also used in the treatment of human infections. Because of their water solubility, sulfonamides are potential pollutants to contaminate groundwater and surface water.³ Antibiotic sulfamethoxazole (SMX) has been chosen for this study since it is known to have low biodegradability.^{8,9} The fact that SMX is one of the five most common pharmaceuticals tested¹⁰ reveals the high concern that it causes. Due to its high biorecalcitrance, the possibility of treatment by means of advanced oxidation processes (AOPs) is being investigated. These processes can either eliminate such pollutants completely through mineralization or convert them to products that are less harmful to human health and the aquatic environment.

Some works can be found in the literature dealing with AOPs applied to the oxidation of SMX. Only ozonation, photo-Fenton and photocatalysis (TiO_2), these last two using artificial light, have been applied to the oxidation of SMX.¹¹⁻¹³ For this reason, another AOP such as UV/ H_2O_2 and the use of sunlight as a source of radiation have been studied in this work.

Although the majority of published work deals with the removal of trace quantities of specific compounds from surface waters or municipal WWTPs, some researchers have also concentrated their efforts on the treatment of effluents from pharmaceuticals manufacturing or hospital operation. Unlike surface and ground waters, and WWTP effluents, this type of waste is highly contaminated (in the order of several g L^{-1} COD) and, therefore, should be treated as industrial effluent. A high concentration of SMX has also been chosen for this study. Specifically, a 200 mg L^{-1} SMX solution was subjected to a) photolysis using black-light blue (BLB) lamps, low-pressure mercury vapor UV lamps (254 nm) and sunlight, b) UV/ H_2O_2 using 254 nm lamps and sunlight, and finally c) photo-Fenton using BLB lamps and sunlight. A comparison between the efficiencies of the different oxidation processes used has been done. For this purpose, total organic carbon (TOC), chemical oxygen demand (COD), SMX, produced inorganic ions and H_2O_2 concentrations were monitored. Biochemical oxygen demand at 5 days (BOD_5) and short-term biodegradability (by a simple fast measurement of the O_2 consumption corresponding to the faster biodegradable organic matter present in the media) were also measured in some cases.

Materials and methods

Analytical methods

Samples were withdrawn periodically along the different experiments in order to determine the following parameters: TOC, COD, BOD_5 or concentrations of SMX (supplied by Sigma, 99%), NO_3^- , NH_4^+ , total N, SO_4^{2-} and H_2O_2 .

The concentration of H_2O_2 (supplied by Panreac 30% w/v) was frequently determined in fresh sample solutions using Quantofix® test sticks (Macherey-Nagel). When necessary, the concentration of peroxide was measured by iodometric titration (more accurate method). TOC was measured by means of a Shimadzu TOC-VCSN TOC analyzer. The concentration of the antibiotic was quantified by means of an HPLC supplied by Waters Corporation (configuration described elsewhere;¹⁴ wavelength used: 270.5 nm). To analyze the COD, the Standard Methods 5220D procedures were followed.¹⁵ For the evaluation of the BOD_5 , the WTW OxiTop® measuring system (Weilheim, Germany) thermostated at 20°C was used. The measurement was done following the Standard Methods 5210D procedures.¹⁵ Ammonium and anion concentrations were determined by ionic chromatography. A persulfate digestion method (Hach Test'N Tube^{1M} Vials; method 10072) was used to measure the total N present in the

resultant effluents.

The samples to be analyzed by HPLC were quenched with 50% MeOH (Panreac PAI) to avoid further reactions. Catalase from bovine liver (Sigma) was used to destroy the H_2O_2 to determine COD and SO_4^{2-} concentration. Finally, the samples for the rest of the analysis were quenched with NaHSO_3 (Panreac QP, 40% w/v).

Short-term biodegradability tests. Some of the resultant effluents from different reactions were subjected to a short-term biodegradability test in order to estimate their quality from a biological point of view. The effluents were kept refrigerated. Before the analysis, neutralization and addition of nutrients and buffer were needed. Directions from the Respirometric Standard Method 5210 D (APHA, 1985) were followed for this purpose.¹⁵ Initially, the effluent was left to reach room temperature, and the pH was increased to 7 with NaOH and buffered with 6 mL L^{-1} of NaH_2PO_4 solution 1.5N. After that, 2 mL L^{-1} of each of the following solutions were added: NH_4Cl 0.71N, CaCl_2 0.25N, MgSO_4 0.41N, and FeCl_3 0.018N. This test involved the measurement of biomass respiration rate (oxygen uptake rate (OUR)) by oxygen probes (Orion Model 97-08) for a period of approximately 25 minutes in 300 mL BOD bottles. The test was conducted keeping the biomass (aerobic sludge taken from a WWTP was used as inoculum) concentration constant at 300 mg L^{-1} as total volatile suspended solids. A modification of the OECD Method 209²⁴ was followed as the experimental protocol for the short-term tests.

Accumulated energy. The radiation energy (accumulated energy entered in the reactor; kJ L^{-1}) used in each reaction was calculated taking into account the wavelengths involved in each photo-oxidation process and the emission spectrum of the radiation source (either lamps or sun). There was no controversy when working with lamps since all the emitted radiation is involved in the oxidation process. Regarding the solar-based UV/ H_2O_2 experiments, radiation between 300 and 360 nm was quantified taking into account the solar UV radiation measurements and the solar spectrum since light above 360 nm was not considered useful for the H_2O_2 photolysis.¹⁶ Concerning photolysis with sunlight, the same range was selected since this experiment was carried out in order to quantify the contribution of direct photolysis in the UV/ H_2O_2 experiment. Finally, radiation ranging from 300 to 500 nm (calculated also taking into account the solar UV radiation measurements and the solar spectrum) was considered for solar-based photo-Fenton experiments since the photolysis of Fe(III) complexes with organic ligands is efficient up to 500 nm.¹⁷

Experimental systems

UV-R. Photolysis and UV/ H_2O_2 experiments were carried out in a continuously stirred, two-liter quartz reactor vessel, which was placed centrally inside a *RAYONET* photochemical chamber, equipped with 16 low-pressure mercury vapor UV lamps (254 nm; nominal power of 8 W each) (*RPR-1849/2537A*) that surround the reaction vessel. Radiation entering the reactor was determined to be 3.78 W by means of a *UVX DIGITAL RADIOMETER UVP* using a *UVX-25* sensor. The experiments in this set-up were performed at a steady temperature of 42 °C and at free pH.

BLB-R. Photolysis and photo-Fenton experiments were performed in the same reactor vessel and the same *RAYONET* photochemical chamber of set-up UV-R, but equipped with 8 BLB (ranging from 350–400 nm with maximum intensity about 360 nm) (*EIKO F5T8 BLB*) with nominal power of 8 W each in this case. The radiation entering the reactor was measured using a *UVX-36* sensor this time and it was found to be 0.87 W. The pH was initially adjusted to 2.8 with H_2SO_4 and the temperature was not controlled. The initial temperature was 23 °C and it did not exceed 31 °C in any reaction.

4CPC-R. Solar-based photo-Fenton experiments were conducted in this system. The solar pilot plant consisted of a continuously stirred tank, a centrifugal recirculation pump, a solar collector and connecting tubing and valves. Several on-line sensors and devices for controlling the temperature were installed in the connecting tubing. The recirculation flow rate was set at 25 L min^{-1} . The solar reactor was composed of four compound parabolic collector (CPC) units (concentration factor = 1) with an area of 1.04 m^2 (total area 4.16 m^2), mounted on a fixed platform tilted 37° (local latitude) facing south. The total illuminated volume inside the borosilicate-glass absorber tubes was 44.6 L whereas the total volume was 82 L . The experimental procedure as well as a scheme of the plant is presented elsewhere.¹⁸ Solar ultraviolet radiation was determined by a global UV radiometer measuring radiation from 300 to 400 nm (*KIPP & ZONEN*, model *CUV3*), mounted on a platform tilted 37° (the same angle as the CPCs). The efficiency of the CPC mirrors and the transmittance of the material from which the walls of the photoreactors are made have been considered total in the systems working with sunlight. Therefore, the radiation entering has been considered equal to the radiation arriving. The solar emission spectrum has been used to estimate the entering solar radiation between 300 and 500 nm. The temperature was fixed at 26°C and the initial pH was adjusted to 2.8 with H_2SO_4 in all the experiments.

3CPC-R. A solar-based UV/ H_2O_2 experiment was carried out in this pilot plant. The set-up was very similar to the one described above. This one had three CPC units. Collectors (total area 3.09 m^2) were mounted on a fixed platform tilted 37° (local latitude). The water flowed at 20 L min^{-1} . The total volume was 35 L , 22 of which corresponded to the irradiated volume inside the borosilicate-glass absorber tubes. The pilot plant as well as the experimental procedure is described in detail elsewhere.¹⁹ Solar ultraviolet radiation was measured by the same global UV radiometer used in set-up 4CPC-R. The solar emission spectrum was used to estimate the arriving solar radiation between 300 and 360 nm. In this case, the temperature was not controlled ($23\text{--}43^\circ \text{C}$) during the experiment and the pH was not adjusted.

Beaker-R. A photolysis experiment with sunlight was performed in a three-liter Pyrex beaker (internal diameter = 13.5 cm) covered with a Pyrex top to avoid sample contamination and evaporation. The beaker was continuously stirred and exposed to direct sunlight during the photolysis test. Solar ultraviolet radiation was measured by the same global UV radiometer used in set-up 4CPC-R. The temperature inside the beaker was $25\text{--}40^\circ \text{C}$ during the experiment and the initial pH was set at 2.8.

Procedures

Photolysis. Three different photolysis experiments were conducted using different radiation sources: 254 nm lamps (set-up UV-R), BLB lamps (set-up BLB-R) and solar light (set-up Beaker-R).

UV/ H_2O_2 . These experiments were conducted in two different systems: at laboratory scale (UV-R, using 254 nm lamps) and at solar pilot plant scale (set-up 3CPC-R). The amounts of H_2O_2 (50, 100, 200 and 250 mg L^{-1}) chosen to perform the experiments in the laboratory installation were introduced under vigorous magnetic stirring at the beginning of the reaction and the UV lamps were switched on simultaneously. The system was left to react until only 10 mg L^{-1} of H_2O_2 remained in the solution (the H_2O_2 photolysis rate becomes too slow at low concentrations of the reagent).

Another UV/ H_2O_2 experiment was carried out under sunlight using the installation 3CPC-R with the objective of assessing the efficiency of the UV/ H_2O_2 reaction using solar radiation. The H_2O_2 concentration chosen for this comparative evaluation was the highest one tested in the laboratory because the molecular extinction coefficient of H_2O_2 is quite low in the range of wavelengths available within the solar radiation.

Photo-Fenton. Photo-Fenton experiments were carried out with BLB lamps and with solar light at laboratory and pilot plant scale respectively (installations BLB-R and 4CPC-R). Regarding the experiments conducted in the lab-scale reactor, it is important to say that the amounts of H_2O_2 (50, 100, 200, 300 and 400 mg L^{-1}) chosen to perform the experiments were introduced at the beginning of the reaction and the reactions were considered finished when all the H_2O_2 was consumed.

Two different types of solar-based photo-Fenton experiments were performed in the pilot plant 4CPC-R. 300 mg L^{-1} of H_2O_2 were added at the beginning in the first one to obtain a direct comparison with the experiment carried out with the same initial H_2O_2 concentration but in the lab-scale installation (BLB-R). The system was also left to react until all the H_2O_2 was used up. In the second case a dose of 50 mg L^{-1} of H_2O_2 was fed into the reactor. When the H_2O_2 was completely consumed, a sample was withdrawn and another aliquot of 50 mg L^{-1} was supplied until a total concentration of 550 mg L^{-1} was achieved. This last experiment was performed in order to determine the maximum oxidation degree that could be reached based on the amount of oxidizing agent consumed.

10 mg L^{-1} of Fe^{2+} were added as $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac PA) to perform all the photo-Fenton experiments.

Results

The main objective of this work is to compare the efficiency of the different light-assisted oxidation technologies used. Analysis of the obtained results is complex due to the heterogeneity of the factors involved in the processes: different reaction set-ups, oxidation processes, sources of light, *etc.* For this reason, all reactions where H_2O_2 was added were left to react until it was completely consumed. Final abatements, characteristics and effluent qualities achieved by means of the different reactions were compared. To complement the comparison, the amounts of energy involved in the reactions were also reported.

Photolysis

As expected, since the SMX molecule does not absorb radiation above 305 nm, photolysis experiments carried out with BLB lamps did not cause SMX degradation in solution (results not shown). As could be presumed from the absorption spectra of SMX and shown in [Fig. 1](#), photolysis experiments carried out with 254 nm lamps in the UV-R set-up led to a very fast antibiotic removal. Only 20 minutes (2.3 kJ L^{-1}) were necessary for the complete elimination of 200 mg L^{-1} of SMX. A much smaller removal rate was obtained when working with sunlight (48 mg L^{-1} after 53 kJ L^{-1}). Major COD elimination (31.9%) was also obtained for the 254 nm photolysis. On the other hand, independently of the source of light used, the mineralization of SMX was nearly negligible as shown by the TOC results.

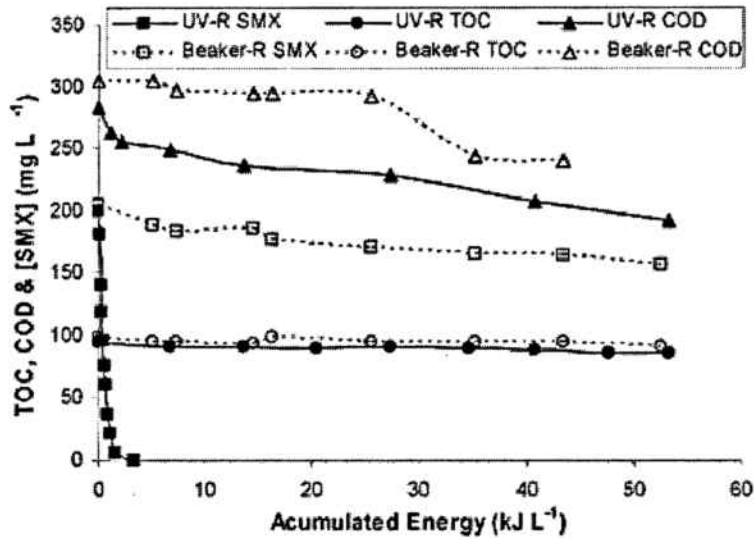


Fig. 1 TOC, COD and SMX elimination profiles for both the lab-scale (UV-R) and the solar-based (Beaker-R) photolysis experiments.

Formation of NO_3^- was negligible in both cases. However, Fig. 2 shows that significant amounts of N and S were found as NH_4^+ and SO_4^{2-} respectively, especially for the experiments performed in set-up UV-R. The photolysis with 254 nm lamps showed that 53.3 kJ L^{-1} led to the formation of 26.6% and 82.0% of the stoichiometrically possible NH_4^+ and SO_4^{2-} , respectively. Experiments performed with solar energy in Beaker-R demonstrated the stability of SMX under natural light, which is consistent with its persistence in the environment. Basing on the results, photolysis with 254 nm lamps could seem a suitable technology to remove the SMX from water. But attending to the low TOC decrease, concern about the persistence and toxicity of resulting metabolites could arise since some intermediates are more toxic than the original antibiotic.¹² Therefore other more powerful treatment methods should be applied in order to efficiently treat waters contaminated with SMX.

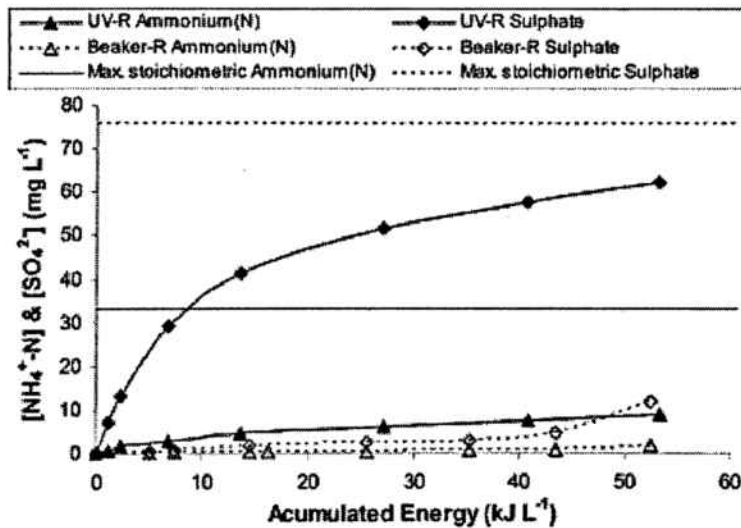


Fig. 2 Ion generation during the lab-scale (UV-R) and the solar-based (Beaker-R) photolysis reactions.

Concerning the experiments performed in the lab-scale reactor (UV-R), when different initial doses of H_2O_2 were added at the beginning of the experiment, SMX degradation rate was almost identical to that observed during the photolysis experiment in UV-R. This fact is consistent with the rapid degradation suffered by SMX in the mentioned experiment. As expected, the addition of H_2O_2 improved the final COD and TOC removals satisfactorily compared to the direct photolysis of SMX. Partial oxidation (COD decrease), mineralization (TOC decrease) and final ion concentrations achieved for the different initial H_2O_2 concentrations assessed, as well as those for the photolysis experiment, are presented in [Table 1](#). NO_3^- formation was not significant.

Table 1 TOC and COD eliminations achieved and inorganic ionic species formation by means of photolysis and UV/ H_2O_2 experiments carried out in set-up UV-R

	ΔTOC (%)	ΔCOD (%)	Irradiation time/min	Accumulated energy/ kJ L^{-1}	$[\text{NH}_4^+]$ $[\text{mgN L}^{-1}]$	$[\text{SO}_4^{2-}]$ / mg L^{-1}
Photolysis	9.2	31.9	470	53.3	8.8	62.2
$[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 50$ mg L^{-1}	5.4	23.0	190	21.5	4.9	48.6
$[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 100$ mg L^{-1}	39.6	61.9	440	49.9	10.6	67.2
$[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 200$ mg L^{-1}	62.3	79.1	380	43.1	11.2	66.9
$[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 250$ mg L^{-1}	59.9	79.3	298	33.8	11.2	68.2

The observed formation of a thin oily layer over the internal side of the quartz reactor for all the initial H_2O_2 concentrations studied, would explain the abnormal behavior of the irradiation time necessary to consume the initial H_2O_2 added. The difficulty of the radiation to penetrate appropriately through the reactor caused a decrease in the H_2O_2 photolysis rate when the H_2O_2 concentration was increased from 50 up to 100 mg L^{-1} . The higher initial concentration of hydroxyl radicals ($^{\bullet}\text{OH}$) achieved when dosing bigger amounts of H_2O_2 ($\geq 200 \text{ mg L}^{-1}$), enabled the partial destruction of the oily layer, suppressing its negative effect to a great extent and increasing the reaction rate.

The same oxidation results were obtained using 200 or 250 mg L^{-1} of H_2O_2 after long irradiation times and obtaining substantial mineralization. The mineralization rate was higher with 250 than with 200 mg L^{-1} of H_2O_2 due to the higher $^{\bullet}\text{OH}$ concentration. However, the same degree of mineralization was achieved. It is therefore envisaged that highly oxidized end-products that are formed during chemical oxidation tend to be refractory to total oxidation. These end-products are typically represented by short carboxylic acids, described as very stable final intermediates prior to mineralization.²⁰

It seems appropriate to work with high H_2O_2 concentrations in order to avoid the mentioned operation problem, reaching good TOC and COD elimination with shorter irradiation times.

Concerning the solar-based experiment (3CPC-R), although 250 mg L^{-1} of H_2O_2 were added at the beginning of the reaction, only 55% had been abated at the end of an 11 hour experiment (almost 40 kJ L^{-1}) with an average solar radiation of 11.26 W m^{-2} (measured between 300 and 360 nm). Eliminations achieved in the 3CPC-R were much lower than those reached in the lab-scale experiment. The concentrations of NH_4^+ and SO_4^{2-} were also much lower and the amount of NO_3^- continued to be negligible. The comparison of the results is shown in [Fig. 3](#) and [4](#). The

solar-based UV/H₂O₂ process is not efficient for mineralizing SMX due to the low absorption of solar photons by hydrogen peroxide and, therefore, the non-substantial formation of [•]OH. However, the use of sunlight to conduct UV/H₂O₂ reactions should be taken into consideration since it led to almost complete elimination of SMX and the energy consumed by the 254 nm lamps was very remarkable. To point out the relevance of the specific H₂O₂ photolysis with solar radiation, the comparison between values obtained by means of solar photolysis (set-up Beaker-R) and solar-based UV/H₂O₂ (set-up 3CPC-R) when 35 kJ L⁻¹ had entered the systems is presented next. The SMX and TOC eliminations were 18.9 and 3.7% respectively in installation Beaker-R. In addition, NH₄⁺ and SO₄²⁻ amounts reached 2.0 and 4.0% with respect to the maximum possible stoichiometric values. With regards to the solar UV/H₂O₂ experiment, SMX and TOC eliminations were 82.6 and 12.6% respectively and final NH₄⁺ and SO₄²⁻ amounts were 11.8 and 41.8% of the maximum possible values. The results revealed the importance of this specific oxidation process in spite of using solar radiation.

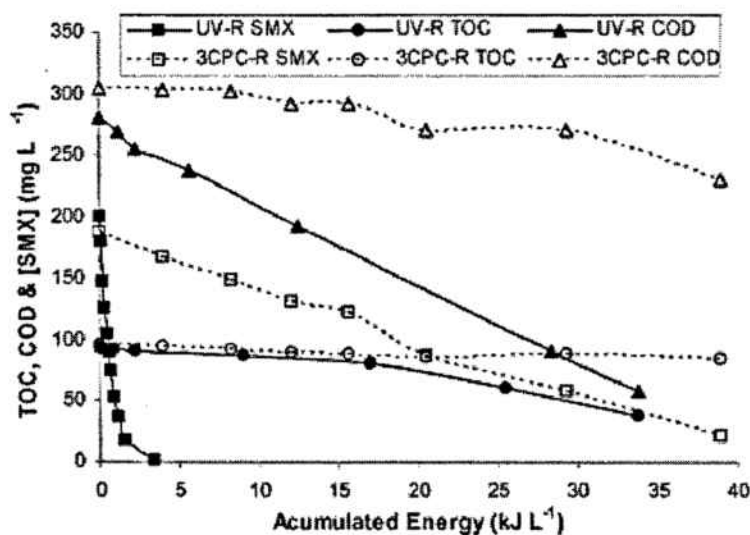


Fig. 3 TOC, COD and SMX elimination profiles by UV/H₂O₂ for both the lab-scale (UV-R) and the solar-based (3CPC-R) experiments conducted with 250 mg L⁻¹ of H₂O₂.

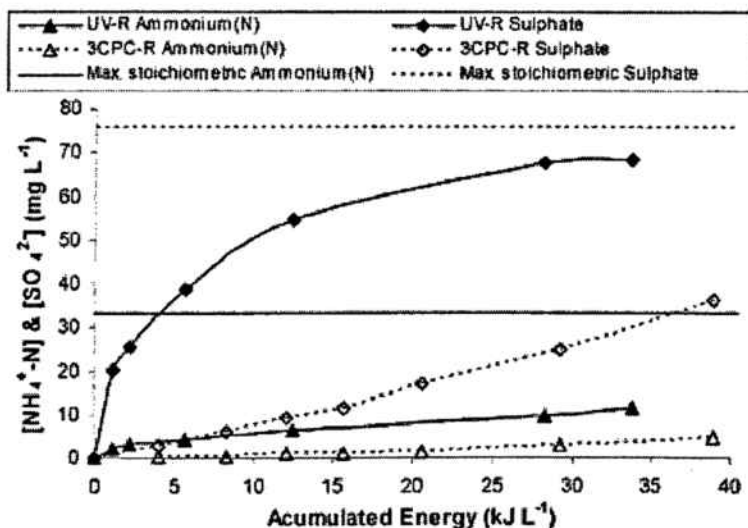


Fig. 4 Ion generation during the lab-scale (UV-R) and the solar-based (3CPC-R) UV/H₂O₂ reactions performed with 250 mg L⁻¹ of H₂O₂.

Photo-Fenton

Eliminations achieved by photo-Fenton in BLB-R, final ions (NO₃⁻ formation was negligible) and SMX concentrations in the effluents for the different initial H₂O₂ concentrations assessed, are presented in [Table 2](#). It is necessary to recall that the photolysis experiment in the same photoreactor did not produce any SMX degradation (see *Photolysis* section).

Table 2 TOC and COD removals achieved and inorganic ionic species formation by means of photo-Fenton experiments performed in set-up BLB-R ([Fe²⁺]_{initial} = 10 mg L⁻¹). Entered radiation involved in the reactions is also shown

	ΔTOC (%)	ΔCOD (%)	Irradiation time/min	Accumulated energy/kJ L ⁻¹	[NH ₄ ⁺ -N]/mgN L ⁻¹	[SMX]/mg L ⁻¹
[H ₂ O ₂] ₀ = 50 mg L ⁻¹	5.8	17.7	36	0.9	3.7	29.4
[H ₂ O ₂] ₀ = 100 mg L ⁻¹	5.3	29.4	42	1.1	5.2	5.6
[H ₂ O ₂] ₀ = 200 mg L ⁻¹	16.6	46.5	57	1.5	7.2	2.2
[H ₂ O ₂] ₀ = 300 mg L ⁻¹	35.4	65.4	72	1.9	8.2	0.9
[H ₂ O ₂] ₀ = 400 mg L ⁻¹	56.4	82.2	94	2.5	8.9	0

A comparison between [Tables 1 and 2](#) reveals that, for a particular initial concentration of H₂O₂, the final eliminations reached were higher for the UV/H₂O₂ process in UV-R than for the photo-Fenton one in BLB-R. The higher degree of oxidation obtained can be also observed by comparing the final ion concentrations measured. However, the better oxidation reached in UV-R could be also achieved by means of the photo-Fenton experiments by increasing the initial amount of oxidant up to 400 mg L⁻¹. In addition, only 50 minutes were needed to remove the antibiotic completely when working with this initial concentration. From these results and also taking into account that the amount of energy consumed in photo-Fenton reactions is much lower than in UV/H₂O₂ ones (2.5 kJ L⁻¹ compared to 33.8 kJ L⁻¹ for these two particular experiments), photo-Fenton seems to be a better option in order to remove the organic matter present in the initial solution.

Since photo-Fenton has been selected as the best strategy to treat waters containing SMX, different experiments were performed at a larger scale in solar photoreactors in order to evaluate the viability of working with sunlight. A photo-Fenton experiment with an initial H₂O₂ concentration of 300 mg L⁻¹ was conducted with sunlight in 4CPC-R. It was preferred not to use a very large concentration of H₂O₂ to avoid substantial mineralization in order to better evaluate BOD₅, TOC and COD removals. The final concentrations of SMX and NH₄⁺ as well as the BOD₅ and the ratio of biodegradability (BOD₅/COD) of the effluent obtained, are presented and compared with those obtained for the analog reaction conducted at lab-scale (BLB-R) in

Table 3.

Table 3 Comparison between the degradations obtained by means of photo-Fenton reaction using both BLB lamps (set-up BLB-R) and sunlight (set-up 4CPC-R) with an initial H_2O_2 concentration of 300 mg L^{-1} . BOD_5 , BOD_5/COD , and final NH_4^+ and SMX concentrations of the effluents obtained are also shown

	ΔTOC (%)	ΔCOD (%)	$BOD_5/mg\ O_2$ L^{-1}	BOD_5/COD	$[NH_4^+-N]_{final}/mgN$ L^{-1}	$[SMX]_{final}/mg$ L^{-1}
Lab-scale	35.4	65.4	23.6	0.23	8.2	0.9
Pilot plant	34.6	68.3	25.1	0.29	10.0	2.3

The short duration of the experiment (50 minutes in 4CPC-R with an average solar radiation of 121.6 W m^{-2} measured between 300 and 500 nm; 19.0 kJ L^{-1}) and the good reproducibility of the experiment between lab and pilot plant scale encourages both the use of sunlight to conduct photo-Fenton reactions and a deeper study under different conditions.

