



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

TESIS DOCTORAL

**BIODEGRADACIÓN DE 17BETA-ESTRADIOL Y AMPICILINA
CONTENIDOS EN AGUA MEDIANTE DESNITRIFICACIÓN Y
TOXICIDAD DEL EFLUENTE.**

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Ambientales

PRESENTA

I.Q. Cesar Camacho López

Directora

Dra. Claudia Romo Gómez

Mineral de la Reforma, Hgo., México., enero 2023



Mineral de la Reforma, Hgo. a 19 de enero de 2023

Número de control: ICBI-D/047/2023

Asunto: Autorización de impresión de tesis.

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado al I.Q. César Camacho López, alumno del Doctorado en Ciencias Ambientales (Directo) con número de cuenta 409823, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado "BIODEGRADACIÓN DE 17BETA-ESTRADIOL Y AMPICILINA CONTENIDOS EN AGUA MEDIANTE DESNITRIFICACIÓN Y TOXICIDAD DEL EFLUENTE" en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación, se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor.

PRESIDENTE	Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval	
SECRETARIO	Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa	
1er VOCAL	Dra. Claudia Romo Gómez	
2do VOCAL	Dra. Elena María Otazo Sánchez	
3er VOCAL	Dra. Araceli Ortiz Polo	
1er SUPLENTE	Dra. Silvia Montiel Palma	
2do SUPLENTE	Dra. Irasema Leticia Islas García	

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 "Amor, Orden y Progreso"

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
 Director del ICBI



Departamento de Planeación y Desarrollo
 Carretera Tachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
 Teléfono: 771 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx



Agradecimientos

Agradezco a las siguientes personas e instituciones que con su apoyo se logró cumplir con los objetivos del presente trabajo:

A Dios por nunca dejarme solo y siempre ayudarme y guiarme en cada reto que nos planteamos en la vida.

A mis papás, Petra y Gabriel, y mi hermano, Saúl, por continuamente apoyarme y velar por mí, por no dejarme solo en ningún momento a pesar de la distancia. Gracias también por formar a la persona que soy ahora. Infinitas gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca no. 711593 otorgada para la realización del doctorado.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) por siempre mantener una alta calidad académica e infraestructura para una formación integral del alumnado.

Agradezco el apoyo recibido del personal docente y administrativo de la UAEH.

A la Dra. Claudia Romo Gómez, por su enorme apoyo y compromiso para que además de cumplir con el trabajo doctoral, pudiera mejorar profesional y espiritualmente. Gracias por todas las facilidades y su incondicional disponibilidad en el laboratorio, me llevo una gran cantidad de enseñanzas para la vida.

Al comité tutorial, Dra. Elena, Dr. Carlos, Dra. Araceli, Dra. Irasema, Dra. Silvia, Dr. Otilio, Dra. Yolanda, por continuamente ayudarme a mejorar mi trabajo y crecer profesionalmente. Gracias por las enseñanzas en cada uno de sus comentarios y gracias por dedicar tiempo para generar un trabajo de calidad y a la altura y reconocimiento de la universidad.

A Itzel por todo su gran apoyo y siempre estar ahí, escuchándome. Gracias por todo.

A mis amigos y a todas las personas que conocí a lo largo del desarrollo de la tesis doctoral, gracias por todas las experiencias vividas, hicieron aún más ameno este recorrido.



Contribuciones derivadas de la tesis doctoral

Algunos de los resultados obtenidos en el presente trabajo formaron parte de las siguientes publicaciones:

- ❖ **Camacho-López, C.,** Romo-Gómez, C., Otazo-Sánchez, E. Gómez-Aldapa, C. A., García-Nieto, E. & Juárez-Santacruz, L. (2022). The pollution effect on the denitrifying capacity of methanogenic sludges. *Water Science & Technology*, 0 (0), 0. Doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2022.416>
- ❖ **Camacho-López, C.;** Romo-Gómez, C.; Otazo-Sánchez, E.M.; Acevedo-Sandoval, O.A.; García-Nieto, E.; Juárez-Santacruz, L. (2022) Biotransformation of 17 β -estradiol through a Denitrifying Sludge. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19, 13326. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph192013326>

Además, se presentaron en los siguientes eventos académicos y científicos:

- ❖ 6th Latin American & Caribbean Young Water Professional Conference organizado por la International Water Association (IWA), Sinaloa, México. (25-27 mayo 2022). Oxidación de 17 β -estradiol por un lodo desnitrificante. Cesar Camacho López, Claudia Romo Gómez, Elena María Otazo Sánchez, Otilio Arturo Acevedo Sandoval, Silvia Montiel Palma, Carlos Alberto Gómez Aldapa.
- ❖ Twitter Latin American Conference on Environmental and Chemical Process Systems Engineering, México. (1 julio 2021). Descripción matemática de la biodegradación de 17B-estradiol(E2) mediante un lodo desnitrificante. C. Camacho-López, J.A. Monroy-Azpeitia, C. Romo-Gómez, J.A. Monroy-Gómez.
- ❖ VII Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), México. (6-8 diciembre 2020). Biotransformación de ampicilina por un lodo desnitrificante. Camacho-López, C., Romo-Gómez, C., Otazo-Sánchez, E., Acevedo-Sandoval, O., Juárez-Santacruz, L., García-Nieto, E.
- ❖ 2nd Latin American & Caribbean Young Water Professional Conference organizado por *International Water Association (IWA)*, Colombia. (8-12 noviembre 2020). Comparación de dos lodos desnitrificantes de diferente origen. C. Camacho López, E. García Nieto, L. Juárez Santacruz, Y. Marmolejo Santillán, E. M. Otazo Sánchez, C.A. Gómez Aldapa, C. Romo Gómez.
- ❖ 2nd Latin American & Caribbean Young Water Professional Conference organizado por *International Water Association (IWA)*, Colombia. (8-12 noviembre 2020). Biodegradación de 17B-estradiol y ampicilina en agua mediante un lodo desnitrificante. C. Camacho López, E. García Nieto, L. Juárez Santacruz, Y. Marmolejo Santillán, E. M. Otazo Sánchez, C. Romo Gómez.
- ❖ Foro sobre la apropiación social de tecnologías para la gestión sostenible del agua, México. (28-30 octubre 2020). Biodegradación de 17 β -estradiol, ampicilina y acetato por

desnitrificación. Cesar Camacho-López, Claudia Romo-Gómez, Elena Otazo-Sánchez, Otilio Acevedo-Sandoval, Libertad Juárez-Santacruz y Edelmira García-Nieto.

- ❖ XLI Encuentro Nacional de la *Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ)*, México. (20-24 octubre 2020). Mineralización 17 β -estradiol (E2) mediante un lodo desnitrificante. Cesar Camacho-López, María Elena Otazo-Sánchez, Yolanda Marmolejo-Santillán, Claudia Romo-Gómez.
- ❖ VI Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), México. (1-4 diciembre 2019). Evaluación de tres métodos para la inactivación de lodos desnitrificantes. Camacho-López, C., Gómez-Aldapa C.A., Otazo-Sánchez E.M., Marmolejo-Santillán Y. y Romo-Gómez, C.
- ❖ XL Encuentro Nacional de la *Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ)*, México. (7-10 mayo 2019). Proceso desnitrificante como estrategia para la eliminación de 17 β -estradiol contenido en agua. Cesar Camacho-López, Claudia Romo-Gómez, Araceli Ortiz-Polo, Elena Otazo Sánchez, Carlos Gómez-Aldapa, Yolanda Marmolejo-Santillán.
- ❖ 5to Encuentro de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias (ECFA), Habana, Cuba. (15-17 mayo 2019). Biotransformación 17 β -estradiol presente en agua mediante desnitrificación. Camacho-López C., Romo-Gómez C., Marmolejo-Santillán Y., Otazo-Sánchez E. M., García-Nieto E., Juárez-Santacruz L.
- ❖ V Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), México. (2-5 diciembre 2018). Eliminación de 17 β -estradiol contenido en agua mediante desnitrificación. Camacho-López, Cesar, Gómez-Aldapa C.A., Otazo-Sánchez E.M., Marmolejo-Santillán Y. y Romo-Gómez, C.



ÍNDICE.

	Pág.
Acrónimos	XIV
Resumen	XVI
Abstract	XVIII
I- Introducción	1
1.1. El agua	1
1.2. Contaminantes emergentes (CEs)	2
1.2.1. Productos farmacéuticos presentes en agua	4
1.2.2. Compuestos hormonales: 17 β -estradiol	6
1.2.3. Antibióticos en agua: Ampicilina	7
1.3. Compuestos nitrogenados	9
1.4. Tecnologías para el tratamiento de aguas residuales	10
1.4.1. Tratamientos físico-químicos	11
1.4.2. Tratamientos biológicos	11
A) Sistemas MBR	11
B) Humedales artificiales	12
C) Metanogénesis	12
D) Nitrificación	12
E) Desnitrificación	13
1) Microbiología de la desnitrificación	13
2) Bioquímica de la desnitrificación	14
3) Factores que afectan la desnitrificación	16
4) Cinética de la desnitrificación	17
II- Antecedentes	20
2.1. Procesos fisicoquímicos para la eliminación de E2 y AMP	20
2.2. Procesos biológicos para la eliminación de E2 y AMP	21
2.3. Antecedentes de la desnitrificación	22
III- Justificación	25
IV- Objetivos	26
V- Metodología	27

5.1. Montaje y operación de reactor UASB	27
5.2. Cultivos en lote	28
5.2.1. Medio de cultivo para ensayos en lote	28
5.2.2. Cultivos control abióticos y con biomasa inactiva	29
5.2.3. Ensayos desnitrificantes de referencia con acetato	30
5.2.4. Ensayos desnitrificantes con estradiol y ampicilina	31
5.2.5. Ensayos desnitrificantes con estradiol, ampicilina y acetato en mezcla	31
5.2.6. Ensayos de recuperación con acetato	32
5.3. Variables de respuesta del proceso en ensayos en lote y reactor UASB	32
5.4. Métodos analíticos	34
5.4.1. Análisis de iones NO_2^- y NO_3^-	35
5.4.2. Análisis de N_2 y CO_2	37
5.4.3. Análisis de CH_3COO^-	39
5.4.4. Análisis de 17β -estradiol	40
5.4.5. Análisis de ampicilina	41
5.4.6. Análisis de carbono total (CT) y carbono inorgánico (CI)	42
5.5. Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)	43
5.6. Evaluación de toxicidad: ensayo de MN	44
VI- Resultados y discusión	46
6.1. Fuente de inóculo de reactor UASB	46
6.2. Evaluación de fenómenos físicos y químicos en ensayos abióticos en lote	49
6.3. Biodegradación de C- CH_3COO^- : ensayos de referencia	55
6.4. Ensayos desnitrificantes con 17β -estradiol y ampicilina	60
6.5. Ensayos desnitrificantes con 17β -estradiol, ampicilina y CH_3COO^- en mezcla	66
6.6. Ensayos de recuperación con C- CH_3COO^-	72
6.7. Evaluación cinética de ensayos en lote	74
6.8. Evaluación de toxicidad de efluentes de ensayos en lote	77

VII- Conclusiones	80
VIII- Recomendaciones	82
IX- Referencias	83

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág.
Figura 1.1 Producción de contaminantes emergentes en el medio ambiente	3
Figura 1.2 Estructura química de 17 β -estradiol	6
Figura 1.3 Estructura molecular de ampicilina	8
Figura 1.4 Esquema representativo de la desnitrificación	13
Figura 5.1 Diagrama de Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente (UASB)	28
Figura 5.2 Ejemplo de curva de calibración para N-NO ₂ ⁻ .	36
Figura 5.3 Ejemplo de curva de calibración para N-NO ₃ ⁻ .	36
Figura 5.4 Ejemplo de curva de calibración para N ₂ .	38
Figura 5.5 Ejemplo de curva de calibración para CO ₂ .	39
Figura 5.6 Ejemplo de curva de calibración para CH ₃ COO ⁻ .	40
Figura 5.7 Ejemplo de curva de calibración para 17 β -estradiol (E2).	41
Figura 5.8 Ejemplo de curva de calibración para Ampicilina (AMP).	42
Figura 5.9 Ejemplo de curva de calibración para IC.	43
Figura 6.1 Evaluación de pH y temperatura del reactor UASB.	46
Figura 6.2 Perfil cinético de las cargas volumétricas (Q) de carbono y nitrógeno que alimentaron al reactor UASB.	47
Figura 6.3 Cinética de cargas volumétricas de especies carbonadas y nitrogenadas a la salida del reactor UASB, así como cinética de crecimiento bacteriano del lodo en el reactor.	48
Figura 6.4 Perfil cinético de 4 ensayos abióticos con 30 mg C-E2 L ⁻¹ ; (A) con biomasa estéril, (B) biomasa seca, (C) biomasa expuesta a luz UV y (D) sin la presencia de lodo.	50
Figura 6.5 Ensayos de estabilidad de (A) 33 mg C-E2 L ⁻¹ y (B) 33 mg C-AMP L ⁻¹ .	54
Figura 6.6 Perfil cinético de ensayo de referencia con 10 mg C-CH ₃ COO ⁻ L ⁻¹ y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1.	55
Figura 6.7 Perfil cinético de ensayo de referencia con 20 mg C-CH ₃ COO ⁻ L ⁻¹ y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1.	56

Figura 6.8	Perfil cinético de ensayos de referencia con 30 mg C-CH ₃ COO ⁻ L ⁻¹ y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.8, inoculado con lodo de la UAM-I.	57
Figura 6.9	Perfil cinético de ensayo de referencia con 50 mg C-CH ₃ COO ⁻ L ⁻¹ y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1.	58
Figura 6.10	Perfil cinético de ensayos desnitrificantes don con 10 mg C-E2 L ⁻¹ como única fuente de electrones y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1.	61
Figura 6.11	Perfil cinético de ensayos desnitrificantes don con 20 mg C-E2 L ⁻¹ como única fuente de electrones y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1.	62
Figura 6.12	Perfil cinético de ensayos desnitrificantes don con 10 mg C-AMP L ⁻¹ como única fuente de electrones y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1.	63
Figura 6.13	Perfil cinético de ensayos desnitrificantes con 20 mg C-AMP L ⁻¹ como única fuente de electrones y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1.	64
Figura 6.14	Perfil cinético de ensayos desnitrificantes con (mg L ⁻¹) (3.3) C-E2, (3.3) C-AMP y (3.3) C-CH ₃ COO ⁻ en mezcla y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1.	67
Figura 6.15	Perfil cinético de ensayos desnitrificantes con (mg L ⁻¹) (10) C-E2, (10) C-AMP y (10) C-CH ₃ COO ⁻ en mezcla y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1.	68
Figura 6.16	Perfil cinético de ensayos desnitrificantes con (mg L ⁻¹) (10) C-E2 y (10) C-CH ₃ COO ⁻ en mezcla y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1.	69
Figura 6.17	Perfil cinético de ensayos desnitrificantes con (mg L ⁻¹) (10) C-E2 y (10) C-AMP en mezcla y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1.	70
Figura 6.18	Perfil cinético de ensayo de recuperación con 20 mg C-CH ₃ COO ⁻ L ⁻¹ y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1, pero con lodo previamente expuesto a 20 mg C-E2 L ⁻¹ .	72
Figura 6.19	Perfil cinético de ensayo de recuperación con 20 mg C-CH ₃ COO ⁻ L ⁻¹ y N-NO ₃ ⁻ a una C/N de 1.1, pero con lodo previamente expuesto a 20 mg C-AMP L ⁻¹ .	73
Figura 6.20	Comparación de frecuencia de MN inducidos por efluentes del ensayo con 20 mg C-E2 L ⁻¹ .	78

Figura 6.21	Comparación de frecuencia de MN inducidos por efluentes del ensayo con 20 mg C-AMP L ⁻¹ .	79
--------------------	--	----

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág.
Tabla 1.1 Algunos géneros microbiológicos que llevan a cabo la desnitrificación.	14
Tabla 1.2 Enzimas desnitrificantes y su localización.	15
Tabla 2.1 Algunas aplicaciones de la desnitrificación para la biodegradación de compuestos recalcitrantes industriales y farmacéuticos.	23
Tabla 5.1 Composición de medio de cultivo de alimentación del reactor UASB.	27
Tabla 5.2 Composición de medio de cultivo para ensayos en lote.	29
Tabla 5.3 Ensayos control abióticos con E2, AMP y N-NO ₃ ⁻ con tres procesos de inactivación de biomasa desnitrificante.	30
Tabla 5.4 Ensayos desnitrificantes en lote con C-CH ₃ COO ⁻ , C-E2 y C-AMP por separado y en mezcla.	31
Tabla 6.1 Resultados de eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de formación de productos en el reactor UASB.	49
Tabla 6.2 Cargas volumétricas de especies carbonadas y nitrogenadas a la entrada y salida del reactor UASB.	49
Tabla 6.3 Resultados del cálculo de factor decremento de E2 en ensayos abióticos en lote a diferentes concentraciones iniciales de C-E2 como única fuente de electrones y en mezcla con AMP a una C/N de 1.1	52
Tabla 6.4 Resultados del factor de decremento de AMP a diferentes concentraciones de C-AMP como única fuente de electrones y en mezcla con C-E2 a una C/N de 1.1.	52
Tabla 6.5 Resultados del factor decremento con N-NO ₃ ⁻ en los ensayos con C-E2 y C-AMP como únicas fuentes de electrones y en mezcla a una C/N de 1.1.	53

Tabla 6.6	Eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de productos de los ensayos de referencia a diferentes concentraciones de C-CH ₃ COO ⁻ .	57
Tabla 6.7	Velocidades específicas de generación de productos y consumo de sustratos de ensayos de referencia a diferentes concentraciones de C-CH ₃ COO ⁻ .	58
Tabla 6.8	Balance de materia de ensayos de referencia en lote de especies carbonadas y nitrogenadas.	59
Tabla 6.9	Eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de productos de los ensayos con C-E2 y C-AMP como únicas fuentes de electrones.	65
Tabla 6.10	Balance de materia de ensayos desnitrificantes en lote con C-E2 y C-AMP como únicas fuentes de electrones.	66
Tabla 6.11	Eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de productos de los ensayos desnitrificantes con C-E2, C-AMP y C-CH ₃ COO ⁻ en mezcla.	71
Tabla 6.12	Balance de materia de ensayos desnitrificantes en lote con C-E2, C-AMP y C-CH ₃ COO ⁻ en mezcla.	71
Tabla 6.13	Eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de productos de los ensayos desnitrificantes de recuperación con lodo de los ensayos con 20 mg C-E2 L ⁻¹ y 20 mg C-AMP L ⁻¹ , como únicas fuentes de electrones.	74
Tabla 6.14	Velocidades específicas de generación de productos y consumo de sustratos de ensayos de referencia a diferentes concentraciones de C-CH ₃ COO ⁻ .	75

ACRÓNIMOS

ALZ	Alizarina
[N]	Concentración del sustrato nitrogenado
[S]	Concentración de sustrato
AMP	Ampicilina
ANOVA	Análisis de Varianza
BTX	Benceno, Tolueno y Xileno
CE	Contaminante Emergente
CI	Carbono Inorgánico
COD	Carbono Orgánico Disuelto
CT	Carbono Total
CV	Coefficiente de Variación
DEs	Disruptores endócrinos
E	Eficiencia
E1	Estrona
E2	17beta-estradiol ó 17β-estradiol
EE2	17α-etinilestradiol
EED	Estado Estacionario Desnitrificante
FID	Flame Ionization Detector
GC	Gas Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
K_s y K_n	Constantes de saturación de cada sustrato usado
m	Velocidad específica de crecimiento
MBR	Reactor de Membrana
MEN	Menadiona
m_{max}	Velocidad específica de crecimiento máxima
MN	Micronúcleos
N₂	Nitrógeno molecular o nitrógeno gaseoso
Nar	Nitrato reductasa
Nir	Óxido nítrico reductasa

NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
Nor	Nitrito reductasa
Nos	Óxido nitroso reductasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
POA	Procesos de oxidación avanzada
PTAR	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
q	Velocidad específica de consumo o producción
Q	Velocidades volumétricas de generación o consumo
R²	Coefficiente de determinación
SMX	Sulfametoxazol
SSF	Sólidos Suspendidos Fijos
SST	Sólidos Suspendidos Totales
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles
TCD	Thermal Conductivity Detector
TOC	Carbono Orgánico Total
TRH	Tiempo de Retención Hidráulica
UASB	Upflow Anaerobic Sluge Blanket reactor
UV	Ultravioleta
Y	Rendimientos

RESUMEN

Los contaminantes emergentes son un grupo de compuestos orgánicos que provienen de las diferentes actividades antrópicas. Dentro de este grupo se encuentran una gran cantidad de compuestos como productos de cuidado personal, retardantes de flama, fármacos, entre otros. 17 β -estradiol (E2) y ampicilina (AMP) son compuestos farmacéuticos que forman parte del grupo de los contaminantes emergentes cuando se encuentran presentes cuerpos de agua, provocando feminización de especies acuáticas, resistencia bacteriana, entre otros a concentraciones de ng L⁻¹ a mg L⁻¹. Los procesos de tratamiento de agua convencionales y algunas tecnologías de reciente aplicación como la oxidación avanzada, no han logrado eliminar totalmente estos compuestos o bien, son fuente de producción de compuestos mayormente tóxicos que los compuestos originales. La desnitrificación es un proceso biológico que ha demostrado mineralizar por completo compuestos farmacéuticos como la ampicilina y algunos recalcitrantes como fenol, tolueno, xileno, entre otros. Por ello, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la capacidad del proceso desnitrificante para la biodegradación de 17 β -estradiol y ampicilina contenidos en agua, así como la toxicidad del efluente. Un lodo de origen metanogénico fue llevado hasta régimen estacionario desnitrificante (EED) en un reactor UASB. Posteriormente, se realizaron ensayos desnitrificantes en lote en botellas serológicas de 60 mL. Estos ensayos fueron evaluados a diferentes concentraciones de estradiol, ampicilina y acetato, dependiendo del análisis a desarrollar. En todos los ensayos se añadió la suficiente concentración de nitrato con la finalidad de mantener una relación C/N de 1.1. En todos los experimentos, cada botella fue inoculada con 0.5 gr SSV L⁻¹ y se añadió medio mineral bajo la composición reportada por Islas et al. (2017). Todas las botellas fueron incubadas a 34 °C y 200 rpm. Los compuestos fueron cuantificados mediante HPLC, CG y TOC. Se calcularon eficiencias (E) de consumo de sustratos, rendimientos (Y) de productos, así como las velocidades específicas (q) de cada una de las especies. Se evaluó la genotoxicidad de los efluentes de la 1, 192 y 408 h de reacción de los ensayos con 20 mg de C-AMP L⁻¹ y el ensayo con 20 mg C-E2 L⁻¹, mediante el bioensayo de micronúcleos (MN), bajo la metodología reportada por García et al. (2012). Los resultados obtenidos en todos los ensayos en lote mostraron E_{C-CH₃COO-}, E_{C-AMP}, E_{E2} y E_{N-NO₃-} superiores a 98 %, así como Y_{C-HCO₃-} y Y_{N₂} cercanos a 1. No se cuantificó la producción y acumulación de metabolitos e intermediarios del proceso en todos los ensayos.

Se obtuvieron $q_{C-CH_3COO^-}$, q_{C-E2} , q_{C-AMP} y $q_{N-NO_3^-}$ superiores a lo reportado en la literatura, pero menores a los ensayos de referencia cuando se utilizó E2 y AMP como fuentes de electrones. Se obtuvo una frecuencia de MN de 0.5 % en el efluente de la 1h de reacción del ensayo con 20 mg C-AMP L⁻¹, 0.25 % a las 192 h y a las 408 h se contabilizaron 0.125 % de MN. En el caso de la evaluación de la genotoxicidad de los efluentes de los ensayos con 20 mg C-E2 L⁻¹, se obtuvo una frecuencia de MN de 0.45 % en el efluente de la 1h de reacción, 0.125 % a las 90 h y a las 240 h, ya no se contabilizaron MN. El metabolismo del lodo desnitrificante fue completo con eficiencias de biodegradación de todos los sustratos superiores a 95 % y $Y_{C-HCO_3^-}$ y Y_{N_2} cercanos a 1. Se observó un efecto negativo en el proceso cinético del lodo desnitrificante con E2 y AMP, comparado con lo obtenidos en los ensayos de referencia. No se observó la producción y acumulación de sustratos e intermediarios carbonados y nitrogenados. La frecuencia de MN indicó que la toxicidad del efluente disminuyó en los ensayos con E2 y AMP, respectivamente.