Next, the results obtained by means of the solar-based aliquots photo-Fenton experiment are presented. Apart from characterizing the eliminations and the ion generations achieved, the ratio of biodegradability (BOD_5/COD) of the effluents after the consumption of each H_2O_2 aliquot was also determined in order to evaluate the biocompatibility of the effluents with a possible subsequent biological stage. The dissolved Fe profiles during the experiment were also followed since the oxidation process rate is greatly influenced by the dissolved iron available. Fig. 5 shows that 96% of COD reduction was achieved when 550 mg L^{-1} of H_2O_2 were consumed. Likewise, 87% of mineralization was also reached at this point.

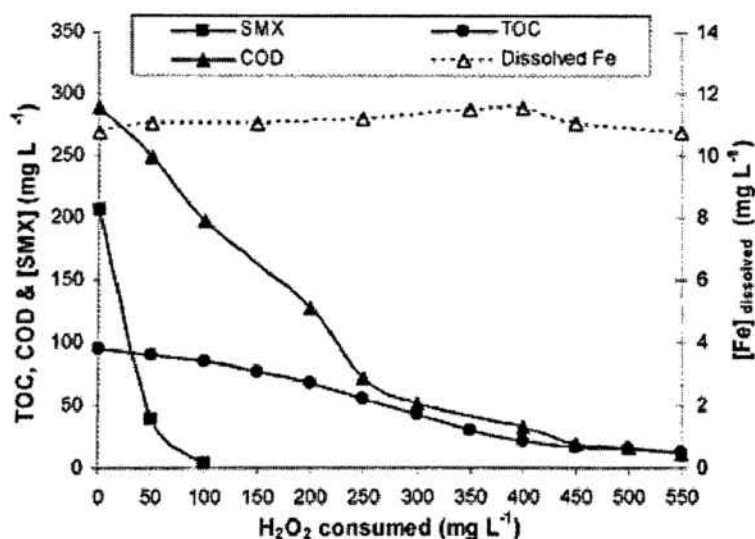


Fig. 5 TOC, COD, SMX and dissolved Fe concentrations for the different H_2O_2 amounts consumed during photo-Fenton experiment at the solar pilot plant (4CPC-R).

During the performance of the photo-Fenton experiments, the appearance of brown precipitates was observed. The monitoring of the total dissolved Fe shown in Fig. 5 reveals that the concentration of dissolved Fe remained constant during the experiment. Therefore, these

brown precipitates seem to be free of Fe, which is interesting in photo-Fenton reactions from a performance point of view. These results are consistent with the fact that similar brown precipitates were observed while experimenting with the other AOPs where Fe is not involved.

As Fig. 6 depicts, the maximum possible amount of SO_4^{2-} was detected when 550 mg L^{-1} of H_2O_2 were consumed. Nevertheless, only 53% of the maximum possible N was detected as NH_4^+ or NO_3^- , the latter being nearly negligible. Taking into account that total N was determined in every effluent and that it matched with the N present in the initial SMX solution, the non-released N probably formed part of nitrogenated organic compounds. The C/N molar ratio (organic) reached a value of 1 when 550 mg L^{-1} of H_2O_2 had been consumed.

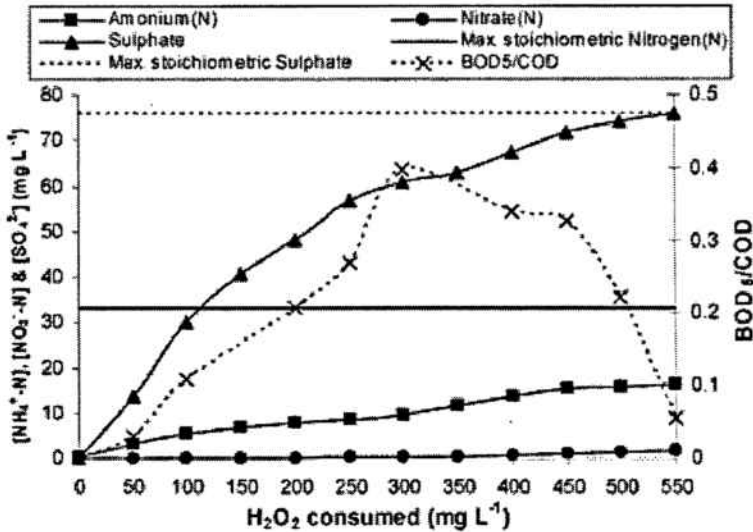


Fig. 6 Ion concentrations and biodegradability ratio values for the different H_2O_2 amounts consumed during photo-Fenton experiments at the solar pilot plant (4CPC-R).

The profile for the biodegradability ratio (BOD_5/COD) plotted in the same figure, indicates a very positive effect on the biodegradability of the solution. Metcalf & Eddy²¹ suggest that a municipal wastewater can be considered biodegradable if the attained ratio is higher than 0.4. In addition, previous experiences^{22,23} prove that TOC abatements around 75% are achieved biologically for similar effluents with a BOD/COD ratio in the order of 0.25. Attending to that, an integration of a solar-based photo-Fenton with a subsequent biological treatment might be successful.

Short-term biodegradability tests

Short-term biodegradability tests were conducted in order to evaluate the quality of the effluents obtained by means of direct photolysis (254 nm), UV/ H_2O_2 and photo-Fenton reactions in the lab-scale experiments. Results obtained with photo-Fenton at the lab-scale (BLB-R) could be extrapolated to the solar experiments as the H_2O_2 dose determines the same degree of mineralization in both conditions.

Effluents from lab-scale photo-Fenton reactions were subjected to BOD_5 tests. OURs of the same effluents were also determined. Firstly, endogenous respiration (blank) was subtracted from the OURs. After that, these rates were divided by the TOC of the corresponding effluent in order to make the measurement independent of the amount of organic matter present in the solutions. A comparison between the obtained values and the BOD_5 values mentioned above revealed a relationship between them. As Fig. 7 shows, a multiplying factor relates the short-term measurements to the BOD obtained at 5 days. Results indicate that this tool could be

useful to estimate the biodegradability of these types of effluents. Therefore, it has been used to compare the quality of the effluents obtained from the experiments mentioned at the beginning of this paragraph.

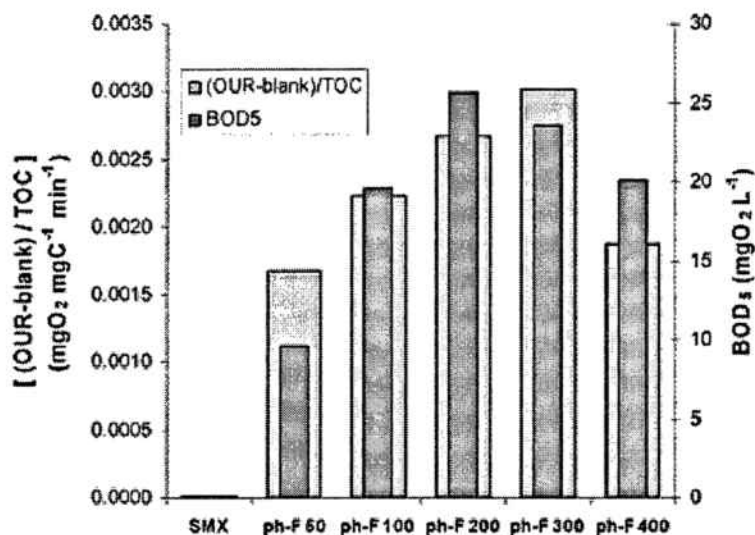


Fig. 7 Short-term biodegradability measurements and BOD₅ values for the initial SMX solution and the effluents obtained by photo-Fenton reaction in set-up BLB-R.

Short-term results of photolysis (254 nm), UV/H₂O₂ and photo-Fenton (all in lab-scale installations) effluents are presented together with that of a readily biodegradable yeast extract solution (TOC = 100 mgC L⁻¹) in Fig. 8. From these values, BOD₅ can be estimated using the calculated multiplying factor. Subsequently, the biodegradability ratio (BOD₅/COD) can be calculated dividing the estimated BOD₅ by the COD of the corresponding effluent. Thereby, the quality of the different effluents can be compared in order to select the most convenient oxidation treatment if integration with a biological process is being considered. Fig. 9 presents the UV/H₂O₂ with 200 mg L⁻¹ of H₂O₂, and the photo-Fenton with 300 and 400 mg L⁻¹ of H₂O₂ as the most adequate pre-treatments for this purpose following the biodegradability ratio criterion.

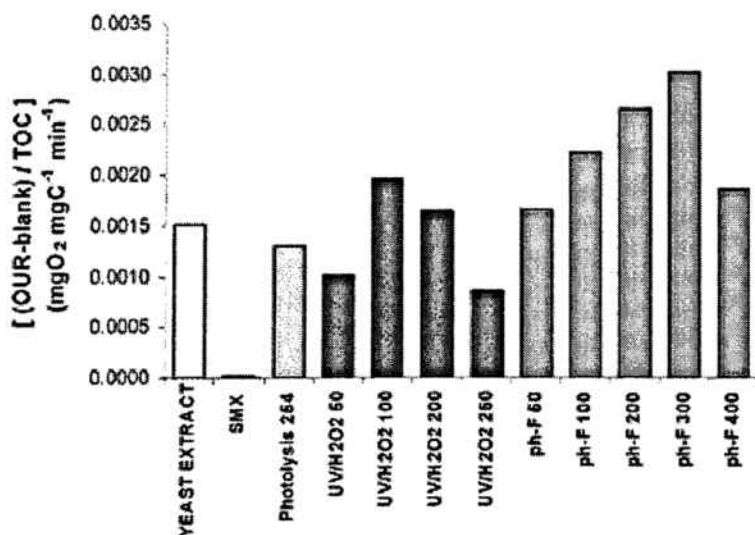


Fig. 8 Comparison of the short-term biodegradability measurements obtained for

the effluents from the photolysis (254 nm), UV/H₂O₂ and photo-Fenton experiments conducted in lab-scale reactors (UV-R and BLB-R).

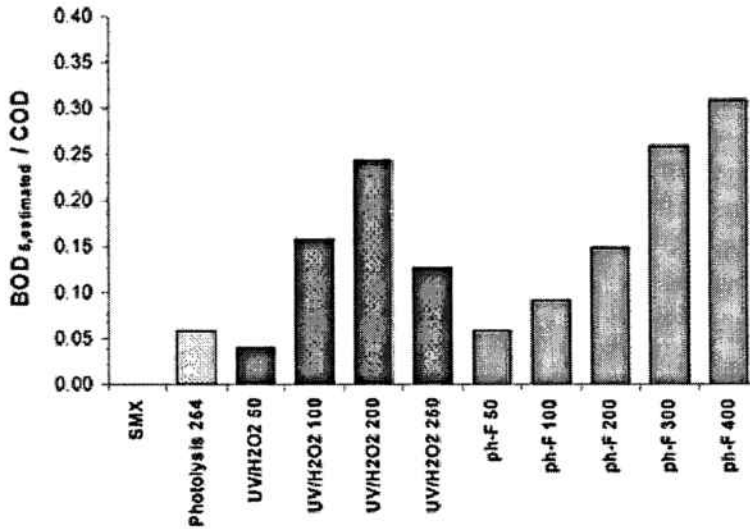


Fig. 9 Biodegradability ratios estimated using the short-term biodegradability measurements for the effluents from photolysis (254 nm), UV/H₂O₂ and photo-Fenton experiments conducted in lab-scale reactors (UV-R and BLB-R).

Conclusions

Photo-Fenton is the most appropriate AOP to remove the organic matter present in the initial solution when working with this high concentration of pollutant. The use of sunlight to conduct this reaction gave rise to practically the same results as those when working at lab-scale.

The UV/H₂O₂ process using 254 nm lamps could be an attractive alternative since addition of Fe and pH adjustment are not required. However, two important aspects should be taken into consideration: (a) the high consumption of energy required and (b) the formation of a thin oily layer that diminishes the reaction performance. The solar-based UV/H₂O₂ is a reaction to take into consideration in despite of low absorption of H₂O₂ above 300 nm since it led to the almost complete SMX elimination.

A good relationship between the short-term biodegradability measurements and the BOD₅ values was found. Therefore, these fast measurements could help to estimate the BOD₅ of wastewaters containing similar compounds in order to select the best pretreatment in case of the addition of a subsequent biological step.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Ministry of Education and Culture (CICYT Projects CTQ2005-00446/PPQ and CTQ2008-01710/PPQ) and to DURSI (Department of Universities, Research and Information Society, Generalitat de Catalunya) for funds received to carry out this research.

References

- 1 B. Halling-Sørensen, S. N. Nielsen, P. F. Lanzky, F. Ingersley, H. C. H. Lützhøft and S. E. Jørgensen, Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review, *Chemosphere*, 1998, 36, 357–393 [Links].
- 2 K. Kümmerer, Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources—a review, *Chemosphere*, 2001, 45, 957–969 [Links].
- 3 T. Heberer, Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicol. Lett.*, 2002, 131, 5–17 [Links].
- 4 M. Carballa, F. Omil, J. M. Lema, M. Llombart, C. García, I. Rodríguez, M. Gómez and T. Ternes, Behaviour of pharmaceuticals and personal care products in a sewage treatment plant of northwest Spain, *Water Sci. Technol.*, 2005, 52, 29–35.
- 5 S. D. Costanzo, J. Murby and J. Bates, Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment, *Mar. Pollut. Bull.*, 2005, 51, 218–223 [Links].
- 6 S. Kim, J. N. Jensen, D. S. Aga and A. S. Weber, Tetracycline as a selector for resistant bacteria in activated sludge, *Chemosphere*, 2007, 66, 1643–1651 [Links].
- 7 E. R. Cooper, T. C. Siewicki and K. Phillips, Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment, *Sci. Total Environ.*, 2008, 398, 26–33 [Links].
- 8 A. Radka, T. Kumpel and K. Kümmerer, Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test, *Chemosphere*, 2004, 57, 505–512 [Links].
- 9 M. L. Richardson and J. M. Bowron, The fate of pharmaceutical chemicals in the environment, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1985, 37, 1–12 [Links].
- 10 M. Klavarioti, D. Mantzavinos and D. Kassinos, Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes, *Environ. Int.*, 2009, 35, 402–417 [Links].
- 11 W. Baran, J. Sochacka and W. Wardas, Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions, *Chemosphere*, 2006, 65, 1295–1299 [Links].
- 12 O. Gonzalez, C. Sans and S. Esplugas, Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton. Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates, *J. Hazard. Mater.*, 2007, 146, 459–464 [Links].
- 13 R. F. Dantas, S. Contreras, C. Sans and S. Esplugas, Sulfamethoxazole abatement by means of ozonation, *J. Hazard. Mater.*, 2008, 150, 790–794 [Links].
- 14 J. Bacardit, A. Hultgren, V. García-Molina and S. Esplugas, Biodegradability enhancement of Wastewater Containing 4-Chlorophenol by means of photo-Fenton, *J. Adv. Oxid. Technol.*, 2006, 9, 27–34.
- 15 APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 16th ed. Washington DC, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, 1985.
- 16 S. Esplugas, M. Vicente, A. Ibarz, C. Prat and J. Costa, Influence of lamp position on available radiation flux in an annular photoreactor, *Chem. Eng. J.*, 1987, 34, 111–115 [Links].
- 17 J. J. Pignatello, E. Oliveros and A. MacKay, Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 2006, 36, 1–84 [Links].
- 18 M. Lapertot, C. Pulgarín, P. Fernández-Ibáñez, M. I. Maldonado, L. Pérez-Estrada, I. Oller, W. Gernjak and S. Malato, Enhancing biodegradability of priority substances (pesticides) by solar photo-Fenton, *Water Res.*, 2006, 40, 1086–1094 [Links].

- 19 M. Kositzki, I. Poulios, S. Malato, J. Caceres and A. Campos, Solar photocatalytic treatment of synthetic municipal wastewater, *Water Res.*, 2004, 38, 1147–1154 [[Links](#)].
- 20 C. Comninellis, A. Kapalka, S. Malato, S. A. Parsons, I. Poulios and D. Mantzavinos, Advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for R & D, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2008, 83, 769–776 [[Links](#)].
- 21 Metcalf & Eddy, *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal, and Reuse*, McGraw-Hill, Inc., New York, 3rd edn, 1991, 1334 p.
- 22 O. González, M. Esplugas, C. Sans and S. Esplugas, Biodegradation of photo-Fenton pre-treated solutions of Sulfamethoxazole by aerobic communities. Molecular biology techniques applied to the determination of existing strains, *J. Adv. Oxid. Technol.*, 2008, 11, 238–245.
- 23 O. González, M. Esplugas, C. Sans, A. Torres and S. Esplugas, Performance of a Sequencing Batch Biofilm Reactor for the treatment of pre-oxidized Sulfamethoxazole solutions, *Water Res.*, 2009, 43, 2149–2158 [[Links](#)].
- 24 OECD Method 209, Activated Sludge, Respiration Inhibition Test, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 1987.

Footnote

† This article was published as part of the themed issue in honour of Esther Oliveros.

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2009

APÉNDICE II

Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates

El artículo ha sido publicado en *Journal of Hazardous Materials*, vol. 146 (2007), pp. 459-464.

Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates

Oscar González*, Carme Sans, Santiago Esplugas

Facultat de Química, Departament d'Enginyeria Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1, 08028 Barcelona, Spain

Available online 20 April 2007

Abstract

The objective of this work was to study the abatement of 200 mg L⁻¹ sulfamethoxazole (SMX) solution by means of photo-Fenton process. Biodegradability of the treated solutions was followed by the ratio biochemical oxygen demand at five days/chemical oxygen demand (BOD₅/COD) and toxicity by Microtox[®] and inhibition tests. Experiments with different initial concentration of H₂O₂ were carried out. The initial amount of Fe²⁺ and pH of the solution were set at 10 mg L⁻¹ and 2.8 respectively. The temperature of the reactor was kept constant in all the experiments (25 ± 0.8 °C). Photo-Fenton process is thought to be a successful treatment step to improve the biodegradability of wastewater containing SMX. The complete antibiotic removal was achieved for a H₂O₂ dose over 300 mg L⁻¹. Biodegradability (BOD₅/COD) rose from zero (SMX solution) to values higher than 0.3 (treated solutions). Toxicity and inhibition tests pointed out in the same direction: oxidized intermediates for initial H₂O₂ dose over 300 mg L⁻¹ showed no toxicity effects on pure bacteria and no inhibition on activated sludge activity.

© 2007 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Photo-Fenton; Sulfamethoxazole; Antibiotic; Biodegradability; Toxicity; Inhibition

1. Introduction

In the beginning of the 21st century, the lack of water is one of the biggest concerns. The shortage of fresh pure water affects more than 25% of the world population and according to the World Health Organization (WHO), every year, 2.2 millions people die because of this reason [1]. Additionally, and especially in developed countries, large amounts of water are being polluted due to industrial activity and domestic use. Restoring the quality of wastewater is essential in order to avoid further pollution of the environment and also, to allow the reuse of this water, decreasing thus the fresh water consumption. Reflecting a new environmental conscience, the European Directive 2000/60/CE pointed out the necessity of a progressive reduction of pollutants in water effluents. Antibiotics are one of the numerous recalcitrant pollutants present in aqueous medium that might not be treatable in the biological step of the sewage treatment plants, because of their antibacterial nature [2]. Furthermore, the presence of antibiotics in wastewaters has increased in the last

years and their abatement will be a challenge in the near future. Among all the emerging organic pollutants, antibiotics are those, which have become of increasing concern, due to the possible appearance of resistant bacterial cultures as a consequence of their extensive use.

Advanced oxidation processes (AOP) have proved to be highly effective for the removal of most of the pollutants in wastewaters [3]. Photo-Fenton reaction is also well-known in the literature. It is an efficient method for wastewater and soil treatment [4,5]. Photo-Fenton is known to be able to improve the efficiency of dark Fenton reagent by means of the interaction of radiation with Fenton's reagent [6]. Hydroxyl radicals are produced by the decomposition of hydrogen peroxide when reacting with ferrous ions in presence of UV light, which contributes in an additional pathway to the generation of free radicals, increasing the concentration of hydroxyl radicals [7]. It should be pointed that the recognition of the •OH radical as the active intermediate is not yet universal, and even doubts as to its very existence in the system have been raised [8].

Only a few works dealing with the treatment of water containing sulfamethoxazole (SMX) have been reported in the literature [9–13]. However, no studies aiming its treatment using photo-Fenton process have been found. The aim of the present

* Corresponding author. Tel.: +34 93 4021290; fax: +34 93 4021291.

E-mail address: ogonzalez@angel.qui.ub.es (O. González).

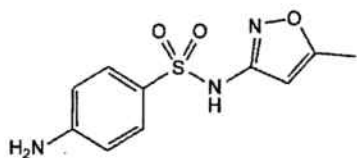


Fig. 1. Chemical structure of SMX.

work is to study the degradation of an antibiotic, the SMX ($C_{10}H_{11}N_3O_3S$) (see Fig. 1), by means of photo-Fenton process, with the further intention of decreasing the toxicity and improving the biodegradability of the resultant waters.

2. Materials and methods

2.1. Experimental device and procedure

The photochemical reactor was a Pyrex-jacketed thermostatic 2 L vessel (inner diameter 11 cm; height 23 cm) (Fig. 2), equipped with three black-light blue lamps (length 30 cm), placed in its centre (Philips TL 8W-08 FAM), with nominal power of 8 W each, which emitted radiation between 350 and 400 nm, with a maximum at 365 nm. The vessel was covered with aluminum foil to avoid personal damage. The photon flow arriving in the system was measured before and after the experimental set by means of actinometries [14]. It changed from 6.85 to 5.67 μ Einstein s^{-1} . The temperature was kept at 25 ± 0.8 °C with a thermostatic bath (Haake C-40) and good mixing was provided using a magnetic stirrer.

A 200 $mg L^{-1}$ SMX (Sigma, >99%) aqueous solution (total organic carbon, $TOC = 94.5$ $mg CL^{-1}$ and $COD = 290$ $mg O_2 L^{-1}$) was fed into the reactor. Then, 10 $mg L^{-1}$ of Fe^{2+} were added in form of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Panreac PA). The pH was adjusted to 2.8 with H_2SO_4 aqueous solution. Finally, the necessary amount of H_2O_2 (Panreac PRS, 30%, w/v) was introduced under vigorous magnetic stirring and the UV lamps were switched on simultaneously. The system was let to react until all the H_2O_2 was consumed.

Samples were withdrawn periodically from the reactor to monitor the H_2O_2 consumption using Quantofix® test sticks (Macherey–Nagel) and were quenched with sodium hydrogen sulphite (Panreac QP, 40%, w/v) or with the same volume of methanol (Panreac PAI) (to avoid further reactions) in order to use these samples for total organic carbon and HPLC analysis

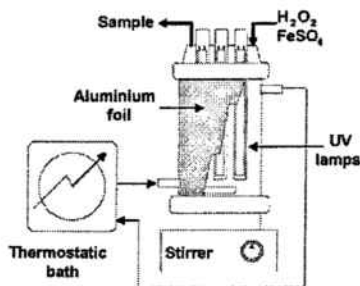


Fig. 2. Scheme of the device where the photo-Fenton reactions were carried out.

respectively. The resulting effluent was kept to carry out chemical oxygen demand (COD), biochemical oxygen demand at five days (BOD_5), Microtox® and inhibition test analysis. TOC was measured by means of a Shimadzu TOC-VCSN TOC analyzer. The concentration of the antibiotic was quantified by means of a HPLC supplied by Waters Corporation (configuration described elsewhere [15]; wavelength used: 270.5 nm). To analyze the COD, the Standard Methods 5220D procedures were followed [16]. For the evaluation of the BOD_5 , the WTW OxiTop® measuring system (Weilheim, Germany) thermostated at 20 °C was used. The measure was done following the Standard Methods 5210D procedures [16].

2.2. Microtox® test

Acute toxicity of the SMX initial solution and the photo-Fenton final effluents was measured by Microtox® toxicity test, using *Vibrio fischeri* strains. Analysis was conducted according to the standard Microtox® test procedures recommended by the manufacturer (Azur Environmental, Delaware, USA). Toxicity is expressed as EC_{50} value, the concentration of sample that causes a 50% reduction in light emission. In this paper, the $EC_{50,15\text{ min}}$ value, that is after 15 min of contact, was used to trace the change in toxicity due to the photo-Fenton treatment of SMX. The pH value of all test samples was neutralized at seven before toxicity was measured. A color correction procedure was incorporated to the highly colored photo-Fenton samples, according to the manufacturer procedure. The EC_{50} values used in this study are expressed as percentage (% v/v) of the initial sample. In addition, EC_{50} values were transformed to toxicity units (TU). $TU = 100/EC_{50}$. The conversion of EC_{50} values to TU brings out the lowest EC_{50} values.

2.3. Activated sludge inhibition test

Activated sludge inhibition tests were conducted in accordance with the test procedure described in OECD method 209. All experiments were run at constant temperature of 20 ± 2 °C. The activated sludge was obtained from the domestic wastewater treatment plant of Gavà (Barcelona). The biomass used in the test was fed with synthetic sewage as described in OECD. The 500-mL test samples were aerated for 3 h containing proper amounts of activated sludge. (Total suspended solids = 1.2 $g L^{-1}$.) Susceptibility of each batch of activated sludge was checked determining the EC_{50} value of 3,5-dichlorophenol, and its acceptable range was defined between 5 and 30 $mg L^{-1}$. The test result was considered acceptable when the deviation between the oxygen-consumption rates of the blanks was lower than 15%.

The decrease in dissolved oxygen concentration in the blank synthetic wastewater and in different dilutions of raw and treated SMX effluent samples was monitored from 6.5 to 2.5 $mg L^{-1}$, or over a period of 15 min using a Crison Oxi 330i model oxygen meter. During the measurement, the sludge was kept suspended with a magnetic stirrer. Oxygen uptake rates (OUR), expressed in $mg L^{-1} h^{-1}$ were calculated on the basis of the linear part of the decreasing dissolved oxygen concentration curves versus time. Inhibition percentage of OUR, i.e., I_{OUR} , for every tested

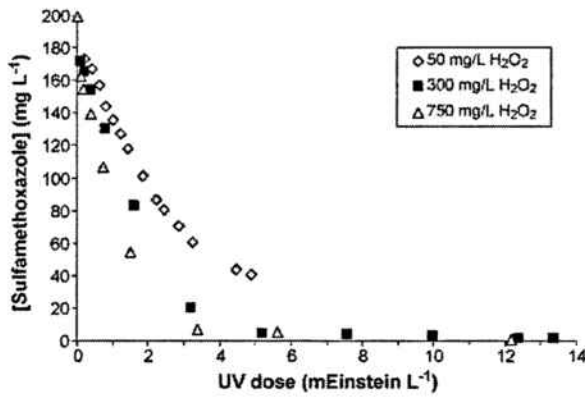


Fig. 3. SMX degradation for three different initial H₂O₂ concentration used in photo-Fenton experiments; [SMX]₀ = 200 mg L⁻¹, [Fe²⁺]₀ = 10 mg L⁻¹, pH₀ 2.8, T = 25 °C.

sample dilution was calculated using the Eq. (1):

$$I_{OUR}(\%) = \left[1 - \frac{2R_S}{R_{c1} + R_{c2}} \right] \times 100 \quad (1)$$

where R_S is the oxygen uptake rate in the sample effluent mixture and R_{c1} and R_{c2} are the oxygen uptake rates in the blank samples.

3. Results and discussion

3.1. Photo-Fenton results

Photo-Fenton reactions at different concentrations of H₂O₂ were carried out to investigate the influence of hydrogen peroxide in the degradation of a 200 mg L⁻¹ SMX solution. TOC and SMX concentration were monitored for each concentration of H₂O₂. The accumulated photons entering the system were chosen instead of time to study the evolution of the experiments because a decrease in the photon flow of the lamps was observed along the period of time that the experiments were carried out. Three of these experiments have been chosen to show the antibiotic degradation and the TOC evolution. They are shown in Figs. 3 and 4, respectively.