ABSTRACT

Emerging pollutants are a group of organic compounds that come from different anthropic activities. Within this group are a large number of compounds, such as personal care products, flame retardants, and drugs, among others. 17β -estradiol (E2) and ampicillin (AMP) are pharmaceutical compounds that are part of the group of emerging contaminants when they are present in bodies of water, causing feminization of aquatic species, bacterial resistance, among others, at concentrations of ng L^{-1} to mg L^{-1} . Conventional water treatment processes and some recently applied technologies, such as advanced oxidation, have not been able to eliminate these compounds totally, or they are the source of the production of more toxic compounds than the original compounds. Denitrification is a biological process that has been shown to completely mineralize pharmaceutical compounds such as ampicillin and some recalcitrant compounds such as phenol, toluene, and xylene. Therefore, this work aimed to evaluate the denitrifying process's capacity for the biodegradation of 17β -estradiol and ampicillin contained in water, as well as the effluent toxicity. A sludge of methanogenic origin was brought to denitrifying steady state (DEE) in a UASB reactor. Subsequently, batch denitrifying tests were carried out in 60 mL serological bottles. Depending on the analysis to be developed, these assays were evaluated at different concentrations of estradiol, ampicillin, and acetate. In all cases, a sufficient nitrate concentration was added to maintain a C/N ratio of 1.1. In all the experiments, each bottle was inoculated with $0.5 \text{ gr VSS L}^{-1}$, and the mineral medium was added under the composition reported by Islas et al. (2017). All the bottles were incubated at $34 \text{ }^\circ\text{C}$ and 200 rpm. Compounds were quantified by HPLC, GC, and TOC-Analyzer. Efficiencies (E) of consumption of substrates, yields (Y) of products, as well as the specific speeds (q) of each of the species were calculated. The genotoxicity of the effluents from the 1, 192, and 408 h reaction from the assays with $20 \text{ mg C-AMP L}^{-1}$ and the assay with $20 \text{ mg C-E2 L}^{-1}$ was evaluated employing the micronucleus bioassay (MN) under the methodology reported by García et al. (2012). The results obtained in all batch assays showed $E_{\text{C-CH}_3\text{COO-}}$, $E_{\text{C-AMP}}$, E_{E2} , and $E_{\text{N-NO}_3-}$ higher than 98 %, as well as $Y_{\text{C-HCO}_3-}$ and Y_{N_2} close to 1. All trials had no production and accumulation of metabolites and process intermediates. $q_{\text{C-CH}_3\text{COO-}}$, $q_{\text{C-E2}}$, $q_{\text{C-AMP}}$, and $q_{\text{N-NO}_3-}$ were obtained higher than those reported in the literature but lower than the reference assays when E2 and AMP were used as electron sources. A frequency of MN of 0.5% was obtained in the effluent of the 1h reaction of the

assay with 20 mg C-AMP L⁻¹, 0.25% at 192h, and at 408h, 0.125% of MN were counted. In the case of the evaluation of the genotoxicity of the effluents of the tests with 20 mg C-E2 L⁻¹, a frequency of MN of 0.45 % was obtained in the effluent of the 1 h of reaction, 0.125 % at 90 h and 240 h, MN were no longer counted. The metabolism of the denitrifying sludge was complete with biodegradation efficiencies of all the substrates higher than 95 % and Y_{C-HCO₃⁻} and Y_{N₂} close to 1. A negative effect was observed on the kinetic process of the denitrifying sludge with E2 and AMP, compared with the results obtained in the reference assays. The production and accumulation of carbon and nitrogen substrates and intermediates were not observed. The frequency of MN indicated that the toxicity of the effluent decreased in the trials with E2 and AMP, respectively.

I-INTRODUCCIÓN

1.1.El agua

El agua es uno de los recursos naturales más importantes en el planeta Tierra. Ésta cubre el 70 % de la superficie del mismo. Sin embargo, del total, sólo 2.5 % está considerada como agua dulce y menos del 1 % se encuentra disponible para uso y consumo de animales, así como del ser humano (Hasan et al., 2019). En México, según Banda (2018) se dispone de solo el 0.1 % del total de agua dulce a nivel mundial y de precipitaciones, el país recibe 1489 millones de metros cúbicos al año, de los cuales 22 % van directo a ríos y lagos, mientras que el 6 % se mantiene como reservorio en mantos acuíferos.

El rol del agua en el planeta es de vital importancia, ya que animales y en general, todos los seres vivos requieren de su suministro para beber, asearse o bien para mantener el equilibrio en cada ecosistema de la biosfera (Hasan et al., 2019; Varsha et al., 2022). No obstante, dado el creciente desarrollo económico e industrial (debido al aumento de la población mundial y con ello el de la demanda de los recursos naturales); la calidad y cantidad de agua disponible ha ido disminuyendo no sólo para el ser humano, sino para toda especie de vida que habita en el planeta (Egea et al., 2019). En este sentido, las consecuencias por el uso excesivo de este recurso se han comenzado a presentar en las últimas décadas. (Vargas, 2019). Ejemplo de ello es la crisis de agua que se vive actualmente, la cual ha afectado a una gran cantidad de naciones, incluido México, resultado de la continua sobreexplotación de cuerpos de agua potable como es el caso de las cuencas del centro y norte del país, así como las cuencas del río Lerma y la de México.

Aunado a la constante extracción de agua subterránea, se estima que más de 2 millones de toneladas de aguas residuales se desechan a diario y se incorporan a cuerpos de agua natural sin previo tratamiento, es decir, un promedio de 1,500 km³ son desechados al año, las cuales contienen una gran cantidad de contaminantes de origen industrial y doméstico (Sophia y Lima, 2018). Generalmente, estas aguas resultantes de todas las actividades antrópicas no son previamente tratadas y aprovechadas para su reutilización en la población, por lo que el suministro principal proviene del subsuelo (Martínez et al., 2019).

Las aguas residuales se caracterizan por contener diferentes tipos de agentes físicos, químicos y biológicos. Algunos de estos pueden ser de gran tamaño como son plásticos (botellas, sillas, juguetes, bolsas, llantas, entre otros), ramas y algún otro tipo de basura generada por la población, pero debido a su tamaño pueden ser removidos fácilmente del agua. Sin embargo, los agentes que no son visibles a simple vista como es el caso de metales pesados, aceites, grasas, colorantes, materia orgánica, ácidos, salinidad, concentración de ciertos iones y cationes, entre otros, requieren un proceso de mayor especialidad para su remoción del agua y durante varias décadas, han sido centro de atención debido a los problemas que generan tanto al ser humano como a otros seres vivos. Aunado a ello y con el avance de la tecnología en las metodologías aplicadas para la cuantificación y detección de compuestos a concentraciones traza, se han encontrado elementos orgánicos químicamente estables en el medio ambiente, a los cuales se les ha dado el nombre de Contaminantes Emergentes (CEs). La presencia de los CEs en el agua es un tema de gran importancia por los diferentes problemas que están generando a la biota de los ecosistemas, en especial a los acuáticos, pero, además, se les ha encontrado en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales.

1.2. Contaminantes emergentes (CEs)

Actualmente, los seres humanos utilizan una gran cantidad de sustancias químicas en la vida cotidiana, de las que se tiene registro de cerca de 30,000 a 70,000 y a diario, se integran 4,000 a esta gran lista. Sin embargo, de todos estos compuestos, no se cuenta con conocimiento de sus efectos cuando son incorporados al medio ambiente después de su uso (Lukač et al., 2022). De lo anterior, se han descubierto trazas de orgánicos (ng L^{-1} a mg L^{-1}) en cuerpos de agua natural, a los cuales se les ha denominado como contaminantes emergentes (CEs).

Los CEs son un grupo de compuestos orgánicos de diferente naturaleza química y de origen antropogénico, su introducción es continua a cuerpos de agua natural como ríos, lagos, lagunas, entre otros (Egea et al., 2019). Se consideran altamente estables y recalcitrantes. Son de tipo sintético y también existen algunos naturales, provenientes de actividades industriales y de la vida diaria (Saidulu et al., 2021). La mayoría no cuentan con una regulación o bien algunos ya son candidatos a normativas internacionales (Lencioni et al., 2020). Dentro de este grupo se ha enlistado a los productos de aseo y cuidado personal, pesticidas, surfactantes,

aditivos, retardantes de flama, nanopartículas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, plastificantes, productos farmacéuticos, por mencionar solo algunos (Islas et al., 2017; Taheran et al., 2018; Varsha et al., 2022). Se ha reportado a estos compuestos en diferentes compartimentos ambientales, por ejemplo, los productos farmacéuticos y de cuidado personal se han cuantificado en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, sedimentos, así como en biota acuática. Pesticidas se han encontrado en suelos y en agua, así como en flora y en fauna, la cual puede movilizar estos compuestos de un punto a otro (Matich et al., 2019).

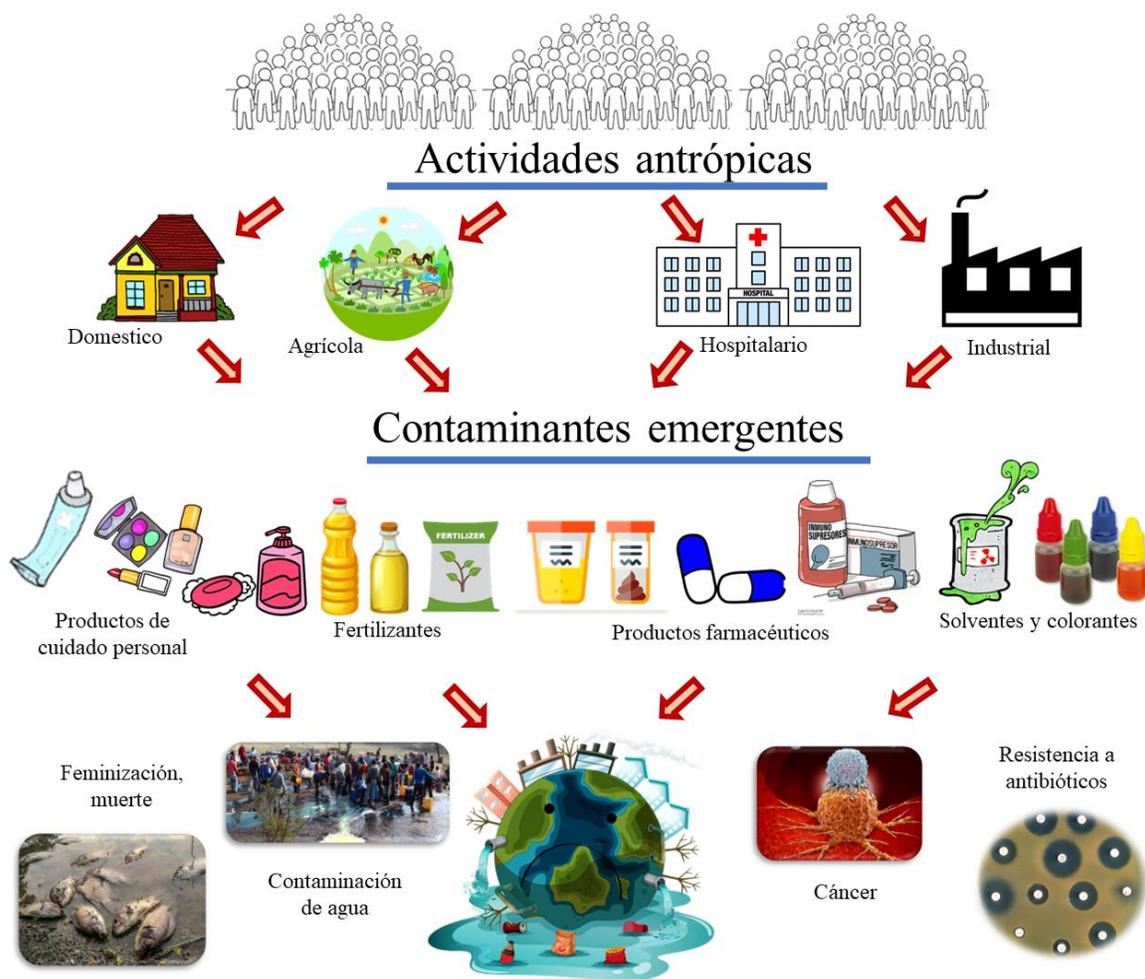


Figura 1.1. Producción de contaminantes emergentes en el medio ambiente (Elaboración propia).

Asimismo, se ha reportado que la exposición de CE a fauna acuática y terrestre puede provocar problemas como desordenes genéticos, alteraciones en el sistema inmune, cambios en su comportamiento, feminización y bioacumulación, entre otros. Esto se considera como una de las causas de la migración de ciertas especies y de la alteración de la cadena reproductiva de los animales, lo que los puede llevar a su inminente extinción (Varsha et al., 2022).

1.2.1 Productos farmacéuticos presentes en aguas naturales

Los fármacos a pesar de ser útiles en el tratamiento de algunas enfermedades en el ser humano y en algunos animales, cuando se encuentran en el medio ambiente, provocan una gran cantidad de problemas, debido a que son persistentes y recalcitrantes, puesto que originalmente se diseñaron para ser químicamente estables y resistir el metabolismo rápido en el cuerpo para asegurar un efecto farmacológico adecuado (Castro et al., 2021; Madden et al., 2009). Por ello, no son asimilados por completo en el cuerpo receptor, por lo que un porcentaje de la concentración original es desechada e incorporada al medio ambiente por medio de efluentes de agua residual.

Los productos farmacéuticos más encontrados en aguas naturales y residuales a nivel mundial, son los siguientes (Islas et al., 2017; Petrie et al., 2015):

- A) Estrógenos naturales: Compuestos hormonales utilizados en el tratamiento de enfermedades como la menopausia y en forma de anticonceptivos. 17beta-estradiol o 17β-estradiol (E2), estrona (E1) y estriol (E1), sintéticos como 17α-etinilestradiol (EE2).
- B) Antiinflamatorios no esteroideos (ng L⁻¹): diclofenaco (0.5-154), ibuprofeno (1-2370), ketoprofeno (1-4), naproxeno (1-59),
- C) Analgésicos (ng L⁻¹): morfina (1.6-36), metadona (0.6-12),
- D) Antiepilépticos (ng L⁻¹): carbamazepina (0.5-251),
- E) Antibióticos (ng L⁻¹): amoxicilina (2.5-245), eritromicina (0.5-159), metronidazol (1.5-12), oxitetraciclina (170), ampicilina (13).

Los productos farmacéuticos se caracterizan por ser persistentes, bioacumulables y tóxicos en el medio ambiente. Se consideran persistentes debido a que no son biodegradados

por completo mediante métodos convencionales, pero también son continuamente integrados al medio ambiente. Algunos de los productos farmacéuticos y sus metabolitos con mayor índice de persistencia de acuerdo a su tiempo de disipación (DT50) son paracetamol, ibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno (3.1 a 7 días), CBZ-diol, oxazepan, iopromida, ivermectina (14 a 54 días), ácido clofibrico, diazepam y caramazepina (119 a 328 días) (Ebele et al., 2017).

Diferentes estudios han reportado la bioacumulación de diversos fármacos en animales acuáticos y en algunas algas, tal es el caso del pez dorado (*Carassius auratus*), donde se han descubierto concentraciones de gemfibrozil en factores de bioacumulación de 113, después de 14 días. Carbamazepina en algas como *Pseudokirchneriella subcapitata* y el crustáceo *Thamnocephalus platyurus* con factores de bioacumulación de 2.2 y 12.6, respectivamente. Asimismo, se han detectado 43 fármacos de diferentes clases en tejido de mejillones con factores de bioacumulación de 0.66 para metformina hasta 32022 para sertralina (Ebele et al., 2017).

Generalmente, los fármacos son considerados como disruptores endócrinos (DEs) cuando se encuentran en el medio ambiente y son introducidos a organismos acuáticos. Esto está asociado a problemas con funciones fisiológicas clave de los organismos, incluidas el metabolismo y los procesos reproductivos. Un disruptor endócrino es toda aquella sustancia exógena que provoca alteraciones graves en el sistema endócrino de los seres vivos vertebrados, el cual tiene la función de regular la secreción hormonal que controla la mayor parte de las reacciones en el cuerpo (Zhang y Zhou, 2005). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido a los DEs como sustancias exógenas que alteran las funciones del sistema endócrino y en consecuencia causa efectos en la salud del organismo (Ebele et al., 2017). Dentro de la lista de los principales compuestos DEs se ha integrado a los productos esteroideos como los estrógenos, los progestágenos, los fitoestrógenos, entre otros; de cuidado personal como desinfectantes, fragancias, agentes conservadores, por mencionar algunos; y los fármacos no esteroideos, tales como analgésicos, antiinflamatorios, drogas dermatológicas, antibióticos, entre otros (Ebele et al., 2017).

1.2.2 Compuestos hormonales: 17 β -estradiol

Los compuestos farmacéuticos hormonales son utilizados en el tratamiento de algunas enfermedades en el ser humano como la menopausia, tienen la capacidad de regular gran parte de las reacciones que se llevan a cabo en el ser humano y tienen influencia en procesos cognitivos en el mismo (Fernández et al., 2017; Xu et al., 2021). Además, se utilizan en actividades acuícolas y medicina veterinaria. De esta última, se ha estimado una descarga promedio de 83 Ton por año tan solo en Estados Unidos y en la Unión Europea (Li et al., 2020). Sin embargo, al no ser asimilados completamente en el cuerpo receptor, son desechados al medio ambiente por medio de aguas residuales domésticas. Cuando se encuentran en el agua tienen la capacidad de generar un efecto androgénico y estrogénico en los seres vivos acuáticos.

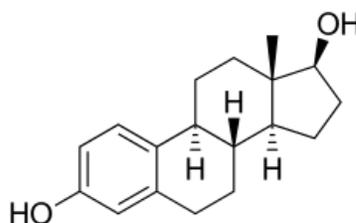


Figura 1.2. Estructura química de 17 β -estradiol.

17 α -estradiol, 17beta-estradiol o 17 β -estradiol (E2), equilenina, equilina, estriol (E3), estrona (E1), mestranol, noretindrona y etinilestradiol (EE2) son solo algunos ejemplos de compuestos orgánicos hormonales generados de manera natural por los ovarios o bien en forma sintética (Bernal y Paolieri, 2022). Se consideran como los principales estrógenos que han sido encontrados en el medio ambiente e introducidos por medio de aguas residuales (Khan et al., 2022).

17 β -estradiol (E2) es una hormona neuronal con alta actividad estrogénica (Duan et al., 2022). Se produce de manera natural en el cuerpo humano y se considera de suma importancia, debido a que interviene en procesos neuronales como la espinogénesis, sinaptogénesis y la neurogénesis adulta en la región del hipocampo en la corteza cerebral (Bernal y Paolieri, 2022). Se caracteriza por contener en su estructura un anillo aromático, el cual tiene una alta afinidad a receptores estrogénicos en los seres humanos, dos anillos ciclohexanos y un anillo pentano (Figura 1.2) (Yu et al., 2013). En las mujeres, se utiliza como

tratamiento exógeno contra la depresión causada en la menopausia, debido a la relación que existe entre este problema con la falta de síntesis de estrógenos en los ovarios (Xu et al., 2021). Sin embargo, debido a que su producción es de manera natural, se desecha e incorpora continuamente al medio ambiente por medio de aguas residuales provenientes de actividades domésticas y en algunos casos industriales del ramo farmacéutico, por lo que se han reportado rangos de concentraciones de E2 en agua natural de 0.7 hasta 62 ng L⁻¹ e incluso algunos estrógenos sintéticos como 17 α -etinilestradiol (EE2) de 0.4 hasta 6.86 ng L⁻¹ (Djebbi et al., 2022). Estas concentraciones son lo suficientemente altas para provocar problemas en peces como es la feminización de machos, inducción intersexual, reducción de la fertilidad, reducción en el conteo de espermatozoides en machos, estrés oxidativo, provoca alteraciones en la diferenciación sexual, la producción de Vitellogenina en peces macho juveniles y la reducción del tiempo de supervivencia de los animales (Fernández et al., 2017; Li et al., 2020; Orozco et al., 2019). Es por ello que E2 se le ha considerado como uno de los principales y más agresivos disruptores endócrinos en el medio ambiente (Fernández et al., 2017).

1.2.3 Antibióticos en agua: Ampicilina

Los antibióticos han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias en ramas de la medicina para humanos y animales (Yu et al., 2019). Asimismo, se han usado como método de prevención de infecciones en pacientes quirúrgicos, personas con sistema inmune débil, como promotor de crecimiento y prevención de enfermedades en ganado (Manage y Liyanage, 2019). Se estima que la población mundial consume un total de 100,000 hasta 200,000 MT al año (Elizalde et al., 2016; Islas et al., 2017) y tan solo del 2000 al 2015, el consumo global incrementó en un 65 %, donde los antibióticos β -lactámicos fueron y actualmente son el grupo de fármacos de mayor demanda en todos los países (Islas et al., 2017; De Sotto et al., 2022). Dentro de los β -lactámicos se han incluido a la penicilina G, amoxicilina y ampicilina, donde su modo de acción es mediante la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana (Islas et al., 2017; Ramírez et al., 2020).

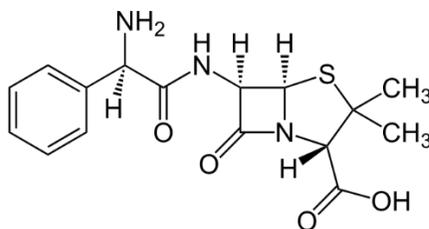


Figura 1.3. Estructura molecular de ampicilina.

Al igual que ocurre con 17β -estradiol y en general con todos los fármacos, los antibióticos no son metabolizados por completo, por lo que más del 50% de la dosis suministrada es desechada por medio de la orina y heces fecales, enviada a cuerpos de agua natural mediante aguas residuales hospitalarias, domésticas e industriales, principalmente (De Sotto et al., 2022). La presencia de antibióticos a concentraciones de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ en el medio ambiente ha generado varios problemas que deben ser resueltos rápidamente por seguridad de la salud mundial (Biancullio et al., 2019). Ejemplo de ello es el uso de amoxicilina, debido a que en la naturaleza genera alergias a medicamentos, problemas toxicológicos y aumenta el número de bacterias resistentes a antibióticos (Matsubara et al., 2020).

La ampicilina (AMP) (Figura 1.3.) es uno de los β -lactámicos de mayor prescripción en todo el mundo, CAS 69-53-4. de peso molecular de 349.4 g mol^{-1} , log Kow de 1.45 y pKa de 2.5 (Anjali y Shanthakumar, 2019), ha contribuido en el aumento de bacterias resistentes a antibióticos, debido a que continuamente es desechada al medio ambiente (Islas et al., 2017). Incluso, se ha demostrado que, durante la transferencia vertical de material cromosómico, es decir, cuando una célula bacteriana comienza con su división los cromosomas de la bacteria madre son compartidos con la célula hija y por lo tanto, los genes de resistencia a antibióticos producidos por la constante exposición de las bacterias a antibióticos son compartidos entre células y la población de este tipo de superbacterias aumenta (Manage y Liyanage, 2019). Se han clasificado a 5 tipos de resistencia a antibióticos, tal es el caso de la resistencia natural, resistencia adquirida, resistencia cruzada y resistencia a múltiples medicamentos. Esta última se da por medio de 5 mecanismos, destrucción enzimática, modificación de objetivos de antibióticos, efluvios, reducción de la permeabilidad y creando distintas rutas metabólicas del antibiótico (Manage y Liyanage, 2019). Por todo ello, es de suma importancia reducir, eliminar y evitar que la presencia de antibióticos continúe en el medio ambiente.

1.3 Compuestos nitrogenados

Las alteraciones en los ciclos biogeoquímicos a causa del aumento en la emisión de compuestos contaminantes por el desarrollo industrial, ha ido en aumento. Ciclos como el del carbono, del azufre, del fósforo y del nitrógeno, son los principalmente afectados. Este último ha sido modificado a causa de la quema de combustibles, la producción y el uso de fertilizantes nitrogenados, así como el cultivo de mezclas de legumbres (Cervantes, 2009). Por ello, se han observado múltiples problemas como:

A) Problemas ambientales

Emisión a la atmósfera de óxidos de nitrógeno como N_2O , ha contribuido al aumento del efecto invernadero, debido a que el óxido nitroso se ha incluido en la lista de los gases de efecto invernadero y, de hecho, se ha reportado su capacidad para almacenar calor de hasta 230 veces mayor a CO_2 (Meza, 2008). El N_2O es un producto que se genera comúnmente en plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales por la conversión de $N-NH_4$, dado que los procesos nitrificantes y desnitrificantes se llevan a cabo de forma incompleta debido a las bajas concentraciones de oxígeno disuelto y una consecuencia de esto son las constantes emisiones de N_2O a la atmósfera (Beier et al., 2021; Conthe et al., 2019). También, se ha reportado que los suelos agrícolas contribuyeron globalmente en un 55 % al total de emisiones en el año 2005 y se ha estimado que este porcentaje incrementará a 59 % al año 2030.

Según Cervantes (2009), el dióxido de nitrógeno (NO_2) y el monóxido de nitrógeno (NO) son parte de la lista de compuestos con capacidad de aumentar la acidez de cuerpos de agua natural, lo cual trae consigo diferentes consecuencias como:

1. Perturbaciones metabólicas y respiratorias en moluscos, insectos, peces y algunos otros animales.
2. Incremento en la bioacumulación y toxicidad de aluminio y otros metales traza en insectos, crustáceos, peces y anfibios.
3. Depresión de la fotosíntesis y reducción de la productividad en plancton y especies de algas.

4. Disminución de la diversidad de especies de fitoplancton y comunidades perifiton, con la baja de especies sensitivas.
5. Disrupción de la regulación iónica, especialmente en la baja de sodio en el cuerpo y la dificultad para obtener el suficiente calcio en moluscos, insectos, crustáceos, peces y anfibios.
6. Reduce la tasa de crecimiento en cladóceros, peces y anfibios.

Aunado a todo lo anterior, se sabe que las actividades agrícolas son una de las principales fuentes de nitrógeno en ríos y lagos, ocasionado por el continuo uso de fertilizantes y pesticidas a base de compuestos nitrogenados tales como NO_2^- , NO_3^- y NH_4^+ . Altas concentraciones de nitrógeno orgánico e inorgánico en el agua han provocado que actualmente, estos se encuentren en estado de eutrofización (Shitu et al., 2021), generando un aumento del crecimiento de algas y disminuyendo la concentración de oxígeno disuelto afectando a la biota acuática, provocando la disminución de especies y su subsistencia (Hassanpour et al., 2019).

B) Salud del ser humano

Se ha reportado que NO_3^- provoca metahemoglobinemia y cáncer gástrico, resultado de la formación de sustancias química genotóxicas por metabolismo endógeno en bacterias gastrointestinales. NO_2^- por su parte, al entrar en contacto con la saliva forma nitrosaminas, consideradas como cancerígenas (Meza, 2008).

1.4. Tecnologías para el tratamiento de aguas residuales

A lo largo de los años, plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) convencionales se han centrado en la eliminación de materia orgánica y algunos nutrientes provenientes de aguas residuales de cualquier tipo. En la mayoría de estas, se han aplicado procesos biológicos como los lodos activados, humedales artificiales, reactores secuenciados en lote, entre otros (Parida et al., 2021). Sin embargo, estos no han sido lo suficientemente eficientes para la eliminación de algunos otros compuestos orgánicos e inorgánicos como los contaminantes emergentes, por lo que se consideran una de las principales fuentes de emisión de estos compuestos y dado el creciente conocimiento de los efectos de estos compuestos, es de vital importancia su eliminación del medio ambiente. Los procesos de reciente estudio son

los físicos, químicos, la combinación de ambos y en algunos casos los tratamientos biológicos.

1.4.1 Tratamientos físico-químicos

A) Coagulación

El mecanismo de coagulación consiste en la remoción de materia orgánica, partículas suspendidas, nitrógeno y fósforo mediante el uso de agentes químicos como cloruro poliférrico (PFC) y FeCl_3 (Ezeuko et al., 2021).

B) Absorción en carbón activado

La porosidad del carbón activado ha sido en gran medida una alternativa para la eliminación de CE's del agua, con eficiencias superiores al 90 %. Se ha reportado la remoción de fármacos como ciprofloxacino, primidona, levofloxacino, eritromicina, ibuprofeno, diclofenaco, trimetoprima, cafeína, carbamazepina, entre otros (Khan et al., 2022).

Además de las tecnologías con carbón activado, se han comenzado a estudiar materiales resultado de la calcinación de materia orgánica como es el caso de Biochar, el cual es producido a partir de pirólisis de material celulósico. Algunos reportes han mencionado que la porosidad del material posee sitios activos para la interacción hidrofóbica con los CE's (Tang et al., 2022).

C) Procesos de oxidación avanzada (POA)

Los POA se llevan a cabo de dos maneras, con la generación de radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$), el cual es un potente compuesto oxidante, o bien con la formación de compuestos oxidantes de moléculas orgánicas. Dentro de los procesos de oxidación avanzada, se consideran a la ozonación, procesos Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$), foto Fenton ($\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$), $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ y Fenton con luz solar (Anjali y Shanthakumar, 2019).

1.4.2 Tratamientos biológicos

A) Sistemas MBR

Los procesos con reactores biológicos de membrana, MBR, consisten en un recipiente con agitación en el que los lodos y los sustratos son impactados constantemente con la

finalidad de facilitar la biodegradación. Son similares a los tratamientos con lodos activados, solo que en estos presentan mejores beneficios, dado que son compactos y simples, de fácil operación, presentan bajos tiempos de retención, requieren de menor espacio, se pueden generar menores concentraciones de lodos y las cargas pueden ser grandes, comparado con los procesos con lodos activados (Shitu et al., 2021).

B) Humedales artificiales

Los humedales, son sistemas artificiales de alta complejidad, de bajo costo y están compuestos por plantas de una especie, grandes comunidades de microorganismos y sustratos. Se consideran como una alternativa en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con productos farmacéuticos (Santos et al., 2019). En ellos se llevan a cabo procesos físicos, químicos y algunos biológicos, donde en el caso de los físicos predominan la fotodegradación y la adsorción-desorción, pero pueden llevarse a cabo algunos otros como volatilización, absorción en plantas y acumulación (Ilyas et al., 2021). En el caso de los biológicos, los procesos dominantes son la biodegradación (aerobia o anaerobia) y la fitorremediación (Santos et al., 2019). Sin embargo, estos aún no eliminan por completo CEs o bien sólo los acumulan sin transformarlos para trasladarlos de una matriz ambiental a otra.

C) Metanogénesis

La metanogénesis consiste en la transformación de compuestos orgánicos en CH_4 y CO_2 , bajo condiciones aerobias. Este es uno de los procesos más comunes que se llevan a cabo en reactores biológicos de plantas de tratamiento de aguas residuales (Beristain et al., 2015). Sin embargo, metano es el gas que mayor contribuye al fenómeno de efecto invernadero que causa el cambio climático en todo el mundo (Chen et al., 2019).

D) Nitrificación

La nitrificación es un proceso biológico perteneciente al ciclo biogeoquímico del nitrógeno que consiste en la oxidación de NH_3 hasta NO_2^- y NO_3^- . Este proceso se lleva a cabo en compartimentos ambientales como suelo y agua y se divide en dos etapas; la amonio oxidación y posteriormente, la nitrato oxidación (Cervantes, 2009).

Se han reportado bacterias con capacidad nitrificante durante la amonio oxidación a proteobacterias como *Nitrosomonas*, *Nitrospira* y *Nitrosococcus mobilis*. Asimismo, en el

caso de nitrato oxidación, se han incluido a *Nitrobacter*, *Nitrococcus* y *Nitrospira*. Además, dentro de los factores principales que influyen en la eficiencia de la nitrificación, se considera a la temperatura (28 a 36 °C), pH (7.5 a 8), las concentraciones de los sustratos, así como factores inhibitorios que puedan producir y la concentración de oxígeno disuelto (Cervantes, 2009)

E) Desnitrificación

La desnitrificación (Figura 1.4.), es una etapa del ciclo biogeoquímico del nitrógeno que consiste en la reducción de NO_3^- hasta N_2 (Rambags et al., 2019). En este proceso intervienen 4 enzimas: Nitrato reductasa (*Nar*), nitrito reductasa (*Nor*), óxido nítrico reductasa (*Nir*) y óxido nitroso reductasa (*Nos*).

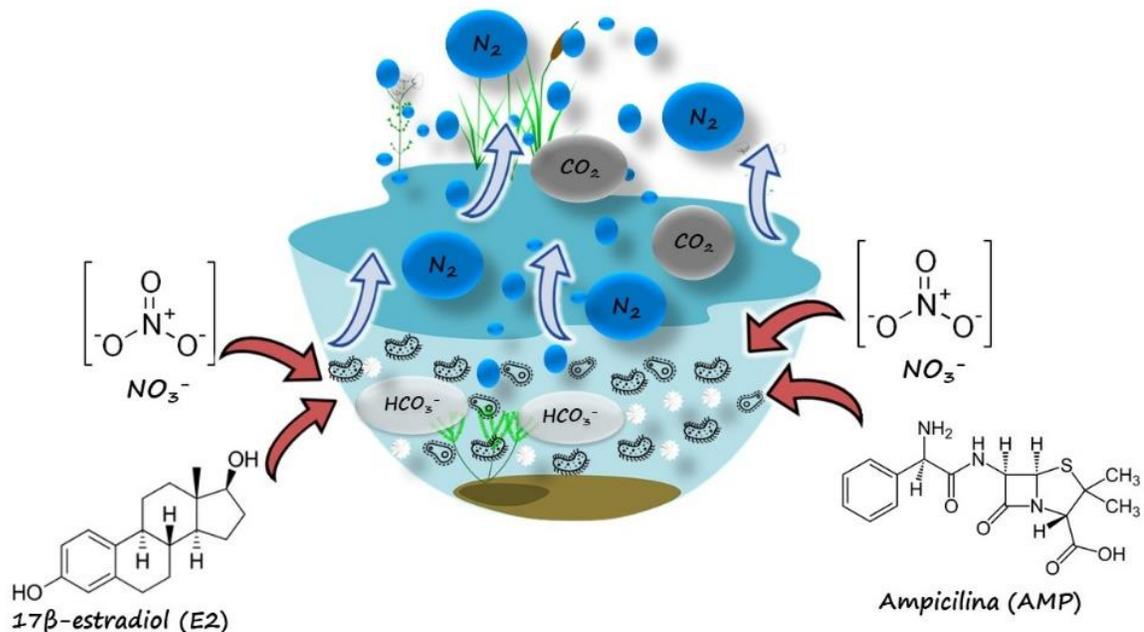


Figura 1.4. Esquema representativo de la desnitrificación.

1) Microbiología de la desnitrificación

El proceso desnitrificante se lleva a cabo en diferentes géneros de bacterias y, de hecho, es uno de los procesos que se lleva a cabo en diferentes compartimentos ambientales a lo largo de todo el mundo. Para que se lleve a cabo es necesaria la presencia de un donador de

electrones que regularmente es una fuente orgánica, dado que esta etapa del ciclo del nitrógeno se lleva a cabo bajo condiciones anóxicas (Cuervo et al., 2017). Organismos autótrofos y heterótrofos participan en el proceso, son considerados como facultativos y su habilidad para biodegradar compuestos o sustratos carbonados depende de las propiedades físicas y químicas de cada compuesto (Han et al., 2020; RebereCuervo et al., 1999). Además, poseen diferentes características físicas y morfológicas como lo expone la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Algunos géneros microbiológicos que llevan a cabo la desnitrificación (Cervantes, 2009).

Familia	Género	Morfología	Características fisiológicas
Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>	Bastón	Organotróficas y litotróficas
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>		
Rodobacteriaceae	<i>Paracoccus</i>	Cocos	
Hidrogenofilaceae	<i>Tiobacillus</i>		Litotróficas
Bradirizobiaceae	<i>Rodopseudomonas</i>	Bastón	Fototróficas
Bacillaceae	<i>Bacillus</i>		Fermentativas
Rizobiaceae	<i>Rizobium</i>		Organotróficas fijadoras de N ₂
Neisseriaceae	<i>Neisseria</i>	Cocos	Patogénicas organotróficas
Propionibacteriaceae	<i>Propionibacterium</i>		Organotróficas

Organográficas desnitrificantes se han encontrado en suelos, agua superficial, agua subterránea y en sedimentos, así como en plantas de tratamiento de aguas residuales y en específico en reactores configurados bajo condiciones organotróficas, autotróficas o mixotróficas (Cuervo et al., 2017).

Este proceso ha sido utilizado en el tratamiento de agua residual rica en nitrógeno inorgánico, pero también ha demostrado buenos resultados en la eliminación de algunos compuestos orgánicos sin la producción mayoritaria de biomasa y en bajas relaciones C/N (Zhang et al., 2020).

2) Bioquímica de la desnitrificación

El proceso desnitrificante se compone por una serie de reacciones, donde cada una es catalizada por una enzima específica. Estas enzimas son reductasas, las cuales son

sintetizadas por microorganismos cuando las condiciones ambientales se vuelven anóxicas (Tabla 1.2)

Tabla 1.2. Enzimas desnitrificantes y su localización (Cervantes, 2009).

Enzima	Localización en la célula	Grupo prostético
Nitrato reductasa (<i>Nar</i>)	Membrana celular y espacio periplásmico	Molibdeno
Nitrito reductasa (<i>Nir</i>)	Espacio periplásmico	Cobre y Hemo
Óxido nítrico reductasa (<i>Nor</i>)	Membrana celular	Grupo Hemo
Óxido nitroso reductasa (<i>Nos</i>)	Espacio periplásmico	Cobre

Reducción de NO_3^- a NO_2^- : Nitrato reductasa

En la primera etapa del proceso desnitrificante, NO_3^- atraviesa la membrana celular y se acopla a la enzima *Nar* para ser transformado a NO_2^- . Se han descrito 4 tipos de enzimas nitrato reductasas, dos de ellas son enzimas respiratorias, una acoplada a la membrana (*Nar*) y otra se localiza en el espacio periplásmico (*Nap*) (Cervantes, 2009). *Nar* está compuesta por diferentes subunidades:

1. Subunidad α : De peso molecular de 104-150 KDa, donde el sitio activo es contenido en molibdeno.
2. Subunidad β : De peso molecular de 118-150 KDa. Regula la transferencia de electrones entre las otras dos subunidades.
3. Subunidad γ : De peso molecular de 19-20 KDa y está ligada a la membrana celular.

Han sido propuestas que este mecanismo de reacción se localiza en el centro de molibdeno donde la etapa de reducción cambia de Mo(IV) a Mo(VI) (Cuervo et al., 2017).

Reducción de NO_2^- a NO: Nitrito reductasa

En este paso, NO_2^- es reducido a NO mediante la enzima nitrito reductasa. Algunos reportes han demostrado la participación de dos tipos de enzimas nitrito reductasa, pero con diferente grupo prostético por lo que son mutuamente excluidos. Por ello, pueden encontrarse solo un

tipo dentro de los microorganismos desnitrificantes (Cervantes, 2009). Una de estas enzimas contiene cobre como grupo prostético (CuNIR) y la otra es el citocromo *cd₁* con el grupo Hem como cofactor.

Reducción de NO a N₂O: Óxido nítrico reductasa

En esta etapa, NO es reducido hasta N₂O por la acción de la enzima óxido nítrico reductasa (*Nor*). Esta última es conocida también como citocromo *bc₁* y se ha logrado purificar y extraer de microorganismos como *Pseudomonas stutzeri*, *Paracoccus denitrificans*, *P. aeruginosa*, *Flexibacter canadensis* y *Achromobacter cycloclastes* (Cervantes, 2009).

Nor se le ha asociado a la membrana celular y se ha observado que sólo se sintetiza bajo condiciones anaeróbicas. Diferentes reportes mencionan que el óxido nítrico reductasa se compone de dos subunidades:

- 1) Citocromo *c* (*NorC*) con peso molecular de 17 KDa.
- 2) Citocromo *b* (*NorB*) con peso molecular de 53 KDa.

Los grupos prostéticos para esta enzima son Hem C, Hem B y Fe no-Hem, por lo que se ha mencionado que los sitios activos de la enzima se encuentran en el sitio binuclear y está compuesto de Hem B y no-Hem (Cervantes, 2009).

Reducción de N₂O a N₂: Óxido nitroso reductasa

La reducción de N₂O hasta N₂ es la última etapa del proceso desnitrificante, en la cual es catalizada por la enzima óxido nitroso reductasa (*Nos*). Esta enzima es soluble y se localiza en el espacio periplásmico con un peso molecular de 70 KDa. Se compone por subunidades, donde cada subunidad contiene cuatro diferentes átomos, los cuales son organizados en dos centros binucleares CuA y CuZ (Cervantes, 2009). Estudios acerca de la estructura tridimensional de CuZ han mostrado un átomo de sulfuro en el centro que es ligado con cuatro átomos de cobre (Cu I a Cu IV). Se ha propuesto que N₂O está relacionado con Cu IV.

3) Factores que afectan la desnitrificación

El desempeño del proceso desnitrificante es controlado por diferentes factores medioambientales como son la concentración, tipo y solubilidad de los sustratos, la relación

carbono-nitrógeno (C/N), temperatura y pH. Cada uno de ellos juegan un papel importante en el metabolismo y bioquímica de los microorganismos desnitrificantes (Cuervo et al., 2017).

En el caso de la relación C/N, diversos estudios han sugerido que, a una relación muy próxima a la estequiométrica, determinada entre los sustratos, se obtiene una desnitrificación completa. Además, esta relación controla la producción de biomasa.

En el caso de pH, se considera una variable independiente que afecta al proceso en diferentes niveles, pero el valor óptimo para un desempeño completo de los microorganismos es a pH cercano a 7 (Cuervo et al., 2017). Algunos estudios mencionan que a valores bajos de pH se puede presentar una inhibición en la reducción de óxido nitroso, por lo que la producción de N₂ se ve reducida (Cervantes, 2009).

En cuanto a la temperatura, se ha reportado un rango óptimo que va de los 20 a los 35 °C. Pero si éstos son menores o mayores, la cinética del proceso y el crecimiento bacteriano se verán afectados. Así también, los cambios de temperatura afectan directamente a la estructura de la membrana celular, así como la de lípidos y proteínas (Cervantes, 2009).

4) Cinética de la desnitrificación

La cinética de la desnitrificación se ha representado mediante el modelo de Monod, considerando los sustratos, tanto carbonados como nitrogenados empleados (Ecuación 1.1).

$$\mu = \mu_{max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \frac{[N]}{K_n + [N]} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Donde:

μ = velocidad específica de crecimiento.

μ_{max} = velocidad específica de crecimiento máxima.

$[S]$ = concentración de sustrato.

$[N]$ = concentración del sustrato nitrogenado y

K_s y K_n = constantes de saturación de cada sustrato usado.

Cervantes y col., 2000, mencionan que el valor de la constante de saturación K_n del nitrato es muy bajo cercano a $0.1 \text{ g N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$, por esta razón, la desnitrificación se ha considerado independiente de la concentración de esta especie, resultando de este modo la Ecuación 1.2.

$$\mu = \mu_{max} \frac{[S]}{K_S + [S]} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Donde:

μ = velocidad específica de crecimiento

μ_{max} = velocidad específica de crecimiento máxima

$[S]$ = concentración de sustrato.

K_S = constante de saturación

Las velocidades específicas, tanto de consumo de sustratos (q_s) como de formación de productos (q_p), también pueden ser calculadas a partir de la ecuación modificada de Monod (Ecuación 1.3), esta ecuación no considera el crecimiento microbiano (Beccari et al., 1983; Wiesmann, 1994; Cervantes et al., 2000).

$$q_S = q_{max} \frac{[S]}{K_S + [S]} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

Donde:

q_S = velocidad de consumo de sustrato o de formación de producto

q_{max} = velocidad específica máxima de consumo de sustratos

K_S = constante de saturación del aceptor de electrones

$[S]$ = concentración de sustrato

Cada etapa del proceso desnitrificante tiene una velocidad específica que depende de las características cinéticas de cada enzima, de este modo, si las enzimas involucradas en los últimos pasos presentan una velocidad de reacción menor que las de la primera etapa, habrá acumulación de intermediarios (Cervantes et al., 2000). En la literatura se encuentran reportes donde mencionan que la acumulación de N_2O es la etapa más lenta durante la reducción de

nitrate to N_2 and that can depend on the presence of some sulfur species such as H_2S , HS^- and S_2^- and the pH of the work (Phan et al., 2014).

II.- Antecedentes

2.1. Procesos fisicoquímicos para la eliminación de E2 y AMP

En los últimos años, diferentes procesos físicos y químicos se han aplicado para la eliminación de 17β -estradiol y ampicilina. Bennett et al. (2018) realizaron experimentos en lote aplicando un proceso de oxidación avanzada (POA) a una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de E2 como única fuente carbonada y en mezcla con sus metabolitos como estrona (E1) y estriol (E3). Los autores realizaron una irradiación con luz UV combinada con UV/H₂O₂ empleando una lámpara UV de mercurio de 1kW. Los resultados reportados mostraron eficiencias (E) de eliminación de E1, E2 y E3 de 64, 15 y 42 % respectivamente, después de 45 min de exposición. No se reportó el destino final de los contaminantes y aunque los tiempos de eliminación son cortos en comparación con los procesos biológicos, cabe la posibilidad de una acumulación de algunos radicales libres, considerados de alto riesgo para los seres vivos. Por otro lado, Kovacic et al. (2018) reportaron que al exponer $5 \mu\text{M}$ de E2 a luz emitida por una lámpara de Xe de 450 W, ajustándolo hasta $124.78 \pm 0.11 \text{ mW cm}^{-2}$ obtuvieron una E_{E2} de 30 % en menos de 95 min. Durante este tipo de procesos fotocatalíticos existe una amplia posibilidad de producción de algunos radicales libres como los hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), los cuales pueden generar mayores efectos negativos en el medio ambiente que el compuesto problema, como en el reporte de Bennett et al. (2018).

Kim et al. (2015) realizaron el estudio de la eliminación de E2 a concentraciones de 1 a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ mediante un sistema de ultrasonido con una potencia superior a los 2.2 kW, equivalente a una frecuencia de 20 kHz. En este estudio, la eficiencia de eliminación fue cercana al 60 % y la cinética de eliminación siguió una cinética de pseudo segundo orden. Aunque en este trabajo no se eliminó por completo E2, no se cuantificaron y detectaron metabolitos secundarios, pero tampoco los productos del proceso. Esto evidencia que el ultrasonido no elimina por completo E2 y no presentan potencial para su aplicación en sistemas de aguas residuales reales.

Para el caso de los antibióticos, también se han aplicado procesos fisicoquímicos para su eliminación en cuerpos de agua natural y residual, tal es el caso del estudio realizado por Biancullu et al. (2019), donde se tomaron aguas residuales que contenían concentraciones de azitromicina, trimetoprima, ofloxacino y sulfametoxazol en mezcla y a concentraciones de

100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se le aplicó un proceso fotocatalítico con TiO_2 e irradiado con luz UVA. Se reportaron eficiencias de foto degradación superiores al 99 % en menos de 60 min, pero con el uso de 4 lámparas Led y no sólo una. En este tipo de procesos, al producirse compuestos con radicales libres, pueden generar afectaciones al entorno en el que se encuentran y agravar la problemática ambiental.

2.2. Procesos biológicos para la eliminación de E2 y AMP

Por otro lado, los procesos biológicos son considerados amigables con el medio ambiente, ya que los productos generados no tienen las mismas propiedades químicas que los producidos en los procesos fisicoquímicos. Sin embargo, al igual que los POA, los resultados obtenidos por diferentes autores no han tenido una eficiencia completa o bien el tiempo de eliminación resulta muy largo en contaminantes como E2 y AMP. Por ejemplo, Li et al. (2020), reportaron que al estudiar la eliminación de 1 mg L^{-1} de E2 en reactores de membrana (MBR), inoculados con lodos nitrificantes, alcanzaron una E_{E2} de 96 a 98 % en 64 días, equivalentes a más de 1500 h de reacción. Asimismo, en este estudio se reportó la formación de metabolitos secundarios como E1 y no se mencionó el destino final del contaminante. En otro estudio, Fernández et al. (2017) reportaron eficiencias de consumo de 68 % en la biodegradación de 5 mg L^{-1} de E2, después de 90 días de ensayo, usando *Bacillus licheniformis*. Cabe mencionar que, a pesar de obtener eficiencias superiores al 50 % en los estudios antes mencionados, no se reportó el destino final de los contaminantes y debido a la incompleta eliminación, el E2 continúa incorporándose a cuerpos de agua natural, manteniendo la problemática ambiental. Amin et al. (2017) estudiaron la biodegradación de 200 mg L^{-1} de E2 en mezcla con E1 en un reactor MBR aireado, donde se obtuvieron eficiencias de biodegradación de 95 a 97 % en 16 días de tiempo de retención hidráulica (TRH). Aunque el tiempo de biodegradación fue de 16 días, casi 400 h, se concluyó que E2 es de fácil biodegradación comparado con otros compuestos hormonales sintéticos como etinilestradiol (EE2). Castellanos et al. (2021) estudiaron la capacidad de biodegradación de un lodo granulado al exponerlo a un agua residual que contenía 50 $\text{mg N-NH}_4^+ \text{L}^{-1}$, 16 $\text{mg P-PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$, 400 mg de COD L^{-1} y añadiendo 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de una mezcla de E2 y EE2, obteniendo eficiencias de biodegradación de 99 y 93 %, respectivamente. Lo que es similar a lo reportado por Amin et al. (2017).

Huang et al. (2019) evaluaron la biodegradación de 1 y 0.5 mg de E2 L⁻¹ mediante el uso de *chlorella*, reportando eficiencias de biodegradación de E2 de 65 y 92 %, respectivamente. En este estudio se evaluó el crecimiento de *chlorella* contrastándolo con la disminución en la concentración a lo largo del tiempo, concluyendo que a mayor concentración inicial de E2 en el experimento, mayor inhibición en el crecimiento.

En el caso de la ampicilina, se han evaluado procesos físicos y algunos biológicos para su biodegradación, tal es el caso del realizado por Ramírez et al. (2020) donde estudiaron en ensayos nitrificantes en lote, la eliminación 10, 20 y 50 mg L⁻¹ de C-AMP como único donador de electrones. Después de 24 h de reacción, reportaron eficiencias de consumo de hasta 70.5 % y de 99.7 %, de AMP y NH₄⁺, respectivamente. Asimismo, Islas et al. (2017) obtuvieron eficiencias superiores al 99 % en la biodegradación de 10 mg L⁻¹ de C-AMP, con 114 mg N-NO₃⁻ L⁻¹ usando un lodo desnitrificante. Sin embargo, en este proceso se añadieron 100 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ como cosustrato lo que permitió la mejora del proceso respiratorio desnitrificante para la completa biodegradación de ampicilina. Cabe mencionar que, en este estudio sí reportaron los productos finales del proceso, en donde se menciona que todo el C-AMP y C-CH₃COO⁻ y el N-NO₃⁻ fue transformado a C-HCO₃ y N₂, con rendimientos de producción superiores a 0.9.

En algunos casos, se ha estudiado el proceso desnitrificante para la biodegradación de otros antibióticos, como es el caso de lo reportado por Zhang et al. (2020), donde evaluaron la biodegradación de 20 µg L⁻¹ de sulfametoxazol (SMX) mediante un proceso desnitrificante en un reactor SBR, utilizando sulfuro como donador de electrones y NO₃⁻, como aceptor. En este trabajo se alcanzaron eficiencias de tan solo 30 % de eliminación de SMX, con una velocidad específica de consumo de 3.7 ± 1.4 µg g SS⁻¹ d⁻¹. Sin embargo, a pesar de tratarse de un proceso desnitrificante, no se menciona el destino final de los compuestos, como se ha reportado en otros estudios.