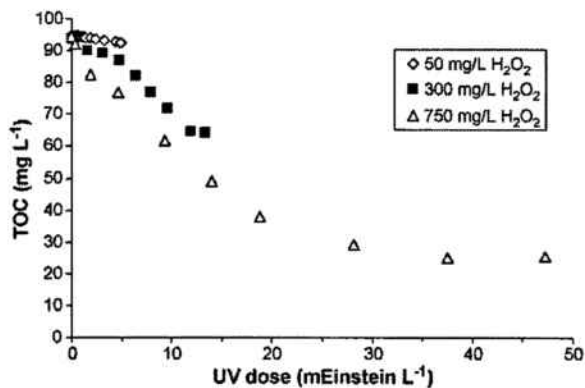


Fig. 4. TOC monitoring for three different initial H₂O₂ concentration experiments; [SMX]₀ = 200 mg L⁻¹, [Fe²⁺]₀ = 10 mg L⁻¹, pH₀ 2.8, T = 25 °C.

It should be pointed out that the total abatement of SMX was not reached when working with a low, initial H₂O₂ concentration, as shown in Fig. 3. The final antibiotic concentration was below 5 mg L⁻¹ when working with more than 100 mg L⁻¹ and below 1 mg L⁻¹ when more than 300 mg L⁻¹ of H₂O₂ were used.

There are nearly no TOC variations when carrying out the reaction with 50 mg L⁻¹ H₂O₂ concentration but an increase in the H₂O₂ dose results in higher decreases in the TOC content of the treated solutions. In order to evaluate the effects of the hydrogen peroxide amount used, final (when all the H₂O₂ is consumed), TOC and COD abatements have been calculated and plotted in Fig. 5 for all the runs carried out.

The TOC abatement achieved at the end of the reactions ranges from 2.4 to 79.9% depending on the hydrogen peroxide doses (from 50 to 1000 mg L⁻¹). In Fig. 5 it can be observed that an increase in the hydrogen peroxide dose results in an increase in the TOC removal attained after the reaction. However, two different tendencies are observed in this plot. Regarding the first one, a sharp increase in the TOC removal is observed when increasing the H₂O₂ up to 550 mg L⁻¹. Secondly, only a slight increase in the TOC removal is obtained when increasing the peroxide from 550 to 1000 mg L⁻¹.

With respect to COD, the removal achieved at the end of the reactions increase from 12 to 92.5% depending on the hydrogen peroxide doses (from 50 to 1000 mg L⁻¹). The same tendency as in TOC abatement is observed in the case of COD removal. Both the acute and the slight increases appear in Fig. 5. The change in the slope seems to be around the 550 mg L⁻¹ initial peroxide concentration.

In both cases, (TOC and COD abatements) the change in the tendency could be explained taking into consideration the different compounds or intermediates formed during the reaction. A higher dose of hydrogen peroxide provokes a higher removal of the target compound and the early intermediates. These compounds are characterized by being easily abated by the hydroxyl radical. However, this tendency stops when low molecular weight acids are formed. These substances are usually the last step before a complete mineralization is achieved.

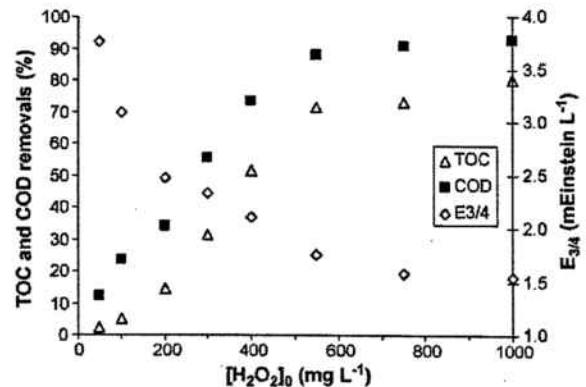


Fig. 5. Final TOC and COD abatements and "accumulated energy 3/4 (E_{3/4})" for the different initial H₂O₂ concentrations; [SMX]₀ = 200 mg L⁻¹, [Fe²⁺]₀ = 10 mg L⁻¹, pH₀ 2.8, T = 25 °C.

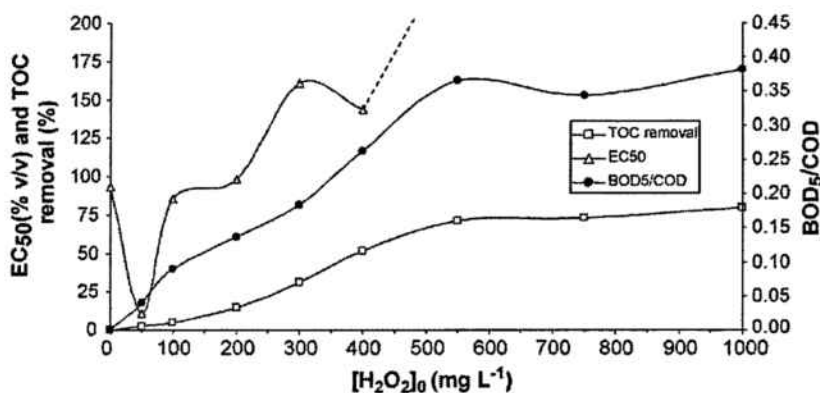


Fig. 6. Final TOC removals, EC₅₀ and BOD₅/COD ratios vs. H₂O₂ dose. Initial conditions in photo-Fenton experiments: [SMX]₀ = 200 mg L⁻¹, [Fe²⁺]₀ = 10 mg L⁻¹, pH₀ 2.8, T = 25 °C.

Moreover, they are well-known for being refractory to oxidation substances. This fact could explain why similar results for the TOC and COD removals are attained at the highest concentrations of hydrogen peroxide [3].

The necessary UV dose to abate the 75% of the antibiotic has been calculated to check the improvement in the antibiotic degradation rate when the initial concentration of H₂O₂ is increased. The UV dose (mEinstein L⁻¹) needed to reach this antibiotic removal has been named "accumulated energy 3/4 (E_{3/4})". In Fig. 5, the influence of the initial hydrogen peroxide dose on the E_{3/4} can be observed.

As expected, the necessary energy to reach a 75% of SMX removal is lower when the initial dose of H₂O₂ becomes higher. Antibiotic degradation rate improves when the H₂O₂ dose is increased up to approximately 600 mg L⁻¹, which would mean that until this concentration, an excess of hydroxyl radicals is not present in the reaction medium. On the other hand, it can be observed that at higher initial values of hydrogen peroxide, the E_{3/4} remains almost constant, which would indicate that the reaction medium is saturated with hydroxyl radicals. These results highlight the fact that the degradation rate of the target compound cannot be significantly improved even when the hydrogen peroxide concentration is increased up from 600 mg L⁻¹.

3.2. Biodegradability, toxicity and inhibition tests

The characteristics of oxidized intermediates after photo-Fenton treatment from the biodegradability and toxicity points of view were evaluated. The results will allow considering the integration of a photo-Fenton pretreatment and a final biological TOC removal as a possible optimal strategy to eliminate SMX in industrial wastewater. The BOD₅ for the different photo-Fenton treatment effluents was tested and the BOD₅/COD ratios are plotted in Fig. 6. The BOD₅ of 200 mg L⁻¹ SMX solution was zero, meaning that the antibiotic is not readily biodegradable. The effluents from the photo-Fenton process increase their biodegradability indicator with increasing H₂O₂ dose, which is indicative of improved biodegradability due to an enhancement in the proportion of organic matter (the intermediates) able to biodegradation. From a treatment with more than 400 mg L⁻¹ of

H₂O₂ on, the biodegradability ratio was greater than 0.25, representing an easily biodegradable effluent. On the other hand, effluents with lower biodegradability ratio fit with some presence of SMX in the solution (up to 300 mg L⁻¹ H₂O₂ dose).

Fig. 6 also includes the TOC removal observed with the treatment conditions tested. The TOC removal profile reveals that rather destructive treatment is required to ensure an appreciable biodegradability (over 50% TOC abatement for a BOD₅/COD ratios higher than 0.3).

The acute toxicity of SMX and changes in acute toxicity of photo-Fenton effluents were evaluated by the Microtox[®] bioassay. The marine photo bacteria *Vibrio fischeri* has been used to determine the influence of toxic substances on pure bacteria. EC₅₀ after 15 min of exposition measured by the Microtox[®] is presented in Fig. 6.

From the figure it can be observed that acute toxicity of SMX is relatively low (EC₅₀ = 93.43%). This result is in accordance to EC₅₀ data available in specialized literature for SMX and others antibiotics [17,18]. Some authors point out that acute and even usual chronic toxicity tests are relatively short in comparison with the life cycle of organisms. They neglect the accumulative nature of some antibiotics and possible accumulation of their toxic effects [19,20].

Acute toxicity response from Microtox[®] changes considerably when analysing the photo-Fenton products. A significant increase in toxicity was observed for the waters resulting from treatment using a 50 mg L⁻¹ initial H₂O₂ concentration. It seems that some different intermediate with a higher toxicity is generated and present at higher concentration in the reaction medium when the photo-Fenton reaction is carried out with this low concentration of H₂O₂ (see representation of TU (toxicity units = 100/EC₅₀) in Fig. 7).

This would indicate that the photo-Fenton oxidized SMX intermediates increase the toxicity when using low H₂O₂ concentration (around 50 mg L⁻¹). From this point on, acute toxicity of raw solution decreases appreciably after the treatment with photo-Fenton, and the detoxification effect increases with the H₂O₂ dose. For treatments with H₂O₂ dose over 500 mg L⁻¹, EC₅₀ were higher than 200%, which would mean that bacteria were insensitive to antibiotic photo-Fenton intermediates.

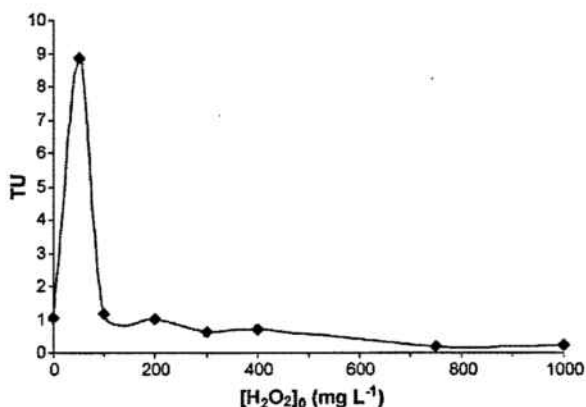


Fig. 7. TU values (toxicity units = 100/EC₅₀) for the different initial H₂O₂ doses.

Table 1

Oxygen uptake rates obtained for different SMX concentrations during the inhibition test performance

[SMX] (mg L ⁻¹)	OUR (mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)
0 (Blank _{average})	89.6
113.6	66.6
56.8	74.4
28.4	89.5
14.2	89.4

Among the oxidative treatment conditions, photo-Fenton with H₂O₂ dose over 300 mg L⁻¹ appeared to have enough positive effect on SMX toxicity. These results would be in accordance with BOD₅/COD ratio.

In summary, the earliest intermediates of oxidized SMX might produce the risk of acute toxicity if these toxic intermediates are not further oxidized.

Based on the results of the OUR test, the percentage of inhibition for SMX is shown in Table 1 and Fig. 8. The results revealed that the highest percentage of inhibition was 25.64% for a SMX concentration of 113 mg L⁻¹. Percentage of inhibition decreased with SMX dilution and no inhibition was observed

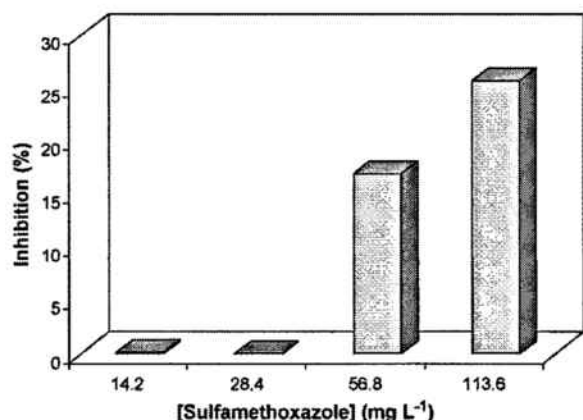


Fig. 8. Percentages of inhibition for different SMX concentrations observed in activated sludge inhibition test.

for concentration lower than 28.4 mg L⁻¹. On the other hand, no inhibition effect was observed for the oxidized intermediates when working with 100, 330 and 550 mg L⁻¹ of H₂O₂ dose. These results would indicate that photo-Fenton oxidized intermediates from SMX solutions would not inhibit the biological activity of a sewage treatment plant when integrating approaches were applied.

4. Conclusions

Photo-Fenton process is thought to be a successful treatment for both the abatement and the improvement of the biodegradability of wastewater containing SMX. The complete antibiotic removal was achieved for H₂O₂ dose over 300 mg L⁻¹ ([Fe²⁺] = 10 mg L⁻¹). On the other hand, BOD₅/COD ratio increased with increasing H₂O₂ dose, obtaining biodegradabilities over 0.25 for 400 mg L⁻¹ H₂O₂. Toxicity test by means of Microtox[®] and inhibition test revealed that the earliest intermediates of oxidized SMX for low H₂O₂ dose might produce the risk of acute toxicity. A treatment photo-Fenton process with a H₂O₂ concentration over 400 mg L⁻¹ will produce an oxidized intermediates with enough acute detoxicity and no inhibition effects on sewage sludge as well as a BOD₅/COD higher than 0.25. These conclusions would allow us to suggest to integrate the technology of photo-Fenton process and biological treatment as an optimal strategy for antibiotic removal in industrial wastewater.

Acknowledgements

Authors are grateful to Spanish ministry of education and culture (CICYT project CTQ2005-00446/PPQ) and to DURSI (department of universities, research and information society) for funds received to carry out this research.

References

- [1] World Health Organization, http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/global/en/ArticleEHP052002.pdf (accessed December 2005).
- [2] R. Alexy, T. Kumpel, D. Klaus Kummerer, Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test. *Chemosphere* 57 (2004) 505–512.
- [3] M. Pera-Titus, V. García-Molina, M.A. Baños, J. Giménez, S. Esplugas, Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Appl. Catal., B* 47 (2004) 219–256.
- [4] R. Bauer, H. Fallmann, The photo-Fenton oxidation—a cheap and efficient wastewater treatment method. *Res. Chem. Intermed.* 23 (1997) 341–354.
- [5] R. Chen, J.J. Pignatello, Role of quinone intermediates as electron shuttles in Fenton and photoassisted Fenton oxidations of aromatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 2399–2406.
- [6] K.A. Hislop, J.R. Bolton, The photochemical generation of hydroxyl radicals in the UV-vis/ferrioxalate/H₂O₂ system. *Environ. Sci. Technol.* 33 (18) (1999) 3119–3126.
- [7] F.J. Benítez, J. Beltrán-Heredia, J.L. Acero, F.J. Rubio, Rate constants for the reactions of ozone with chlorophenols in aqueous solutions. *J. Hazard. Mater.* 79 (2004) 271–285.
- [8] S.H. Bossmann, E. Oliveros, S. Gob, S. Siegart, E.P. Dahlen, L. Payawan, M. Straub, M. Wörner, A.M. Braun, New evidence against hydroxyl radicals as reactive intermediates in the thermal and photochemically enhanced Fenton reactions. *J. Phys. Chem. A* 102 (1998) 5542–5550.

- [9] M.M. Huber, S. Canonica, G.-Y. Park, U.V. Gunten, Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1016–1024.
- [10] M.C. Dodd, C.-H. Huang, Transformation of the antibacterial agent sulfamethoxazole in reactions with chlorine: kinetics, mechanisms, and pathways, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 5607–5615.
- [11] P. Calza, C. Medana, M. Pazzi, C. Baiocchi, E. Pelizzetti, Photocatalytic transformations of sulphonamides on titanium dioxide, *Appl. Catal., B* 53 (2004) 63–69.
- [12] V.K. Sharma, S.K. Mishra, A.K. Ray, Kinetic assessment of the potassium ferrate(VI) oxidation of antibacterial drug sulfamethoxazole, *Chemosphere* 62 (2006) 128–134.
- [13] W. Baran, J. Sochacka, W. Wardas, Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions, *Chemosphere* 65 (2006) 1295–1299.
- [14] J.F. Rabek, *Experimental methods in photochemistry and photophysics*. Part 2, John Wiley & Sons, Avon, New York, 1982.
- [15] J. Bacardit, A. Hultgren, V. García-Molina, S. Esplugas, Biodegradability enhancement of wastewater containing 4-chlorophenol by means of photo-Fenton, *J. Adv. Oxid. Technol.* 9 (2006) 27–34.
- [16] *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, sixteenth ed., American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, Washington DC, USA, 1985.
- [17] K. Kümmerer, R. Alexy, J. Hüttig, A. Schöll, Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria, *Water Res.* 38 (2004) 2111–2116.
- [18] R. Andreozzi, M. Canterino, R. Marotta, N. Paxeus, Antibiotic removal from wastewaters: the ozonation of amoxicillin, *J. Hazard. Mater.* 122 (2005) 243–250.
- [19] K. Froehner, T. Backhaus, L.H. Grimme, Bioassays with *Vibrio. scheri* for the assessment of delayed toxicity, *Chemosphere* 40 (2000) 821–828.
- [20] R. Laskowski, Why short-term bioassays are not meaningful-effects of a pesticide (Imidacloprid) and a metal (cadmium) on pea aphids (*Acyrtosiphon pisum* Harris), *Ecotoxicology* 10 (3) (2001) 177–183.

APÉNDICE III

Photocatalysis and photo-Fenton applied to the degradation of sulfamethoxazole

El artículo ha sido publicado en *CUTEC Serial Publication No_ 68* (ISBN 3-89720-860-1) (2006), pp. 777-781.

Photocatalysis and photo-Fenton applied to the degradation of sulfamethoxazole.

M. N. Abellán, O. González, B. Bayarri, J. Giménez, C. Sans and S. Esplugas.
Department of Chemical Engineering, University of Barcelona.
Martí i Franquès, 1. 08028-Barcelona. Spain.
Phone: +34 93 402 12 93. Fax: +34 93 402 12 91
E-Mail: navarro@angel.qui.ub.es

Keywords

AOP's, photo-Fenton, photocatalysis, sulfamethoxazole.

Abstract

Among all the emerging organic pollutants, antibiotics are those which have become of increasing concern, due to the possible appearance of resistant bacterial cultures, as a consequence of the antibiotics extensive use. The degradation of sulfamethoxazole by means of photo-Fenton and photocatalysis has been investigated in the present work. Both processes are able to degrade the sulfamethoxazole in the experimental tested conditions (initial concentration of antibiotic = 100 and 200 ppm, and temperature 25 °C). Photo-Fenton needs a lower photon amount to reach the total abatement of the organic compound. On the contrary, photocatalysis seems to be less selective, since it causes a higher mineralization compared to that obtained with photo-Fenton, for the same antibiotic abatement. It can be concluded that photo-Fenton is more appropriate to be used as a pre-treatment of a subsequent biological process, if only the antibiotic abatement is considered, while photocatalysis seems to be able to degrade the antibiotic and its intermediates simultaneously, at higher radiation dose.

INTRODUCTION

In the last decades, the scarcity and the quality of water have become of increasing concern, due to the presence of pollutants in wastewater, hence the urgent development of wastewater treatment techniques. AOPs have proved to be highly effective for the removal of most of the pollutants in wastewaters [1]. Antibiotics are one of the numerous recalcitrant pollutants present in aqueous media that might not be treatable in the biological step of the sewage treatment plants, because of their antibacterial nature [2]. On the other hand, the presence of antibiotics in wastewaters is increasing in the last years and their abatement will be a challenge in the next years. In this way, the application of two different AOPs in the treatment of antibiotics has been studied: photocatalysis and photo-Fenton.

Heterogeneous photocatalysis mechanism is based on the use of a semiconductor as a catalyst and UV radiation. In this case, TiO₂ in suspension is used as catalyst, which absorbs photons belonging to the UV range, whose energy is higher than the energy corresponding to the band-gap of the semiconductor. Thus, some electrons may jump from the valence band to the conduction band, generating electron/hole pairs which may be responsible of the ultimate degradation of the organic compounds by means of redox reactions in the aqueous media [3].

Photo-Fenton is known to be able to improve the efficiency of dark Fenton by interaction of radiation (UV) with Fenton's reagent (H₂O₂ and Fe ion as catalyst, such as iron). Hydroxyl radicals are produced by the decomposition of hydrogen peroxide when reacting with ferrous ions in presence of UV light, which contributes in an additional pathway to the generation of free radicals, increasing the concentration of hydroxyl radicals [4].

The aim of the present work is to study the degradation of an antibiotic, the sulphamethoxazole, by means of the two processes mentioned above: photocatalysis and photo-Fenton. In this way, comparisons between both techniques can be established.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The chemicals used in these experiments were sulfamethoxazole (100%, Sigma-Aldrich), TiO₂ (Degussa P25), hydrogen peroxide (30%, Merck), iron sulphate 7-hydrate (98%, Panreac), iron chloride 6-hydrate (98%, Panreac), sodium hydrogen sulphite solution (40 % W/V, Panreac), uranyl nitrate (98 %, Panreac), oxalic acid (99.5%, Panreac), potassium permanganate (>99%, Panreac), acetonitrile (99.8%, isocratic grade for HPLC, Merck), Methanol (UV-IR-HPLC-

HPLC isocratic, Merck) and Millipore water (Milli-Q Millipore system with a $18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ resistivity).

Analytical methods

The sulfamethoxazole concentration was measured by using Waters' HPLC apparatus (photodiode array detector 996, auto sampler 717, controller 600) equipped with Millennium software. The reverse-phase column used was a Spherisorb ODS2. The mobile phase was a mixture of water, acetonitrile and phosphoric acid (60:40:5%) isocratically delivered by a pump at a flow rate of 1 mL/min. The wavelength of the UV absorbance detector was 280 nm. The dissolved organic carbon (DOC) was measured using a TOC analyzer (Rosemaunt Dohrmann D-C-190) provided with an auto-sampler.

Experimental devices

Photo-Fenton experiments

The experimental set-up is described elsewhere [5]. The photochemical reactor is a Pyrex jacketed thermostatic 2 L vessel equipped with three black-blue lamps placed in its centre (Philips TL 8w-08 FAM) with nominal power of 8 W each, which emit radiation basically at 365 nm. The photon flux entering the reactor at this wavelength is $6.85 \mu\text{Einstein}\cdot\text{s}^{-1}$. The temperature inside the reactor was kept at $25\pm 0.8^\circ\text{C}$ with a thermostatic bath (Haake C-40). The experimental conditions are summarized in table 1.

Table 1. Experimental conditions in photo-Fenton process.

Experiment	[Sulfamethoxazole] (ppm)	[H ₂ O ₂] (ppm)
A	100	60
B	100	100
C	200	60
D	200	100

The concentration of Fe^{2+} was fixed at 10 ppm in all the experiments. The low concentrations of H_2O_2 were chosen in order to monitor the antibiotic abatement during the runs. Samples were withdrawn periodically from the reactor to monitor the H_2O_2 consumption with Quantofix test sticks and were quenched with sodium hydrogen sulphite or with the same volume of methanol (to avoid further reactions) in order to use these samples for DOC and HPLC analysis respectively.

Photocatalysis experiments

The system employed to study the photocatalytic process has already been described elsewhere [6]. The photoreactor is a quartz tubular reactor ($V = 0.09 \text{ L}$) inside a solar simulator (SolarBox) from COFOMEGRA. The Solarbox is equipped with a 1000 W Xenon lamp (PHILIPS XOF-15-OF) that simulates the solar spectrum in the UV range, being $13.4 \mu\text{Einstein}\cdot\text{s}^{-1}$ the photon flux entering the reactor at 300-400 nm wavelength range. The solution inside the tubular reactor was re-circulated to a jacketed thermostatic 1 L reservoir tank ($Q = 28 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$). The temperature inside the reactor was kept at $25\pm 0.8^\circ\text{C}$ with a thermostatic bath (Haake C-40). The initial pH of the suspension was between 4 and 5 (not buffered). Periodical samples were taken from the reaction media and analyzed by means of HPLC and TOC. The experimental conditions are summarized in table 2.

Table 2. Experimental conditions in photocatalytic process.

Experiment	[Sulfamethoxazole] (ppm)	[TiO ₂] (g/L)
E	100	0.5
F	100	1.0
G	200	0.5
H	200	1.0

Actinometric experiments

Actinometric experiments were performed to determine the amount of radiation emitted by the lamps of both devices and transferred into the reactors. The method is based on the well-known photochemical decomposition of oxalic acid in the presence of uranyl [7].

RESULTS AND DISCUSSION

Degradation rates of the antibiotic sulfamethoxazol have been studied as a function of accumulated photons entering the system per treated volume, in order to make a more realistic comparison between the two processes, since both techniques employ radiation to activate its prime steps: generation of hydroxyl radicals. The radiation that has been considered is the one belonging to the 300-400 nm range, and it has been calculated as Einsteins instead of Joules because this is more suitable to compare experiments when different spectrum emissions are used.

Two pseudo-kinetic constants have been calculated by means of fitting the experimental data to a first order kinetic equation (eq. 1 and 2):

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -k_C \cdot F_0 \quad (1)$$

$$\ln\left(\frac{DOC}{DOC_0}\right) = -k_{DOC} \cdot F_0 \quad (2)$$

where c (mol/L) is the concentration of the antibiotic, c_0 (mol/L) is the initial concentration, k_C (L/Einstein) is the pseudo-first order kinetic constant and F_0 (mEinstein/L) is the accumulated energy entering the system. F_0 has been chosen as the independent variable instead of time. Similarly, the pseudo-first order constant k_{DOC} can be estimated by using the dissolved organic carbon (DOC) instead of sulfamethoxazole concentration.

The degradation rates of sulfamethoxazol, when photo-Fenton and photocatalysis are used as the oxidation processes, are plotted in figures 1 and 2, respectively.

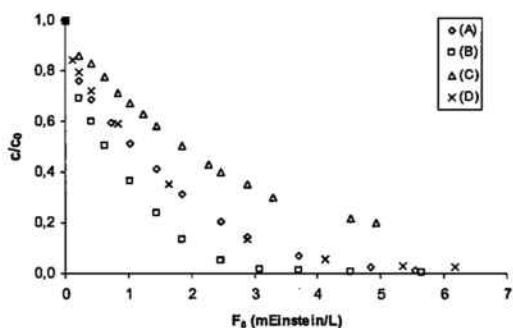


Figure 1. Photo-Fenton degradation.

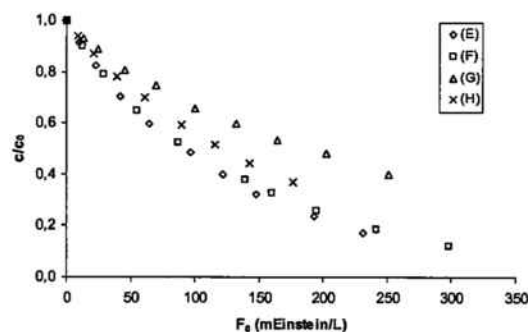


Figure 2. Photocatalytic degradation.

The most favourable cases with photocatalysis in terms of antibiotic degradation (E and F) do not reach the total abatement of the antibiotic, in spite of the fact that the system has received 300 mEinstein/L. On the other hand, the photo-Fenton process has reached the total abatement of the antibiotic at $C_0 = 100$ ppm (A and B), using an energy (F_0) < 6 mEinstein/L. The existing difference in radiation dose employed in photocatalysis (more than 50 times the radiation dose used in photo-Fenton), results in larger differences in radiation time: photo-Fenton needs scarcely 20 minutes to reach the total abatement of the antibiotic, contrary to the photocatalytic process, which needs more than 360 minutes. In spite of the advantages shown by the photo-Fenton process, it is worth noting that this process implies the addition of H_2O_2 , whose storage could be dangerous at high concentrations and it is more expensive than the TiO_2 .

The mineralization rates of the solution are shown in figures 3 and 4 (photo-Fenton and photocatalysis respectively).

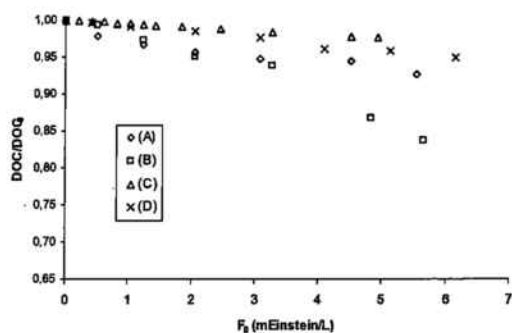


Figure 3. Photo-Fenton mineralization.