2.3 Antecedentes de la desnitrificación

Lodos con capacidad desnitrificante han sido utilizados para la biodegradación de compuestos recalcitrantes provenientes de la industria como la petroquímica y la farmacéutica. Con este proceso se ha logrado biodegradar estos contaminantes a compuestos inocuos para el medio ambiente y con altas eficiencias de biotransformación. Cabe mencionar

que la desnitrificación es uno de los únicos procesos en el que se monitorea el destino final de los contaminantes, es decir, los productos del proceso que en su mayoría son HCO_3^- y N_2 como lo muestra la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Algunas aplicaciones de la desnitrificación para la biodegradación de compuestos recalcitrantes industriales y farmacéuticos.

Compuesto	Concentraciones (sustratos)	Condiciones	Resultados	Referencia
p-cresol	10-65 mg L^{-1} 113.6 mg $\text{N-NO}_2^- \text{L}^{-1}$	Lodo desnitrificante 2 g SSV L^{-1} pH 7, 200 rpm C N^{-1} 0.088	$E_{p\text{-Cr}} = 100 \pm 0.15$ % $E_{\text{NO}_2^-} = 100 \pm 1.4$ % $Y_{\text{C-HCO}_3^-} = 1 \pm 0.15$ $Y_{\text{N}_2} = 1 \pm 0.01$ Sin intermediarios	(González et al., 2013)
Fenol	69-92 mg C-Fenol L^{-1} 60-108 mg C-Ac L^{-1}	Lodo desnitrificante 0.5±0.04 g SSV L^{-1} 1 pH 7, 200 rpm C N^{-1} 1	$E_{\text{C-2-CP}} = 94.7 \pm 5.3$ % $E_{\text{NO}_3^-} = 100 \pm 0.01$ % $Y_{\text{HCO}_3^-} = 0.99 \pm 0.05$ $Y_{\text{N}_2} = 0.94 \pm 0.02$ Sin intermediarios	(Martínez et al., 2012)
Benceno, tolueno y xileno	15-100 mg C-Tolueno L^{-1} 1 15-70 mg C-Xileno L^{-1}	Lodo desnitrificante 1.1±0.15 g SSV L^{-1} 1 pH 7, 200 rpm C N^{-1} 1	$E_{\text{C-Tol}} = 100$ % $E_{\text{C-Xileno}} = 60 \pm 0.9$ % $E_{\text{NO}_2^-} = 100$ y 65 % $Y_{\text{HCO}_3^-} = 0.85 \pm 0.01$ $Y_{\text{N}_2} = 0.98 \pm 0.02$ Sin intermediarios	(Peña et al., 2004)
Quinonas: Menadiona (MEN), alizarina (ALZ) y AQDS p-cresol	0.035, 0.2, 1.0 y 2.0 Mm de cada quinona y en mezcla con 50 mg C-p- cresol L^{-1} .	Lodo desnitrificante 1 g SSV L^{-1} pH 7 C/N 1.2	Afectaciones en la eliminación de p- cresol $E_{p\text{-cresol}}$ menores al 39 % debido a la presencia de quinonas.	(Cadena et al., 2019)

Tolueno	Cargas de 25, 50, 75, 100 y 125 mg C-Tolueno L ⁻¹ d ⁻¹ en mezcla con C-CH ₃ COO-	Reactor UASB C/N 1.4, TRH= 2 d, T= 30 °C, V= 1.4 L.	E _{C-Tolueno} ≥ 98% E _{N-NO3-} ≥ 87% Y _{C-HCO3-} ≥ 0.70 Y _{N2} ≥ 0.88 El proceso respiratorio del lodo se ve afectado por la presencia de Tolueno.	(Martínez et al., 2007)
	C-CH ₃ COO ⁻ /C-Tolueno: 65/20, 50/30, 30/50 y 10/70	Lodo desnitrificante 1 ± 0.11 g SSV L ⁻¹ pH = 7 30 °C y 150 rpm	E _{C-Tolueno} ≥ 96 % E _{C-CH3COO-} ≥ 96 % E _{N-NO3-} ≥ 96 % Y _{C-HCO3-} y Y _{N2} cercano a 1 Afectaciones en la cinética del proceso por Tolueno	(Martínez et al., 2009)

III.- JUSTIFICACIÓN

La gran lista del grupo de contaminantes emergentes continua en aumento, debido a que con el paso del tiempo se continúan identificando y cuantificando compuestos farmacéuticos, de uso personal, industriales y algunos otros provenientes de todas las diferentes actividades antropogénicas en cuerpos de agua natural. Dentro de este grupo se ha incluido a 17β -estradiol y ampicilina, dos compuestos farmacéuticos utilizados en el tratamiento de diferentes enfermedades en el ser humano y en animales. En estos tratamientos, un porcentaje del fármaco no es asimilado por completo en los cuerpos receptores, por lo que una cierta concentración es incorporada a cuerpos de agua natural mediante fuentes de agua residual. Incluso, 17β -estradiol es un estrógeno que se sintetiza de manera natural en hembras, por lo que su incorporación es natural y continua al medio ambiente. Diferentes estudios han asociado la presencia de E2 y ampicilina a concentraciones mínimas de ng L^{-1} con algunos problemas en fauna acuática como la feminización, disrupción endócrina, baja en la fertilidad, disminución en el conteo de espermatozoides y en el caso de AMP, contribuye en el aumento de bacterias resistentes a antibióticos.

Los procesos de tratamiento de aguas residuales convencionales no han logrado eliminar completamente estos compuestos. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha comenzado con el estudio de diferentes procesos fisicoquímicos para la eliminación de algunos contaminantes emergentes como E2 y AMP. No obstante, estos aún no consiguen alcanzar eficiencias completas de eliminación, no reportan los productos del proceso o bien, pueden generar especies más reactivas que el compuesto original.

Si bien, aún es mínima la literatura en cuanto al tratamiento de contaminantes emergentes con procesos biológicos, la desnitrificación ha demostrado biodegradar totalmente compuestos farmacéuticos y algunos industriales provenientes de la industria petroquímica con eficiencias de biodegradación completas y con productos inocuos para el medio ambiente como es HCO_3^- y N_2 . Por ello que se estudiará el proceso respiratorio de un lodo desnitrificante en presencia de E2 y AMP como fuentes donadoras de electrones.

IV.- OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

1. Evaluar la capacidad del proceso desnitrificante para la biodegradación de 17β -estradiol y ampicilina contenidos en agua, así como la toxicidad del efluente.

4.2. Objetivos específicos

1. Alcanzar el estado estacionario desnitrificante (EED) de un lodo de origen metanogénico proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Atotonilco de Tula en un reactor UASB alimentado con acetato de sodio como fuente de electrones y nitrato de sodio como aceptor de electrones.
2. Evaluar en ensayos en lote fenómenos físicos y químicos entre los sustratos en presencia y ausencia de lodo desnitrificante inactivo.
3. Evaluar en ensayos en lote la capacidad del consorcio desnitrificante para biodegradar acetato a diferentes concentraciones y los resultados obtenidos utilizarlos como referencia.
4. Evaluar en ensayos en lote la capacidad de un consorcio desnitrificante para la biodegradación de 17β -estradiol y ampicilina a diferentes concentraciones a una misma relación C/N.
5. Evaluar en ensayos en lote la capacidad de un consorcio desnitrificante para la biodegradación de 17β -estradiol, acetato y ampicilina a diferentes concentraciones a una misma relación C/N.
6. Evaluar la toxicidad del efluente de los ensayos con 17β -estradiol y ampicilina como únicas fuentes de electrones a través de un ensayo de micronúcleos (MN) en *Vicia faba*.

V.- METODOLOGÍA

5.1 Montaje y operación de reactor UASB

Se utilizó un reactor anaerobio de manto de lodos con flujo ascendente (Por sus siglas en inglés, UASB: Upflow Anaerobic Sluge Blanket) de 1.350 L de volumen de trabajo, alimentado en continuo bajo un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 2 días, pH de 8.147 \pm 0.7 y temperatura constante de 30 \pm 0.5 °C mediante el uso de un recirculador de agua Techne Tempette (mod TE-8D) (Islas et al., 2017; Martínez et al., 2004; Cuervo et al., 1999). El reactor se inoculó con 4.5 gr L⁻¹ de lodo anaerobio de origen metanogénico, proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Atotonilco de Tula, Hidalgo. La composición del influente del UASB consistió en 250 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ d⁻¹ como fuente de carbono y 138.89 mg N-NO₃⁻ L⁻¹ d⁻¹ como fuente de nitrógeno, manteniendo en todo momento una relación C/N de 1.8. Cada fuente se alimentó por separado con la finalidad de evitar la precipitación de compuestos del medio mineral. La composición del medio de cada fuente se muestra en la Tabla 5.1. El medio 1 corresponde a la fuente carbonada y el medio 2 a la de nitrógeno.

Tabla 5.1. Composición de medio de cultivo de alimentación del reactor UASB.

Medio mineral 1 (mg/L)		Medio mineral 2 (mg/L)	
C-CH ₃ COO ⁻	1000	N-NaNO ₃	555.55
KH ₂ PO ₄	1000	CuSO ₄ ·5H ₂ O	20
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	120	FeCl ₃ ·6H ₂ O	100
CaCl ₂ ·2H ₂ O	60		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	400		

El flujo volumétrico de biogás a la salida del UASB fue medido por desplazamiento y para ello se conectó la campana separadora de biogás del reactor a una columna invertida, la cual se sumergió en una solución ácida saturada de NaCl (200 g L⁻¹) a pH de 3 con la finalidad de evitar la solubilidad de los gases generados como se muestra en la Figura 5.1 (Martínez et al., 2007). Se evaluaron las concentraciones de los sustratos y de los productos a la entrada y salida del reactor, hasta que el lodo alcanzó el estado estacionario

desnitrificante (EED, $CV < 100\%$). Además, se calcularon eficiencias de consumo de sustratos (E), rendimientos de productos (Y), así como las velocidades volumétricas de cada compuesto (Q).

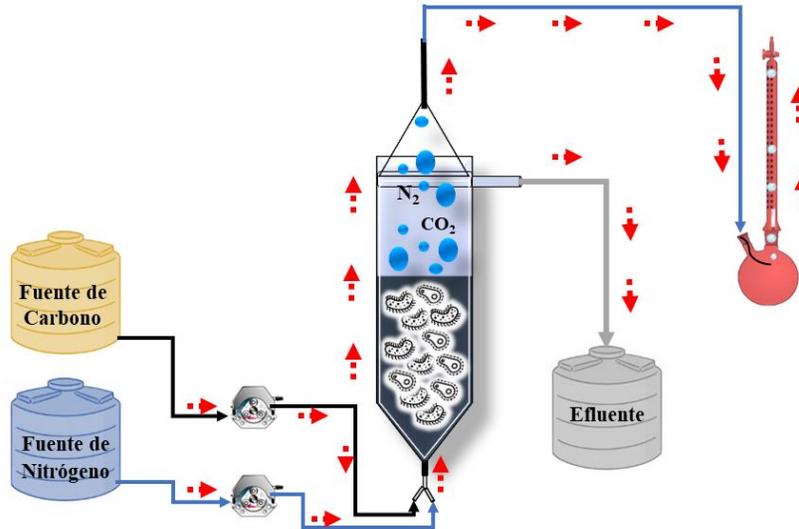


Figura 5.1. Diagrama de Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente (UASB).

5.2. Cultivos en lote

5.2.1. Medio de cultivo para ensayos en lote

Los ensayos en lote se realizaron en botellas serológicas de 60 mL, del cual 80% fue utilizado como volumen de trabajo y el 20% restante, como espacio de cabeza. A cada botella se añadió medio de cultivo, bajo la composición mostrada en la Tabla 5.2 (Islas et al., 2017) y las fuentes de nitrógeno y de carbono. Para suministro de nitrógeno se utilizó nitrato de sodio y para carbono acetato de sodio, E2 y AMP, respectivamente, dependiendo del tipo de cultivo.

Tabla 5.2. Composición de medio de cultivo para ensayos en lote.

Compuesto	mg L ⁻¹
KH₄PO₄	500
MgSO₄*7H₂O	100
FeCl₃*6H₂O	50
CuSO₄*5H₂O	10
Na₂MoO₄*H₂O	25
CaCl₂*2H₂O	150

Cada una de las botellas fueron inoculadas con 0.5 g de SSV L⁻¹ de lodo en régimen estacionario desnitrificante proveniente del reactor UASB, mismo que fue lavado en repetidas ocasiones con solución fisiológica (9% NaCl) (Martínez et al., 2012; Gómez & Goma, 1986). Además, las botellas fueron selladas herméticamente con tapas de goma y casquillos de aluminio y el oxígeno en el espacio de cabeza fue desplazado con una corriente de Argón de alta pureza durante 5 minutos, con la finalidad de mantener una atmósfera anóxica (Ramírez et al., 2017). Posteriormente fueron colocadas en una incubadora equipada con un agitador orbital, estableciendo una agitación de 200 rpm a 34°C (Islas et al., 2017). Para la construcción de los perfiles cinéticos de cada ensayo, se tomaron muestras líquidas y gaseosas de cada botella para su posterior análisis. Los ensayos se realizaron por duplicado donde cada una de las botellas representó una unidad de tiempo experimental y fueron desechadas después de su análisis.

5.2.2. Cultivos control abióticos y con biomasa inactiva

Con la finalidad de evaluar pérdidas de las concentraciones de E2, AMP, CH₃COO⁻ y NO₃⁻, por adsorción, reacción química o volatilización, se realizaron ensayos en los que se añadió medio mineral, nitrato y cada una de la fuente de electrones, por separado y en mezcla, tal como se muestra en la Tabla 5.3. La capacidad de adsorción del lodo fue evaluada mediante la comparación de 3 procesos de inactivación del lodo (1) esterilización a 101 °C y 115 kPa, durante 2 horas, (2) secado a 105 °C y 0.7 atm, durante 2 horas y (3) exposición a luz UV equivalente a una longitud de onda (λ) de 365 nm, por 2 horas.

Tabla 5.3. Ensayos control abióticos con E2, AMP y N-NO₃⁻ con tres procesos de inactivación de biomasa desnitrificante.

Compuesto	Ensayo control abiótico (mg L ⁻¹)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
C-E2	30	3.5		5	30	3.5		5	30	3.5		5	30	3.5		5
C-AMP			30	25			30	25			30	25			30	25
N-NO ₃ ⁻	27	3.1	27	27	27	3.1	27	27	27	3.1	27	27	27	3.1	27	27
Medio Mineral*	Aplica				Aplica				Aplica				Aplica			
Lodo estéril	-				500				-				-			
Lodo Seco	-				-				500				-			
Lodo expuesto a UV	-				-				-				500			

*Composición de medio mineral de acuerdo a la Tabla 5.2.

Se realizó el cálculo de un factor que relaciona la concentración de sustrato respecto al tiempo con la concentración inicial del mismo como se muestra en la ecuación 1. Esto con la finalidad de conocer el comportamiento de las concentraciones de los sustratos de los resultados de los 16 experimentos de este estudio y evaluar las diferencias entre cada pretratamiento de la biomasa.

$$Factor = \frac{C_n}{C_o} \tag{Ecuación 5.1}$$

Donde, C_n se refiere a la concentración de sustrato (mg L⁻¹) al finalizar el ensayo y C_o a la concentración inicial del sustrato (mg L⁻¹). Este factor mejora el entendimiento y la comparación de los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos, puesto que, si el valor es cercano a 1, no hubo pérdidas de sustratos. Por el contrario, si el resultado del factor es cercano a 0, las concentraciones del sustrato se perdieron casi por completo.

5.2.3. Ensayos desnitrificantes de referencia con acetato

Se realizaron ensayos desnitrificantes de referencia con CH₃COO⁻ como fuente única de electrones. Esto con el objetivo de evaluar metabólica y cinéticamente el proceso respiratorio desnitrificante del lodo. Se realizaron ensayos con 10, 20, 30 y 50 mg de C-CH₃COO⁻ L⁻¹ a una C N⁻¹ de 1.1 y 1.8 como se muestra en la Tabla 5.4, respectivamente. Cada uno se llevó

a cabo en botellas serológicas con las características anteriormente descritas, medio de cultivo y nitrato como aceptor de electrones, respectivamente.

5.2.4. Ensayos desnitrificantes con estradiol y ampicilina

Se evaluó la capacidad del lodo desnitrificante bajo las condiciones anteriormente descritas, pero con C-E2 y C-AMP como fuentes carbonadas por separado y en mezcla como se muestra en la Tabla 5.4. Se añadió el suficiente N-NO_3^- como aceptor de electrones para mantener una C/N de 1.1.

5.2.5. Ensayos desnitrificantes con estradiol, ampicilina y acetato en mezcla

Se realizaron cultivos con $\text{C-CH}_3\text{COO}^-$, C-E2 y C-AMP en mezcla como se muestra en la tabla 5.4. Se utilizó N-NO_3^- como aceptor de electrones y se añadió el suficiente para mantener una C/N de 1.1.

Tabla 5.4 Ensayos desnitrificantes en lote con $\text{C-CH}_3\text{COO}^-$, C-E2 y C-AMP por separado y en mezcla.

Ensayo	Composición (mg L^{-1})					
	C- CH_3COO^-	C-E2	C-AMP	COT	N- NO_3^-	C/N
I	10			10	9.09	1.1
II	20			20	18.18	1.1
III	30			30	16.66	1.8
IV	50			50	45.45	1.1
V		10		10	9.09	1.1
VI		20		20	18.18	1.1
VII			10	10	9.09	1.1
VIII			20	20	18.18	1.1
IX	3.3	3.3	3.3	10	9.09	1.1
X	10	10		20	18.18	1.1
XI		10	10	20	18.18	1.1
XII	10	10	10	30	27.27	1.1
XIII^a	20			20	18.18	1.1
XIV^b	20			20	18.18	1.1

^aEnsayo de recuperación con lodo de ensayo VI, ^bEnsayo de recuperación con lodo de ensayo VIII.

5.2.6. Ensayos de recuperación con acetato

Con la finalidad de evaluar el porcentaje de afectación de los lodos al exponerlos a un contaminante recalcitrante como E2 y AMP, se tomaron los lodos resultantes de los ensayos con 20 mg C-E2 L⁻¹ y 20 mg C-AMP L⁻¹ y se expusieron a 20 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹, por separado (Tabla 5.4). Estos fueron realizados con N-NO₃⁻ como aceptor de electrones a una C/N de 1.1.

5.3. Variables de respuesta del proceso en ensayos en lote y reactor UASB

La capacidad del lodo para metabolizar ciertos sustratos y biotransformarlos en un producto en específico fue evaluada mediante el cálculo de las eficiencias de consumo para cada fuente de carbono (E_{C-CH₃COO⁻}, E_{C-E2}, E_{C-AMP}) y de la fuente de nitrógeno (E_{N-NO₃⁻}), de acuerdo a las Ecuaciones 5.2.1 a 5.2.4 (González et al., 2012).

$$E_{C-CH_3COO^-} = \left(\frac{[C-CH_3COO^-] \text{ consumido}}{[C-CH_3COO^-] \text{ inicial}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 5.2.1}$$

$$E_{C-E2} = \left(\frac{[C-E2] \text{ consumido}}{[C-E2] \text{ inicial}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 5.2.2}$$

$$E_{C-AMP} = \left(\frac{[C-AMP] \text{ consumido}}{[C-AMP] \text{ inicial}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 5.2.3}$$

$$E_{N-NO_3^-} = \left(\frac{[N-NO_3^-] \text{ consumido}}{[N-NO_3^-] \text{ inicial}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 5.2.4}$$

De igual manera, se realizó el cálculo de los rendimientos de producción de nitrógeno gaseoso (Y_{N₂}), dióxido de carbono (Y_{C-CO₂}) y de ion bicarbonato ácido (Y_{C-HCO₃⁻}), mediante las Ecuaciones 5.3.1 a 5.3.3 (Peña et al., 2004).

$$Y_{N-N_2} = \frac{[N_2] \text{ formado}}{[N-NO_3^-] \text{ consumido}} \quad \text{Ecuación 5.3.1}$$

$$Y_{C-CO_2} = \frac{[CO_2] \text{ formado}}{[\text{Fuente orgánica}] \text{ consumida}} \quad \text{Ecuación 5.3.2}$$

$$Y_{C-HCO_3^-} = \frac{[C-HCO_3^-] \text{ formado}}{[\text{Fuente orgánica}] \text{ consumida}} \quad \text{Ecuación 5.3.3}$$

En el reactor UASB, se calcularon las velocidades volumétricas de consumo de sustratos ($Q_{N-NO_3^-}$ y $Q_{C-CH_3COO^-}$) y formación de productos (Q_{N_2} , Q_{CO_2} y $Q_{HCO_3^-}$) mediante las ecuaciones 5.4.1 a 5.4.5, con la finalidad de analizar la estabilidad del lodo hasta alcanzar el estado estacionario desnitrificante (EED), donde las variaciones en cada uno de los flujos fuera menor al 10% ($CV < 10\%$) (Martínez et al., 2007).

$$Q_{N-NO_3^-} = \frac{\text{mg N-NO}_3^- \text{ consumido}}{\text{Volumen} \times \text{tiempo}} \quad \text{Ecuación 5.4.1}$$

$$Q_{C-CH_3COO^-} = \frac{\text{mg C-CH}_3\text{COO}^- \text{ consumido}}{\text{Volumen} \times \text{tiempo}} \quad \text{Ecuación 5.4.2}$$

$$Q_{N_2} = \frac{\text{mg N}_2 \text{ producido}}{\text{Volumen} \times \text{tiempo}} \quad \text{Ecuación 5.4.3}$$

$$Q_{HCO_3^-} = \frac{\text{mg HCO}_3^- \text{ producido}}{\text{Volumen} \times \text{tiempo}} \quad \text{Ecuación 5.4.4}$$

$$Q_{CO_2} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ producido}}{\text{Volumen} \times \text{tiempo}} \quad \text{Ecuación 5.4.5}$$

La cinética del proceso respiratorio desnitrificante fue evaluada mediante el cálculo de las velocidades específicas de consumo de sustratos (q_{C-E_2} , q_{C-AMP} , $q_{C-CH_3COO^-}$ y $q_{N-NO_3^-}$) y formación de productos (q_{N_2} , q_{C-CO_2} y $q_{CHCO_3^-}$), las cuales son expresadas en función de la concentración de lodo. La determinación de estas variables se realizó empleando las Ecuaciones 5.5.1 a 5.5.7 en función del modelo de Gompertz (Salas et al., 2016).

Velocidades específicas de consumo de sustratos.

$$q_{C-CH_3COO^-} = \frac{\text{mg}_{C-CH_3COO^-} \text{ consumido}}{\xi_{\text{Proteína microbiana}} \times \text{tiempo}} \quad \text{Ecuación 5.5.1}$$

$$q_{C-E_2} = \frac{\text{mg}_{C-E_2} \text{ consumido}}{\xi_{\text{Proteína microbiana}} \times \text{tiempo}} \quad \text{Ecuación 5.5.2}$$

$$q_{C-AMP} = \frac{mg_{C-AMP} \text{ consumido}}{g_{\text{Proteína microbiana}} \times \text{tiempo}} \quad \text{Ecuación 5.5.3}$$

$$q_{N-NO_3^-} = \frac{mg_{N-NO_3^-} \text{ consumido}}{g_{\text{Proteína microbiana}} \times \text{tiempo}} \quad \text{Ecuación 5.5.4}$$

Velocidades específicas de generación de productos.

$$q_{C-CO_2} = \frac{mg_{C-CO_2} \text{ producido}}{g_{\text{Proteína microbiana}} \times \text{tiempo}} \quad \text{Ecuación 5.5.5}$$

$$q_{C-HCO_3^-} = \frac{mg_{C-HCO_3^-} \text{ producido}}{g_{\text{Proteína microbiana}} \times \text{tiempo}} \quad \text{Ecuación 5.5.6}$$

$$q_{N_2} = \frac{mg_{N_2} \text{ producido}}{g_{\text{Proteína microbiana}} \times \text{tiempo}} \quad \text{Ecuación 5.5.7}$$

Por último y con la finalidad de observar el destino final de cada uno de los sustratos, así como evaluar acumulaciones a lo largo de los experimentos, se realizaron balances de materia tanto de las especies nitrogenadas y carbonadas, siguiendo las ecuaciones 5.6.1 y 5.6.2 (González et al., 2013).

$$\frac{dC}{dt} = [N - NO_3 \text{ Entrada}] - [N - NO_3 \text{ Salida}] - [N - N_2 \text{ Salida}] - [N - NO_2 \text{ Salida}] = 0 \quad \text{Ecuación 5.6.1}$$

$$\frac{dC}{dt} = [C - \text{Acetato} \text{ Entrada}] - [C - \text{Acetato} \text{ Salida}] - [C - HCO_3 \text{ Salida}] - [C - CO_2 \text{ Salida}] = 0 \quad \text{Ecuación 5.6.2}$$

5.4 Métodos analíticos

Para la construcción de los perfiles cinéticos de cada especie química en los ensayos en lote, así como el reactor UASB, se analizó cada compuesto mediante el uso de diferentes métodos analíticos, de los cuales se realizaron sus respectivas curvas de calibración por triplicado. Con cada curva se estimó la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (r^2), con la finalidad de establecer la linealidad y reproducibilidad de los resultados de cada método utilizado.

5.4.1. Análisis de iones NO_2^- y NO_3^-

Las concentraciones de iones NO_2^- y NO_3^- fueron determinadas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC, por sus siglas en inglés) adaptando el método de (Cadena et al., 2018). Para ello, se utilizó un HPLC marca Perkin Elmer, Series 200 (USA) equipado con detector UV-visible, en donde se estableció una longitud de onda (λ) de 214 nm. Se empleó una columna aniónica IC-Pak Anion HR con una longitud de 75 mm y diámetro interno de 4.6 mm, a la cual se hizo pasar un flujo de 1 mL min^{-1} de una fase móvil compuesta por 2% en volumen de una solución de Gluconato-Borato, 2% Butanol, 12% Acetonitrilo grado HPLC y 84% de agua grado HPLC. La composición de la solución Gluconato-Borato fue de (g L^{-1}) Gluconato de sodio (16), Ácido bórico (18), Tetraborato de sodio decahidratado (25) y 25% en volumen de Glicerol. La fase móvil y cada una de las muestras, fueron filtradas previamente, utilizando una membrana de nylon de 0.4 y 0.20 μm de tamaño de poro, respectivamente. El volumen de inyección fue de 20 μL a temperatura ambiente con un tiempo de corrida de 10 min, la toma de datos se realizó mediante el software TC Nav versión 6.3.1.

Para la construcción de las curvas de calibración se emplearon soluciones estándares de NO_3^- y NO_2^- , equivalentes a concentraciones madre de 605 mg L^{-1} y a partir de estas, se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 80 y 100 mg N L^{-1} . Posteriormente, se inyectaron por duplicado en el HPLC. A manera de ejemplo, en las Figuras 5.2 y 5.3 se muestran las curvas de calibración resultantes para N- NO_2^- y N- NO_3^- , respectivamente, donde se contrastó la respuesta eléctrica del equipo con la concentración de cada estándar, demostrando que la respuesta del equipo fue lineal y reproducible.

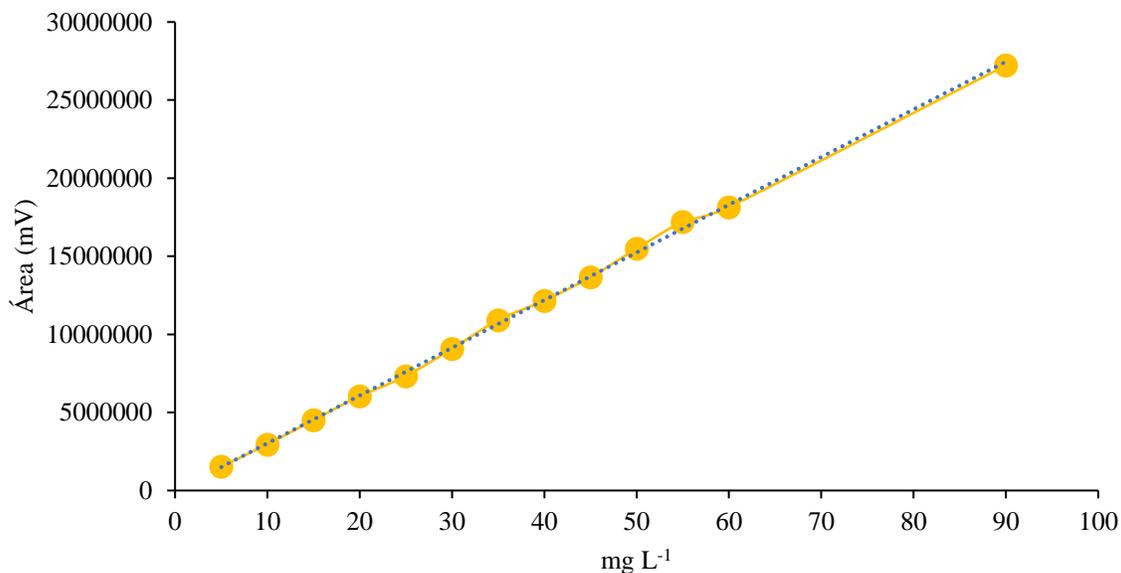


Figura 5.2. Ejemplo de curva de calibración para N-NO₂⁻. $m=305451$, $b= -28659$ y $r^2= 0.9992$.

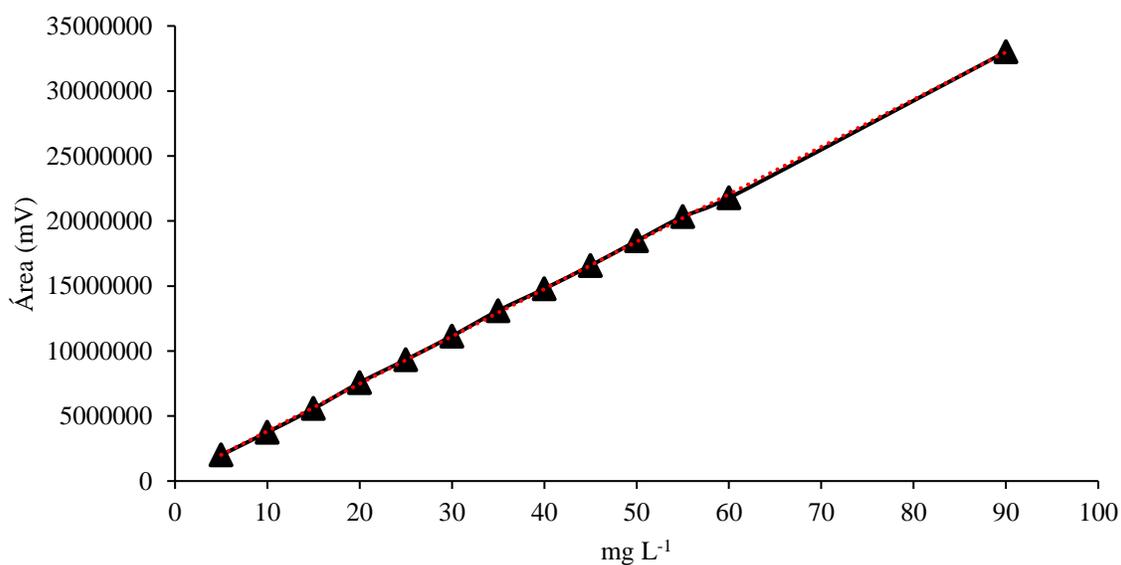


Figura 5.3. Ejemplo de curva de calibración para N-NO₃⁻. $m=364377$, $b= 193304$ y $r^2= 0.9998$.

5.4.2. Análisis de N₂ y CO₂

N₂ y CO₂ fueron cuantificados mediante un cromatógrafo de gases (CG) Perkin Elmer modelo Autosystem XL (USA) de acuerdo al método reportado por (Cadena et al., 2018). El GC estuvo equipado con un detector de conductividad térmica (TCD), así como una columna capilar HP-PLOT/Q, marca Agilent Technologies (USA) de 30 m de longitud, 0.530 mm de diámetro interno y 40 μm de tamaño de partícula. Como fase móvil se utilizó argón de ultra alta pureza a un flujo de 10 mL min⁻¹. Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron de 60°C, 100°C y 200°C, respectivamente. El tiempo de análisis fue de 5 minutos. El volumen de inyección fue de 100 μL y para la adquisición de datos se utilizó el software TC Nav versión 6.3.1.

Los estándares para la curva de calibración fueron preparados en relación a la ley de los gases ideales, donde 1 mol de gas ocupa un volumen de 30.545 L. Con ello se lograron establecer los volúmenes de N₂ y CO₂ para cada estándar. El cálculo de las concentraciones estándares de los gases se obtuvo mediante las ecuaciones 5.7.1 y 5.7.2.

$$\text{Concentración}_{\text{N}_2\text{Cabeza}} = \frac{\left(\frac{\text{Concentración}_{\text{N}_2} * \text{Volumen}_{\text{N}_2} * \text{PM}_{\text{N}_2}}{\text{Volumen}_{\text{N}_2\text{Cabeza}}} \right)}{1000} = \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \quad \text{Ecuación 5.7.1}$$

$$\text{Concentración}_{\text{CO}_2\text{Cabeza}} = \frac{\left(\frac{\text{Concentración}_{\text{CO}_2} * \text{Volumen}_{\text{CO}_2} * \text{PM}_{\text{CO}_2}}{\text{Volumen}_{\text{CO}_2\text{Cabeza}}} \right)}{1000} = \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \quad \text{Ecuación 5.7.2}$$

Dónde, la concentración de N₂ y CO₂ fue considerada en mol L⁻¹, el volumen en litros (L) y el peso molecular de cada compuesto gaseoso en g mol⁻¹. Para la preparación de cada una de las muestras se utilizaron botellas serológicas de 60 mL, donde el 80% de volumen fue llenado con una solución saturada de NaCl (200 g L⁻¹) y el 20% restante fue establecido como volumen de cabeza considerado en cada una de las expresiones matemáticas. Cada botella fue sellada con septa de goma y casquillo de aluminio y con la finalidad de mantener bajo condiciones anóxicas el espacio de cabeza, se hizo pasar una corriente de argón extra puro durante 5 min. Los volúmenes utilizados de N₂ y CO₂ para el cálculo de las concentraciones

fueron ajustados a 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 μL , equivalentes a concentraciones de N_2 de 8.63, 17.26, 25.89, 34.52, 43.15, 51.78, 60.44, 69.04, 77.67 y 86.30 mg L^{-1} y de CO_2 de 13.56, 27.12, 40.69, 54.25, 67.82, 94.95, 108.51, 122.08 y 135.64 mg L^{-1} , respectivamente. A manera de ejemplo, en las Figuras 5.4 y 5.5 se muestran las curvas de calibración resultantes, contrastando el área bajo la curva de la respuesta eléctrica en el GC en relación a la concentración de los gases.

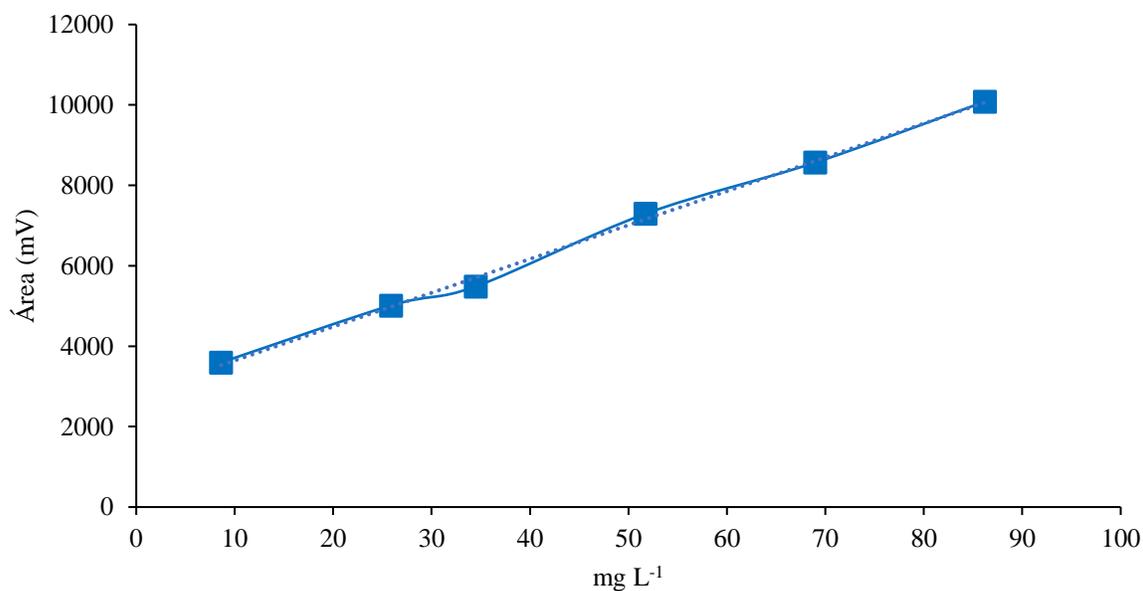


Figura 5.4. Ejemplo de curva de calibración para N_2 . $m=84.209$, $b=2801.5$ y $r^2= 0.9974$.

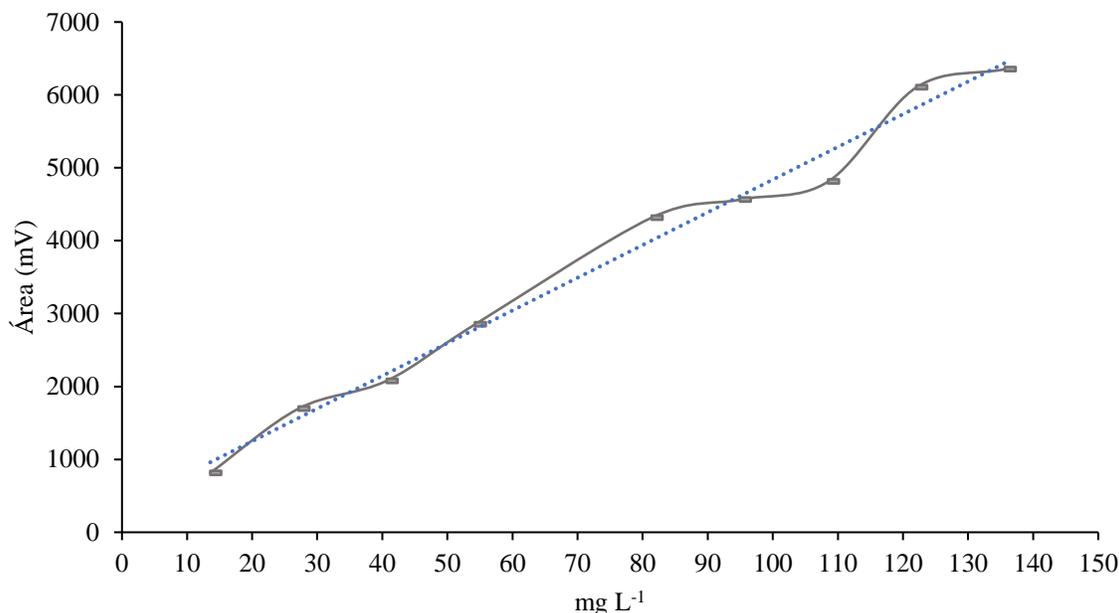


Figura 5.5. Ejemplo de curva de calibración para CO₂. $m=44.869$, $b= 350.74$ y $r^2= 0.987$.

5.4.3. Análisis de CH₃COO⁻

La concentración de CH₃COO⁻ fue cuantificada mediante la metodología propuesta por (Islas et al., 2017), en donde se empleó un cromatógrafo de gases (CG) marca Perkin Elmer AutoSystem XL, equipado con un detector de ionización de flama (FID) y de una columna capilar DB-1701, marca Agilent Technologies (USA), de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de tamaño de partícula. Como fase móvil se utilizó N₂ cromatográfico a un flujo de 1 mL min⁻¹, las temperaturas de operación de horno, inyector y detector fueron 180°C, 230°C y 260°C, respectivamente. El volumen de inyección de la muestra fue de 1 μL.

Para construir la curva de calibración de CH₃COO⁻, se preparó una solución madre de 100 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ y a partir de esta, se realizaron disoluciones para obtener concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 y 90 mg/L. Se tomaron 900 μL de muestra filtrada, se colocaron en un vial de 2.5 mL y se añadieron 100 μL de HCl al 38% con la finalidad de acidificar la muestra y así, obtener ácido acético sin disociar para su respectivo análisis. Los gráficos de las curvas de calibración se construyeron a partir de los valores promedio obtenidos del área bajo la curva en los cromatogramas. La Figura 5.6 muestra un

ejemplo de la curva de calibración obtenida, en la que se describe la linealidad de los datos bajo una regresión lineal.

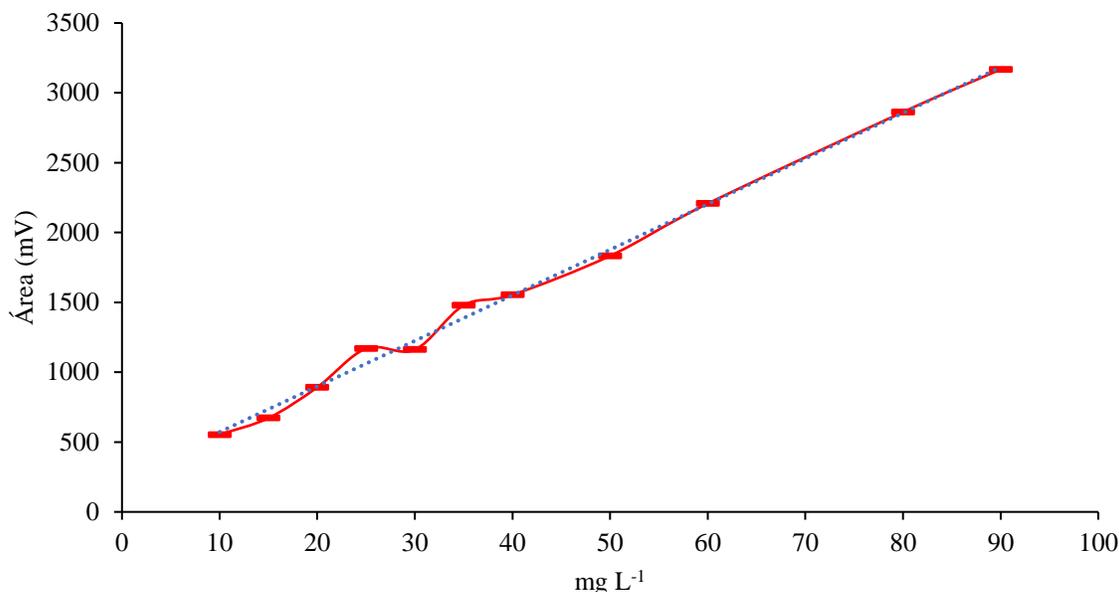


Figura 5.6. Ejemplo de curva de calibración para CH_3COO^- . $m=32.629$, $b=245.74$ y $r^2= 0.9958$.

5.4.4. Análisis de 17β -estradiol

Las concentraciones de E2 fueron determinadas mediante un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC: High Performance Liquid Chromatography), marca Perkin Elmer series 200 (USA) equipado con un detector UV-visible en donde se estableció una longitud de onda (λ) de 230 nm. Se empleó una columna Symmetry C8 marca Waters (4.6 x 250 mm, 5 μm) a la cual, se hizo pasar una fase móvil compuesta por acetonitrilo-agua (50:50 v/v) a un flujo de 1 mL/min, con una duración de corrida de 10 min, de acuerdo al método reportado por (Orozco et al., 2019; Shareef et al., 2006)

Para la construcción de las curvas de calibración se emplearon soluciones estándares de 17β -estradiol (Sigma, Número de CAS 200-023-8). Se preparó una solución madre con una concentración de 100 mg/L y a partir de esta, se realizaron diluciones hasta obtener concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 y 100 mg/L. Posteriormente se inyectaron 20 μL en el equipo de HPLC. Cada análisis se realizó por

duplicado y todas las muestras se filtraron previamente, utilizando una membrana de 0.20 μm de tamaño de poro. Un ejemplo de la curva obtenida para E2, se muestra en la Figura 5.7.

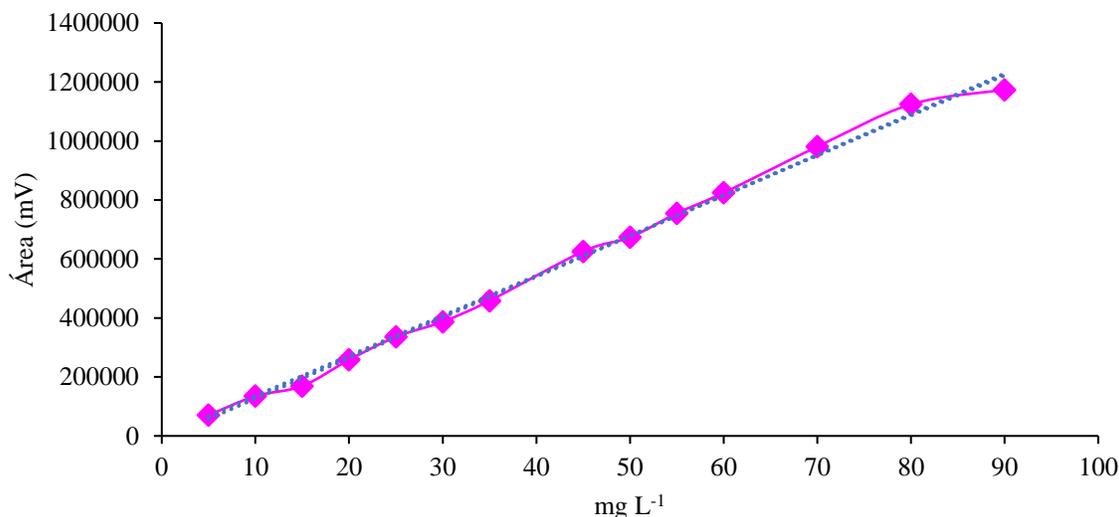


Figura 5.7. Ejemplo de curva de calibración para 17 β -estradiol (E2). $m=13775$, $b= -11213$ y $r^2= 0.9961$.

5.4.5. Análisis de ampicilina

La concentración de ampicilina fue determinada usando un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC: High Performance Liquid Chromatography), marca Perkin Elmer series 200 (USA), equipado con un detector UV-visible en donde se estableció una longitud de onda (λ) de 230 nm, empleando una columna Symmetry C8 marca Waters (4.6 x 250 mm, 5 μm). Como fase móvil se utilizó una solución de 10% en volumen de Acetonitrilo, 8% Metanol y 1% Solución Fosfato Monobásico de Potasio 1M, con un flujo de 1 mL/min y una duración de corrida de 10 min, de acuerdo a lo reportado por Ramírez et al., (2020).

Para la construcción de las curvas de calibración se emplearon soluciones estándares de Ampicilina (Sigma, Número de CAS 7177-48-2). Se preparó una solución madre con una concentración de 100 mg/L y a partir de ésta, se realizaron diluciones hasta obtener concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 y 100 mg/L. Posteriormente se inyectaron por duplicado en el equipo de HPLC, donde el volumen de inyección fue de 20 μL . Todas las muestras se filtraron previamente, utilizando una

membrana de nylon de 0.20 μm de tamaño de poro. Un ejemplo de la curva de calibración de ampicilina se muestra en la Figura 5.8.

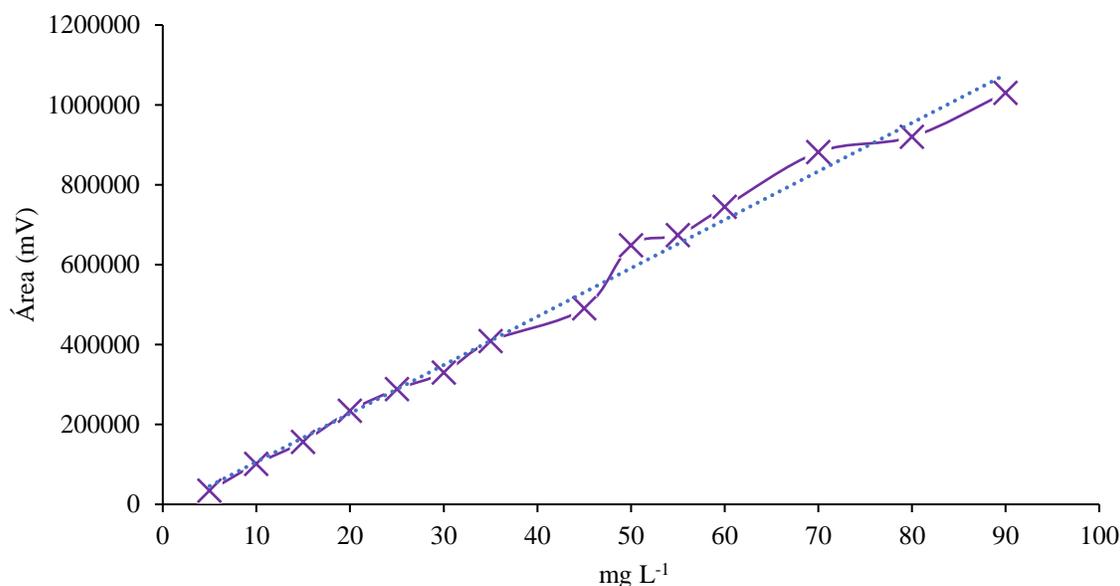


Figura 5.8. Ejemplo de curva de calibración para Ampicilina (AMP). $m=12120$, $b= -14786$ y $r^2= 0.9907$.

5.4.5. Análisis de carbono total (CT) y carbono inorgánico (CI)

TC e IC fueron cuantificados mediante un analizador de carbono orgánico total marca Shimadzu, de acuerdo a lo reportado por Martínez et al. (2019) y Usyskin et al. (2020). Para cuantificar TC, la muestra es introducida al tubo de combustión de TC, en el cual se realiza una oxidación catalítica de la muestra a 680 °C y es alimentado con aire a un flujo de 150 mL/min. Los compuestos resultantes de la calcinación de la muestra en el tubo de combustión se convierten hasta CO_2 . Los productos de la combustión son acarreados del tubo de combustión al deshumidificador electrónico, donde el gas es enfriado y deshidratado. El gas acarreador con los productos resultantes se pasa a un depurador de halógenos para remover cloro y algunos otros halógenos. Finalmente, los gases son llevados al analizador no dispersivo infrarrojo, donde el CO_2 es detectado. En el caso del análisis de IC, consistió en la acidificación de la muestra con HCl a pH de 3, donde todos los carbonatos disueltos son desprendidos de la muestra y convertidos a dióxido de carbono. CO_2 es detectado por el

analizador no dispersivo infrarrojo. La diferencia entre la concentración de TC e IC, correspondió a la concentración de carbono orgánico total (TOC).