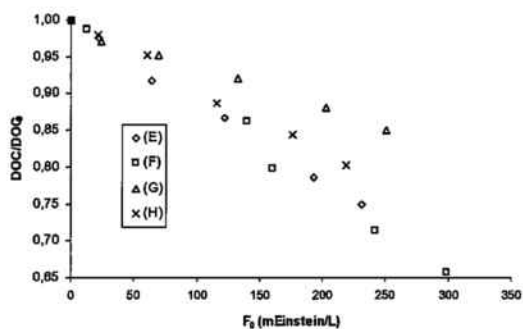


Figure 4. Photocatalytic mineralization.

As expected, mineralization rates are much slower than degradation rates of the compound in both photocatalysis and photo-Fenton processes. In fact, the maximal mineralization achieved has been 34 % and 16 % with photocatalysis and photo-Fenton respectively. As it can be observed in case F of photocatalysis, 75 % of the antibiotic has been degraded, while the mineralization has been of 25 %. In case B of photo-Fenton, for the same antibiotic degradation (75 %), only 3 % of mineralization is achieved. Therefore, the photocatalytic process seems to be less selective than photo-Fenton.

As mentioned above, two pseudo-first order constants (k_C and k_{DOC}) have been employed to compare both processes. The values for k_C and k_{DOC} are shown in table 3.

Table 3. Values of pseudo-first order constants k_C and k_{DOC} in photo-Fenton and photocatalysis.

Photo-Fenton	K_C	K_{DOC}	K_C / K_{DOC}
A	0.746	0.0118	63.2
B	1.05	0.0322	35.5
C	0.328	0.0051	64.3
D	0.629	0.0086	73.1
Photocatalysis	K_C	K_{DOC}	K_C / K_{DOC}
E	0.0075	0.00124	6.25
F	0.0070	0.00141	5.00
G	0.0036	0.00061	6.00
H	0.0056	0.00100	5.60

With regards to photo-Fenton, when working with low antibiotic concentrations (A and B) both k_C and k_{DOC} increase with the amount of H_2O_2 . It seems that, due to the observed selectivity of the photo-Fenton process, the total abatement of the antibiotic allows an increase in the mineralization. However, when the initial concentration of the antibiotic is higher (C and D) the increase of the constant k_{DOC} with the amount of H_2O_2 is not so acute, owing to the fact that the antibiotic is not completely removed in case C, and this abatement is reached when practically all H_2O_2 is already consumed in case D.

The photocatalytic process shows a different behaviour: at low antibiotic concentrations (E and F) k_C and k_{DOC} are similar for both conditions, which means that the amount of catalyst is enough for this antibiotic concentration, and no enhancements are observed if the catalyst concentration is increased. Regarding cases G and H, as it can be observed in table 3, k_C and k_{DOC} values increase when the catalyst concentration does it, which means that, probably, in case G the amount of catalyst is not large enough, and the increase of catalyst improves the process.

The ratio k_C/k_{DOC} is shown in table 3. High values of this parameter (observed in photo-Fenton process) would suggest that the process is adequate as pre-treatment for a subsequent biological treatment, if only antibiotic abatement is considered. When the ratio k_C/k_{DOC} is not so high

(photocatalysis), the process would be less selective, because it would be able to degrade more simultaneously the antibiotic and its intermediates.

CONCLUSIONS

Both the photocatalytic and the photo-Fenton processes are able to degrade the sulphamethoxazole. The photocatalytic process requires a much higher radiation flux to remove the organic pollutant. On the other hand, the photo-Fenton reduces considerably the time to degrade the organic compound but a lower DOC removal is achieved by means of this process, if the same antibiotic abatement is considered. As referred to the sulphamethoxazole, the photocatalysis seems to be less selective than the photo-Fenton process.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to Spanish Ministry of Education and Culture (CICYT projects CTQ2005-00446/PPQ and CTQ2004-02311/PPQ) for funds received to carry out this work, to DURSI (Departments of Universities, Research and Information Society) –Generalitat de Catalunya- of Catalonia and to European Social Fund.

REFERENCES

- [1] Pera-Titus, M., García-Molina, V., Baños, M. A., Giménez, J. and Esplugas, S., *Appl. Catal. B Environ.*, 47(4), 219-256 (2004).
- [2] Alexy, R., Cuple, T. and Kümmerer K., *Chemosphere*, 57, 505-512 (2004).
- [3] Herrmann, J.-M., *Catal. Today*, 53, 115-129 (1999).
- [4] Benítez, F.J., Beltrán-Heredia, J., Acero, J.L. and Rubio, F.J., *J. Hazard. Mater B*, 79, 271–285 (2004).
- [5] Bacardit J., Hultgren A., García-Molina V. and Esplugas S., *J. Adv. Oxid. Technl.*, 9 (1), 27-34 (2006).
- [6] Bayarri, B., Giménez, J., Curcó, D. y Esplugas S., *Catal. Today*, 101, 227-236 (2005)
- [7] Rabek, J.F. *Experimental methods in photochemistry and photophysics*, John Wiley and Sons, Belfast, pp. 937-949, Chap. 27 (1982).

APÉNDICE IV

Biodegradation of photo-Fenton pre-treated solutions of Sulfamethoxazole by aerobic communities. Molecular biology techniques applied to the determination of existing strains

El artículo ha sido publicado en *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, vol. 11 (2008), pp. 238-245.

Biodegradation of Photo-Fenton Pre-Treated Solutions of Sulfa-Methoxazole by Aerobic Communities. Molecular Biology Techniques Applied to the Determination of Existing Strains

Oscar González*, Marc Esplugas, Carme Sans, and Santiago Esplugas

Chemical Engineering Department, Faculty of Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès 1, 08028 Barcelona

Abstract: This work is focused in the combination of a photo-Fenton process and biological treatments in different devices for the degradation of a 200 mg.L⁻¹ Sulfamethoxazole (SMX) solution. Firstly, the combination of a photo-Fenton process, carried out with different initial H₂O₂ concentrations, with an aerobic biological treatment performed in a 1 L suspended biomass batch reactors was carried out. A relationship between the degree of pre-treatment and the overall TOC removals achieved was found. Secondly, a photo-Fenton pre-treatment carried out with an initial H₂O₂ concentration of 300 mg.L⁻¹ and 10 mg.L⁻¹ of Fe²⁺, was selected to feed a Sequencing Batch Biofilm Reactor (SBBR). It was possible to work with stable cycles of 24 hours, degrading 75% of the TOC contained in initial SMX solution. Bacterial community located in the biofilm was successfully characterized by applying molecular biology techniques and Scanning Electron Microscopy (SEM).

Introduction

In recent years there has been a growing awareness to eliminate pharmaceutical products from the aquatic system, especially antibiotics. These compounds are known to be immune against bacterial degradation, and since some of them have been designed to harm bacteria, it has been possible to detect antibiotic concentrations in the range of µg.L⁻¹ at the effluents of Waste Water Treatment Plants (WWTPs) (1). On the other hand, it has been observed that certain microorganisms are able to mutate and become resistant to these drugs, making their active principle ineffective against certain populations (2).

Antibiotics are widely used in both human and animals, but once ingested, generally not all the compound remains in the recipient organism and consequently a considerable amount of them comes in the form of urine or feces, which end up in surface waters. After these pharmaceuticals leave the WWTPs, they can be found in both recreational water and soils, being a potential threat for public health.

In this work, SMX has been chosen among a wide variety of antibiotics since is a commonly pharmaceutical product used in large amounts and, in turn, has been detected in the effluents of WWTPs (1, 3).

It has been demonstrated that the use of advanced oxidation processes (AOP) can break down SMX molecules (4) An AOP consists on the generation of hydroxyl radicals, a highly potent chemical oxidant

which is extremely reactive, in sufficient quantity to oxidize these compounds and thus purify water (5). In previous studies it has been observed that the products obtained after AOP treatment turns the antibiotic into biodegradable compounds (4), becoming more suitable to be biologically treated.

The combination of Advanced Oxidation Processes together with biological treatment has proven to be a successful tool to treat waters contaminated with biorecalcitrant substances (6, 7). Photo-Fenton process has been selected as a pre-treatment for the SMX solution.

The aim of this work is to evaluate the changes in the biodegradability of the effluents obtained using different pre-treatment conditions. For this purpose, different tests in aerobic batch reactors were carried out. On the other hand, a SBBR filled with volcanic stones will be used to biodegrade a SMX pre-treated solution. Its bacterial population will be characterized by means of molecular biology techniques and the biofilm attached in the filling rocks will be observed using a scanning electron microscope.

Experimental Devices and Procedures

Photochemical Reaction

Even though the concentrations in the WWTP effluents are in the range of micrograms per liter (8), the study deals with concentration near the maximum solubility limit of this substance in water, trying to emulate wastewaters of pharmaceutical companies.

A 200 mg.L⁻¹ SMX (Sigma, >99%) aqueous solution (TOC = 94.5 mg.C.L⁻¹ and COD = 290 mg.O₂.L⁻¹) was

Keywords: Antibiotic, biodegradation, PCR, photo-Fenton, SBBR
*Corresponding author; E-mail: ogonzalez@angel.qui.ub.es

treated in a Pyrex jacketed thermostatic 2 L vessel equipped with three black-light blue lamps with nominal power of 8 W each. The temperature and the Fe^{2+} (added as $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) concentration were fixed at 25 °C and 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. The pH was adjusted to 2.8 with H_2SO_4 . The necessary amount of H_2O_2 was introduced under vigorous magnetic stirring and the UV lamps were switched on simultaneously. The system was left to react until all the H_2O_2 was consumed. The end of the reaction was determined using Quantofix® test sticks (Macherey-Nagel). A wider description of this equipment as well as the manner to run the experiments is reported elsewhere (4). Since photo-Fenton has been used as a pre-treatment to fill different biological devices (4 biological batch reactors and 1 SBBR), Table 1 shows the different oxidizing conditions, the main parameters of the resultant effluents as well as the fate of each one of them.

Biological Batch Reactors

Biological batch reactors were 6 Pyrex 1L Erlenmeyers covered with aluminum foil to avoid light interferences (photolysis, algae proliferation...). Enough air to guarantee a dissolved oxygen concentration above 6 $\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ was continuously supplied by means of ceramic diffusers. Reactors were provided of magnetic stirring and they worked at room temperature. The pH was also measured and adjusted around 7 if necessary. The withdrawn samples were filtrated using 0.45 μm polyethersulfone filters (Millex-HP 0.45 μm PES) and acidified with H_2SO_4 in order to monitor TOC, TVSS and SMX concentration. TOC was measured by means of a Shimadzu TOC-VCSN TOC analyzer. The concentration of the antibiotic was quantified by means of a HPLC supplied by Waters Corporation (Massachusetts, USA). The column used was a TRACER EXTRASIL ODS2 TR-016059 supplied by Tecknokroma S. Coop. C. Ltd (Barcelona, Spain). The mobile phase employed was a mixture of Acetonitrile and Millipore water in proportion of 40:60% in volume, acidified until pH 3 by the addition of phosphoric acid. The wavelength used was 270.5 nm. Standard Methods 2540 E was followed to determine TVSS (9). Aerobic sludge (Total Volatile Suspended Solids (TVSS) = 2000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) taken from a WWTP placed in Barcelona (Spain) was used as inoculum.

Since SMX solutions for photo-Fenton experiments were prepared using deionized water and adjusted at low pH, neutralization and addition of nutrients, trace elements and buffer were needed before being fed into the reactors. Directions from the Respirometric Standard Method 5210 D are followed for this purpose.

Initially, the pH is increased up to 7 with NaOH and buffered with 6 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ of NaH_2PO_4 solution 1.5N. After that, 2 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ of each of the next solutions were added: NH_4Cl 0.71N, CaCl_2 0.25N, MgSO_4 0.41N, and trace element solution (consisting of traces of MnSO_4 , H_3BO_3 , ZnSO_4 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ and $\text{FeCl}_3\text{-EDTA}$). The addition of FeCl_3 was suppressed in reactors from 1 to 4 because it was already present in the photo-Fenton effluent.

First Load: The first 5 reactors were filled with 0.9 L of the corresponding photo-Fenton effluents and SMX solution described in Table 1 and with 0.1 L of aerobic sludge to obtain an initial TVSS concentration of 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Table 2 presents the initial TOC in every batch reactor and a summary of the solutions used to fill each of them. *Second Load:* Another load of the corresponding photo-Fenton effluents and SMX solution was added to the 5 first reactors. Stirring and air supply were stopped while the microorganisms were settling. Afterwards, the supernatant was withdrawn gently and the reactors were filled up again to 1 L. Nor FeCl_3 (except in reactor 5) neither NH_4Cl were added as nutrients in this case.

Reactor 6 was filled with deionized water and the same concentration of TVSS was inoculated. Two doses of a readily biodegradable glucose-glutamic solution were added in order to ensure the proper activity of the bacterial culture. Once the activity of bacteria was corroborated, the reactor was left to react until TVSS concentration reached approximately 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in order to know the residual TOC in equilibrium that corresponds to this amount of bacteria.

As a complementary assay, 3 amounts of sodium acetate (600 $\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ of COD each) were added, between the 50th and the 73rd day, to reactors 1, 2, 3 and 4 in order the bacteria to degrade the existing nitrogenated intermediates when all the inorganic nitrogen present in the solution has already been consumed as nutrient (10).

As example of the procedure performed in each batch reactor, monitoring of TOC, SMX and TVSS in reactor 1 is depicted in Figure 1.

Biological Sequencing Batch Biofilm Reactor

SBBR reactor was a 2.6 L vessel packed with volcanic stones. The reactor was covered to avoid light interferences. The temperature was fixed at 25 °C using a thermostatic bath and the pH was daily measured and adjusted around 7 if necessary. The volcanic stones occupied 0.87 L and 88% percent of liquid was replaced in each cycle change. The liquid was recirculated from the bottom to the top of the reactor at a flow rate of 4.5 $\text{mL} \cdot \text{s}^{-1}$. One and a half

Table 1. Amount of H₂O₂ used in the pre-treatments, main parameters of the resultant effluents and devices which they are used for.

[H ₂ O ₂] _{ph-Fenton} (mg.L ⁻¹)	TOC (mgC.L ⁻¹)	COD (mgO ₂ .L ⁻¹)	[SMX] (mg.L ⁻¹)	BOD ₅ /COD	Fed reactor
50	92.0	248.7	38.6	0.04	Batch 1
100	91.0	219.2	5.0	0.09	Batch 2
200	80.5	188.0	3.5	0.14	Batch 3
400	45.4	76.6	0.4	0.26	Batch 4
0	94.5	290.0	200.0	0.00	Batch 5
300	68.0	129.0	2.0	0.18	SBBR

Table 2. Initial TOC in every batch reactor and summary of the solutions used to fill them.

	Load used (H ₂ O ₂ used in mg.L ⁻¹)	Initial TOC (mgC.L ⁻¹)
Batch 1	ph-Fenton (50)	90.1
Batch 2	ph-Fenton (100)	83.9
Batch 3	ph-Fenton (200)	71.5
Batch 4	ph-Fenton (400)	43.7
Batch 5	200 mg.L ⁻¹ SMX solution	97.9
Batch 6	glucose-glutamic solution	308.6

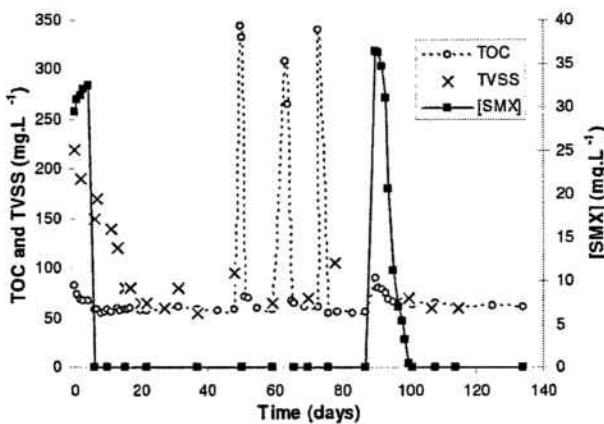


Figure 1. Monitoring of TOC, TVSS and SMX concentration in batch reactor 1.

L.min⁻¹ of air was supplied through a ceramic diffuser placed under the volcanic stones to ensure correct aeration.

Initially, the SBBR reactor was inoculated with 1000 mg.L⁻¹ (TVSS) of activated sludge coming from the same WWTP that the one for the batch reactors.

Effluent resultant from treating a 200 mg.L⁻¹ SMX solution in the photo-Fenton reactor with 300 mg.L⁻¹ of H₂O₂ was selected to carry out aerobic cycles with Hydraulic Retention Time (HRT) of 24 hours. Effluent properties are described in Table 1. Addition of nutrients was also needed (see *Biological batch reactors* procedures). FeCl₃ was suppressed because it was already present in the photo-Fenton effluent.

A start-up stage and a strategy to reduce the HRT of the cycles were carried out in order to work in stable 24 hours cycles. Concentrations of TOC, SMX and TVSS were followed to evaluate the significance of a longer acclimation period for the microorganisms and the advantages of a supported biomass. For this purpose, samples were extracted, filtered using 0.45 µm PES filters and acidified with H₂SO₄.

Molecular Biology Techniques

During the operation of the SBBR, a rock sample from the reactor was collected in order to evaluate the bacterial community located in the biofilm, using a FastDNA® SPIN for Soil Kit (QBIogene) and following its protocol. An Eppendorf 5804R centrifuge was used when necessary. Once the DNA from the stone was extracted, an amplification stage targeting the gene 16SrRNA in an Applied BioSystems 9700 Thermocycler by means of Polymerase Chain Reaction (PCR) was carried out, using an Eppendorf Master Mix (2.5x) and following its protocol. Afterwards, a cloning step using a TOPO TA Cloning® Kit and conducting its procedures was performed. Once the DNA was separated in different Escherichia Coli colonies, 96 of these were randomly chosen and isolated in order to purify their respective DNA, using a Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) and following its protocol. Once the 96 colonies were isolated, another PCR was carried out. The resulting samples were terminated using a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystems) and finally, a DNA sequencing was performed in an ABI

Prism ® 3730XL DNA Sequencer (Applied Bio-Systems). At last, each one of the 96 DNA sequences obtained in the sequencer was compared in the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Database from the National Center of Biotechnology Information (NCBI) and in the Ribosomal Database Project II database from the Michigan Institute of Technology, in order to identify the types of bacteria that correspond to the extracted DNA samples.

Scanning Electron Microscopy

A Jeol SEM 840 microscope was used to capture surface images of the rock to confirm the presence of a biofilm layer covering the filling stones in the reactor. Nevertheless, to improve the visualization of the rock sample a chemical pretreatment was realized. First of all, 10 ml of liquid from the SBBR reactor were mixed with a 10 ml 5% glutaraldehyd solution in order to have a 2,5% glutaraldehyd solution buffered with phosphate at pH 7. Then, a rock sample was extracted from the reactor and immediately submerged in the glutaraldehyd solution. The sample was covered and stored for 2 hours at 4 °C. Afterwards, a post-fixation in OsO₄ was performed for 24 hours and the dehydration was carried out in alcoholic series (10, 25, 50, 70, 90 and 100%) during 20 minutes. Subsequently, the sample was critical point dried and metallized with gold-palladium prior to be observed in the SEM.

Results and Discussion

Biological Batch Reactors

First of all, it is important to comment that reactor 6 was able to degrade high loads of glucose-glutamic mixture in only a few hours. This proved the proper activity of the activated sludge.

As it can be seen in Table 3, the percentages of TOC eliminated in each reactor increased from 32.4 up to 75.2% when the initial concentration of H₂O₂ used in the photo-Fenton pre-treatment was increased from 50 to 400 mg.L⁻¹.

As depicted in Figure 2 the biodegradable organic part was eliminated in all 4 reactors along the first 5 days and the percentage of TOC removal did not increase with time from that moment on. Therefore, the existence of non biodegradable intermediates implies the utilization of higher H₂O₂ doses in the pre-treatment to achieve smaller TOC values in the final biological effluent.

For the first 4 reactors, a direct and positive linear relationship could be established between the total TOC elimination (photo-Fenton + biological treatment) and the H₂O₂ dose used in the pre-treatment. Figure 3 shows this relationship.

Table 3. TOC removals achieved in the biological batch reactors regarding to the TOC of photo-Fenton effluents and total TOC eliminations reached through the combination of photo-Fenton and biological processes.

	Biological TOC removal (%)	Total TOC removal (%) (chemical + biological)
Reactor 1	32.4	34.2
Reactor 2	42.5	44.7
Reactor 3	56.6	63.0
Reactor 4	75.2	88.0

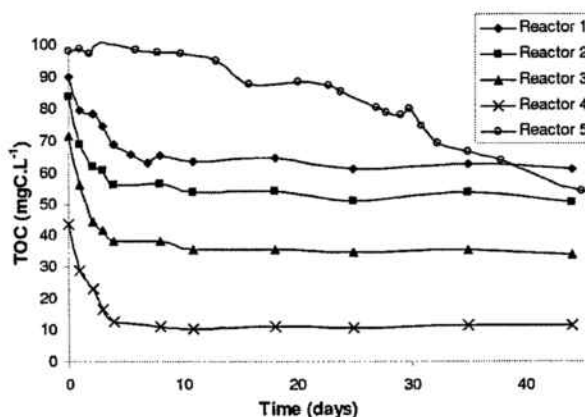


Figure 2. TOC removal profiles for the first 5 batch reactors.

This equation is not valid when there is no photo-Fenton pre-treatment. Figure 2 shows how the degradation profile in reactor 5 for the SMX solution is completely different compared with the others. Two organic fractions with different biodegradability were not observed for this reactor. Also, for a H₂O₂ concentration of 400 mg.L⁻¹, residual TOC in the solution was already in the range of the residual TOC obtained (TOC ≈ 11 mg.C.L⁻¹) in reactor 6 when the TVSS reached a concentration around 100 mg.L⁻¹. Thus, probably no smaller values of TOC would be reached in the final biological effluents although higher H₂O₂ concentrations were used.

From the first column of Table 3 it can be concluded that the quality of the organic matter present in the solutions improved when the oxidation degree was higher. Each time, smaller percentages of TOC were refractory to biodegradation.

There were no noteworthy differences between the first and the second charges in reactors from 1 to 4. The shape of the TOC elimination curves is practically the same for both loads. The same refractory TOC remained in every reactor effluent. Thus, no improvements took place due to bacteria adaptation.

As far as the antibiotic concentration concerns, it is important to remark that the amount of antibiotic

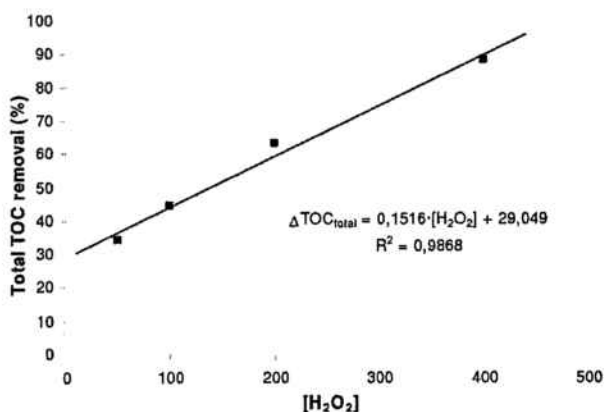


Figure 3. Relationship between total TOC removal and H_2O_2 concentration used in the pre-treatment.

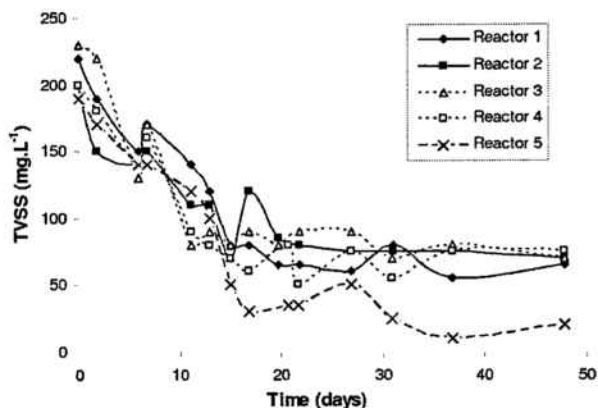


Figure 5. TVSS evolution during the first load in the first 5 batch reactors.

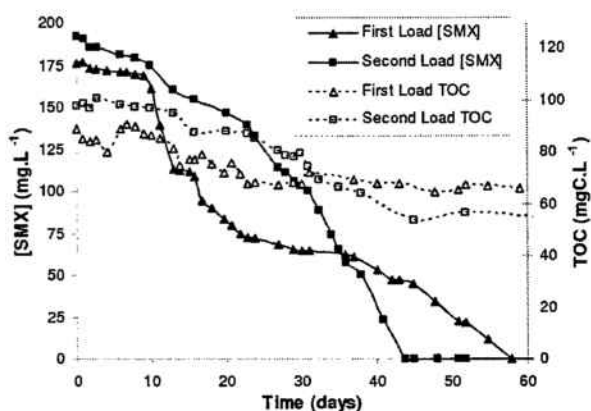


Figure 4. Elimination of TOC and antibiotic degradation in reactor 5, filled with SMX solution, in both loads.

present in the solution was removed completely at 6, 6 and 8 days in reactors 1, 2 and 3 respectively for the first load made, whereas the removal took 10, 2 and 2 days correspondingly for the second load done. Therefore, there is not a match that allows saying that there was an improvement in the elimination rates due to a possible acclimation of microorganisms. Reactor 5 presented a slightly different antibiotic removal rate when comparing the first and the second load of SMX solution. Figure 4 shows how the bacteria presented a lag phase of approximately 10 days before starting a faster SMX degradation for both cases.

Elimination of the pharmaceutical compound in reactor 5 was achieved at very long times in both cases (58 and 44 days for the first and the second loads respectively). Tendency of SMX curves is slightly different so, bacteria seem to have undergone acclimation which allowed them to degrade the antibiotic faster in the second load. This could have occurred due to the growth of the most adequate strains to degrade this pharmaceutical and their intermediates.

Figure 5 shows the monitoring of TVSS along the first 50 days for the first 5 reactors. As exposed in the figure, TVSS concentration decreased from the initial 200 mg.L^{-1} until it reached a plateau around 70 mg.L^{-1} in the first 4 reactors, the ones filled with photo-Fenton effluents. Nevertheless, the TVSS concentration continued decreasing in reactor 5 until it reached a final value of 20 mg.L^{-1} . Therefore, results seem to indicate that a high antibiotic concentration such as 200 mg.L^{-1} had a negative effect against some of the microorganisms present in the activated sludge. However, as described below, the surviving microorganisms seem capable of continuing the slow degradation of the antibiotic.

As a final comment for these biological batch assays, it should be remarked that the sodium acetate doses introduced in the first 4 reactors had not a positive effect over the degradation of nitrogenated intermediates present in the photo-Fenton effluents. According to the standard nitrogen requirements (11), the amount of readily biodegradable carbon added as acetate should have been enough to consume all the inorganic nitrogen available in the reactors. However, the TOC did not decrease below the plateau value in any of these 4 reactors. As example of the general behaviour of these 4 reactors, Figure 1 illustrates that there were no TOC removal improvements when doses of acetate were added between the 50th and the 73rd day in reactor 1.

Biological SBBR Reactor

A photo-Fenton pre-treatment carried out with an initial H_2O_2 concentration of 300 mg.L^{-1} was selected to feed the SBBR. An start-up stage of 30 days and a strategy of cycles to reduce the Hydraulic Retention Time (HRT) from 7 days down to 24 hours were carried out in order to increase the Organic Loading Rate (OLR) up to $68 \text{ mg.C.L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$. An overall TOC

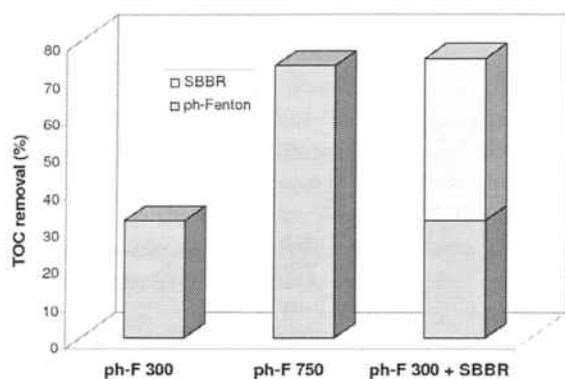


Figure 6. TOC removal achieved by means of the combination of both chemical and biological treatments compared to the ones reached exclusively with 2 photo-Fenton treatments using different initial concentrations of H_2O_2 .