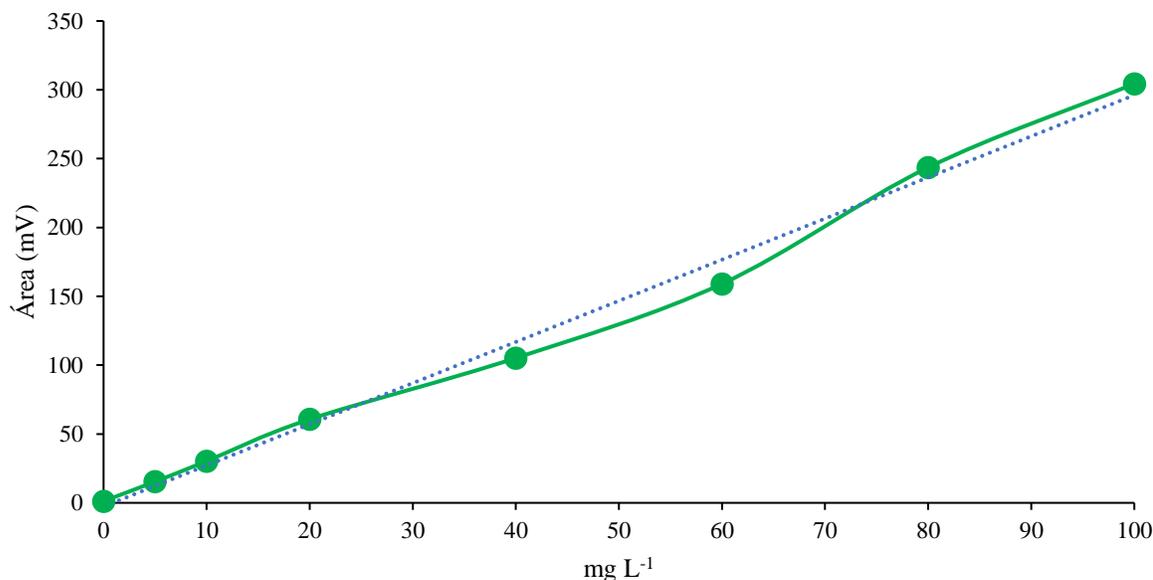


Figura 5.9. Ejemplo de curva de calibración para IC. $m= 2.9885$, $b= - 2.6794$ y $r^2= 0.993$.

5.5. Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Para la evaluación de los sólidos suspendidos se empleó el método establecido por APHA (1999). Para ello se emplearon crisoles de 20 mL, los cuales se colocaron en una estufa Oven 20/300 LSN11 a una temperatura de 100°C hasta un peso constante. Posteriormente, se les agregó 10 mL de lodos provenientes del reactor UASB. Cada muestra de lodo fue secada por 2 horas a 100°C. Se colocaron en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, fueron pesados y con la diferencia de los pesos del crisol sin muestra y con muestra, se determinaron los sólidos suspendidos totales (SST), como se muestra en la ecuación 5.8.1. Una vez determinados los SST, las muestras de lodo fueron calcinadas a 500°C durante una hora para obtener los sólidos suspendidos fijos (SSF), como se muestran en la ecuación 5.8.2. Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se obtuvieron por la diferencia de SST y SSF (Ecuación 5.8.3).

$$SST = \frac{\text{masa}_{\text{Crisol Horno}} - \text{masa}_{\text{Crisol vacío}}}{\text{Volumen muestra}}$$

Ecuación 5.8.1

$$SSF = \frac{\text{masa}_{\text{Crisol Mufla}} - \text{masa}_{\text{Crisol vacío}}}{\text{Volumen muestra}}$$

Ecuación 5.8.2

$$SSV = SST - SSF$$

Ecuación 5.8.3

5.6. Evaluación de toxicidad: ensayo de MN

Se realizaron ensayos de micronúcleos (MN) con semillas de haba (*Vicia faba*), con la finalidad de evaluar el grado de genotoxicidad de los efluentes de los ensayos en lote con E2 y AMP, de acuerdo a la metodología reportada por García (2012). Para ello, se utilizaron 48 habas, las cuales fueron lavadas, inhibidas y germinadas con agua de la llave hasta que la raíz alcanzó una longitud de 3 cm. Se tomaron 3 muestras de efluentes de los ensayos en lote con 20 mg C-E2 L⁻¹ y 20 mg C-AMP L⁻¹, como únicas fuentes de electrones por separado. Se colocaron 6 semillas germinadas de modo que la raíz quedó en contacto con las muestras de los ensayos, durante 6 h. Posteriormente se enjuagaron y se colocaron en baño de recuperación por 22 h con agua corriente. A la par, se colocó un testigo negativo con agua destilada. Pasado este proceso, se cortaron 5 mm de raíz y se fijaron en una solución de etanol-ácido acético (3:1, v/v) hasta su tinción.

Para la tinción, se colocaron los meristemas de las semillas de *V. faba* en etanol al 70 % durante 20 min a 28 °C. Se eliminó todo el etanol y se hidrolizaron con HCl 5 N a 28 °C por 30 min. Se lavaron 3 veces con agua destilada, se secaron con papel absorbente y se les agregó reactivo de Schiff a 28 °C durante 30 min, bajo condiciones de oscuridad.

Después, cada meristemo se colocó en un portaobjetos, se agregó una gota de ácido acético al 45 %, se cubrió con un cubreobjetos y se aplastó el tejido con la goma de un lápiz hasta formar una monocapa uniforme.

La frecuencia de MN fue contabilizada en 1000 células en interfase, mediante el uso de un microscopio óptico con un aumento de 40x. Los criterios para la selección de los MN fueron los siguientes:

1. El diámetro de un MN estuvo entre 1/16 a 1/3 de la media del diámetro del núcleo principal.
2. Los MN no so refractarios.

3. La intensidad de la tinción del MN es similar al núcleo principal.
4. El MN no está conectado con el núcleo principal.
5. Los MN se encuentran en el mismo plano del núcleo.

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Fuente de inóculo de reactor UASB

El reactor UASB fue inoculado con 4.5 gr de SSV L⁻¹ de un lodo de origen metanogénico proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Atotonilco de Tula, Hidalgo, México. Se monitoreo durante 136 días, manteniendo un pH de 8.147 ± 0.71 y una temperatura en 30 ± 0.01 °C, como se muestra la Figura 6.1 y se ha reportado en otros estudios (Albina et al., 2021). El lodo alcanzó el Estado Estacionario Desnitrificante (EED) (CV<10 %) en este lapso de tiempo. Mantener un lodo bajo las condiciones antes mencionadas, modifica el proceso respiratorio de los microorganismos y los vuelve desnitrificantes como se ha reportado la estabilización completa de lodos de origen metanogénico a régimen desnitrificante como lo menciona Cervantes (2009) en rangos de pH de 7 a 8.2, así como de temperatura, entre 30 a 35 °C.

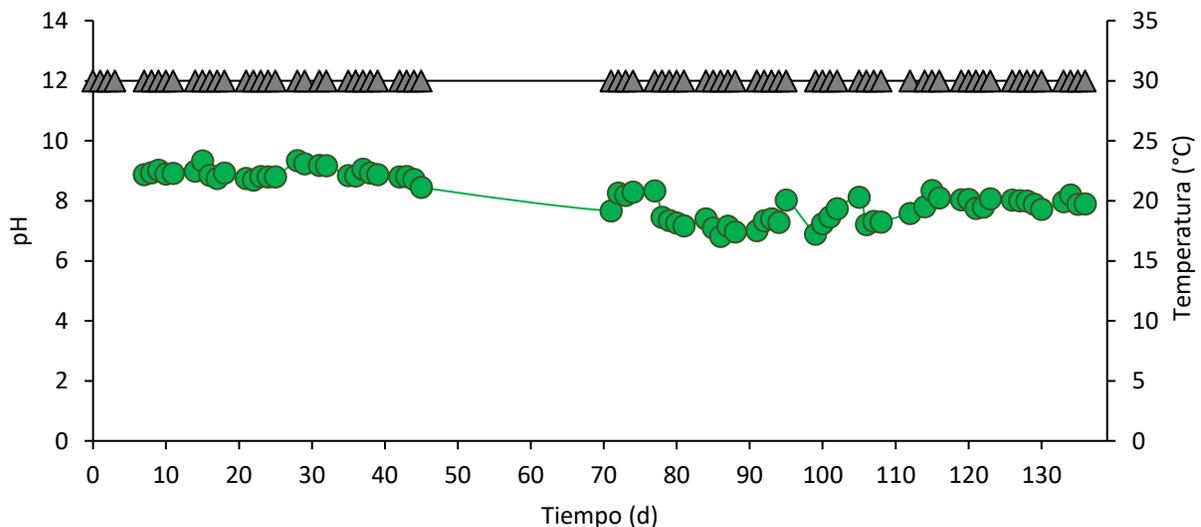


Figura 6.1. Evaluación de pH (●, eje primario) y Temperatura (▲, eje secundario) del reactor UASB.

La carga de alimentación de la fuente carbonada fue continua de 250 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ d⁻¹ y de nitrógeno de 138 mg N-NO₃⁻ L⁻¹ d⁻¹ (Figura 6.2), manteniendo en todo momento una relación C/N de 1.8 como se ha reportado en estudios anteriores (Martínez-Gutiérrez et

al., 2019). Esta última favoreció la síntesis celular como se ha reportado en otros estudios, dado que fue superior a la estequiométrica (C/N 1.07, ecuación 6.1). En este sentido, la biomasa inicial (4.5 g SSV L^{-1}) con la que se inoculó el UASB aumentó 222 % ($10.03 \text{ g SSV L}^{-1}$) después de 136 días de evaluación. La biomasa generada fue utilizada como inóculo en los ensayos en lote posteriores.

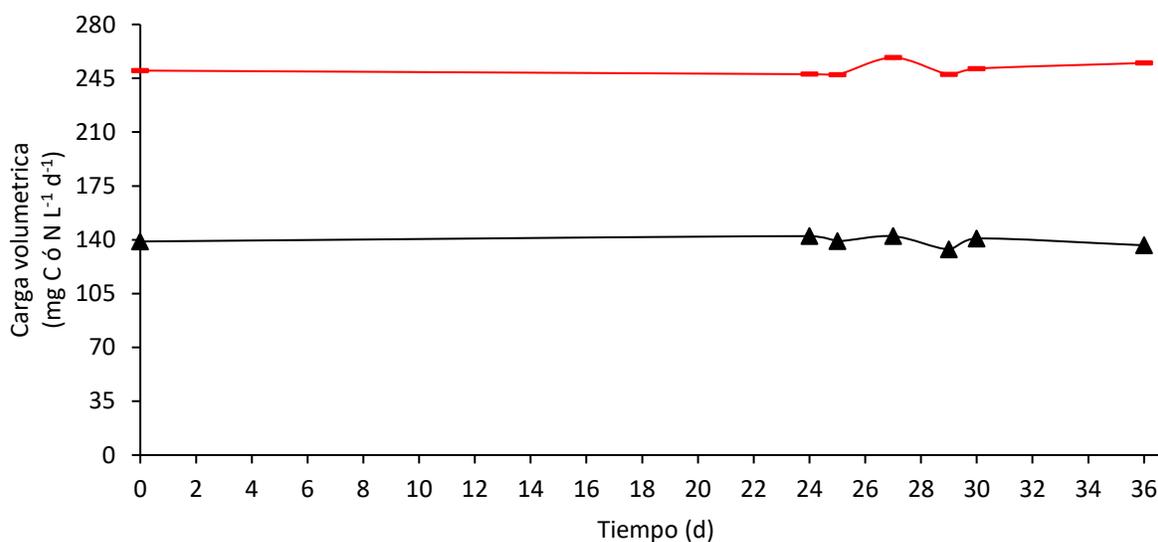


Figura 6.2. Perfil cinético de las cargas volumétricas (Q) de carbono y nitrógeno que alimentaron al reactor UASB. (—) C- CH_3COO^- , (\blacktriangle) N- NO_3^- .

Los resultados de la evaluación de las cargas volumétricas de los sustratos y productos a la entrada y salida del reactor UASB (Figuras 6.2 y 6.3), muestran que el lodo alcanzó el EED pasados 90 días de operación. Las velocidades de producción de N_2 y HCO_3^- se mantuvieron en $127.71 \pm 3.46 \text{ mg N}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $247.73 \pm 5.86 \text{ mg C-HCO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente ($\text{CV} < 3 \%$). En otros estudios, se han reportado diferentes lapsos de tiempo para la estabilización de lodos originalmente metanogénicos, como es el caso del trabajo realizado por Peña y col. (2004) donde en 150 días de operación de un reactor, se alcanzó el EED de un lodo inicialmente metanogénico. Islas et al. (2017) estabilizaron un lodo en un reactor UASB en un tiempo menor a lo reportado por Peña, solo 69 días, pero Banda et al. (2016) reportaron 35 días para alcanzar el EED. Esta diferencia de tiempo de adaptación y aclimatación de cada uno de los lodos puede ser dependiente de su origen, dado que no en

todas las plantas de tratamiento de aguas residuales se reciben influentes con la misma cantidad de contaminantes y los lodos son expuestos a una gran variedad de sustancias recalcitrantes que pueden mejorar su metabolismo cuando se exponen a compuestos de fácil biodegradabilidad como CH_3COO^- (Chávez et al., 2011).

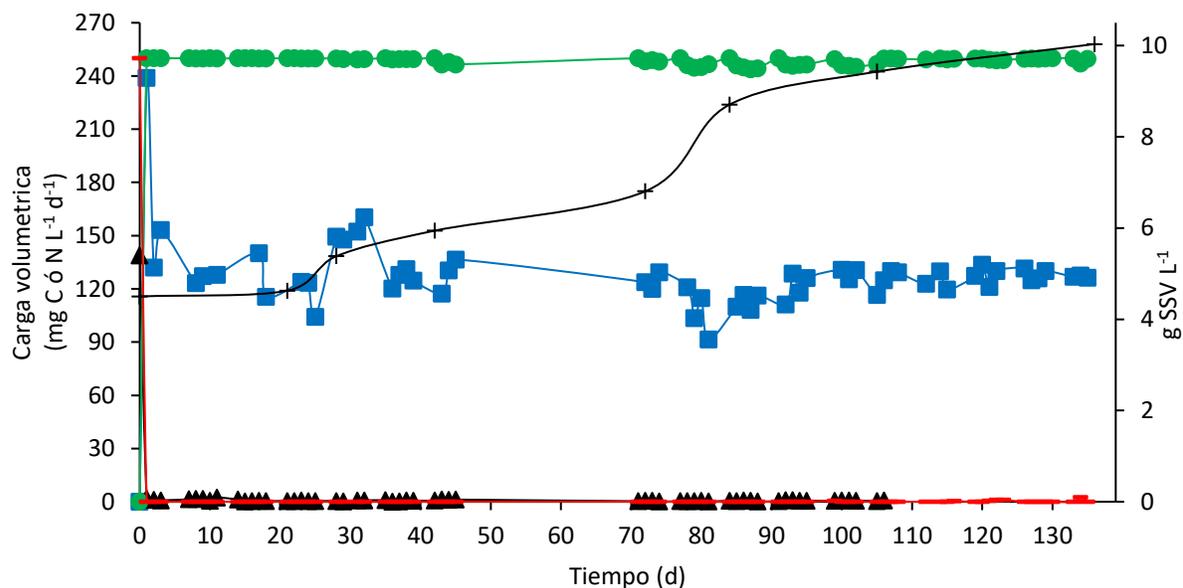


Figura 6.3. Cinética de cargas volumétricas de especies carbonadas y nitrogenadas a la salida del reactor UASB, así como cinética de crecimiento bacteriano del lodo en el reactor. Eje primario: (—) $\text{C-CH}_3\text{COO}^-_{\text{Residual}}$, (●) C-HCO_3^- , (▲) $\text{N-NO}_3^-_{\text{Residual}}$, (■) N_2 . Eje secundario: (+) Biomasa producida.

Los resultados del cálculo de las variables de respuesta del proceso en el reactor UASB, se obtuvieron $E_{\text{C-CH}_3\text{COO}^-}$ y $E_{\text{N-NO}_3^-}$ de 99.74 ± 0.01 y 99.36 ± 0.01 % (Tabla 6.1), respectivamente. Los $Y_{\text{C-HCO}_3^-}$ y Y_{N_2} fueron de 0.91 ± 0.01 y 0.91 ± 0.01 , respectivamente. Esto demuestra que el lodo adquirió la capacidad desnitrificante completa, puesto que el CV de cada una de las variables fue menor al 10 % y los únicos productos generados fueron HCO_3^- y N_2 . Asimismo, no se observó la formación y acumulación de intermediarios carbonados y nitrogenados de acuerdo a los resultados del balance de materia que se muestra en la Tabla 6.2.

Tabla 6.1. Resultados de eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de formación de productos en el reactor UASB.

Variable de respuesta	Valor
$E_{C\text{-acetato}}$ (%)	99.74 ± 0.01
$E_{N\text{-NO}_3^-}$ (%)	99.36 ± 0.01
$Y_{C\text{-HCO}_3^-}$ (mg C-HCO ₃ ⁻ / mg C-acetato consumido)	0.91 ± 0.01
Y_{N_2} (mg N ₂ / mg N-NO ₃ ⁻ consumido)	0.91 ± 0.01
$Y_{C\text{-CO}_2}$ (mg C-CO ₂ / mg C-acetato consumido)	0.001 ± 0.01
$Y_{C\text{-biomasa}}$ (mg biomasa / mg C-acetato consumido)	0.09 ± 0.01

Se cuantificó la producción de 0.0066 ± 0.0018 mg L⁻¹ d⁻¹ de C-CO₂, único intermediario, el cual se consideró una carga despreciable, comparado con la carga de producción de Q_{C-HCO₃⁻}.

Tabla 6.2. Cargas volumétricas de especies carbonadas y nitrogenadas a la entrada y salida del reactor UASB.

Especie	Entrada	Salida			
Carbono	Q_{C-acetato entrada}	Q_{C-acetato salida}	Q_{C-CO2}	Q_{C-HCO₃⁻}	Q_{C-biomasa}
mg L ⁻¹ d ⁻¹	250.00 ± 0.001	0.0687 ± 0.0003	0.0066 ± 0.0018	228.39 ± 0.8155	24.36 ± 2.53
Nitrógeno	Q_{N-NO₃⁻ entrada}	Q_{N-NO₃⁻ salida}	Q_{N-NO₂⁻}	Q_{N₂}	Q_{N-biomasa}
mg L d	138.88 ± 0.001	0.8580 ± 0.0423	ND	127.71 ± 3.46	5.68 ± 0.59

6.2. Evaluación de fenómenos físicos y químicos en ensayos abióticos en lote

Se realizaron 16 ensayos abióticos con una duración de más de 160 horas, con cada uno de los lodos pretratados (Tabla 5.3) y sin la presencia de biomasa. Esto con la finalidad de evaluar la eficacia de cada uno de los procesos de inactivación, sus diferencias y el porcentaje de adsorción de los sustratos en el lodo, así como para evaluar posibles reacciones químicas que se pudieran llevar a cabo entre los compuestos.

Los resultados obtenidos de cada perfil cinético de los diferentes ensayos muestran una disminución superior al 59 % de las concentraciones iniciales de los sustratos a lo largo de las pruebas, descartando la formación de nuevos compuestos a causa de alguna reacción química entre los sustratos. Ejemplo de ello se muestra en la Figura 6.4, en ensayos con 30 mg C-E2 L⁻¹ inoculados con lodo pretratado (Figura 6.4 A, B y C) y en ausencia del mismo (Figura 6.4 D), donde se observó que el 86.5% de todo el C-E2 inicial no fue cuantificado al terminar las 168 h que duró la prueba. Comportamientos similares se observaron en todos los ensayos y con todos los diferentes pretratamientos del lodo, lo cual es atribuible a un fenómeno físico y no alguno de tipo químico o bien, al mismo proceso desnitrificante, ya que la biomasa estuvo completamente inactiva. Además, no se cuantificaron concentraciones de productos o intermediarios del proceso y el comportamiento fue similar durante los ensayos en ausencia de biomasa (Figura 6.4 D).

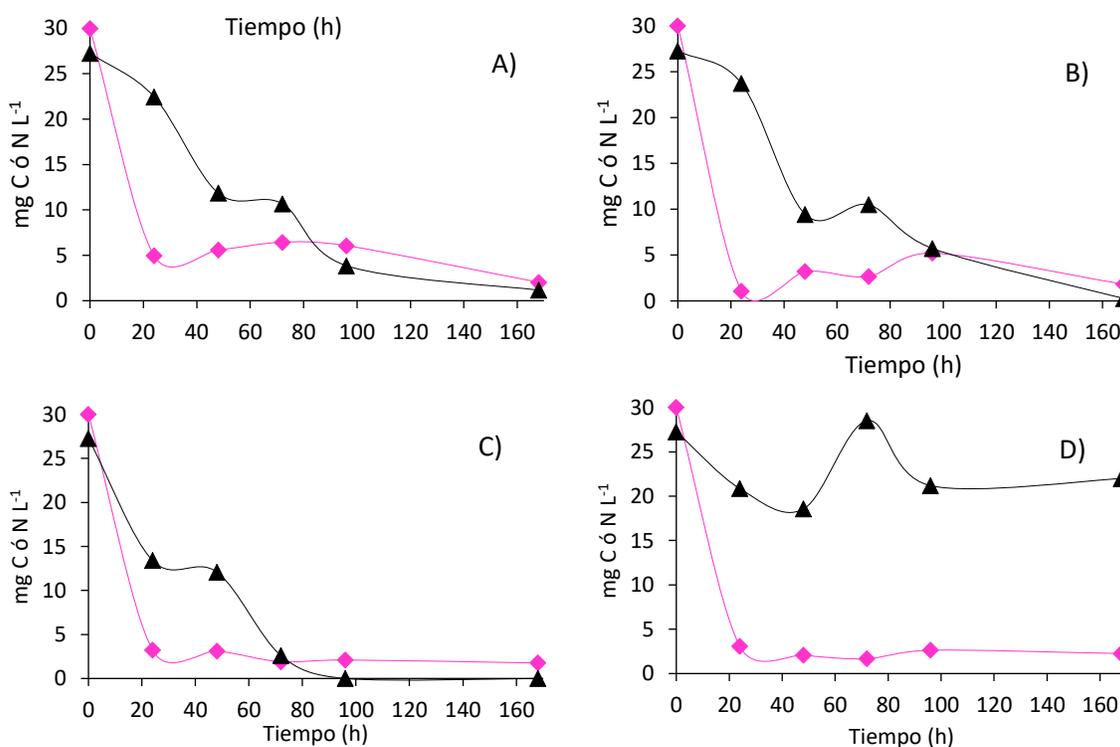


Figura 6.4. Perfil cinético de 4 ensayos abióticos con 30 mg C-E2 L⁻¹; (A) con biomasa estéril, (B) biomasa seca, (C) biomasa expuesta a luz UV y (D) sin la presencia de lodo. (◆) C-E2, (▲) N-NO₃⁻.

Las concentraciones de N-NO₃⁻ tuvieron un comportamiento similar a las de E2. Se cuantificó una disminución en la concentración de N-NO₃⁻ superior al 90.78% en los ensayos

con lodo inactivo. Este porcentaje fue aún mayor al calculado con C-E2. Sin embargo, en el ensayo en ausencia de microorganismos, sólo se estimó la pérdida del 20.83%. Estos resultados sugieren que el decremento de las concentraciones de ambos sustratos se debió a que el lodo absorbió cierto porcentaje. Asimismo, los compuestos se precipitaron, debido a que las concentraciones disminuyeron en presencia y ausencia de lodo, pero no se identificó la formación de metabolitos o nuevos productos. Incluso, se realizó una extracción con metanol de los compuestos y se demostró su presencia en todos los ensayos.

En algunos estudios donde se han aplicado procesos biológicos para la eliminación de E2, también se han realizado ensayos control abióticos, tal es el caso del realizado por Fernández y col (2017), donde se evaluaron las posibles pérdidas de 5 mg L⁻¹ de E2 y 5 mg L⁻¹ de E1 (estrona), con y sin la presencia de microorganismos y en un medio en condiciones anóxicas. Los resultados de este estudio reportaron que después de 90 días de evaluación y sin la presencia de ningún tipo de organismo, las concentraciones de E2 y E1 se mantuvieron constantes. Sólo en presencia de *Virgibacillus halotolerans* y *Bacillus licheniformis* (inactivos), se obtuvo un decremento de 0.5 mg/L de E2 después de 90 días de evaluación. Estos resultados sugieren que fenómenos como la absorción también pueden contribuir en las pérdidas de las concentraciones de algunos sustratos como lo ocurrido en el presente trabajo. Cabe mencionar que los ensayos realizados por Fernández et al. (2017), se realizaron en condiciones de oscuridad, para evitar pérdidas de E2 a causa de luz solar.

Los resultados del factor decremento de los ensayos con E2 en mezcla y por separado, se muestran en la Tabla 6.3. En todas las pruebas hubo una disminución de la concentración de los sustratos superior al 50%, en relación a la concentración inicial. De acuerdo al análisis estadístico de los resultados del factor en cada ensayo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes pretratamientos del lodo, pero si al realizar evaluaciones con diferentes concentraciones iniciales de estradiol (ANOVA, $p > 0.05$).