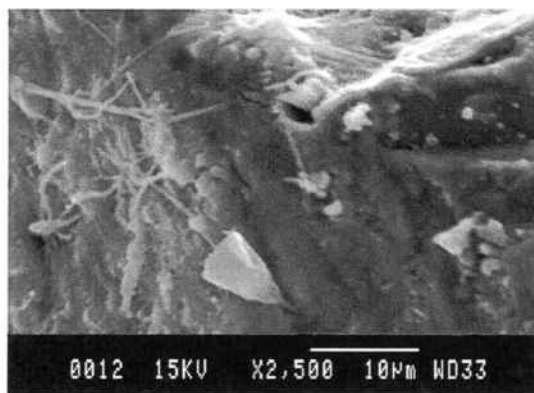


Figure 7: Filamentous bacteria found in a Biofilm sample.

removal higher than 75% and the complete abatement of the antibiotic were reached, working at 24 hours of retention time. Expected TOC removal for this combination using the linear equation showed in Figure 3 would be 74.5%. Taking into account that no improvements in final TOC removal were achieved in the SBBR during the different acclimation periods, this equation has proved to be a useful tool to predict total TOC removals in this kind of combined systems. On the other hand, in Figure 6, the total TOC removal achieved by means of the combination of both chemical and biological treatments are plotted next to the chemical TOC mineralization obtained exclusively with photo-Fenton treatment using 2 different initial concentrations of H_2O_2 . It is necessary to consume 750 mg.L^{-1} of H_2O_2 in the photo-Fenton process to reach a TOC removal similar to the one in the combination assayed.

The microorganisms grew properly over the volcanic support. The biofilm behaved adequately against the fast reduction of the HRT. The settling stage was suppressed and, consequently, more time of the cycle could be spent in biological degradation.

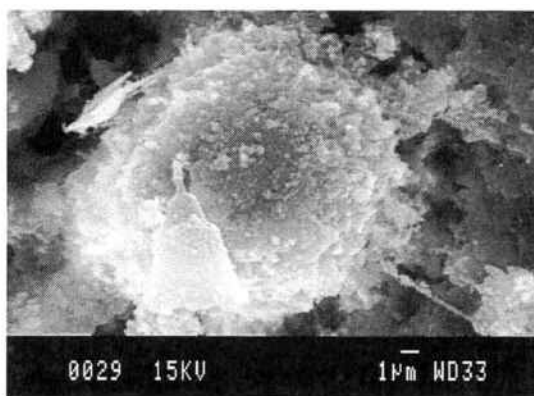


Figure 8: Spherical-shape bacteria with attached bell-like flower.

Scanning Electron Microscopy and Molecular Biology Techniques

As it can be observed in the images obtained using the scanning electron microscope, living organisms were found in the biofilm of the filling stones. Looking at Figure 7 and Figure 8 we can distinguish completely different types of microbial communities. In the first case (Figure 7), a large area was found to be populated by filamentous bacteria. The aggregates in its surface strands seem to be precipitated products. Moreover, in Figure 8, rounded organisms with attached flower-shape extensions seem to occupy a different region of the same rock sample.

The population in the biofilm appeared to be diverse since different types of bacteria could be seen by means of SEM.

It was possible to extract DNA from organisms present in the biofilm. Among all the colonies isolated from a SBBR rock sample, ninety six DNA cells/pellets were amplified, sequenced and consequently compared in the BLAST database to have them phylogenetically classified and to observe which types of bacteria were the most predominant in the reactor during its operation. From the starting 96 samples, 93 contained clear enough (confidence threshold of 95% or higher) information to be analyzed in the database. All these samples were found to be in the Bacteria domain and were subsequently classified by their phylum as it can be observed in Figure 9.

From this chart (Figure 9) it can be noticed that the dominant phylum was Proteobacteria with 69 clones out of 93, followed by Nitrospira with 12 colonies, concretely from the Nitrospirales class, a known nitrogen oxidizing bacteria (12). Both Actinobacteria and Planctomycetes contributed with two clones, and Verrucomicrobia, Deinococcus-Thermus

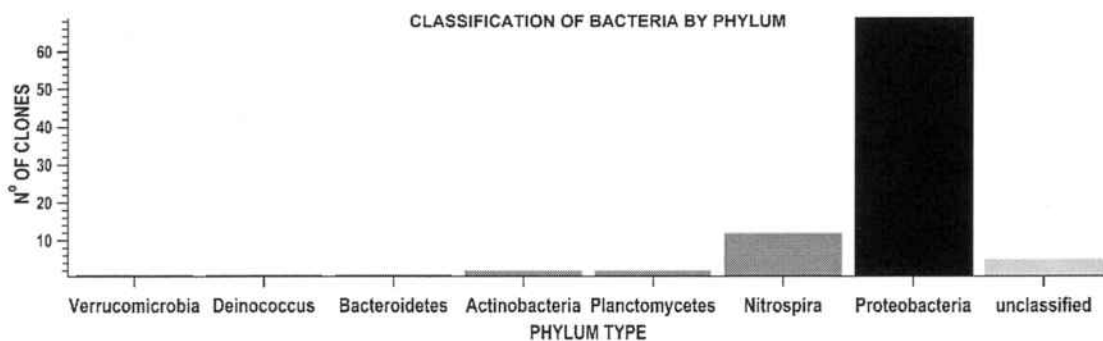


Figure 9. Classification of Bacteria by Phylum.

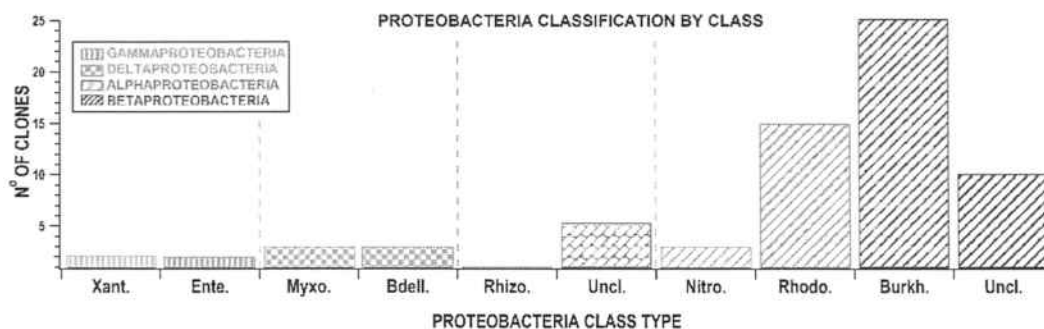


Figure 10. Classification of Proteobacteria by class and order. *Xant*: Xanthomonas, *Ente*: Enterobacter, *Myxo*: Myxococcales, *Bde*: Bdellovibrionales, *Uncl*: Unclassified, *Nitro*: Nitrosomonadales, *Rhodo*: Rhodocyclales, *Burkh*: Burkholderiales.

and Bacteroidetes participated with just one. Five bacteria colonies were unable to be identified.

The following Figure 10 classifies in more detail the 69 colonies found in the Proteobacteria phylum depending on their Group and Order. It is possible to observe that Betaproteobacteria was the major Class with 25 clones, followed by Alphaproteobacteria and Deltaproteobacteria, both with 6 clones, and lastly 4 clones were found to belong to the Gammaproteobacteria group. Among all these Classes, the Order with more sequences found was Burkholderiales with 25 clones, followed by Rhodocyclales with 15 contributions. Myxococcales, Bdellovibrionales and Nitrosomonadales appeared with 3 colonies each. Other Orders were found with less colonies and several colonies could not be identified inside their respective Classes.

Over all, it was observed that many colonies involved in the nitrification-denitrifying process of nitrogen (Nitrospira, Nitrosomonadales, Rhizobiales) (12), while other ones (Burkholderiales) are typical bacteria located in aerobic reactions with high biodegradation potential. Moreover, other ones (Rhodocycles, Planctomycetes) (13) that are mainly present in aquatic environments were found. It is important to remark that the presence of these colonies refers to

activities or situations associated with the processes involved in the SBBR while treating sulfamethoxale pre-treated solutions.

Conclusions

The tests performed in the batch reactors reveal that the total TOC removal percentage was found to be directly proportional to the amount of hydrogen peroxide used in the pre-treatment. The combination of photo-Fenton process together with biological treatment has proved to be a successful strategy to treat water contaminated with SMX.

Finally, the molecular biology techniques allowed to identify different types of bacteria directly related to the processes involved in the biological degradation of the present compounds in the SBBR.

Acknowledgments

Authors are grateful to the Spanish Ministry of Education and Culture (CICYT Project CTQ2005-00446/PPQ) and to DURSI (Department of Universities, Research and Information Society) for funds received to carry out this research. The authors would like to thank the support of Ramón Seminago (Scientific Park of the University of Barcelona) for his contribution in molecular biology analysis.

References

- (1) Batta, A.L.; Bruceb, I.B.; Aгаа, D.S. *Environ. Pollut.* **2006**, *142* (2), 295-302.
- (2) Harold, C.N. *Science.* **1992**, *257*, 1064-1073.
- (3) Kathryn, D. B.; Kulis, J.; Thomson, B.; Chapman, T.H.; Douglas, B. M. *Sci. Total Environ.* **2006**, *366* (2-3), 772-783.
- (4) González, O.; Sans, C.; Esplugas, S. *J. Haz. Mat.* **2007**, *146*, 459-464.
- (5) Glaze, W.H.; Kang, J.W., Chaplin, D.H. *Ozone: Sci. Eng.* **1987**, *9*, 335.
- (6) Lapertot, M.; Ebrahimi, S.; Dazio, S.; Rubinelli, A.; Pulgarin, C. J. *Photochem. Photobiol., A.* **2007**, *186*, 34-40.
- (7) Mantzavinos, D.; Psillakis, E. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2004**, *79*, 431-454.
- (8) Petrović, M.; Hernando, M.D.; Díaz-Cruz, M.S.; Barceló, D. *J. Chrom. A.* **2005**, *1067* (1-2), 1-14.
- (9) Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th ed., American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, Washington DC, USA, **1985**.
- (10) Drillia, P.; Dokianakis, S.N.; Fountoulakis, M.S.; Dornaros, M.; Stamatelatu, S.; Lyberatos, G. *J. Haz. Mat.* **2005**, *122*, 259-265.
- (11) Metcalf & Eddy, Inc. *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal, and Reuse*, third edition; McGraw-Hill, New York, **1991**.
- (12) Freitag, T.E.; Chang, L.; Clegg, C.D.; Prosser, J.I. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 8323-8334.
- (13) Fuerst, J.A. **2004**, *WFCC Newsl.* *38*, 1-11.

Received for review March 14, 2008. Revised manuscript received April 17, 2008. Accepted April 22, 2008.

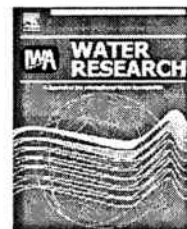
APÉNDICE V

Performance of a Sequencing Batch Biofilm Reactor for the treatment of pre-oxidized Sulfamethoxazole solutions

El artículo ha sido publicado en *Water Research*, vol. 43 (2009), pp. 2149-2158.



ELSEVIER

Available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Performance of a Sequencing Batch Biofilm Reactor for the treatment of pre-oxidized Sulfamethoxazole solutions

Oscar González*, Marc Esplugas, Carme Sans, Alicia Torres, Santiago Esplugas

Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès 1, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2008

Received in revised form

10 February 2009

Accepted 11 February 2009

Published online 20 February 2009

Keywords:

Advanced Oxidation

Technologies (AOTs)

Antibiotic

Biodegradation

Emerging contaminants

Pharmaceuticals

Wastewater

ABSTRACT

A combined strategy of a photo-Fenton pretreatment followed by a Sequencing Batch Biofilm Reactor (SBBR) was evaluated for total C and N removal from a synthetic wastewater containing exclusively 200 mg L^{-1} of the antibiotic Sulfamethoxazole (SMX). Photo-Fenton reaction was optimized at the minimum reagent doses in order to improve the biocompatibility of effluents with the subsequent biological reactor. Consequently, the pretreatment was performed with two different initial H_2O_2 concentrations (300 and 400 mg L^{-1}) and 10 mg L^{-1} of Fe^{2+} . The pre-treated effluents with the antibiotic intermediates as sole carbon source were used as feed for the biological reactor. The SBBR was operated under aerobic conditions to mineralize the organic carbon, and the Hydraulic Retention Time (HRT) was optimized down to 8 h reaching a removal of 75.7% of the initial Total Organic Carbon (TOC). The total denitrification of the NO_3^- generated along the chemical-biological treatment was achieved by means of the inclusion of a 24-h anoxic stage in the SBBR strategy. In addition, the Activated Sludge Model No. 1 (ASM1) was successfully used to complete the N balance determining the N fate in the SBBR.

The characterization and the good performance of the SBBR allow presenting the assessed combination as an efficient way for the treatment of wastewaters contaminated with biorecalcitrant pharmaceuticals as the SMX.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A large number of emerging contaminants (e.g. algal and cyanobacterial toxins, hormones and other endocrine-disrupting compounds, surfactants, perfluorinated compounds, pharmaceuticals or personal-care products) are not currently covered by existing regulations on water quality or have not been previously studied. These contaminants may be candidates for future regulation, depending on research based on their toxicity and potential effects in the environment and on human health. Since these substances are biologically active and they could have limited biodegradability, their entry into

the aquatic environment can involve serious risks for human beings (Christensen, 1998).

Among pharmaceuticals, antibiotics are of particular concern because they can induce bacterial resistance through continuous exposure (Halling-Sørensen et al., 1998). According to the World Health Organization (WHO), 28×10^6 kg antibiotics are produced worldwide every year ($7.700 \text{ kg day}^{-1}$). Approximately, 52% of these products are consumed by human beings and the rest is destined to veterinary purposes. The European Union is, together with EEUU, the biggest consumer of antibiotics and it consumes almost a half of the antibiotic production. Due to the growing interest in the

* Corresponding author. Tel.: +34 93 4021290; fax: +34 93 4021291.

E-mail addresses: ogonzalez@angel.qui.ub.es (O. González), marc.esplugas@angel.qui.ub.es (M. Esplugas), carmesans@ub.edu (C. Sans), alicia_torres_gil@hotmail.com (A. Torres), santi.esplugas@ub.edu (S. Esplugas).

0043-1354/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2009.02.013

Nomenclature**Symbol/acronym**

θ_{SRT} (day) Sludge Retention Time
 AOT (-) Advanced Oxidation Technology
 ASM1 (-) IAWQ Activated Sludge Model No. 1
 b'_A (day⁻¹) Autotrophic Linear Decay Rate
 b'_H (day⁻¹) Heterotrophic Linear Decay Rate
 b_A (day⁻¹) Auto. Death-Regeneration Decay Rate
 b_H (day⁻¹) Het. Death-Regeneration Decay Rate
 BOD₅ (mgO₂L⁻¹) Biochemical Oxygen Demand at 5 days
 COD (mgO₂L⁻¹) Chemical Oxygen Demand
 DO (mgO₂L⁻¹) Dissolved O₂
 HRT (h) Hydraulic Retention Time
 i_{XB} (gN (g COD⁻¹) in biomass) Mass N/mass COD in biomass
 OLR (mgCL⁻¹ day⁻¹) Organic Loading Rate
 OUR (mgO₂L⁻¹ h⁻¹) O₂ Uptake Rate
 PES (-) Polyethersulphone

SBBR (-) Sequencing Bath Biofilm Reactor
 SBR (-) Sequencing Batch Reactor
 SEM (-) Scanning Electron Microscopy
 SMX (-) Sulfamethoxazole
 STP (-) Sewage Treatment Plant
 TOC (mgCL⁻¹) Total Organic Carbon
 TVSS (mgL⁻¹) Total Volatile Suspended Solids
 Y_A (g cell COD formed (gN oxidized)⁻¹) Theoretical Autotrophic Yield
 $Y_{A,Obs}$ (g cell COD formed (gN oxidized)⁻¹) Observed Autotrophic Yield
 Y_H (g cell COD formed (g COD oxidized)⁻¹) Theoretical Heterotrophic Yield
 $Y_{H,Obs}$ (g cell COD formed (g COD oxidized)⁻¹) Observed Heterotrophic Yield
 Y_{Obs} (g cell COD formed (g COD oxidized)⁻¹) Overall Observed Yield

occurrence of antibiotics in the aquatic environment and their potential impacts on the environment, Sulfamethoxazole (SMX) has been chosen for this study. The consumption of SMX in Spain (12.7 t y⁻¹) remains in the same range as in other European countries (Carballa et al., 2008).

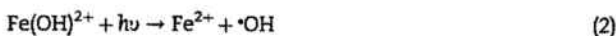
Some data indicate that these compounds are not efficiently eliminated during water treatment (Carballa et al., 2004; Bendz et al., 2005; Hernández et al., 2007) so, depending on the mobility and the persistence of antimicrobials and metabolites in the soil-water environment, they may threaten surface waters and groundwaters. SMX has been detected at ng L⁻¹ levels in the different stages of sewage treatment plants (influent (6.9–390 ng L⁻¹); effluent (24–352 ng L⁻¹)), hospital effluent (1300–2100 ng L⁻¹) and surface waters (0.38–300 ng L⁻¹) in different countries (Göbel et al., 2004; Lindberg et al., 2004; Chang et al., 2008).

An important incoming route for pharmaceuticals to the aquatic medium is the discharge of controlled industrial waste streams. Since conventional water treatment seems not to be efficient in degrading pharmaceuticals, removing them from the waste streams in the pharmaceutical companies should be considered a priority. This way, its dispersion into the environment would be considerably mitigated. Sulfamethoxazole would be a good candidate to be treated at the source since a) it presents low sorption coefficients and it will tend to remain and move in the aqueous phase, b) no remarkable biological transformation is expected due to its low biological degradation constant (Joss et al., 2006) and c) it may affect the biological process in Sewage Treatment Plants (STPs). In addition, since the treatment of large amounts of water containing small concentrations of pharmaceuticals involves big expenses, a possible concentration step should be considered to precede their destruction, reducing, consequently, the treatment costs. At adequate pH and ionic strength, retention of the negatively charged SMX by nanofiltration membranes is considerably high (Nghiem et al., 2006). Membrane filtration process using reverse osmosis also shows excellent removal (>95%) for SMX (Kim et al., 2007). Only a few works dealing with the treatment of water

contaminated with high concentrations of SMX by chemical oxidation processes have been found (Klavarioti et al., 2009). Only low mineralization of SMX was reported in these studies and, in any case, a combination with a subsequent biological treatment has been raised.

On the other hand, conventional biological treatment by itself is not an effective technology to remove SMX from water when working with non-enhanced cultures. Its antibiotic nature and its low biodegradability (Richardson and Bowron, 1985; Radka et al., 2004; González et al., 2007) imply that long residence times are required for the biological treatment of a SMX solution. Previous tests carried out by our research group in aerobic batch reactors using conventional activated sludge revealed that around 60 days are needed for the destruction of 200 mg L⁻¹ of SMX (González et al., 2008).

Due to all these reasons, an alternative technology to treat waters with high concentrations of this pollutant is proposed. The strategy would be the combination of an Advanced Oxidation Technology (AOT) called photo-Fenton with a biological treatment carried out in a Sequencing Batch Biofilm Reactor (SBBR). AOTs are characterized by the generation of hydroxyl radicals (•OH). These radicals are very oxidative species which can attack a high number of pollutants. Photo-Fenton is known to be able to improve the efficiency of dark Fenton or Fenton-like reagents, respectively, by means of the interaction of radiation (UV or Visible) with Fenton's reagent (Bolton et al., 1996; Hislop and Bolton, 1999). There are two main reactions involved in the production of free hydroxyl radicals: the Fenton's reagent (Eq. (1)) and another step (Eq. (2)) which does not take place in the Fenton reaction:



With the most favorable pH conditions (around 3), the ion Fe³⁺ appears as monohydroxy-complex Fe(OH)²⁺. This complex can be photolyzed generating new free hydroxyl

radicals following Eq. (2). This way, UV light also leads to the recycling of ferric iron. The photo-Fenton AOT has proved to be a successful tool to oxidize this antibiotic, as observed in a previous work (González et al., 2007). Its use as a short and soft pretreatment leads to the formation of intermediates more biodegradable than the parent compound and, consequently, allows the biological step to become an effective treatment process again. A strong photochemical pretreatment is not necessary since it is followed by an efficient biological oxidation.

It is well known that the biofilm configured systems are well suited for the treatment of wastewater containing poorly degradable compounds (Bluwer, 1989; Makinen et al., 1993). Immobilization of microorganisms as biofilm results in high biomass hold up, which enables the process to be operated at significantly higher liquid throughputs and Organic Loading Rates (OLR). Attached biofilm acts as buffer to reduce the concentration of toxic chemicals during process operation thereby providing advantage for the treatment of low biodegradable industrial wastewater containing recalcitrant compounds (Bishop, 1997). Biofilm systems are generally less energy intensive and more resistant to shock loads to which wastewater treatment systems are frequently subjected (Chaudhry and Beg, 1998). Supported biomass systems are particularly useful where high hydraulic loading variations occur and where slowly growing organisms with special metabolic capacities are to be protected from washout (Wilderer et al., 1993; Woolard, 1997).

In the present work, photo-Fenton process has been used as pretreatment to increase the biodegradability and to reduce the toxicity of a solution containing 200 mg L^{-1} of SMX, whereas a subsequent biological aerobic–anoxic step in a SBBR has been carried out in order to complete the Total Organic Carbon (TOC) removal and to eliminate the elevated inorganic N generated as NH_4^+ and NO_3^- during the antibiotic oxidation. A synthetic sewage containing exclusively 200 mg L^{-1} of SMX as a source of carbon was treated, trying to simulate a possible industrial washing stream from the manufacturing process of the antibiotic. The key is to minimize residence time and reagent consumption in the more expensive AOP stage by applying an optimized coupling strategy (Scott and Ollis, 1997). A complete characterization of the reactor was performed in order to assess the efficiency of the proposed integrated treatment strategy.

2. Materials and methods

2.1. Photochemical reaction

The photochemical reactor was a Pyrex jacketed thermostatic 2 L vessel equipped with three black-light blue lamps with a nominal power of 8 W each. A description of this equipment, as well as the manner to run the experiments and analyze the resultant solutions is reported in González et al. (2007).

A 200 mg L^{-1} SMX (Sigma, >99%) aqueous solution ($\text{TOC} = 94.5 \text{ mg CL}^{-1}$, Chemical Oxygen Demand (COD) = $290 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ and total N = 33.2 mg NL^{-1}) was oxidized by means of this technology. Resultant photo-Fenton effluents from the different reaction conditions studied were subjected to

diverse biological tests as Biochemical Oxygen Demand at 5 days (BOD_5), Microtox[®] acute toxicity test and activated sludge respiration Inhibition Test, to select the most convenient pretreatment (González et al., 2007). As a result, two different settings in the photo-Fenton reaction were chosen to assess the combination with the biological step. In both cases, the initial pH, the temperature and the initial Fe^{2+} concentration were fixed at 2.8, 25°C and 10 mg L^{-1} respectively whereas two different initial H_2O_2 concentrations were selected: 300 and 400 mg L^{-1} . The system was left to react until all H_2O_2 was consumed.

2.2. Stripping and adsorption tests

Since the two effluents mentioned above were going to be used to feed an aerated SBBR packed with volcanic stones, both effluents and a 200 mg L^{-1} SMX solution were subjected to stripping and adsorption tests to discard external influences over the results.

Target solutions were neutralized to pH 7 with NaOH and put in contact with volcanic stones for 48 h maintaining the same liquid/stones volume ratio as in the SBBR. In a parallel test, a high air flow rate was also bubbled through the same solutions during 2 h. TOC and SMX concentration were followed in both tests.

Sorption of SMX onto the supported biomass of the SBBR was considered negligible since Göbel et al. (2005) and Joss et al. (2005) reported that sorption onto secondary sludge for compounds showing a sorption coefficient of below 300 L kg^{-1} is not relevant. The fact that the concentration of biomass present in the SBBR was much smaller than the normal one present in a conventional wastewater treatment was also taken into account. In any case, it is important to remark that the possible sorbed SMX fraction would be removed in a subsequent hypothetical anaerobic digestion of the sewage sludge (Carballa et al., 2007).

2.3. Biological SBBR

The biofilm over the solid support in the SBBR allowed the suppression of the settling stage, the main difference between a SBBR and a standard Sequencing Batch Reactor (SBR). Volcanic stones were chosen as support due to their high specific area and their economical price (Melgoza et al., 2000).

The capacity of the reactor was 2.62 L (including pipes and reservoirs) whereas the volcanic stones occupied 0.87 L. 88% of the liquid (1.54 L) was replaced in each cycle change. A scheme of this device can be observed in Fig. 1. The liquid was recirculated from the bottom to the top of the reactor at a flow rate of 4.5 mL s^{-1} . 1.5 L min^{-1} of air were supplied through a ceramic diffuser using an air compressor. Loading, draw-off, aeration and recirculation were controlled by a time-based control system (Siemens LOGO! 230 RC). An electrode on the top and a probe in a small reservoir on the bottom of the reactor allowed following the pH and the Dissolved O_2 (DO) respectively. Aerobic sludge (Total Volatile Suspended Solids (TVSS) = 2000 mg L^{-1}) taken from a STP located in Barcelona (Spain) was used as inoculum. The pH and the temperature were kept around 7 and 25°C respectively.

Since SMX solutions for photo-Fenton experiments were prepared using deionized water and adjusted at low pH,

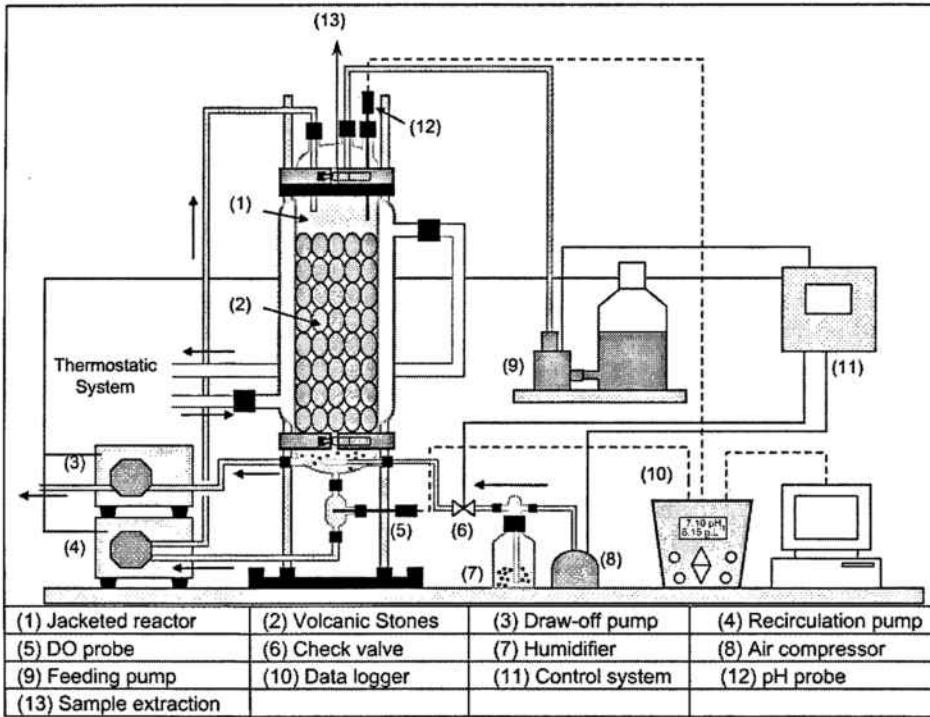


Fig. 1 – SBBR scheme.

neutralization and addition of nutrients, trace elements and buffer were needed before feeding the reactor. Directions from the Respirometric Standard Method 5210 D (APHA, 1985) were followed for this purpose. The addition of NH_4Cl and FeCl_3 was suppressed because ammonium and iron ions were already present in the photo-Fenton effluent.

The withdrawn samples were filtrated using $0.45 \mu\text{m}$ polyethersulphone (PES) filters and acidified in order to monitor TOC, COD and the concentrations of SMX, NO_3^- and NH_4^+ . DO was monitored in all cycles and TVSS were also determined. Air supply was shortly interrupted in order to calculate O_2 Uptake Rates (OURs) with the slope of the DO decay between 6.5 and $2.5 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ (Yoong et al., 2000). These OURs are representative of the biomass activity and their interpretation allows deciding when cycles are stable and which Hydraulic Retention Time (HRT) should be assessed next. By knowing the total O_2 consumption through the OUR profile, the calculation of the Heterotrophic Yield of the biomass present in the biofilm (Y_H) is also possible. This yield will be used to close the N mass balance of the system.

2.3.1. Feed A

Initially, the SBBR was charged with Feed A (photo-Fenton effluent resulting from using 300 mgL^{-1} of H_2O_2). First of all, a start-up of the SBBR was carried out with the objective of forming the biofilm. For this purpose, the SBBR was filled with Feed A and an initial high concentration of TVSS was inoculated (1000 mgL^{-1}). The reactor was working with this load during 27 days until no changes in TVSS and TOC were observed. After this start-up stage, sets of aerobic cycles with different HRTs were carried out. HRTs were shortened from

168 down to 8 h increasing, thereby, the OLR from 9.7 to $204 \text{ mgCL}^{-1}\text{day}^{-1}$. Cycles were repeated without changing the HRT until they were completely stabilized.

2.3.2. Feed B

Aiming to decrease the final TOC value in the SBBR effluent, 24-h cycles were carried out filling the reactor with Feed B (photo-Fenton effluent resulting from using 400 mgL^{-1} of H_2O_2).

Finally, an anoxic stage of 24 h was introduced to assess the denitrification process. Thus, SBBR was operated 24 h under aerobic conditions and 24 h under anoxic conditions. For this purpose methanol was added as C source to biologically remove the NO_3^- . A ratio of $2.5 \text{ CH}_3\text{OH}/1 \text{ NO}_3^- \text{-N}$ (w/w) was used according to Metcalf and Eddy (1991).

2.3.3. Nitrogen balance

It was necessary to determine the Global Observed Yield (Y_{Obs}) (Heterotrophic plus Autotrophic Observed Yields) of biomass in the biofilm in order to know the N assimilated by the new cells formed, closing the N mass balance in the aerobic stage. The Y_{Obs} reflects the effective biomass generation per unit of COD consumed, taking into account the death of microorganisms and the sludge age. An initial estimation of it was done considering the steady performance of the biofilm. Under this hypothetical situation, the Y_{Obs} was calculated dividing the COD corresponding to the TVSS going out when emptying the reactor by the COD consumed in the corresponding cycle, since an amount of microorganisms equivalent to the effective generation of biomass would be leaving the reactor under this steady conditions.

In parallel, some calculations were done using the equations described in the IAWQ Activated Sludge Model No. 1 (ASM1) (Henze et al., 2000) with the intention of corroborating the already calculated Y_{Obs} . Integrating the area under the OUR curve, the total O_2 consumption of a cycle can be determined. These O_2 requirements correspond to: (a) nitrification, (b) endogenous respiration, (c) generation of new biomass and (d) mineralization of C to obtain energy. The endogenous respiration was also established by means of the OUR curve. The O_2 consumption corresponding to nitrification can be calculated considering the next stoichiometry: 1.894 mol of O_2 per mol of NH_4^+ (taking into account the N assimilated by the new autotrophic cells formed). Knowing these data, the O_2 consumption corresponding to the exogenous heterotrophic activity (c+d) can be obtained subtracting the endogenous respiration and the O_2 involved in the nitrification process. Since the O_2 requirements for new heterotrophic biomass generation are negligible, the resultant O_2 matches with the one consumed to mineralize C in order to obtain energy (Dosta et al., 2007). At this point, the following explanation is considered necessary for a good comprehension: the biodegradable substrate may be consumed for obtaining energy ($1 - Y_H$; g COD mineralized (g COD oxidized) $^{-1}$) or for the generation of new biomass (Y_H ; g cell COD formed (g COD oxidized) $^{-1}$). Now, Theoretical Heterotrophic Yield (Y_H) can be calculated making $(1 - Y_H)$ equal to the resultant O_2 obtained. On the other hand, Theoretical Autotrophic Yield (Y_A) was assumed to be 0.24 g cell COD formed (gN oxidized) $^{-1}$ following the ASM1. At this point, Sludge Retention Time (θ_{SRT}) and Heterotrophic Linear Decay Rate (b'_H) and Autotrophic Linear Decay Rate (b'_A), which are the constants that relate the decrease rate in cell mass with the concentration of organisms present, are also required to determine the Observed Heterotrophic and Autotrophic Yields ($Y_{H,Obs}$ and $Y_{A,Obs}$). The rate b'_A matches with the Death-Regeneration Decay Rate (b_A) whereas b'_H can be calculated through Eq. (3). Previous to the determination of b'_A and b'_H , the Death-Regeneration Decay Rates were subjected to temperature correction following the modified Arrhenius Eq. (4) (Dold et al., 2007). Values for b_H and b_A at 20 °C were taken from ASM1 model.

$$b'_H = \frac{b_H}{1 - Y_H(1 - 0.08)} \quad (3)$$

$$b_T = b \cdot 1.029^{(T-20)} \quad (4)$$

$$Y_{X,Obs} = \frac{Y_X}{1 + \theta_{SRT} b'_X} \quad (5)$$

The amount of volatile solids fixed on the volcanic support was estimated by calcination of a fixed weight of stones. From this value and the TVSS leaving the reactor when emptying the reactor, θ_{SRT} was estimated to be 50 days. Now, $Y_{H,Obs}$ and $Y_{A,Obs}$ can be determined using Eq. (5) (Orhon and Artan, 1994) (Y_A was considered 0.24 according to ASM1). Through the experimental ratios gN oxidized/g COD oxidized (0.25 and 0.47 for Feed A and Feed B respectively), the corresponding unit transformations were done and the overall Y_{Obs} was calculated by addition. With the Y_{Obs} and knowing the ratio Mass N/mass COD in biomass ($i_{XB} = 0.086$ gN (g COD) $^{-1}$ in biomass)

(taken from ASM1), the amount of N assimilated by the new cells can be determined and the N balance can be closed.

2.4. Analytical methods

TOC, COD and SMX concentrations together with OUR were monitored with the purpose of assessing the performance of the system. TOC was measured by means of a Shimadzu TOC-VCSN TOC analyzer. To analyze the COD, the Standard Method 5220D procedures were followed (APHA, 1985). The concentration of the antibiotic was quantified by means of a HPLC supplied by Waters Corporation (configuration described elsewhere (Bacardit et al., 2006); wavelength used: 270.5 nm). A DO probe (Sumphony, VWR) was used to follow this parameter in the SBBR. NO_3^- , NH_4^+ and total N concentrations were analyzed to find out the fate of the N contained in the initial SMX molecule. A persulfate digestion method (Hach Test'N Tube™ Vials; method 10072) was used to measure the total N present in the resultant photo-Fenton effluents and both, NH_3 and NO_3^- concentrations were analyzed using electrodes (Symphony, VWR) according to the procedures provided by the manufacturer. Finally, TVSS were determined according to the Standard Method 2540E (APHA, 1985).

2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

A Jeol SEM 840 microscope was used to capture surface images of the biomass over the filling stones in the reactor. To improve the visualization of the rock sample, a chemical pretreatment was realized. First of all, 10 ml of liquid from the SBBR were mixed with a 10 ml of 5% glutaraldehyde solution in order to have a 2.5% glutaraldehyde solution buffered with phosphate at pH 7. Then, a rock sample was extracted from the reactor and immediately submerged in the glutaraldehyde solution. The sample was covered and stored for 2 h at 4 °C. Afterwards, a post-fixation in OsO_4 was performed for 24 h and the dehydration was carried out in alcoholic series (10, 25, 50, 70, 90 and 100%) during 20 min. Subsequently, a critical point drying was performed to avoid collapsing or deforming the surface of the rock samples and, finally, the sample was metallized with gold-palladium prior to be observed in the SEM.

3. Results and discussion

3.1. Photochemical reaction

The characteristics shown in Table 1 were obtained for the two photo-Fenton pretreatments studied after 67 and 83 min of reaction respectively. The antibiotic was almost completely removed in both pretreatments, and the TOC abatements achieved at the end of the reactions were 30 and 53% for solutions A and B respectively. Total N present in the effluents fits with the one in the initial SMX solution (33.2 mgNL $^{-1}$) and NO_3^- concentration was negligible in both cases. The oxidized intermediates resulted in non-toxic and non-inhibitor on sewage sludge, and a final BOD₅/COD ratio of 0.18 for Feed A and 0.26 for Feed B was obtained. More detailed information is presented and discussed elsewhere (González et al., 2007).

Table 1 – Main characteristics for the resultant effluents coming from the photo-Fenton pretreatment carried out with 300 and 400 mg L⁻¹ of H₂O₂ respectively.

	TOC (mgC L ⁻¹)	COD (mgO ₂ L ⁻¹)	[SMX] _{final} (mg L ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N (mgN L ⁻¹)	BOD ₅ / COD	Inhibition (activated sludge)	Acute toxicity (Microtox [®])
Feed A (300 mg L ⁻¹ H ₂ O ₂)	68.0	129.0	2.00	8.91	0.18	No inhibition	No toxicity
Feed B (400 mg L ⁻¹ H ₂ O ₂)	45.6	76.6	0.24	10.42	0.26	No inhibition	No toxicity

3.2. Stripping and adsorption tests

Stripping and adsorption tests did not cause any alteration neither in TOC nor in antibiotic concentration. Therefore, variations in TOC or in SMX concentration in the SBBR were not due to the presence of volatile substances or compounds capable to be adsorbed onto the volcanic support.

3.3. Biological SBBR

3.3.1. Feed A

Initially the SBBR was charged with Feed A. At the end of the start-up stage, TOC and TVSS in the reactor effluent were stabilized around 30 mg L⁻¹ and 5 mg L⁻¹ respectively. From this point on, sets of aerobic cycles with decreasing HRT were performed (168, 48, 24 and 8 h). The low TVSS values obtained and the good operation of the SBBR pointed to a correct creation of the biofilm.

Monitoring of TOC and SMX concentration for all the SBBR aerobic cycles is shown in Fig. 2. As figure shows, practically same TOC removals were achieved for the different HRTs used. The SBBR seemed to be more stable when working with HRT ranging from 168 to 24 h. A minor destabilization in antibiotic and TOC eliminations started with cycles of shorter HRT (8 h). An improvement in the total TOC removal was only observed during the initial cycles, while working with 7-day cycles. From this moment on, the TOC eliminations obtained were the same during the time that the SBBR was working (more than 3 months). The refractory organic fraction remaining in the final effluent after chemical-biological treatment ranged between 20 and 25 mgC L⁻¹ and the average TOC elimination in the SBBR was 65.1%.

In addition, the TOC removal rate increased when the HRT went down as it can be observed in Fig. 3. Therefore, bacteria got acclimated to degrade the organic matter faster when shortening the cycles possibly due to the growth of the biofilm or to physiologic transformations in the metabolic system of the microorganisms (Wiggings et al., 1987). A steady cycle of each set of cycles with a particular HRT was selected for this illustration. This same criterion was followed for Figs. 5-7.

Fig. 4 represents the occurred evolution in OUR monitoring when biofilm got acclimated to a specific HRT. The first and the last cycle of the 48-h cycles set are plotted in this figure to remark the importance of this significant evolution. Fig. 5 depicts the OUR profiles for different HRT cycles. The highest O₂ consumption by microorganisms through the whole experiment took place during the first hours of the 8-h cycles, when the reactor is working at the highest OLR (OLR = 204 mgC L⁻¹ day⁻¹), obtaining the maximal TOC removal rate (see Fig. 3). As a consequence, bacteria endogenous respiration in 8-h cycles started earlier than in the cycles with longer HRTs. It should be noticed that endogenous respiration for a cycle with HRT = 168 h is not shown in this figure because it started at 30 h. The OURs corresponding to endogenous respiration increased approximately from 1 up to 2 mgO₂ L⁻¹ h⁻¹ due to bacteria acclimation along the 3 months of reactor operation. These results illustrate the utility of OURs as an HRT optimizing tool as Yoong et al. (2000) pointed in previous experiments. The fact that TVSS in the SBBR did not increase when endogenous respiration increased was another evidence of the proper growth of the bacteria fixed onto the volcanic stone support.

Regarding the COD elimination, the same final COD removals were also obtained for all the HRTs, with an average value of 57.2%. Meanwhile, a minimum HRT of 48 h was

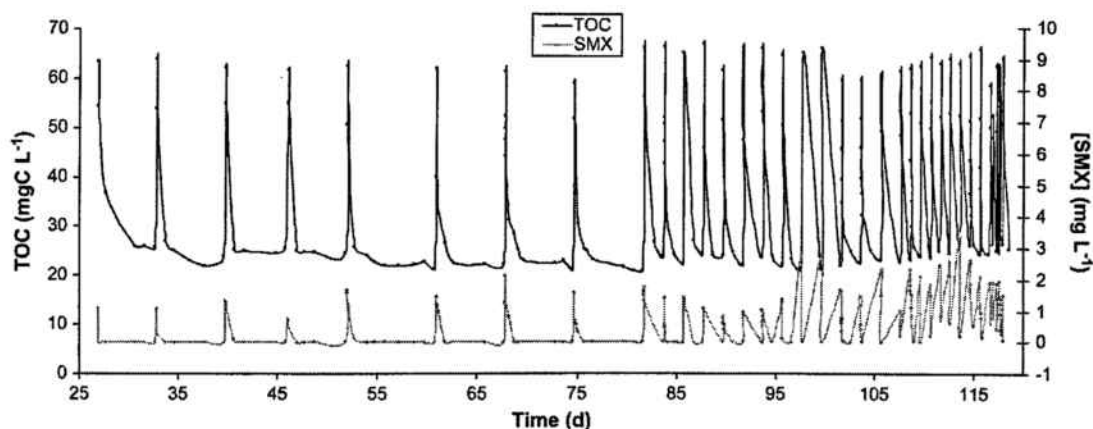


Fig. 2 – TOC and SMX concentration monitoring for all the cycles carried out in the SBBR charging with Feed A.

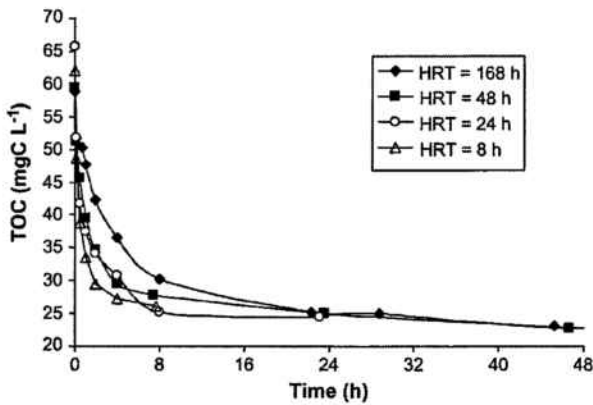


Fig. 3 - TOC elimination curves in the SBBR at different HRTs.

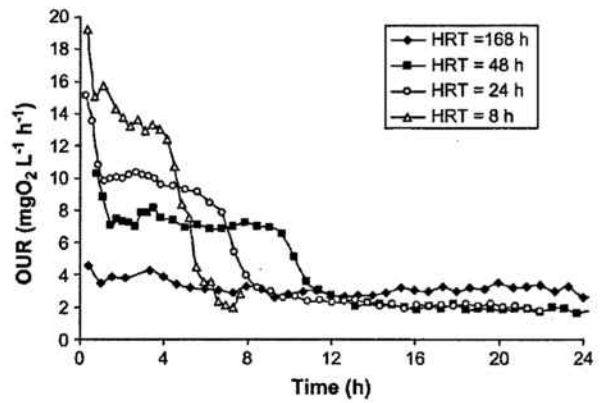


Fig. 5 - OUR monitoring curves for the different HRTs in the SBBR.

needed for the total SMX removal. Approximately, 0.25 mg L^{-1} of SMX remained in the reactor effluent for 8 and 24 HRT cycles. However, a significant SMX accumulation was not observed along the reactor operation time.

NH_4^+ and NO_3^- concentrations were followed along the biological cycles. An example of this monitoring for a 24-h cycle is depicted in Fig. 6. The same tendency was also observed for the rest of HRTs. A 96% of NH_4^+ was removed in the SBBR from the start-up on. No improvement due to bacteria acclimation was observed for the NH_4^+ removal along the whole strategy. There was a clear gap between the NO_3^- appearing and the NH_4^+ disappearing in the SBBR. Only 50.4% of the total NO_3^- appearing came from the nitrification of the initial NH_4^+ . This would indicate that the remaining 49.6% came from the biological degradation of N containing compounds.

The calculations for the N balance were performed for a 24-h cycle. The Y_{Obs} resulted to be $0.044 \text{ g cell COD formed (g COD oxidized)}^{-1}$ by initial estimation considering a steady performance of the biofilm (see Section 2.3.3). This small yield was expected since high sludge age and low production of sludge is a typical characteristic of a biofilm reactor (Mohan et al., 2007). On the other hand and following the ASM1 model

and the steps described in Materials and methods section, the Y_H and the Y_{Obs} resulted to be $0.618 \text{ g cell COD formed (g COD oxidized)}^{-1}$ and $0.042 \text{ g cell COD formed (g COD oxidized)}^{-1}$ respectively. It should be pointed out that the Y_{Obs} obtained corroborate the one estimated initially considering the hypothetical steady performance of the biofilm. With this Y_{Obs} , the amount of N assimilated by the new cells can be determined and the N mass balance can be closed. These are the results obtained: the combination of photo-Fenton reaction using 300 mg L^{-1} of H_2O_2 with the biological SBBR (24-h cycles) enabled 54.8% of the initial N contained in SMX to become NO_3^- . The rest of N would be located as follows: 1.1% as NH_4^+ , 44.1% still forming part of nitrogenated organic compounds and 0.8% would have been assimilated by the cells (see Table 2).

As example and summary of the analysis completed for every cycle, Fig. 7 is presented. The figure shows the TOC removal, OUR and NO_3^- monitoring for a steady 24-h cycle. There were 4 clearly different stages of O_2 consumption. At the beginning of the cycle the O_2 consumption was higher due to the rapid oxidation of both, C and N. Then, the OURs reached a plateau because the still elevated nitrification rate offset the decrease in the TOC removal one. Afterwards, the O_2

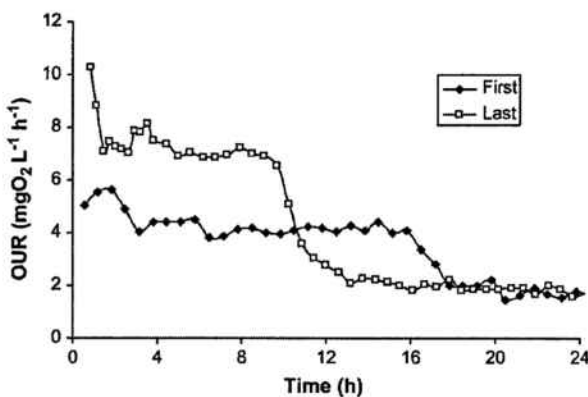


Fig. 4 - Comparison between the first and the last cycles of the 48-h cycles set.

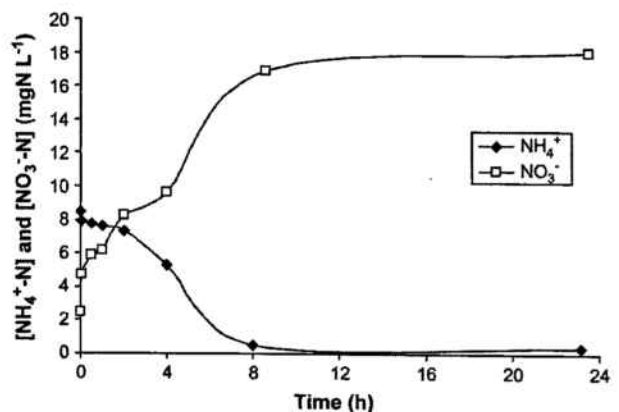


Fig. 6 - NH_4^+ removal and NO_3^- generation profiles for a 24-h cycle in the SBBR.

Table 2 – Distribution of N at the end of the biological treatment.

	N as NO ₃ ⁻ (%)	N as NH ₄ ⁺ (%)	N assimilated into cells (%)	Organic N (%)
Feed A	54.8	1.1	0.8	44.1
Feed B	88.5	0.3	0.7	10.5

consumption dropped since the amount of C and N capable of being oxidized biologically was already very low, to finally reach the stage of endogenous respiration.

3.3.2. Feed B

Initial concentration of H₂O₂ was increased in the pretreatment in order to reduce the final TOC and the amount of N containing organic compounds in the effluent of the biological treatment. Improvements in TOC and COD removals in the SBBR were achieved increasing the dose of H₂O₂ in the pretreatment up to 400 mg L⁻¹. The TOC removal reached in the SBBR increased from 65.1 to 73.6% whereas COD removal did it from 57.2 to 78.8%. It is important to point out that final TOC in the SBBR effluent filled with Feed B was about 10 mg C L⁻¹, which can be considered as the average residual TOC in biological reactors.

From the results, it can be concluded that the presence of refractory compounds in the photo-Fenton effluents decreases when increasing the degree of pretreatment. The same behavior was observed in previous studies working with suspended biomass (González et al., 2008).

To complete the comparison concerning C degradation, Fig. 8 shows the total TOC elimination obtained for the two chemical-biological processes studied. The augment in H₂O₂ dose resulted in an increase of total TOC removal from 75.7% for the strategy with Feed A to 87.7% when using Feed B. On the other hand, 750 mg L⁻¹ of H₂O₂ (more than the double amount of chemical oxidant) were needed using exclusively a photo-Fenton reaction to obtain the same mineralization than in the combined chemical-biological strategy with Feed A.

Attending N removal, an important gap between the NO₃⁻ concentration in the SBBR effluent after the aerobic stage and the NH₄⁺ concentration in Feed B was also observed in this

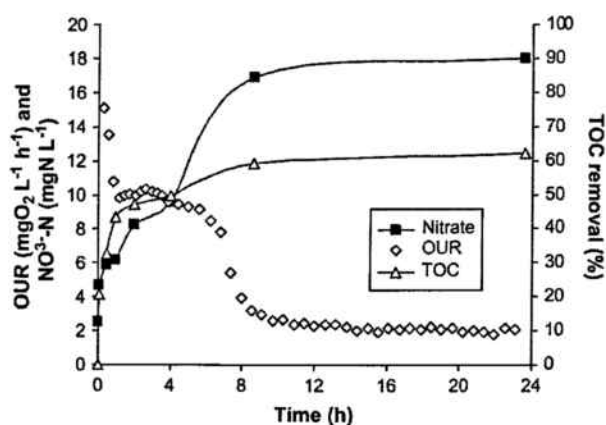


Fig. 7 – OUR, NO₃⁻ and TOC removal monitoring for a 24-h cycle in the SBBR.

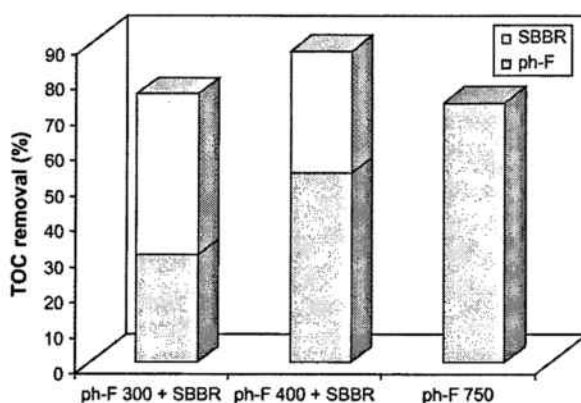


Fig. 8 – Total TOC removal achieved by means of the combination for the 2 studied cases, compared with the chemical TOC mineralization obtained through the photo-Fenton reaction performed with 750 mg L⁻¹ of H₂O₂.

case. Only 36.4% of the formed NO₃⁻ came from the NH₄⁺ present in the photo-Fenton effluent. Consequently, the remaining 63.6% seems to come from the degradation of N containing organic compounds.

Calculation of Y_{Obs} was carried out as when filling with Feed A aiming to close the N mass balance, characterizing the fate of the N present in the initial SMX solution after the SBBR. In this case, Y_{Obs} was found to be 0.047 g cell COD formed (g COD oxidized)⁻¹. Results are represented and compared with the ones of Feed A case in Table 2. As the results show, practically all the SMX and practically all the nitrogenated organic intermediates were mineralized using the combination of the photo-Fenton pretreatment with 400 mg L⁻¹ of H₂O₂ and the SBBR.

Finally, in the denitrification stage, NO₃⁻ were completely removed at the end of the 24-h anoxic stage from the first cycle tested by adding 80 mg L⁻¹ of methanol as readily biodegradable carbon source.

3.4. Scanning electron microscopy

The preparation methodology for the volcanic rocks collected from the SBBR developed by the Scientific Services of the University of Barcelona, led to a good visualization of the microorganisms forming the biofilm. Images of different microorganisms attached onto the volcanic stones were obtained. Although completely different shapes of microorganisms were distinguished, the most abundant were filamentous shape colonies.

4. Conclusions

The combination of photo-Fenton and biological SBBR resulted in a successful strategy for the treatment of water initially contaminated with 200 mg L⁻¹ of SMX. Experimental data revealed that a photo-Fenton pretreatment with 300 mg L⁻¹ of H₂O₂ combined with 8 h of biological treatment in the SBBR allowed removing a 75.7% of initial TOC. However, an increase

of H_2O_2 concentration up to 400 mg L^{-1} was necessary to obtain practically the total organic C and N removal with the combined chemical–biological system. The inclusion of an anoxic stage in the SBBR strategy succeeded and allowed to denitrify all the NO_3^- generated during the oxidation of SMX. No accumulations of SMX in the SBBR were observed even when working at the lowest HRT (8 h) with the less pre-treated effluent (Feed A).

Since the photo-Fenton process is a non-selective powerful oxidation technique that allows degrading a large number of contaminants the presented strategy could be applied to treat sewage containing different pharmaceuticals. The toxicity and the biorecalcitrance of sewage containing different pharmaceuticals as a source of carbon could be reduced through this AOP, allowing an efficient combination with a subsequent biological degradation step.

Acknowledgements

Authors are grateful to the Spanish Ministry of Education and Culture (CICYT Project CTQ2008-01710/PPQ) and to DURSI (Department of Universities, Research and Information Society, Generalitat de Catalunya) for funds received to carry out this research.