Tabla 6.3. Resultados del cálculo de factor decremento de E2 en ensayos abióticos en lote a diferentes concentraciones iniciales de C-E2 como única fuente de electrones y en mezcla con AMP a una C/N de 1.1.

Tratamiento de Lodo	3.5 mg C-E2 L ⁻¹	5 mg C-E2 L ⁻¹ 25 mg C-AMP L ⁻¹	30 mg C-E2 L ⁻¹
Lodo Estéril	0.4404	0.2687	0.1349
Lodo Seco	0.4550	0.2699	0.1173
Lodo Exp. UV	0.4149	0.3286	0.0643
Sin Lodo	0.4091	0.2950	0.0814

Los resultados de los factores decremento calculados para el caso de los ensayos realizados en presencia de Ampicilina, se muestran en la Tabla 6.4, donde de acuerdo al análisis de varianza, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes pretratamientos del lodo, pero si al cambiar las concentraciones iniciales de los sustratos (ANOVA, $p > 0.05$). De la misma manera que el comportamiento observado en los ensayos abióticos con E2, se cuantifico la pérdida de las concentraciones iniciales de C-AMP después de 150 horas de ensayo. En un estudio realizado por Islas et al. (2017), donde se evaluaron las pérdidas por absorción, reacción química o volatilización de 10 mg de C-AMP L⁻¹ con un lodo desnitrificante completamente estéril. Se reportó que 96.13 ± 0.10 % y 98.6 ± 0.8 % de la concentración inicial de C-AMP y N-NO₃⁻ se conservaron al finalizar 360 h de ensayo, respectivamente. Los resultados reportados por Islas sugieren que no hubo pérdidas significativas de sustratos. Esto es completamente contrario a los resultados obtenidos en el presente trabajo con E2 y AMP como únicas fuentes de electrones y en mezcla.

Tabla 6.4. Resultados del factor de decremento de AMP a diferentes concentraciones de C-AMP como única fuente de electrones y en mezcla con C-E2 a una C/N de 1.1.

Tratamiento de Lodo	30 mg C-AMP L ⁻¹	25 mg C-AMP L ⁻¹ 5 mg C-E2 L ⁻¹
Lodo Estéril	0.0402	0.0957
Lodo Seco	0.0420	0.0834
Lodo Exp. UV	0.0348	0.0691
Sin Lodo	0.2791	0.0910

Los resultados del cálculo del factor con las concentraciones de N-NO_3^- a lo largo de los ensayos, fueron similares a los obtenidos anteriormente con E2 y AMP (Tabla 6.5), incluso llegando hasta un valor de 0 en el ensayo con $3.5 \text{ mg C-E2 L}^{-1}$ en presencia de lodo seco y estéril. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes pretratamientos del lodo, pero si al cambiar las concentraciones iniciales de sustrato, como se observa en la Tabla 6.5 (ANOVA, $p > 0.05$).

Tabla 6.5. Resultados del factor decremento con N-NO_3^- en los ensayos con C-E2 y C-AMP como únicas fuentes de electrones y en mezcla a una C/N de 1.1.

Tratamiento de Lodo	$3.5 \text{ mg C-E2 L}^{-1}$	5 mg C-E2 L^{-1} $25 \text{ mg C-AMP L}^{-1}$	$30 \text{ mg C-E2 L}^{-1}$	$30 \text{ mg C-AMP L}^{-1}$
Lodo Estéril	0	0.2284	0.0921	0.0689
Lodo Seco	0	0.3199	0.1098	0.0499
Lodo Exp. UV	0.0636	0.2523	0	0.0054
Sin Lodo	0.2379	0.3237	0.7916	0.7953

Todos los resultados obtenidos de los ensayos abióticos sugieren que las pérdidas de las concentraciones de sustratos se debieron a fenómenos como la adsorción, puesto que en diferentes estudios se han reportado que sedimentos pueden llegar a retener concentraciones de compuestos como E2 no mayores a los ng L^{-1} (Wang et al., 2019). En el caso de los resultados obtenidos en el presente estudio, la concentración perdida y sin cuantificar superó los $1.5 \text{ mg C-E2 L}^{-1}$. Asimismo, no se identificó la presencia de E2, AMP o N-NO_3^- en el espacio de cabeza, así como la formación de nuevos compuestos o metabolitos secundarios de los sustratos, los cuales sugerirían que la pérdida de las concentraciones se debió a una interacción química entre el medio y los sustratos.

Las concentraciones de los sustratos tuvieron una disminución mayor al 50%, aun cuando se trabajó con 3 mg L^{-1} hasta concentraciones superiores a la solubilidad del estradiol (3.6 mg/L a 25°C) (Bruce et al., 2015). Por tanto, esto es atribuido a fenómenos de precipitación de sustratos por el ajuste del pH de trabajo, ya que, si este aumenta, las sales presentes modifican su pKa y con esto su solubilidad en el agua (Skoog, D. A., West, D. M. & Holler, F.J., 1995). En estudios semejantes, donde se ha utilizado un consorcio desnitrificante para eliminar compuestos como el p-cresol (González et al., 2012), 2-

clorofenol (Martínez et al., 2019), BTX (Peña et al., 2004) y Fenol (Martínez et al., 2012), no se mencionan efectos de precipitación por ajuste de pH o bien, no se toma en cuenta.

Para confirmar las pérdidas de sustratos por precipitación y descartar la fotodegradación de compuestos por la exposición a luz UV, se realizaron pruebas de estabilidad de muestras que contienen 33 mg C-E2 L⁻¹ y 33 mg C-AMP L⁻¹, dado que E2, es considerado fotosensible pero persistente en condiciones de oscuridad (Fernández et al., 2017). Las muestras fueron expuestas a luz solar natural durante 6 horas y se analizaron sus concentraciones por cuadruplicado en HPLC. Los resultados se presentan en la Figura 6.5, donde la concentración de 17β-estradiol y Ampicilina disminuyó entre el 2.86% y 1.95%, respectivamente. Estos resultados descartan pérdidas de los sustratos por inestabilidad de la muestra. (COFEPRIS, 2011; Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2002).

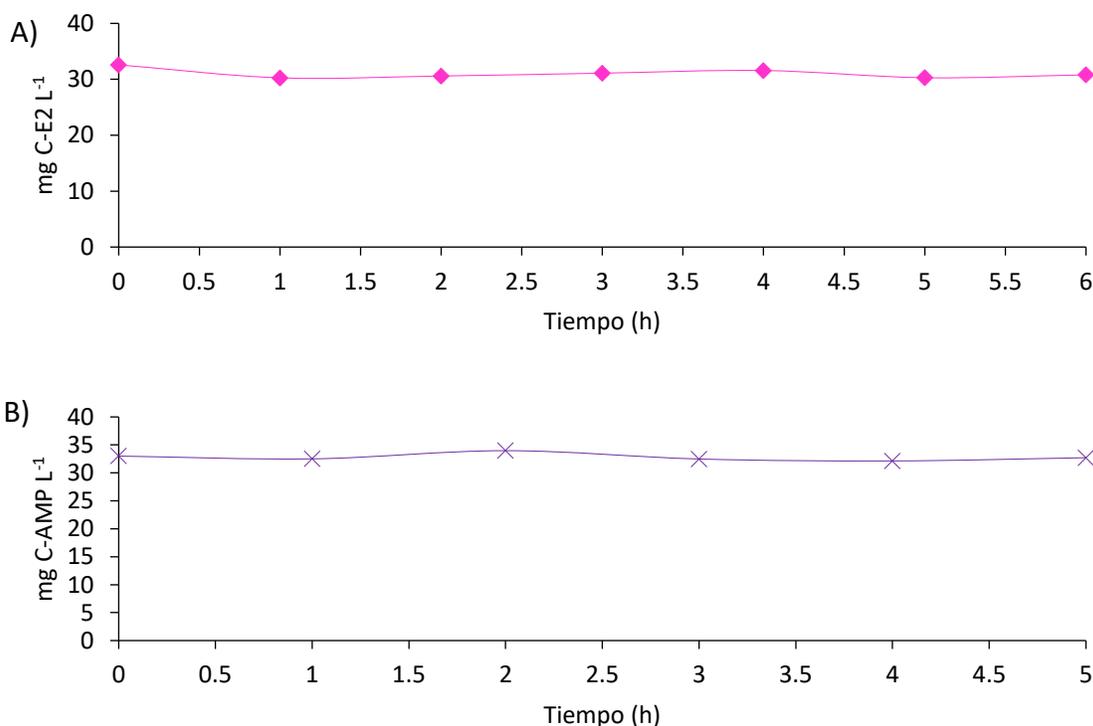


Figura 6.5. Ensayos de estabilidad de (A) 33 mg C-E2 L⁻¹ y (B) 33 mg C-AMP L⁻¹.

Los resultados obtenidos en este apartado sugieren que concentraciones de E2 y Ampicilina se precipitan bajo condiciones y en un medio desnitrificante, no se pierden por sensibilidad a la luz solar y, además, no se volatilizan ni reaccionan entre sí. Para los ensayos desnitrificantes posteriores, tomarán gran importancia los balances de materia

correspondientes a cada especie, puesto que darán información precisa de lo que sucedió con cada uno de los compuestos y si aquellos que se precipitaron fueron tomados para la formación de los productos de la desnitrificación, o no.

6.3. Biodegradación de C-CH₃COO⁻: ensayos de referencia

Una vez que el lodo alcanzó el EED en el reactor UASB, se realizaron ensayos de referencia con C-CH₃COO⁻ y N-NO₃⁻, bajo una C/N de 1.1. El proceso se evaluó con 10, 20, 30 y 50 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ y la concentración necesaria de N-NO₃⁻ para mantener la C/N de trabajo.

A manera de ejemplo, en la Figura 6.6 se muestran los resultados del perfil cinético de los ensayos de referencia con 10 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ a C/N de 1.1. El lodo consumió 68% de la concentración inicial de C-CH₃COO⁻ a la 1 h de experimentación y el resto en un lapso de 2 horas. Simultáneamente, cuando se agotó todo el C-CH₃COO⁻ se produjo HCO₃⁻ con un Y_{C-HCO₃⁻} de 1.01 ± 0.01, al finalizar las 5 h de prueba (Tabla 6.6). En el caso de las especies nitrogenadas, el lodo consumió el 95.33% de N-NO₃⁻ durante la primera hora de reacción y el 4.67% restante, después de 2 h. A la par del consumo de N-NO₃⁻, se generó N₂ y éste alcanzó un Y_{N₂} de 1.059 ± 0.02 cuando se terminó de consumir todo el nitrato, manteniéndose constante hasta concluir el ensayo. No se identificó la presencia y acumulación de intermediarios nitrogenados y carbonados. El proceso respiratorio del lodo fue eficiente y completo en estos ensayos.

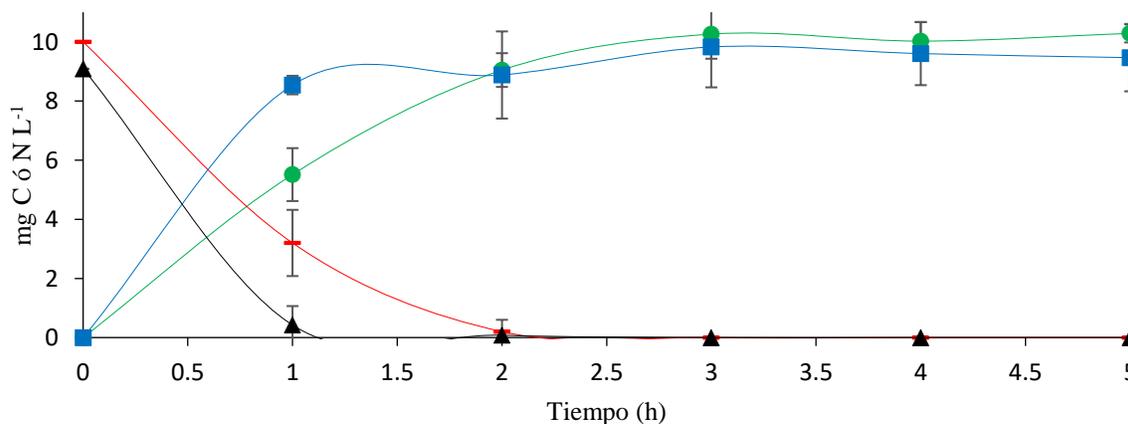


Figura 6.6. Perfil cinético de ensayo de referencia con 10 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ y N-NO₃⁻ a una C/N de 1.1. (—) C-CH₃COO⁻, (●) C-HCO₃⁻, (▲) N-NO₃⁻ y (■) N₂.

Posteriormente, el perfil cinético obtenido de los ensayos con $20 \text{ mg C-CH}_3\text{COO}^- \text{ L}^{-1}$, se muestran en la Figura 6.7. En esta se observa que el 27.23 % de la concentración inicial de $\text{C-CH}_3\text{COO}^-$ fue consumido por el lodo durante la 1 h reacción y después de 2 h se alcanzó una $E_{\text{C-CH}_3\text{COO}^-}$ de 100%. Al igual que en el ensayo con $10 \text{ mg C-CH}_3\text{COO}^- \text{ L}^{-1}$, a la par del consumo de acetato, comenzó la generación de C-HCO_3^- , alcanzando una producción máxima de $20 \text{ mg C-HCO}_3^- \text{ L}^{-1}$ a 1 h de haber iniciado el ensayo. Esta producción se mantuvo constante desde la 1 h de reacción hasta que finalizó la prueba. Se obtuvo un $Y_{\text{C-HCO}_3^-}$ de 1.11 ± 0.03 .

En el caso de las especies nitrogenadas la $E_{\text{N-NO}_3^-}$ fue de $99.20 \pm 1.59 \%$, a partir de 1.5 h de reacción. Simultáneamente, se produjeron $16.23 \text{ mg N}_2 \text{ L}^{-1}$ durante la 1 h de prueba y la máxima generación fue después de 2 h de ensayo, obteniendo un Y_{N_2} de 1.004 ± 0.03 . No se cuantificó la producción de metabolitos, pero tampoco la acumulación de intermediarios del proceso desnitrificante.

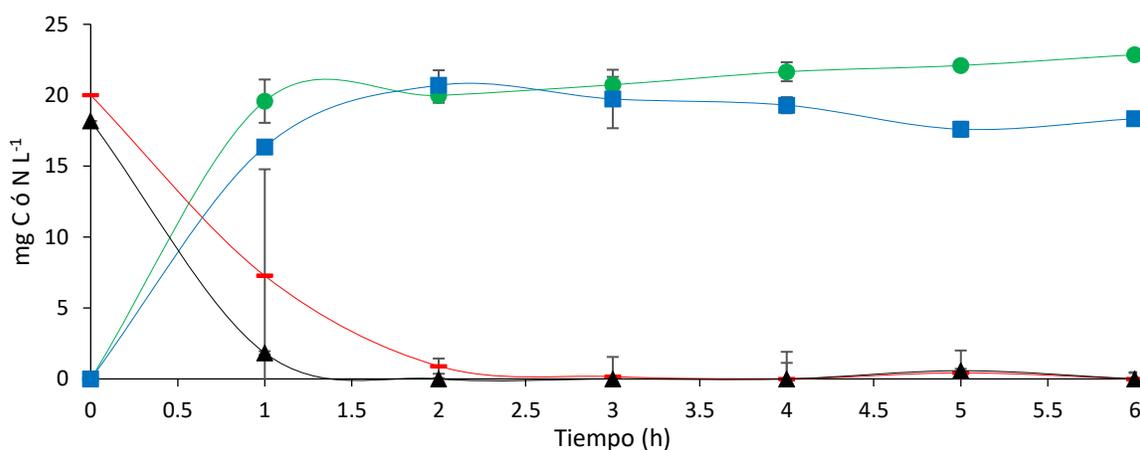


Figura 6.7. Perfil cinético de ensayo de referencia con $20 \text{ mg C-CH}_3\text{COO}^- \text{ L}^{-1}$ y N-NO_3^- a una C/N de 1.1. (—) $\text{C-CH}_3\text{COO}^-$, (●) C-HCO_3^- , (▲) N-NO_3^- y (■) N_2 .

Se realizaron ensayos desnitrificantes de referencia con $30 \text{ mg C-CH}_3\text{COO}^- \text{ L}^{-1}$ a una C/N de 1.8 (Figura 6.8), pero con un lodo desnitrificante de origen metanogénico proveniente de la Planta de Tratamiento de Agua Residual de un centro educativo (PTAR-A) y se compararon con los resultados obtenidos en el ensayo con $50 \text{ mg C-CH}_3\text{COO}^- \text{ L}^{-1}$ a una C/N de 1.1 (Figura 6.9) con lodo proveniente de la Planta de Tratamiento de Agua Residual de Atotonilco de Tula, Hidalgo (PTAR-B).

Tabla 6.6. Eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de productos de los ensayos de referencia a diferentes concentraciones de C-CH₃COO⁻.

Concentración (mg L ⁻¹)	E (%)		Y		
	C-CH ₃ COO ⁻	N-NO ₃ ⁻	C-HCO ₃ ⁻	N ₂	C-CO ₂
10	100 ± 0.001	100 ± 0.001	1.019 ± 0.014	1.059 ± 0.02	-
20	99.263 ± 1.007	99.204 ± 1.591	1.118 ± 0.031	1.004 ± 0.033	-
30	100 ± 0.001	99.52 ± 0.06	0.975 ± 0.001	1.291 ± 0.0402	0.024 ± 0.001
50	100 ± 0.001	100 ± 0.001	0.998 ± 0.004	1.006 ± 0.021	-

En ambos ensayos se obtuvieron E_{C-CH₃COO⁻} y E_{N-NO₃⁻} de 100 % y Y_{C-HCO₃⁻} y Y_{N₂} cercanos a 1, después de 4 h de reacción. Sin embargo, aunque las concentraciones iniciales de sustrato expuestas al lodo de la PTAR-A fueron diferentes a las usadas con el lodo de la PTAR-B, los tiempos de consumo de cada uno de los sustratos fueron similares como se muestra en la Tabla 6.7.

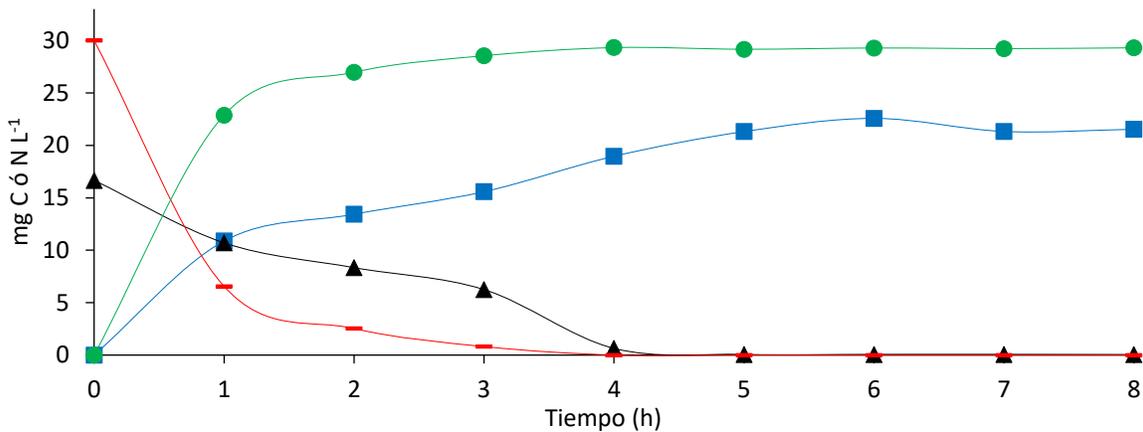


Figura 6.8. Perfil cinético de ensayos de referencia con 30 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ y N-NO₃⁻ a una C/N de 1.8, inoculado con lodo de la UAM-I. (—) C-CH₃COO⁻, (●) C-HCO₃⁻, (▲) N-NO₃⁻ y (■) N₂.

En los resultados de los ensayos con 30 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ con el lodo proveniente de PTAR-A se cuantificó una producción de CO₂ con un Y_{C-CO₂} de 0.024 ± 0.001, la cual es mínima comparado con la producción mayoritaria de HCO₃⁻. Asimismo, no se identificó la producción y acumulación de otro intermediario carbonado y nitrogenado en los ensayos con ambos lodos, por lo que el proceso desnitrificante fue eficiente y completo, sin importar el origen del lodo.

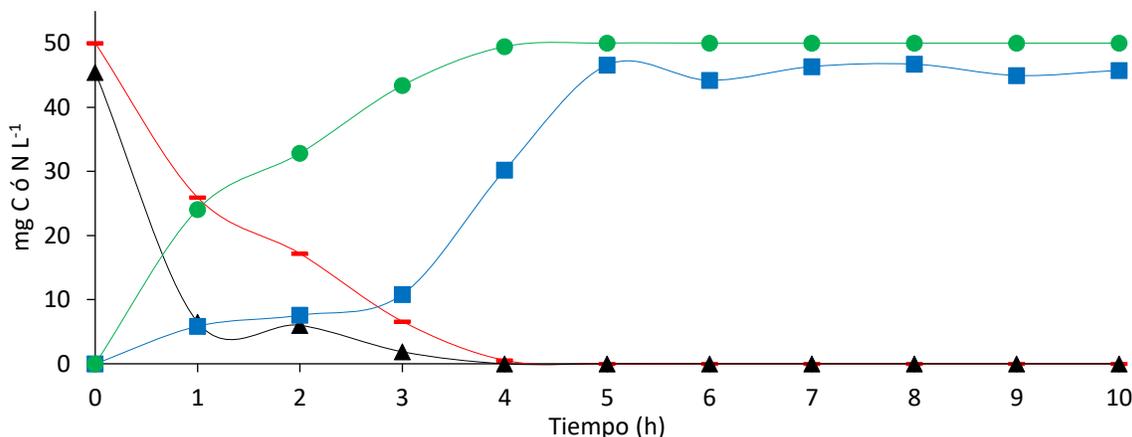


Figura 6.9. Perfil cinético de ensayo de referencia con 50 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ y N-NO₃⁻ a una C/N de 1.1. (—) C-CH₃COO⁻, (●) C-HCO₃⁻, (▲) N-NO₃⁻ y (■) N₂.

Los resultados de la evaluación cinética de los ensayos de referencia se resumen en la tabla 6.7. Se obtuvo una $q_{C-CH_3COO^-}$ mínima de 7.97 ± 0.04 y máxima de 22.93 ± 1.95 mg C-CH₃COO⁻ g SSV⁻¹ h⁻¹, lo que representa una diferencia de 1.8 veces. La $q_{C-HCO_3^-}$ mínima se obtuvo en el ensayo con 10 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ y fue de 5.13 ± 0.29 mg C-HCO₃⁻ g SSV⁻¹ h⁻¹ y la máxima de 23.39 ± 6.38 mg C-HCO₃⁻ g SSV⁻¹ h⁻¹ en el ensayo con 20 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹, con una diferencia de hasta 3.5 veces.

Tabla 6.7. Velocidades específicas de generación de productos y consumo de sustratos de ensayos de referencia a diferentes concentraciones de C-CH₃COO⁻.

Concentración (mg L ⁻¹)	q _{Sustratos}		q _{Productos}	
	C-CH ₃ COO ⁻	N-NO ₃ ⁻	C-HCO ₃ ⁻	N ₂
10	7.97 ± 0.04	12.56 ± 1.47	5.13 ± 0.29	10.08 ± 2.28
20	13.54 ± 0.65	13.95 ± 0.003	23.39 ± 6.38	50.83 ± 1.31
30	22.93 ± 1.95	3.21 ± 0.30	22.51 ± 1.82	4.43 ± 0.48
50	13.74 ± 1.62	43.15 ± 7.72	13.86 ± 0.88	17.51 ± 2.17

Velocidades específicas expresadas en mg sustrato o producto g SSV⁻¹ h⁻¹.

En el caso de las especies nitrogenadas, se obtuvo una $q_{N-NO_3^-}$ mínima de 3.21 ± 0.30 en los ensayos con 30 mg N-NO₃⁻ L⁻¹. En estos se utilizó como fuente de inóculo lodo proveniente de PTAR-A. Asimismo, esta $q_{N-NO_3^-}$ fue menor comparada con las obtenidas en los ensayos con 10 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ con lodo de la PTAR-B en hasta en 2.9 veces. Como ocurrió con N-NO₃⁻, la q_{N_2} fue mayor con el lodo de PTAR-B en hasta 10.47 veces comparado con los ensayos con lodo de PTAR-A. Martínez et al. (2012) reportaron velocidades de consumo de

7.01 ± 0.06 mg C-CH₃COO⁻ g SSV⁻¹ h⁻¹ y 5.86 ± 0.01 mg N-NO₃⁻ g SVV⁻¹ h⁻¹, al trabajar con 100 mg C-CH₃COO L⁻¹ a una relación C/N de 1.1 con lodos desnitrificantes, previamente estabilizados. Estas son menores a las calculadas en el presente trabajo y bajo concentraciones de C-CH₃COO⁻ 9 veces menores.

La diferencia de resultados de los ensayos de referencia estimadas cuando se utilizó un lodo u otro, se debió al origen del inóculo, ya que los lodos de PTAR-B pudieron haber sido expuestos a una gran cantidad de carga orgánica, en la que se incluyen compuestos como antibióticos o algunas otras sustancias orgánicas que hayan mejorado el proceso metabólico del consorcio, ya que un estudio realizado por Islas et al. (2017) demuestra que un lodo desnitrificante expuesto previamente a un antibiótico como la ampicilina, mejora el proceso respiratorio desnitrificante en 4 a 6 veces más, al recuperarlo con una fuente de fácil biodegradabilidad como el CH₃COO⁻.