REFERENCES

- APHA, 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, Washington, DC.
- Bacardit, J., Hultgren, A., García-Molina, V., Esplugas, S., 2006. Biodegradability enhancement of wastewater containing 4-chlorophenol by means of photo-Fenton. *J. Adv. Oxid. Technol.* 9, 27–34.
- Bendz, D., Paxéus, N.A., Ginn, T.R., Loge, F.J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 122, 195–204.
- Bishop, P.L., 1997. Biofilm structure and kinetics. *Water Sci. Technol.* 36, 287–294.
- Bluwer, E.J., 1989. Transformation of xenobiotics in biofilms. In: Charcklis, W.G., Wilderer, P.A. (Eds.), *Structure and Function of Biofilms*. John Wiley, New York, pp. 251–256.
- Bolton, J.R., Ravel, M., Cater, S.R., Safarzadeh-Amiri, A., 1996. Homogeneous solar photodegradation of contaminants in water. In: *Proceedings of the ASME International Solar Energy Conference*. ASME, New York, pp. 53–60.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llopart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Ternes, T., 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 38, 2918–2926.
- Carballa, M., Omil, F., Ternes, Th., Lema, J.M., 2007. Fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Res.* 41, 2139–2150.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., 2008. Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage. *Chemosphere* 72, 1118–1123.
- Chang, H., Hu, J., Asami, M., Kunikane, S., 2008. Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1190 (1–2), 390–393.
- Chaudhry, M.R.S., Beg, S.A., 1998. A review on the mathematical modelling of biofilm processes: advances in fundamentals of biofilm modelling. *Chem. Eng. Technol.* 21, 701–771.
- Christensen, F.M., 1998. Pharmaceuticals in the environment—A human risk? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 28 (3), 212–221.
- Dold, P.L., Fairlamb, P.M., Jones, R., Takács, I., Murthy, S., 2007. Sidestream modelling incorporated into whole plant simulation. In: *Proceedings of the CLONIC Final Workshop'07. Closing the Nitrogen Cycle from Urban Landfill Leachate by Biological Nitrogen Removal Over Nitrite and Thermal Treatment*. Barcelona, pp. 114–122.
- Dosta, J., Galí, A., Benabdallah El-Hadj, T., Macé, S., Mata-Álvarez, J., 2007. Operation and model description of a sequencing batch reactor treating reject water for biological nitrogen removal via nitrite. *Bioresour. Technol.* 98 (11), 2065–2075.
- Göbel, A., McArdell, C.S., Suter, M.J.F., Giger, W., 2004. Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 76 (16), 4756–4764.
- Göbel, A., Thomsen, A., McArdell, C.S., Joss, A., Giger, W., 2005. Occurrence and sorption behaviour of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environ. Sci. Technol.* 39 (11), 3981–3989.
- González, O., Sans, C., Esplugas, S., 2007. Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton. Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates. *J. Hazard. Mater.* 146, 459–464.
- González, O., Esplugas, M., Sans, C., Esplugas, S., 2008. Biodegradation of photo-Fenton pre-treated solutions of sulfamethoxazole by aerobic communities. Molecular biology techniques applied to the determination of existing strains. *J. Adv. Oxid. Technol.* 11 (2), 238–245.
- Halling-Sørensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingersley, F., Lützhøft, H.C.H., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* 36, 357–393.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., van Loosdrecht, M., 2000. *Activated Sludge Models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3*. Scientific and Technical Report No 9. IWA Publishing, London, 128 pp.
- Hernández, F., Sancho, J.V., Ibáñez, M., Guerrero, C., 2007. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC–MS. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 26 (6), 466–485.
- Hislop, K.A., Bolton, J.R., 1999. The photochemical generation of hydroxyl radicals in the UV-Vis/ferrioxalate/ H_2O_2 system. *Environ. Sci. Technol.* 33 (18), 3119–3126.
- Joss, A., Keller, E., Alder, A.C., Göbel, A., McArdell, C.S., Ternes, Th., Siegrist, H., 2005. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Res.* 39, 3139–3152.
- Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., McArdell, C.S., Ternes, Th.A., Thomsen, A., Siegrist, H., 2006. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment proposing a classification scheme. *Water Res.* 40, 1686–1696.
- 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 Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Res.* 41, 1013–1021.
- Klavarioti, M., Mantzavinos, D., Kassinos, D., 2009. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environ. Int.* 35 (2), 402–417.

- Lindberg, R., Jarnheimer, P.-A., Olsen, B., Johansson, M., 2004. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere* 57 (10), 1479-1488.
- Makinen, P.M., Theno, T.J., Ferghson, J.F., Ongerth, J.E., Puhakka, J.A., 1993. Chlorophenol toxicity removal and monitoring in aerobic treatment recovery from process upsets. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1434-1439.
- Melgoza, R.M., Chew, M., Buitron, G., 2000. Start-up of a sequential anaerobic/aerobic batch reactor for the mineralization of p-nitrophenol. *Water Sci. Technol.* 42 (5-6), 289-292.
- Metcalf & Eddy, Inc., 1991. *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal, and Reuse*, third ed. McGraw-Hill, Inc., New York, 1334 pp.
- Mohan, S.V., Rao, N.C., Sarma, P.N., 2007. Low-biodegradable composite chemical wastewater treatment by biofilm configured sequencing batch reactor (SBBR). *J. Hazard. Mater.* 144, 108-117.
- Nghiem, L.D., Schäfer, A.I., Elimelech, M., 2006. Role of electrostatic interactions in the retention of pharmaceutically active contaminants by a loose nanofiltration membrane. *J. Membr. Sci.* 286, 52-59.
- Orhon, D., Artan, N., 1994. *Modelling of Activated Sludge Systems*. Technomic Publishing Co., Inc., Pennsylvania, 589 pp.
- Radka, A., Kumpel, T., Kümmerer, K., 2004. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test. *Chemosphere* 57, 505-512.
- Richardson, M.L., Bowron, J.M., 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the environment. *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 1-12.
- Scott, J.P., Ollis, D.F., 1997. Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment II: recent illustrations and experiences. *J. Adv. Oxid. Technol.* 2, 374-381.
- Wiggings, B.A., Jones, S.H., Alexander, M.A., 1987. Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 791-796.
- Wilderer, P.A., Roske, I., Ueberschar, A., Davids, L., 1993. Continuous flow and sequencing batch operation of biofilm reactors: a comparative study of shock loadings responses. *Biofouling* 6, 295-304.
- Woolard, C.R., 1997. The advantages of periodically operated biofilm reactors for the treatment of highly variable waste water. *Water Sci. Technol.* 35, 199-206.
- Yoong, E.T., Lana, P.A., Greenfield, P.F., 2000. In situ respirometry in an SBR treating wastewater with high phenol concentration. *Water Res.* 34 (1), 239-245.

APÉNDICE VI

Combination of photo-Fenton and biological SBBR processes for Sulfamethoxazole remediation

El artículo ha sido publicado en *Water Science & Technology*, vol. 58 (2008), pp. 1707-1713.

Combination of photo-Fenton and biological SBBR processes for sulfamethoxazole remediation

O. González, M. Esplugas, C. Sans and S. Esplugas

ABSTRACT

A combined strategy of a photo-Fenton pretreatment followed by a Sequencing Batch Biofilm Reactor (SBBR) was evaluated for total C and N removal from a synthetic wastewater containing 200 mg L⁻¹ of the antibiotic Sulfamethoxazole (SMX). Photo-Fenton reaction was performed with two different H₂O₂ concentrations (300 and 400 mg L⁻¹) and 10 mg L⁻¹ of Fe²⁺. The pre-treated effluents with the antibiotic intermediates as sole carbon source, together with a nutrients solution, were used as feed for the biological reactor. The SBBR was operated under aerobic conditions to mineralize the organic carbon and the hydraulic retention time (HRT) was optimized down to 8 hours. Then, an anoxic denitrification stage of 24 hours of HRT was added right after the aerobic stage of the same duration in order to remove the NO₃⁻ generated along the chemical–biological treatment. TOC, COD and SMX concentrations together with O₂ uptake rate (OUR) profiles were monitored in purpose of assessing the performance of the system. NO₃⁻, NH₄⁺ and total N concentrations were analyzed to find out the fate of N contained in the initial SMX molecule. A start up strategy resulted in the correct formation of a biofilm over the volcanic support. The total TOC removals achieved with the combination of the chemical and the biological processes were 75.7 and 87.7% for the low and the high H₂O₂ concentration pretreatments respectively. Practically all N present in the SMX solution was eliminated in the SBBR when the aerobic–anoxic strategy was used.

Key words | antibiotic, biodegradation, denitrification, photo-fenton, SBBR

O. González
M. Esplugas
C. Sans
S. Esplugas
Chemical Engineering Department,
Faculty of Chemistry,
University of Barcelona,
Martí i Franquès 1,
08028 Barcelona,
Spain
E-mail: ogonzalez@angel.qui.ub.es

INTRODUCTION

Nowadays, large amounts of water are polluted due to industrial activity and domestic use, especially in developed countries. Restoring wastewater quality is essential to avoid further pollution of the environment, as well as reusing waters in order to decrease fresh water consumption. Reflecting the recent environmental awareness, European Directive 2000/60/CE (2000) pointed out the necessity for the progressive reduction of pollution in water effluents.

A large number of emerging contaminants are not currently covered by existing regulations on water quality or have not been previously studied. These contaminants may be candidates for future regulation, depending on research based on their toxicity and potential effects in the

environment and on human health. Since these substances are biologically active and they have limited biodegradability, their entry into the aquatic environment can involve serious risks for human beings. Several groups of compounds have been considered as particularly remarkable, e.g., algal and cyanobacterial toxins, hormones and other endocrine-disrupting compounds, surfactants, perfluorinated compounds, pharmaceuticals or personal-care products, and their metabolites or transformation products.

Pharmaceuticals are used in large quantities in human and veterinary medicine for treating different diseases. Therefore, the presence of drugs in the aquatic media has emerged during the last decade as a new environmental

risk. Most of these compounds come either from domestic sewage, hospital or industrial discharges and enter Sewage Treatment Plants (STPs). Their adverse potential effects have become of increasing concern (Christensen 1998). Among pharmaceuticals, antibiotics are of particular worry because they can induce bacterial resistance through continuous exposure. Moreover, some data indicate that these compounds are not efficiently eliminated during water treatment (Hernández *et al.* 2007), so, depending on the mobility and the persistence of antimicrobials and metabolites in the soil–water environment, they may threaten surface waters and groundwaters. Due to the growing interest in the occurrence of antibiotics in the aquatic environment and their potential impacts on the environment, Sulfamethoxazole has been chosen for this study. Although it was once a very useful antibiotic, nowadays is almost obsolete as a single agent due to the development of bacterial resistance to its effects. SMX is now used primarily in combination with trimethoprim, and is commonly used to treat urinary tract infections. Despite the fact that the SMX concentration in the influent is in the range of ng L^{-1} , it seems to be only partially removed at STPs (Carballa *et al.* 2004; Bendz *et al.* 2005), reaching, this way, the environment.

One possible strategy to reduce the dispersion of these contaminants into the environment could be to destroy them completely where they are generated and where they can be treated at higher concentrations. The Photo-Fenton Advanced Oxidation Technology (AOT) has proved to be a successful tool to oxidize this antibiotic as observed in a previous work (González *et al.* 2007). Photo-Fenton costs (Bressan *et al.* 2004; Da Hora Machado *et al.* 2005) for total oxidation of hazardous organic compounds remain high compared to biological treatment ones. However, their use as a pretreatment for biodegradability enhancement of wastewater containing recalcitrant compounds can be justified if the intermediates resulting from the reaction are more biodegradable than the parent compounds and can therefore be quickly degraded by biological treatment (Sarria *et al.* 2002; Lapertot *et al.* 2007). Thus, photochemical pretreatment can be shortened when combined with biological oxidation.

With this particular purpose, in this work photo-Fenton process has been used as pretreatment to increase the

biodegradability and to reduce the toxicity of a solution containing 200 mg L^{-1} of SMX, whereas a subsequent biological aerobic–anoxic step in a SBBR has been carried out in order to complete the TOC removal and to eliminate the elevated inorganic N generated as NH_4^+ and NO_3^- during the antibiotic oxidation.

ANALYTICAL METHODS, EXPERIMENTAL DEVICES AND PROCEDURES

Analytical methods

The samples withdrawn from the SBBR were filtrated using $0.45 \mu\text{m}$ polyethersulfone filters (Millex-HP $0.45 \mu\text{m}$ PES) and acidified.

TOC was measured by means of a Shimadzu TOC-VCSN TOC analyzer. The concentration of the antibiotic was quantified by means of a HPLC supplied by Waters Corporation (configuration described elsewhere (Bacardit *et al.* 2006); wavelength used: 270.5 nm). To analyze the COD, the *Standard Method* (1985) 5220D procedures were followed. Regarding to N measurements, a persulfate digestion method (Hach Test'N Tube™ Vials; method 10072) was used to measure the total N present in the resultant photo-Fenton effluents and both, NH_3 and NO_3^- concentrations were analyzed using electrodes (Symphony, VWR) according to the procedures provided by the manufacturer.

A Dissolved O_2 (DO) probe (Symphony, VWR) was used to follow this parameter in the SBBR. Finally, Total Volatile Suspended Solids (TVSS) were determined according to the *Standard Method* (1985) 2540E.

Photochemical reaction

A wide description of the photo-Fenton reactor as well as the manner to run the experiments and analyze the resultant solutions is reported in (González *et al.* 2007). A 200 mg L^{-1} SMX (Sigma, >99%) aqueous solution ($\text{TOC} = 94.5 \text{ mg CL}^{-1}$ and $\text{COD} = 290 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) was oxidized by means of this technology. Resultant photo-Fenton effluents from different reaction conditions were subjected to diverse biological tests as BOD_5 , Microtox®

and Inhibition Test, to select the most convenient pretreatment (González *et al.* 2007). As a result, two different settings in the photo-Fenton reaction were chosen to assess the combination with the biological step. In both cases, the initial pH, the temperature and the initial Fe^{2+} concentration were fixed at 2.8, 25°C and 10 mgL⁻¹ respectively whereas the two H_2O_2 concentrations selected were 300 and 400 mgL⁻¹.

Once the reaction was completed, the effluent was kept refrigerated.

Biological SBBR reactor

The immobilized biomass (biofilm) over the solid support (volcanic stones) in the SBBR allowed the suppression of the settling stage, the main difference between a SBBR and a standard Sequencing Batch Reactor (SBR). The reactor was a 2.5 L jacketed vessel. The temperature was fixed using a thermostatic bath (Haake DC10-K10). The capacity of the device was 2.62 L (including pipes and reservoirs) whereas the volcanic stones occupied 0.87 L. Eighty-eight percent of the liquid was replaced in each cycle change. A scheme

of this device can be observed in Figure 1. The liquid was recirculated from the bottom to the top of the reactor by means of a peristaltic pump (Cole-Parmer) at a flow rate of 4.5 mL s⁻¹. The same model of pump was used to empty the reactor and a small centrifuge pump (Rena Flow 600) filled the SBBR from the top. One and a half L min⁻¹ of air were supplied through a ceramic diffuser placed under the volcanic stones. For this purpose, a small air compressor (Rena Air 200) was used. The same air line was equipped with an electrovalve to avoid liquid return when air was stopped (when O₂ consumption was being measured) and with a humidifier to avoid water dragging. Loading, draw-off, aeration and recirculation were controlled by a time-based control system (Siemens LOGO! 230 RC).

An electrode on the top and a probe in a small reservoir on the bottom of the reactor allowed following the pH and the DO respectively. Both were connected to a multi-parametric meter (VWR Symphony SB90M5). Data was collected in a computer. Aerobic sludge (TVSS = 2,000 mg L⁻¹) taken from a WWTP located in Barcelona (Spain) was used as inoculum. The pH and the temperature were kept around 7 and 25°C respectively.

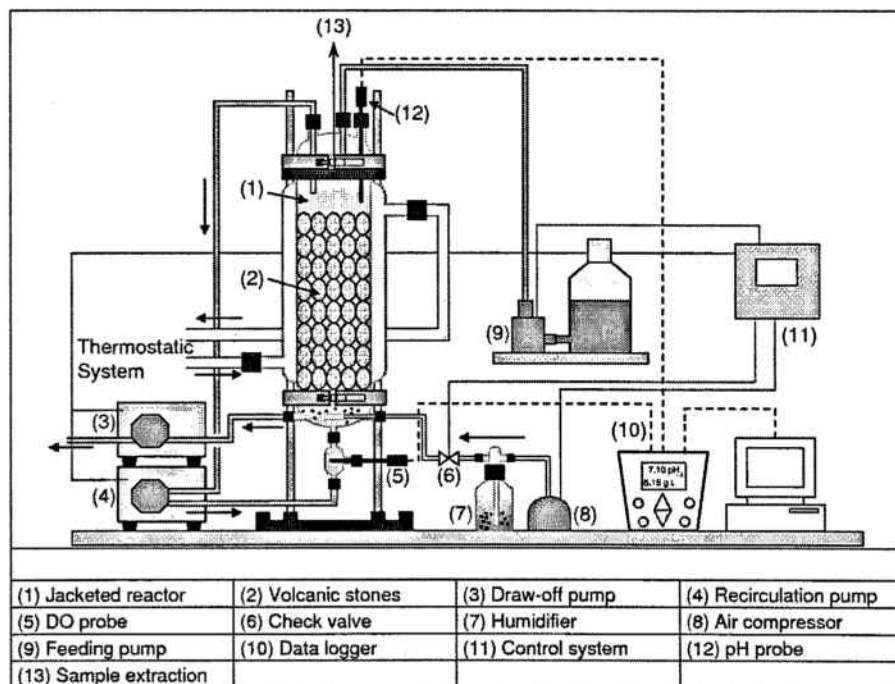


Figure 1 | SBBR scheme.

Since SMX solutions for photo-Fenton experiments were prepared using deionized water and adjusted at low pH, neutralization and addition of nutrients, trace elements and buffer were needed before feeding the reactor. Directions from the respirometric *Standard Method* (1985) 5210 D were followed for this purpose. Initially, the solution was left to reach room temperature, the pH was increased up to 7 with NaOH and buffered with 6 mL L⁻¹ of NaH₂PO₄ solution 1.5N. After that, 2 mL L⁻¹ of each of the next solutions were added: CaCl₂ 0.25N, MgSO₄ 0.41N, and trace element solution (consisted of traces of MnSO₄, H₃BO₃, ZnSO₄, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ and FeCl₃-EDTA). The addition of NH₄Cl and FeCl₃ was suppressed because they were already present in the photo-Fenton effluent.

The withdrawn samples were filtrated using 0.45 μm PES filters and acidified in order to monitor TOC, COD, TVSS and the concentrations of SMX, NO₃⁻ and NH₄⁺. DO was monitored in all cycles. Air supply was shortly interrupted in order to calculate OURs with the slope of the DO decay between 6.5 and 2.5 mg O₂ L⁻¹ (Yoong *et al.* 2000). These OURs are representative of the biomass activity and their interpretation allows deciding when cycles are stable and which HRT should be assessed next.

Pretreatment A effluent

Initially, the SBBR was charged with Pretreatment A effluent. The start-up of the SBBR was carried out along 27 days with the objective of forming the biofilm. The initial TVSS concentration inoculated was 1,000 mg L⁻¹. When the biofilm was considered formed, sets of aerobic cycles with different HRTs were carried out. HRTs were shortened from 168 down to 8 hr increasing, thereby, the Organic Load Rate (OLR) from 9.7 to 204 mg C L⁻¹ day⁻¹. Cycles were repeated without changing the HRT until they were completely stabilized.

Pretreatment B effluent

Aiming to decrease the final TOC value for the SBBR effluent, 24 hr cycles were carried out feeding the reactor with Pretreatment B effluent.

Finally, an anoxic stage of 24 hr has been introduced to assess the denitrification process. Thus, SBBR was operated

24 hours under aerobic conditions and 24 hours under anoxic conditions (DO = 1 mg O₂ L⁻¹). For this purpose methanol was added as C source to biologically remove the nitrate. A ratio of 2.5 CH₄OH/1 NO₃⁻ - N (w/w) was used according to Metcalf & Eddy (1991).

RESULTS AND DISCUSSION

Photochemical reaction

The obtained results for the two photo-Fenton pretreatments studied, with two different H₂O₂ concentrations (pretreatment A: 300 and pretreatment B: 400 mg L⁻¹) are summarized next. The antibiotic was almost completely removed (2 and 0.24 mg L⁻¹ remained in the effluent for pretreatments A and B), and the TOC abatement achieved at the end of the reactions was 30.3 and 53.2% of the initial value, for pretreatments A and B, respectively. Total N present in the effluents fits with the one in the initial SMX solution. NO₃⁻ concentration was negligible in both cases whereas NH₄⁺ concentration was 8.91 and 10.42 mg N L⁻¹ for pretreatments A and B respectively. The oxidized intermediates became non toxic and non inhibitor on sewage sludge, and a final BOD₅/COD ratio of 0.18 for pretreatment A and 0.26 for pretreatment B were obtained. The complete results are presented and discussed elsewhere (Da Hora Machado *et al.* 2005).

Biological SBBR reactor

Pretreatment A effluent

Initially the SBBR was fed with Pretreatment A effluent. At the end of the start-up stage, TOC and TVSS were stabilized around 30 mg L⁻¹ and 5 mg L⁻¹ respectively. The low TVSS value and the good operation of the SBBR pointed to a correct creation of the biofilm. From this point on, sets of aerobic cycles with different hydraulic retention time (HRT) were performed.

Practically same TOC removals were achieved for the different HRTs used, although the SBBR reactor seemed to be more stable when working with HRT down to 24 hr. A minor destabilization in antibiotic and TOC eliminations started with cycles of shorter HRT (8 hr), since only a few

cycles were operated due to difficulties in system maintenance. An improvement in the final TOC removal due to the acclimation of bacteria was only observed during the initial cycles, when working in 7-day cycles. From this moment on, the TOC eliminations obtained were the same during the time that the SBBR was working (more than 3 months). The refractory organic fraction remaining in the final effluent after chemical–biological treatment ranged between 20 and 25 mgCL⁻¹ and the average TOC elimination in the SBBR was 66.1%.

Figure 2 shows how the TOC removal rate increased when the HRT went down. However, same final TOC removals were achieved for the different HRT. Respecting to the COD elimination, the same final COD removals were also obtained for all the HRTs. The average COD removal in the SBBR was 57.2%. A steady cycle of each set of cycles with a particular HRT was selected for this illustration. The same criterion was followed for Figure 3.

On the other hand, in spite of optimal TOC degradation at shorter HRT cycles, a minimum HRT of 48 hours was needed for the total SMX removal. Approximately, 0.25 mg L⁻¹ of SMX remained in the reactor effluent for 8 and 24 HRT cycles. However, a significant SMX accumulation was not observed along the reactor operation time.

Since NH₄⁺ and N containing organic compounds were present in the Pretreatment A effluent, both NH₄⁺ and NO₃⁻ concentrations were followed along the biological cycles.

Ninety six percent of NH₄⁺ was removed in the SBBR from the start-up on regardless of the HRT. No improvement due to bacteria acclimation was observed for the NH₄⁺

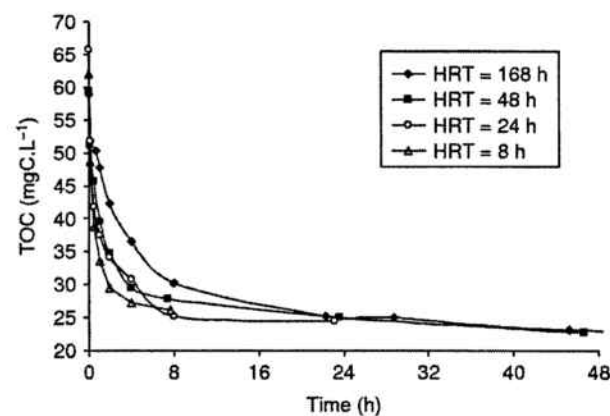


Figure 2 | TOC elimination curves in the SBBR at different HRTs.

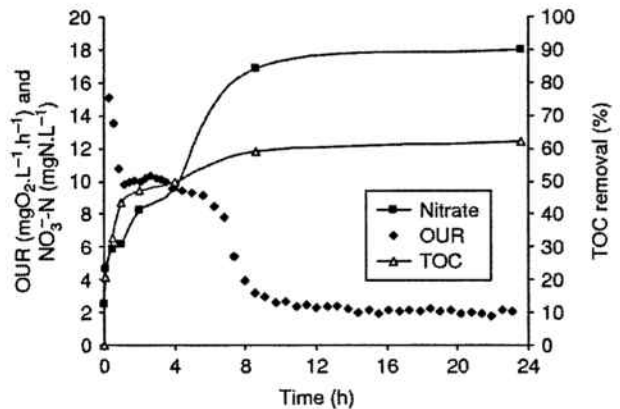


Figure 3 | OUR, NO₃⁻ and TOC removal monitoring for a 24-hour cycle in the SBBR.

removal along the whole strategy. There was a clear gap between the amount of NO₃⁻ appearing and the one of NH₄⁺ disappearing in the SBBR. Only 50.4% of the total NO₃⁻ appearing came from the nitrification of the initial NH₄⁺. This would indicate that the remaining 49.6% came from the biological degradation of N containing organic compounds.

As example and summary of the analysis completed for every cycle, Figure 3 presents the TOC removal, OUR and NO₃⁻ monitoring for a steady 24-hour cycle. There were 3 clearly differentiated zones of O₂ consumption. At the beginning of the cycle the O₂ consumption was higher due to the rapid oxidation of both, C and N. Then, the OURs reached a plateau because the still elevated nitrification rate offset the decrease in the TOC removal one. Afterwards, the O₂ consumption dropped since there were not further C and N capable of being oxidized, to finally reach the stage of endogenous respiration.

Pretreatment B effluent

Initial concentration of H₂O₂ was increased in the pretreatment in order to reduce the final TOC and the amount of N containing organic compounds at the end of the biological treatment. Improvements in final TOC and COD removals were achieved increasing the dose of H₂O₂ in the pretreatment up to 400 mg L⁻¹ before filling the SBBR. TOC removal increased from 66.1 to 73.6% and COD removal augmented from 57.2 to 78.8%. It is important to point out that final TOC in the SBBR reactor

effluent feed with Pretreatment B was about 10 mgC L^{-1} , which can be considered the average residual TOC in biological reactors. It can be concluded that the feasibility of the organic matter present in the photo-Fenton effluents to be biodegraded was improved when the pre-oxidation degree was higher.

To complete the comparison concerning C degradation, the total TOC elimination obtained for the two chemical-biological processes is commented next. The augment in H_2O_2 dose resulted in an increase of total TOC removal from 75.7% for the strategy with pretreatment A to 87.7% for pretreatment B. On the other hand, the chemical TOC mineralization obtained exclusively with photo-Fenton treatment needed 750 mgL^{-1} of H_2O_2 to obtain similar overall TOC removal as combined chemical-biological strategy with pretreatment A, that is more than the double quantity of chemical oxidant.

Attending N removal, all the NH_4^+ was eliminated in the SBBR and 88.5% of initial SMX nitrogen was converted to NO_3^- . However, an important gap between the NO_3^- concentration in the SBBR effluent after the aerobic stage and the NH_4^+ concentration in the Pretreatment B effluent was also observed in this case. Only 36.4% of the formed NO_3^- came from the NH_4^+ present in the photo-Fenton effluent. Consequently, the remaining 63.6% seems to come from the degradation of N-containing organic compounds.

Finally, an anoxic stage was performed after the aerobic one aiming to denitrify all the NO_3^- formed. Air supply was stopped right after 24 hours of aeration and 80 mgL^{-1} of methanol were added as readily biodegradable carbon source. The NO_3^- was completely removed at the end of the 24-hour anoxic stage from the first tested cycle.

CONCLUSIONS

From the results of this work, it can be concluded that the combination of photo-Fenton and biological SBBR is a successful strategy for the treatment of wastewaters containing an emerging biorecalcitrant contaminant like the antibiotic sulfamethoxazole. The combination was effective for the elimination of both dissolved C and N, since the photo-Fenton reaction allowed to increase the biodegradability of the initial sulfamethoxazole solution.

Experimental data revealed that a photo-Fenton pretreatment with 300 mgL^{-1} of H_2O_2 combined with 8 hours of biological treatment in the SBBR allowed to remove a 75.7% of initial TOC. However, an increase of H_2O_2 concentration up to 400 mgL^{-1} was necessary to the complete elimination of the antibiotic and to obtain the total removal of the organic C with the combined chemical-biological system. Finally, the inclusion of an anoxic stage in the SBBR strategy succeeded and allowed to denitrify all the NO_3^- generated during the oxidation of sulfamethoxazole.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to the Spanish Ministry of Education and Culture (CICYT Project CTQ2005-00446/PPQ) and to DURSI (Department of Universities, Research and Information Society, Generalitat de Catalunya) for funds received to carry out this research.

REFERENCES

- Bacardit, J., Hultgren, A., García-Molina, V. & Espulgas, S. 2006 Biodegradability enhancement of wastewater containing 4-chlorophenol by means of photo-fenton. *J. Adv. Oxid. Technol.* **9**, 27–34.
- Bendz, D., Paxéus, N. A., Ginn, T. R. & Loge, F. J. 2005 Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje river in Sweden. *J. Hazard. Mater.* **122**, 195–204.
- Bressan, M., Liberatorre, L., D'Alessandro, N., Tonucci, L., Belli, C. & Ranalli, G. 2004 Improved combined chemical and biological treatments of olive oil mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1228–1233.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llopart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M. & Ternes, T. 2004 Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* **38**, 2918–2926.
- Christensen, F. M. 1998 Pharmaceuticals in the environment—a human risk? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **28**(3), 212–221.
- Da Hora Machado, A. E., Xavier, T. P., de Souza, D. R., de Miranda, J. A., Mendonsa-Duarte, E. T. F., Ruggiero, R., de Oliveira, L. & Sattler, C. 2005 Solar photo-Fenton treatment of chip board production waste water. *Solar Energy* **77**, 583–589.
- EC Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of October 23, 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy (L 327 of 22-12-2000).
- González, O., Sans, C. & Espulgas, S. 2007 Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton. Toxicity, inhibition and

- biodegradability assessment of intermediates. *J. Hazard. Mater.* **146**, 459–464.
- Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M. & Guerrero, C. 2007 Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends Anal. Chem.* **26**(6), 466–485.
- Lapertot, M., Ebrahimi, S., Dazio, S., Rubinelli, A. & Pulgarin, C. 2007 Photo-fenton and biological integrated process for degradation of a mixture of pesticides. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **186**, 34–40.
- Metcalf & Eddy 1991 *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal, and Reuse*, 3rd edition. McGraw-Hill Inc., New York.
- Sarria, V., Parra, S., Adler, N. & Péringer, P. 2002 Recent developments in the coupling of photoassisted and aerobic biological processes for the treatment of biorecalcitrant compounds. *Catal. Today* **76**, 301–315.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1985 16th edition. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, Washington DC, USA.
- Yoong, E. T., Lana, P. A. & Greenfield, P. F. 2000 In situ respirometry in an SBR treating wastewater with high phenol concentration. *Water Res.* **34**(1), 239–245.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Vol. I (2004-2007) John Wiley & Sons, New York.
- [2] www.farmaindustria.es. La industria farmacéutica en cifras (2004). Consulted: October, 2007.
- [3] Palomino J. and Pachón J. (2003) Aminoglucósidos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21, 105-115.
- [4] www.elmedicointeractivo.com. Nuevos tratamientos antibióticos en atención primaria. Consulted: March, 2008.
- [5] Escolar M., Azanza J.R., Sádaba B. and Honorato J. (1998) Tetraciclinas, cloranfenicol y fosfomicina. *Med.* 7(76), 3524-3532.
- [6] Sádaba B., Azanza J.R., García E. and Honorato J. (1998) Glucopéptidos: vancomicina y teicoplanina. *Med.* 7(72), 3329-3336.
- [7] Yu V.L. (1997) Macrolides are ideal for empiric therapy of community acquires pneumonia in the immunocompetent host. *Semin. Respir. Infect.* 12(4), 322-328.
- [8] Ernst M.E., Ernst E.J. and Klepser M.E. (1998) Levofloxacin and trovafloxacin: the next generation of fluorquinolones?. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 54(22), 2569-2584.
- [9] Martin S.J., Meyer J.M., Chuck S.K., Jung R. and Messick C.R. (1998) Levofloxacin and sparfloxacin: new quinolone antibiotics. *Ann. Pharmacother.* 32(3), 320-336.
- [10] Azanza J.R., Sádaba B. and Mediavilla A. (2000) Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprima. Cotrimoxazol. Nitrofurantoina. In: Flores J., Armijo J.A., Mediavilla A. (eds.) *Farmacología humana*. Masson, Barcelona.
- [11] Rodríguez M.A., Gundián J., Barreto J., Lim N., Areu A. and Pardo A. (1998) Tetraciclinas. *Acta Medica* 8(1), 75-79.
- [12] Corres C., Hermosilla L. and Abecia L. (2001) Minimized analysis of costs applied to antimicrobial consumption in a rural area. *Pharmacoepidemiol. Drug. Saf.* 10(2), 27143-27148.
- [13] Nieto A., Borrull F., Marcé R.M. and Pocurull E.J. (2007) Selective extraction of sulfonamides, macrolides and other pharmaceuticals from sewage sludge by pressurized liquid extraction. *J. Chromatogr., A* 1174(1-2), 125-131.
- [14] Thomson P.D.R. (1995) *Drug Information for the Health Care Professional*. Vol I. USP DI, Maryland.
- [15] *European Pharmacopoeia 5th Edition, Vol. II.* (2005) Council of Europe (COE) – European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg.
- [16] Nalini D., Tiwari R.K. and Singh T.P. (1980) Crystallization and x-ray crystal data of sulfonamides. *J. Sci. Res.* 2(2), 137-139.
- [17] ACD/Labs; Calculated using Advanced Chemistry Development Software V8.14 for Solaris (© 1994-2006 ACD/Labs).
- [18] www.toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB. Hazardous Substances Databank (HSDB), National Library of Medicine, Specialized Information Services.

-
- [19] González O., Sans C. and Esplugas S. (2007) Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton. Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates. *J. Haz. Mat.* 146, 459-464.
- [20] Ferrari B., Mons R., Vollat B., Frayse B., Paxeus N., Lo Giudice R., Pollio A. and Barric J. (2004) Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ. Toxicol. Chem.* 23(5), 1344-1354.
- [21] Quinn B., Gagné F. and Blaise C. (2008) An investigation into acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci. Total Environ.* 389(2-3), 306-314.
- [22] Christensen, F.M. (1998). Pharmaceuticals in the Environment – A Human Risk?. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 28, 212-221.
- [23] Dietrich D.R., Webb S.F. and Petry, T. (2002) Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment. *Toxicol. Lett.* 131, 1-3.
- [24] Halling-Sørensen B, Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingersley F., Lützhøft H.C.H. and Jørgensen S.E. (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review, *Chemosphere* 36, 357-393.
- [25] Kümmerer K. (2001) Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere* 45, 957-969.
- [26] Hirsch R., Ternes Th.A., Haberer K., Mehlich A., Ballwanz F. and Kratz K-L. (1998) Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 815 ,213-223.
- [27] Ternes Th.A. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32(11), 3245-3260.
- [28] Stumpf M., Ternes Th.A., Wilken R-D., Rodrigues S.V. and Baumann W. (1999) Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.* 225, 135-141.
- [29] Balcioglu I.A. and Ötker M. (2003) Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes. *Chemosphere* 50, 85-95.
- [30] Díaz-Cruz M.S., López de Alda M.J. and Barceló D. (2003) Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 22(6), 340-351.
- [31] Flippin J.L., Huggett D. and Foran C.M. (2007) Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 81(1), 73-78.
- [32] Stuer-Lauridsen F., Birkved M., Hansen L.P., Lützhøft H.C.H. and Halling-Sorensen B. (2000) Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere* 40(7), 783-793.
- [33] Pomati F., Castiglioni S., Zuccato E., Fanelli R., Vigetti D., Rossetti C., Calamari D. (2006) Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells. *Environ. Sci. Technol.* 40(7), 2442-2447.
- [34] Lindsey M.E., Meyer M. and Thurman E.M. (2001) Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 73(19), 4640-4646.
- [35] Costanzo S.D., Murby J. and Bates J. (2005) Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment, *Mar. Pollut. Bull.* 51, 218-223.

-
- [36] Kim S., Jensen J.N., Aga D.S. and Weber A.S. (2007) Tetracycline as a selector for resistant bacteria in activated sludge. *Chemosphere* 66, 1643-1651.
- [37] Cooper E.R., Siewicki T.C. and Phillips K. (2008) Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Sci. Total Environ.* 398, 26-33.
- [38] Kanda R., Griffin P., James H.A. and Fothergill J. (2003) Pharmaceuticals and personal care products in sewage treatment works. *J. Environ. Monit.* 5, 823-830.
- [39] Fahlenkamp H., Hannich C.B., Möhle E., Nöthe T. And Ries T. (2004) Input and removal of hazardous substances in municipal sewage treatment plants. *Chemie Ingenieur Technik* 76(8), 1179-1189.
- [40] Johnson A.C., Aerni H.R., Gerritsen A., Gibert M., Giger W., Hylland K., Jürgens M., Nakari T., Pickering A., Suter J.J.F., Svenson A. and Wettstein F.E. (2005) Comparing steroid estrogen and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Res.* 39, 47-58.
- [41] Boyd G.R., Reemtsma H., Grimm D.A. and Mitra S. (2003) Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.* 311, 863-870.
- [42] Drewes J.E., Heberer T., Rauch T. and Reddersen K. (2003) Fate of pharmaceuticals during ground water recharge. *Ground Water Monit. Remediat.* 23, 64-72.
- [43] Radka A., Kumpel T. and Kümmerer K. (2004) Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test. *Chemosphere* 57, 505-512.
- [44] Al-Ahmad A., Daschner F.D. and Kummerer K. (1999) Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37(2), 158-163.
- [45] Richardson M.L. and Bowron J.M. (1985) The fate of pharmaceutical chemicals in the environment. *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 1-12.
- [46] Zuccato E. (2001) Environmental loads and detection of Pharmaceuticals in Italy. *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, fate effects and risks.* Springer, Berlin.
- [47] Lam M.W., Young C., Brain R., Johnson D., Hanson M., Wilson C., Richards S., Solomon K. and Mabury S. (2004) Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(6), 1431-1440.
- [48] Hirsch R., Ternes T., Haberer D. and Kratz K-L. (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 225(1-2), 109-118.
- [49] Klavarioti M., Mantzavinos D. and Kassinos D. (2009) Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environ. Int.* 35(2), 402-417.
- [50] Zheng N., Li Y-Z. and Wen M-J. (2004) Sulfamethoxazole-imprinted polymer for selective determination of sulfamethoxazole in tablets. *J. Chromatogr.*, 1033(1), 179-182.
- [51] Hartig C., Storm T. and Jekel M. (1999) Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 854, 163-173
- [52] Verzegnassi L., Savoy-Perroud M-C. and Stadler R.H. (2002) Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. *J. Chromatogr. A* 977, 77-87.

[53] Heberer T. (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5-17.

[54] Jen J-F., Lee H-L. and Lee B-N. (1998) Treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch reactor (SBR) with an aerobic suspended growth configuration. *J. Chromatogr., A* 793(2), 378-382.

[55] Chang H., Hu J., Asami M., Kunikane S. (2008) Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1190(1-2), 390-393.

[56] Lissmore L., Hao C., Yang P., Sibley P.K., Mabury S. and Solomon D.R. (2006) An exposure assessment for selected pharmaceuticals within a watershed in Southern Ontario. *Chemosphere* 64, 717-729.

[57] Andreozzi R., Marotta R., Nicklas P. (2003) Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319-1330.

[58] Bendz D., Paxeus N.A., Ginn T.R. and Loge F.J. (2005) Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 122, 195-204.

[59] Gänge, F., Blaise C., Fournier M. and Hansen P.D. (2006) Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 143, 179-186.

[60] Kinney C.A., Furlong E.T., Werner S.L. and Cahill J.D. (2006) Presence and distribution of wastewater-derived pharmaceuticals in soil irrigated with reclaimed water. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(2), 317-326.

[61] Kolpin D.W., Skopec M., Meyer M.T., Furlong E.T. and Zuagga S.D. (2004) Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Sci. Total Environ.* 328, 119-130.

[62] Zuccato E., Castiglioni S. and Fanelli R. (2005) Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 122, 205-209.

[63] Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llombart M., García-Jares C., Rodríguez I., Gómez M. and Ternes Th.A. (2004) Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 38, 2918–2926.

[64] Karthikeyan K.G. and Meyer M.T. (2006) Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Sci. Total Environ.* 361, 196-207.

[65] Göbel A., Thomsen A., McArdell C.S., Joss A. and Giger W. (2005) Occurrence and Sorption Behavior of Sulfonamides, Macrolides, and Trimethoprim in Activated Sludge Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 39(11), 3981-3989.

[66] Brown K.D., Kulis J., Thomson B., Chapman T.H. and Mawhinney D.B. (2006) Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater and the Rio Grande in New Mexico. *Sci. Total Environ.* 366, 772-783.

[67] Gobel A., McArdell C.S., Suter M.J.F. and Giger W. (2004) Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 76(16), 4756-4764.

[68] Carballa M., Omil F. and Lema J.M. (2008) Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage. *Chemosphere*, 72, 1118-1123.

[69] Zwiener C., Gremm T.J. and Frimmel F.H. (2001) Pharmaceutical residues in the aquatic environment and their significance for drinking water production. In: Kümmerer K. (ed.) *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks*. Springer, Berlin.

[70] Chen M., Ohman K., Metcalfe C., Ikonomou M.G., Amatya P.L. and Wilson J. (2006) Pharmaceuticals and endocrine disruptors in wastewater treatment effluents and in the water supply system of Calgary, Alberta, Canada. *Water Qual. Res. J. Can.* 41(2), 351-364.

[71] Lindberg R., Jarnheimer P-A., Olsen B., Johansson M. (2004) Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere* 57(10), 1479-1488.

[72] Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B. and Buxton H.T. (2002) Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202-1211.

[73] Gagne F., Blaise C. and Andre C. (2006) Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 329-336.

[74] www.epa.gov/ppcp/pdf/drawing.pdf. Origins and Fate of PPCPs in the Environment. Consulted: February, 2008.

[75] Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llompart M., García C., Rodríguez I., Gómez M. and Ternes Th.A. (2005) Behaviour of pharmaceuticals and personal care products in a sewage treatment plant of northwest Spain. *Water. Sci. Technol.* 52, 29-35.

[76] Ternes Th.A., Herrmann N., Bonerz M., Knacker T., Siegrist H. and Joss A. (2004) A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res.* 38, 4075-4084.

[77] Khan S.J. and Ongerth J.E. (2002) Estimation of pharmaceutical residues in primary and secondary sewage sludge based on quantities of use and fugacity modeling. *Water Sci. Technol.* 46 (3), 105-113.

[78] Kupper T., Berset J.D., Etter-Holzer R., Furrer R. and Tarradellas J. (2004) Concentrations and specific loads of polycyclic musks in sewerage sludge originating from a monitoring network in Switzerland. *Chemosphere* 54, 1111-1120.

[79] Kinney C.A., Furlong E.T., Zaugg S.D., Burkhardt M.R., Werner S.L., Cahill J.D. and Jorgensen G.R. (2006) Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. *Environ. Sci. Technol.* 40(23), 7207-7215.

[80] Carballa M., Omil F. and Lema J.M. (2007) Calculation methods to perform mass balances of micropollutants in sewage treatment plants. Application to Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs). *Environ. Sci. Technol.* 41, 884-890.

[81] Joss A., Keller E., Alder A.C., Göbel A., Mc Ardell C.S., Ternes Th.A. and Siegrist H. (2005) Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Res.* 39, 3139-3152.

[82] Joss A., Zabczynski S., Göbel A., Hoffmann B., Löffler D., Mc Ardell C.S., Ternes Th.A., Thomsen A. and Siegrist H. (2006) Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Res.* 40, 1686-1696.

- [83] Göbel A., Thomsen A., McArdeall C.S., Alder A.C., Giger W., Theiß N., Löffler D. and Ternes Th.A. (2005) Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge. *J. Chromatogr. A*, 1085, 179-189.
- [84] Carballa M., Manterola G., Larrea L., Ternes Th.A., Omil F. and Lema J.M. (2007) Influence of ozone pre-treatment on sludge anaerobic digestion: Removal of pharmaceutical and personal care products. *Chemosphere* 67, 1444-1452.
- [85] Carballa M., Omil F., Ternes Th.A. and Lema J.M. (2007) Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Res.* 41, 2139-2150.
- [86] Andreozzi R., Caprio V., Insola A. and Marotta R. (1999) Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catal. Today* 53(1), 51-59.
- [87] Glaze W.H., Kang J.W. and Chapin D.H. (1987) The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone: Sci. Eng.* 9(4), 335-352.
- [88] Gottschalk C., Libra J.A. and Saupe A. (2000) *Ozonation of Water and Waste Water: A Practical Guide to Understanding Ozone and its Application*. Wiley-VCH, Weinheim.
- [89] Vogelpohl A. and Kim S. (2004) Advanced Oxidation Process (AOPs) in wastewater treatment. *J. Ind. Chem.* 10(1), 33-40.
- [90] Méndez-Arriaga F. (2009). *Advanced Oxidation Processes (Photocatalysis, photo-Fenton and Sonolysis) for removal of pharmaceutical pollutants in water*. Doctoral Thesis, University of Barcelona. Barcelona.
- [91] Vicker N., Xiangdong S., Ganeshapillai Hh., Purohit A., Reed J.M. and Potter B.V.Ll. (2005) Phenyl Carboxamide and Sulfonamide derivatives for use as 11-Beta-Hydroxysteroiddehydrogenase. International Publication Number: WO 2005/042513 A1.
- [92] Hancock F.E. (1999) Catalytic strategies for industrial water re-use. *Catal. Today* 53(1), 3-9.
- [93] García-Molina V. (2006) *Wet Oxidation Processes for Water Pollution Remediation*. Doctoral Thesis, University of Barcelona. Barcelona (www.tesisenxarxa.net/TDX-0804106-110239/index.html).
- [94] Huber M.M., Canonica S., Park G., Von Gunten U. (2003) Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. *Environ. Sci. Technol.* 37(5), 1016-1024.
- [95] Baran W., Sochacka J. and Wardas W. (2006) Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions. *Chemosphere* 65, 1295-1299.
- [96] Abellán M.N., Bayarri B., Giménez J. and Costa J. (2007) Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous suspension of TiO₂. *Appl. Catal., B* 74, 233-241.
- [97] González O., Sans C. and Esplugas S. (2007) Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton. Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates. *J. Hazard. Mater.* 146, 459-464.
- [98] Dantas R.F., Contreras S., Sans C. and Esplugas S. (2008) Sulfamethoxazole abatement by means of ozonation. *J. Hazard. Mater.* 150, 790-794.
- [99] Trovó A.G., Nogueira R.F.P., Agüera A., Fernandez-Alba A.R., Sirtori C. and Malato S. Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-fenton. Chemical and toxicological evaluation. *Water Res.* In Press. DOI: 10.1016/j.watres.2009.04.006
- [100] Andreozzi R., Campanella L., Frayse B., Garric J., Gonnella A., Lo Giudice R., Marotta R., Pinto G. and Pollio A. (2004) Effects of advanced oxidation processes (AOPs) on the toxicity of a mixture of pharmaceuticals. *Water Sci. Technol.* 50, 23-28.

- [101] Sharma V.K., Mishra S.K. and Ray A.K. (2006) Kinetic assessment of the potassium ferrate (VI) oxidation of antibacterial drug sulfamethoxazole. *Chemosphere* 62, 128–134.
- [102] Dodd M.C. and Huang C. (2004) Transformation of the antibacterial agent sulfamethoxazole in reactions with chlorine: kinetics, mechanisms, and pathways. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5607-5615.
- [103] Zhou W. and Moore D.E. (1994) Photochemical decomposition of sulfamethoxazole. *Int. J. Pharm.* 110, 55-63.
- [104] Land E.J. and Ebert M. (1967) Pulse radiolysis studies of aqueous phenol. *Trans. Faraday Soc.* 63, 1181-1190.
- [105] Pignatello J.J., Oliveros E. and Mackay A. (2006) Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 36, 1-84.
- [106] Sirés I. (2006). Electrochemical advanced oxidation processes for the removal of the drugs paracetamol, clofibric acid and chlorophene from waters. Doctoral Thesis, University of Barcelona. Barcelona (www.tesisenxarxa.net/TDX-0126107-111807/index.html).
- [107] Legrini O, Oliveros E. and Braun A.M. (1993) Photochemical Processes for Water Treatment. *Chem. Rev.* 93(2), 671-698.
- [108] Bauer R. and Fallmann H. (1997) The Photo-Fenton oxidation – A cheap and efficient wastewater treatment method. *Res. Chem. Intermed.* 23(4), 341-354.
- [109] Barb W.G., Baxendale J.H., Geroge P. and Hargrave K.R. (1949) Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. *Nature (London, U. K.)* 163, 692-694.
- [110] Barb W.G., Baxendale J.H., Geroge P. and Hargrave K.R. (1951) Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. 1. The ferrous ion reaction. *Trans. Faraday Soc.* 47, 462-500.
- [111] Barb W.G., Baxendale J.H., Geroge P. and Hargrave K.R. (1951). Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. 2. The ferric ion reaction. *Trans. Faraday Soc.* 47, 591-616.
- [112] Zepp R.G., Faust B.C. and Hoigne J. (1992) Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of iron (II) with hydrogen-peroxide- The Photo-Fenton reaction. *Environ. Sci. Technol.* 26, 313-319.
- [113] Pignatello J.J., Liu D. and Huston P. (1999) Evidence for an additional oxidant in the photoassisted Fenton reaction. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1832-1839.
- [114] Bossmann S.H., Oliveros E., Gob S., Siegwart S., Dahlen E.P., Payawan L., Straub M., Worner M. and Braun A.M. (1998) New evidence against hydroxyl radicals as reactive intermediates in the thermal and photochemically enhanced Fenton reactions. *J. Phys. Chem. A* 102, 5542-5550.
- [115] Rush J.D. and Bielski B.H.J. (1986) Pulse-Radiolysis Studies of Alkaline Fe(III) and Fe(VI) Solutions – Observation of Transient Iron Complexes with Intermediate Oxidation-States. *J. Am. Chem. Soc.* 108(3), 523-525.
- [116] Kavitha V. and Palanivelu K. (2004) The role of ferrous ion in Fenton and photo-Fenton and photo-Fenton processes for the degradation of phenol. *Chemosphere* 55(2), 1235-1243.
- [117] Pignatello J.J. (1992) Dark and Photoassisted Fe³⁺-Catalyzed Degradation of Chlorophenoxy Herbicides by Hydrogen-Peroxide. *Environ. Sci. Technol.* 26(5), 944-951.
- [118] Lee C.H. and Yoon J.Y. (2004) Temperature dependence of hydroxyl radical formation in the hv/Fe³⁺/H₂O₂ systems. *Chemosphere* 56(10), 923-934.

-
- [119] Freitas A.R., Vidotti G.J., Rubira A.F. and Muniz E.C. (2005) Polychloroprene degradation by a Photo-Fenton process. *Polym. Degrad. Stab.* 87(3), 425-432.
- [120] De Laat J., Le G.T. and Legube B. (2004) A comparative study of the effects of chloride, sulfate and nitrate ions on the rates of decomposition of H₂O₂ and organic compounds by Fe(II)/H₂O₂ and Fe(III)/H₂O₂. *Chemosphere* 55(5), 715-723.
- [121] Rivas F.J., Beltran F.J, Gimeno O. and Alvarez P. (2003) Optimisation of Fenton's reagent usage as a pre-treatment for fermentation brines. *J. Hazard. Mater.* 96(2-3), 277-290.
- [122] Comninellis C., Kapalka A., Malato S., Parsons S.A., Poullos I. and Mantzavinos D. (2008) Advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for R&D. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83,769-776.
- [123] Gotvajn A.Z., Zagorc-Koncan J. and Tisler T. (2007) Pretreatment of highly polluted pharmaceutical waste broth by wet air oxidation. *J. Environ. Eng. ASCE* 133, 89-94.
- [124] Kajitvichyanukul P. and Suntronvipart N. (2006) Evaluation of biodegradability and oxidation degree of hospital wastewater using photo-Fenton process as the pretreatment method. *J. Hazard. Mater.* 138, 384-391.
- [125] Fallmann H., Drutzler T., Bauer R., Malato S. and Blanco J. (1999) Applicability of the Photo-Fenton method for treating water containing pesticides. *Catal. Today* 54(2-3), 309-319.
- [126] Rabek J.F. (1982) *Experimental methods in photochemistry and photophysics. Part 2*, John Wiley & Sons, New York.
- [127] APHA. (1985) *Standard methods for the examination of water and wastewater*, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, Washington DC.
- [128] Amat A.M., Arqués A., López F. and Miranda M.A. (2005) Solar photo-catalysis to remove paper mill wastewater pollutants. *Sol. Energy* 79(4), 393-401.
- [129] Arslan-Alaton I., Caglayan A.E. (2006) Toxicity and biodegradability assessment of raw and ozonated procaine penicillin G formulation effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 131-140.
- [130] García I. (2003) Reactor biológico SBR como solución a los efluentes químicos y farmacéuticos. *Ing. Quím.* 405, 175-182.
- [131] Eldridge E.F. (1942) *Industrial Waste Treatment Practice*. McGraw-Hill, New York.
- [132] Masse D.I. and Masse L. (2000) Treatment of slaughterhouse wastewater in anaerobic sequencing batch reactors. *Can. Agric. Eng.* 42, 131-137.
- [133] Rajaguru P., Kalaiselvi K., Palanivel M. and Subburam V. (2000) Biodegradation of azo dyes in sequential anaerobic-aerobic systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 268-273.
- [134] Giraja S. and Wilderer P.A. (2001) Characterization and treatment of the liquid effluents from an aerobic digestion of biogenic solid waste. *Water Sci. Technol.* 43, 265-274.
- [135] Bae T., Han S. and Tak T. (2003) Membrane sequencing batch reactor system for the treatment of dairy industry wastewater. *Process Biochem.* 39, 221-231.
- [136] Cassidy D.P. and Belia E. (2005) Nitrogen and phosphorus removal from an abattoir wastewater in a SBR with aerobic granular sludge. *Water Res.* 39, 4817-4823.

- [137] Hu Z., Ferraina R.A., Ericson J.F., MacKay A.A. and Smets B.F. (2005) Biomass characteristics in three sequencing batch reactors treating a wastewater containing synthetic organic chemicals. *Water Res.* 39, 710–720.
- [138] Buitron G., Quezada M. and Moreno G. (2004) Aerobic degradation of the azo dye acid red 151 in a sequencing batch biofilter. *Bioresour. Technol.* 92(2), 143-149.
- [139] Zarook S.M. and Shaikh A.A. (1997) Analysis and comparison of biofilter models. *Chem. Eng. J.* 65(1), 55-61.
- [140] Quezada M., Linares I. and Buitron G. (2000) Use of a sequencing batch biofilter for degradation of azo dyes (acids and bases). *Water Sci. Technol.* 42(5-6), 329-336.
- [141] Grady C.P.L. (1990) Biodegradation of Toxic Organics – Status and Potential. *J. Environ. Eng.* 116(5), 805-828.
- [142] Puhakka J.A. and Jarvinen K. (1992) Aerobic Fluidized-Bed Treatment of Polychlorinated Phenolic Wood Preservative Constituents. *Water Res.* 26(6), 765-770.
- [143] Wilderer P.A. (1992) Sequencing batch biofilm reactor technology. *Harnessing biotechnology for the 21st century.* American Chemical Society, Washington DC.
- [144] Wilderer, P.A., Irvine, R.L. and Goronszy, M.C. (2001) *Sequencing Batch Reactor Technology.* IWA Publishing, London.
- [145] Woolard C.R. (1997) The advantages of periodically operated biofilm reactors for the treatment of highly variable waste water. *Water Sci. Technol.* 35, 199-206.
- [146] Devinyy J.S. and Ramesh J. (2005) A phenomenological review of biofilter models. *Chem. Eng. J.* 113(2-3), 187-196.
- [147] Wingender J., Neu T.R. and Flemming H.C. (1999) *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function.* Springer, Berlin.
- [148] Gantzer C.J. (1989) Inhibitory Substrate Utilization by Steady-State Biofilms. *J. Environ. Eng.* 115(2), 302-319.
- [149] Wilderer P.A. and McSwain B.S. (2004) The SBR and its biofilm application potentials. *Water Sci. Technol.* 50(10), 1-10.
- [150] Mohan S.V., Rao N.C., Prasad K.K., Madhavi B.T.V. and Sarma P.N. (2005) Treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch reactor (SBR) with an aerobic suspended growth configuration. *Process Biochem.* 40(5), 1501–1508.
- [151] Rao N.C., Mohan S.V., Muralikrishna P. and Sarma P.N. (2005) Treatment of composite chemical wastewater by GAC-Biofilm configured sequencing batch reactor (SBGR) operated in aerobic environment. *J. Hazard. Mater.* 124, 59–67.
- [152] Mohan S.V., Prakasham R.S., Satyavathi B., Annapurna J. and Ramakrishna S.V. (2001) Biotreatability studies of pharmaceutical wastewater using anaerobic suspended film contact reactor. *Water Sci. Technol.* 43, 271–276.
- [153] Box F.E.P. and Wilson K.B. (1951) On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *J. Royal Stat. Soc.: Ser. B (Stat. Methodology)* 13(1), 1-45.