Los balances de materia (Tabla 6.8) demostraron que no hubo acumulación de compuestos a lo largo del proceso y que todos los sustratos fueron transformados hasta compuestos inocuos para el medio ambiente.

Tabla 6.8. Balance de materia de ensayos de referencia en lote de especies carbonadas y nitrogenadas.

Compuestos carbonados		
Ensayo (mg L ⁻¹)	Entrada (mg L ⁻¹)	Salida (mg L ⁻¹)
	C-CH ₃ COO ⁻	C-HCO ₃ ⁻
(10) C-CH ₃ COO ⁻	10.00 ± 0.01	10.19 ± 0.14
(20) C-CH ₃ COO ⁻	20.00 ± 0.01	22.20 ± 0.60
(30) C-CH ₃ COO ⁻	30.00 ± 0.01	29.27 ± 0.03
(50) C-CH ₃ COO ⁻	50.00 ± 0.01	50.01 ± 0.02
Compuestos nitrogenados		
Ensayo (mg L ⁻¹)	Entrada (mg L ⁻¹)	Salida (mg L ⁻¹)
	N-NO ₃ ⁻	N ₂
(10) C-CH ₃ COO ⁻	9.09 ± 0.01	9.63 ± 0.18
(20) C-CH ₃ COO ⁻	18.18 ± 0.01	18.74 ± 0.95
(30) C-CH ₃ COO ⁻	16.16 ± 0.01	21.81 ± 0.66
(50) C-CH ₃ COO ⁻	45.45 ± 0.01	45.93 ± 0.76

6.4. Ensayos desnitrificantes con 17 β -estradiol y ampicilina

Los resultados del perfil cinético de los ensayos con 10 mg C-E2 L⁻¹ como única fuente de electrones, se presentan en la Figura 6.10. En esta se observa que todo C-E2 fue consumido en las primeras 14 h de ensayo, obteniendo una E_{C-E2} del 100 %. Además, a la 1h, la concentración de E2 disminuyó drásticamente y se mantuvo en 1 mg C-E2 L⁻¹ hasta las 12 h, donde vuelve a disminuir hasta su consumo completo (Figura 6.10-A)). Esto confirma que los sustratos carbonados se precipitan. Sin embargo, dado que HCO₃⁻ es el único producto carbonado del proceso respiratorio, se puede entender el comportamiento del consumo de E2 por medio del perfil de producción de HCO₃⁻. Asimismo, se obtuvo un Y_{C-HCO3-} de 0.86 ± 0.03 cuando todo E2 ya no fue cuantificado (Tabla 6.9).

En el caso de los compuestos nitrogenados (Figura 6.10-B)) N-NO₃⁻ fue consumido por completo en 12 h de reacción. A la par del consumo, se generó N₂, alcanzando un Y_{N2} de 0.95 ± 0.01 después de 15 h de reacción y hasta finalizar la prueba. En este ensayo no se acumularon intermediarios del proceso desnitrificante y todo NO₃⁻ fue reducido hasta N₂, exclusivamente. En un estudio realizado por Li et al. (2020) reportaron eficiencias de eliminación de E2 entre el 96 y 98 % de una concentración inicial de 1 mg E2 L⁻¹ en reactores MBR, inoculados con microorganismos nitrificantes. Estas eficiencias fueron alcanzadas después de 64 días (1536 h) de reacción, las cuales son hasta 102 veces mayores que lo encontrado en el presente estudio.

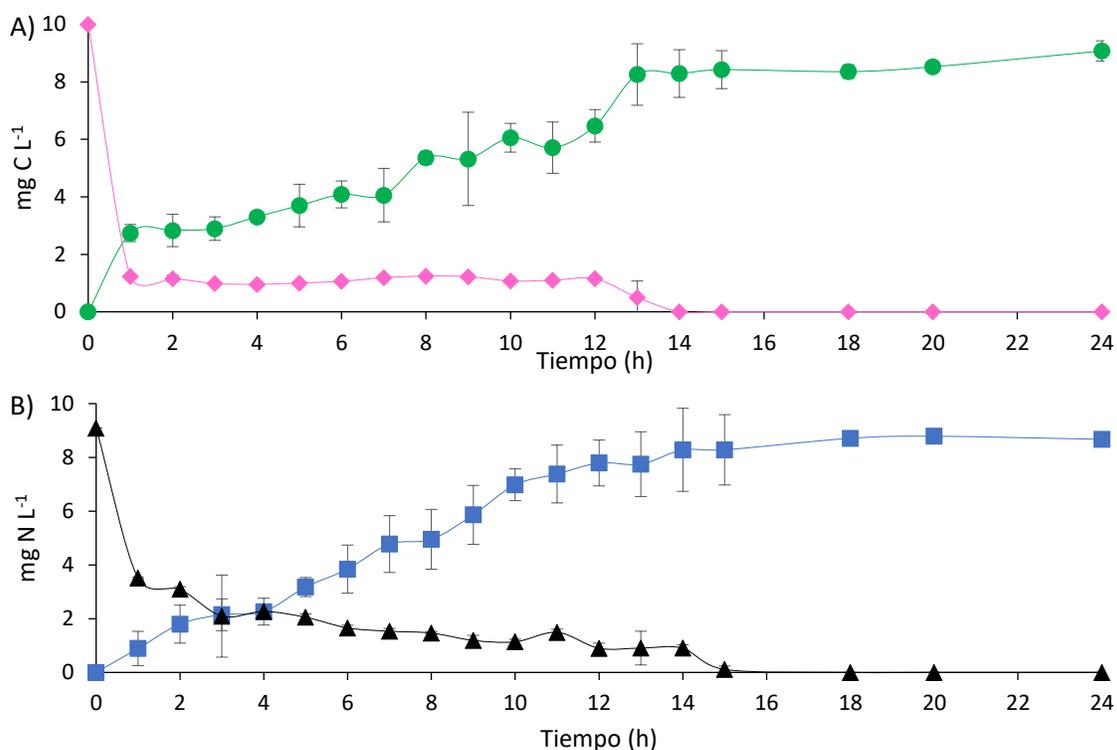


Figura 6.10. Perfil cinético de ensayos desnitrificantes don con 10 mg C-E2 L⁻¹ como única fuente de electrones y N-NO₃⁻ a una C/N de 1.1. A) Compuestos carbonados: (♦) C-E2, (●) C-HCO₃⁻; B) Compuestos nitrogenados: (▲) N-NO₃⁻ y (■) N₂.

Los resultados del ensayo con 20 mg C-E2 L⁻¹ se presentan en la Figura 6.11, donde también se observó la precipitación de E2 al inicio del ensayo, puesto que, a la 1h de reacción, la concentración disminuyó de 20 a 0.15 mg C-E2 L⁻¹ (Figura 6.11-A)). Si se realiza un balance de materia de las especies carbonadas en este punto, se puede observar que la concentración producida de C-HCO₃⁻, no corresponde a la concentración consumida de E2, puesto que es la única fuente de electrones. Sin embargo, después de 240 h de reacción, se alcanzaron E_{C-E2} de 99.13 ± 0.16 % y Y_{C-HCO₃⁻} de 1.28 ± 0.14.

Por otro lado, en el caso de las especies nitrogenadas (Figura 6.11-B)), N-NO₃⁻ fue consumido por completo en 18 h de ensayo. Este sustrato fue transformado hasta N₂ como único producto de la desnitrificación y con un Y_{N₂} de 1.03 ± 0.04 a las 240 h que duró el ensayo. Zhang et al. (2020) estudiaron la biodegradación de E2 por medio de consorcios microbianos bajo condiciones anaerobias, pero utilizando diferentes aceptores de electrones como O₂, NO₃⁻, Fe³⁺, SO₄²⁻ y HCO₃⁻. En este trabajo se utilizó como concentración inicial a 5 mg de E2/ Kg de sedimento. Los resultados mostraron eficiencias de biodegradación de E2

con O_2 , NO_3^- , Fe^{3+} , SO_4^{2-} y HCO_3^- de 98.9, 98.5, 90, 86.6 y 77 %, respectivamente y en más de 1008 h de ensayo. Estos resultados no son mejores que los encontrados en el presente trabajo con lodos desnitrificantes, aun cuando la concentración de E2 es mayor.

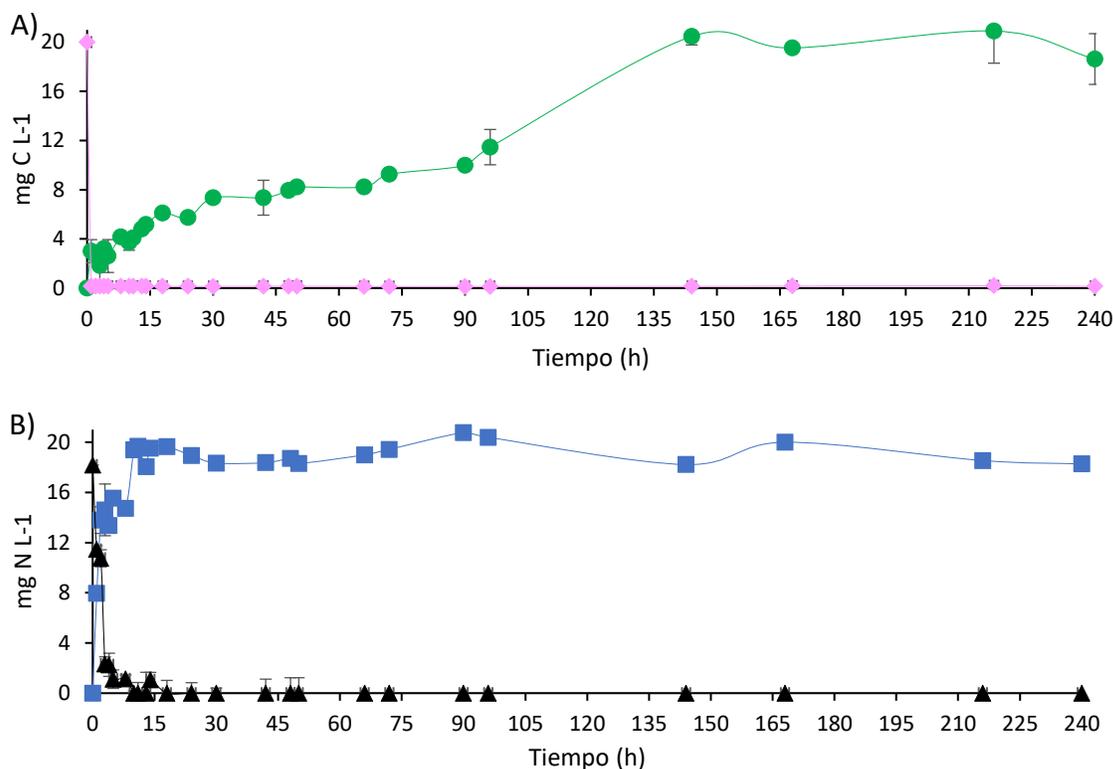


Figura 6.11. Perfil cinético de ensayos desnitrificantes don con 20 mg C-E2 L⁻¹ como única fuente de electrones y N-NO₃⁻ a una C/N de 1.1. A) Compuestos carbonados: (◆) C-E2, (●) C-HCO₃⁻; B) Compuestos nitrogenados: (▲) N-NO₃⁻ y (■) N₂.

Por otro lado, los resultados del perfil cinético del ensayo con 10 mg C-AMP L⁻¹ se presentan en la Figura 6.12, donde también C-AMP se precipitó al inicio del ensayo, dado que, a la 1h de reacción, la concentración disminuyó de 10 a 1.7 mg C-AMP L⁻¹ (Figura 6.12-A). Al igual que en el ensayo anterior, si se realiza un balance de materiales de las especies carbonadas en este punto, se puede observar que la concentración producida de C-HCO₃⁻, no corresponde a la concentración consumida de AMP, aun cuando es la única fuente de electrones. Sin embargo, después de 48 h de reacción, se alcanzaron E_{C-AMP} de 100 ± 0.01 % y $Y_{C-HCO_3^-}$ de 1.01 ± 0.01 .

N-NO₃⁻ fue consumido por completo a las 5 h de ensayo (Figura 6.12-B). Se transformó hasta N₂ como único producto de la desnitrificación y con un Y_{N_2} de 0.96 ± 0.01 a partir de las 3

primeras horas de ensayo. Islas et al. (2017) obtuvieron la oxidación completa de 10 mg C-AMP L⁻¹ mediante un lodo desnitrificante en menos de 15 h de reacción, en mezcla con 100 mg de C-CH₃COO⁻ L⁻¹. Se reportó que todo C-AMP fue mineralizado hasta C-HCO₃⁻, puesto que se obtuvieron Y_{C-HCO₃⁻} de 0.91 ± 0.007. Comparado con lo obtenido en el presente trabajo, se muestran resultados similares, sólo que no se utilizó C-CH₃COO⁻ u alguna otra fuente carbonada de fácil biodegradabilidad para la oxidación completa de AMP.

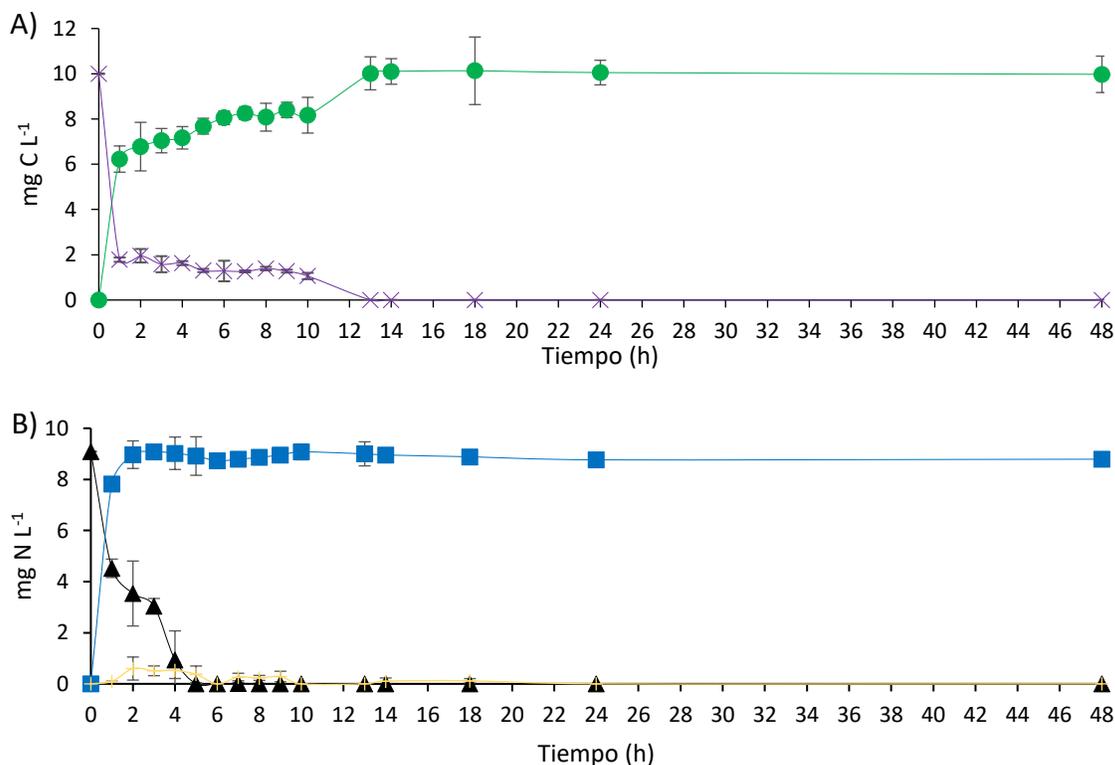


Figura 6.12. Perfil cinético de ensayos desnitrificantes con 10 mg C-AMP L⁻¹ como única fuente de electrones y N-NO₃⁻ a una C/N de 1.1. A) Compuestos carbonados: (x) C-AMP, (●) C-HCO₃⁻; B) Compuestos nitrogenados: (▲) N-NO₃⁻, (+) N-NO₂⁻ y (■) N₂.

Cuando se ensayó con 20 mg C-AMP L⁻¹ como única fuente carbonada, el perfil cinético de los compuestos fue igual al mostrado en la Figura 6.13. C-AMP fue consumido por completo en 240 h y transformado únicamente a C-HCO₃⁻, puesto que no se identificó y cuantificó la formación de metabolitos secundarios. Se obtuvieron E_{C-AMP} de 98.47 ± 0.03 % y Y_{C-HCO₃⁻} de 0.77 ± 0.01. Comparado con lo reportado por Phan y col. (2014), los resultados con el lodo desnitrificante fueron mejores, dado que en ese estudio se obtuvieron porcentajes de

eliminación de E2 en agua residual sintética con 30 compuestos farmacéuticos en más de 25 d (600 h). Esto con E_{E2} entre al 50 y 90 %.

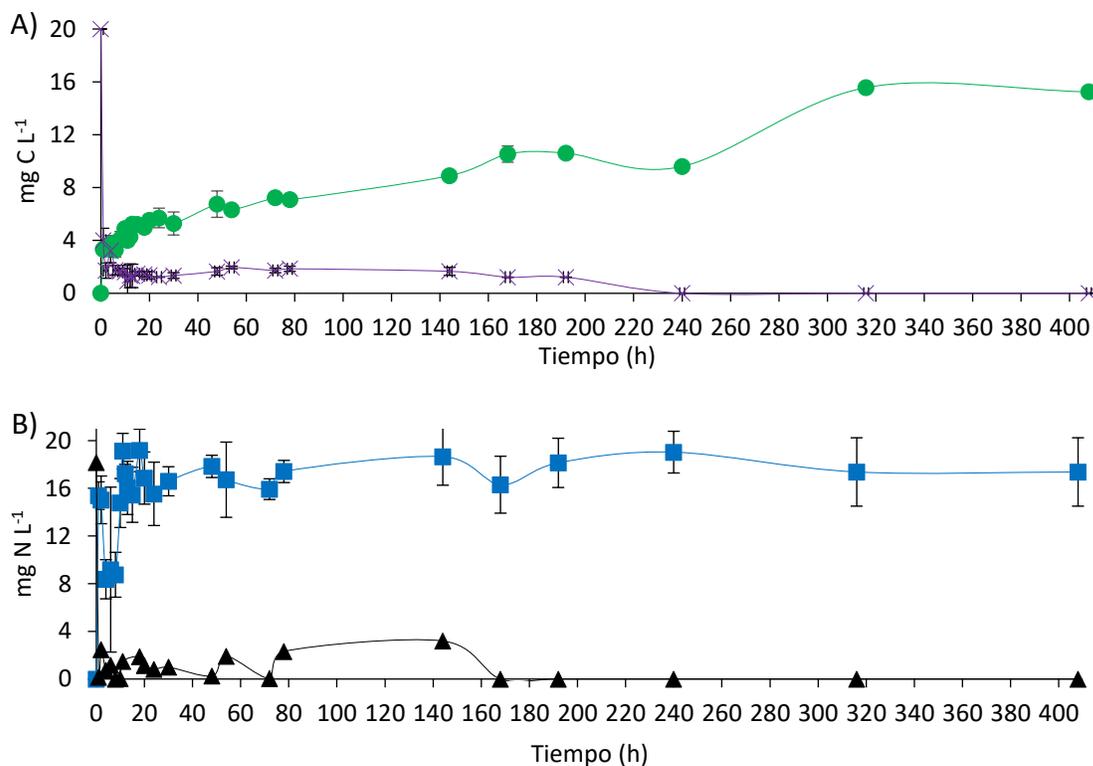


Figura 6.13. Perfil cinético de ensayos desnitrificantes con 20 mg C-AMP L⁻¹ como única fuente de electrones y N-NO₃⁻ a una C/N de 1.1. A) Compuestos carbonados: (x) C-AMP, (●) C-HCO₃⁻; B) Compuestos nitrogenados: (▲) N-NO₃⁻ y (■) N₂.

Un resumen de las eficiencias obtenidas en estos ensayos con E2 y AMP como fuentes únicas de carbono, se presentan en la Tabla 6.9. En todos los ensayos, se obtuvieron eficiencias de consumo de sustratos carbonados y nitrogenados cercanas al 100 %, así como rendimientos cercanos a 1. En el caso de los resultados de las altas eficiencias de consumo de un antibiótico como lo es AMP pudo atribuirse al origen del lodo, puesto que al haberse tomado de una planta de tratamiento de aguas residuales como es la PTAR de Atotonilco. Esta última recibe los efluentes del río Tula, el cual se ha encontrado contienen una gran cantidad de fármacos a concentraciones traza (ng L⁻¹) como ibuprofeno (682-4700), triclosán (320-1821), bisfenol A (432-3177), naproxeno (1614-16336), diclofenaco (1218-3768), 4-nonylfenoles (5847-33798), estrona (10.3-77), 17β-estradiol (0.2-17) y triclosán (320-1587) (Chávez y col., 2011). Muchos de ellos con actividad antibacteriana, lo que lleva a microorganismos a

sintetizar enzimas con capacidad de biodegradar compuestos antimicrobianos, lo que es recientemente llamado como bacterias resistentes a antibióticos. Estas bacterias han desarrollado mecanismos para la utilización de antibióticos en sus procesos metabólicos como es la síntesis de la enzima β -lactamasa, encargada de metabolizar compuestos betalactámicos como la ampicilina y que fue caso de estudio en el presente trabajo (Li et al., 2018; Chen et al., 2019; Almakki et al., 2019).

Tabla 6.9. Eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de productos de los ensayos con C-E2 y C-AMP como únicas fuentes de electrones.

Ensayo	Eficiencias (%)			Rendimientos (Y)	
	C-E2	C-AMP	N-NO ₃ ⁻	C-HCO ₃ ⁻	N ₂
10 mg C-E2 L ⁻¹	100 ± 0.01	-	100 ± 0.01	0.86 ± 0.03	0.95 ± 0.01
20 mg C-E2 L ⁻¹	99.13 ± 0.16	-	100 ± 0.01	1.28 ± 0.14	1.03 ± 0.04
10 mg C-AMP L ⁻¹	-	100 ± 0.01	100 ± 0.01	1.01 ± 0.01	0.96 ± 0.01
20 mg C-AMP L ⁻¹	-	98.47 ± 0.03	100 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.97 ± 0.05

En la Tabla 6.10 se presenta el balance de materia realizado de los ensayos con C-E2 y C-AMP como únicas fuentes de electrones. En todos los casos las eficiencias fueron superiores a 98 % y los rendimientos cercanos a la unidad. Asimismo, se descartó la producción y acumulación de compuestos intermediarios del proceso, puesto que no se cuantificaron en los análisis instrumentales.

Los resultados de la evaluación del proceso respiratorio del lodo fue mejor a lo reportado por Zhang et al. (2020), donde se cuantificó la formación de metabolitos de E2 como E1, 4-hidroxiestrone (4OH-E1), estrone-3-acetato (E1-3-acetato), delta-9(II)-deshidroestrone (9,II-deshidro-E1) y E3. En el presente trabajo no se identificó la formación de intermediarios del proceso.

Tabla 6.10. Balance de materia de ensayos desnitrificantes en lote con C-E2 y C-AMP como únicas fuentes de electrones.

Compuestos carbonados			
Ensayo (mg L ⁻¹)	Entrada		Salida
	C-E2	C-AMP	C-HCO₃⁻
(10) C-E2	10.00 ± 0.01		8.65 ± 0.37
(20) C-E2	20.00 ± 0.01		19.88 ± 1.01
(10) C-AMP	-	10.00 ± 0.01	9.74 ± 0.16
(10) C-AMP	-	20.00 ± 0.01	15.40 ± 0.23
Compuestos nitrogenados			
Ensayo (mg L ⁻¹)	Entrada		Salida
	N-NO₃⁻		N₂
(10) C-E2	9.09 ± 0.01		8.72 ± 0.05
(20) C-E2	18.18 ± 0.01		19.07 ± 1.14
(10) C-AMP	9.09 ± 0.01		8.91 ± 0.08
(10) C-AMP	18.18 ± 0.01		17.92 ± 0.96

6.5. Ensayos desnitrificantes con 17β-estradiol, ampicilina y CH₃COO⁻ en mezcla

Se realizaron ensayos con mezclas de fuentes carbonadas de C-E2, C-AMP y C-CH₃COO⁻. La Figura 6.14 muestra los resultados del perfil cinético del ensayo con la mezcla de C-E2, C-AMP y C-CH₃COO⁻ a una concentración de 3.3 mg L⁻¹, cada uno. Se añadió la concentración necesaria de N-NO₃⁻ para mantener una C/N de 1.1. De las tres fuentes de electrones, C-CH₃COO⁻ fue el primero en consumirse en 7 h de reacción ($E_{C-CH_3COO^-}$ de 100 ± 0.01), seguido de C-AMP a las 30 h de haber iniciado el experimento (E_{C-AMP} de 100 ± 0.47) y, por último, C-E2 después de 48 h de prueba (E_{C-E2} de 99.20 ± 2.24). Esto porque C-CH₃COO⁻ es considerado como la fuente de electrones de más fácil biodegradabilidad (Purba et al., 2022). Los sustratos carbonados fueron transformados hasta C-HCO₃⁻ con un $Y_{C-HCO_3^-}$ de 1.02 ± 0.6 y no se cuantificó la producción de metabolitos secundarios (Tabla 6.11). En el caso de los compuestos nitrogenados, N-NO₃⁻ fue consumido en 15 h de prueba ($E_{N-NO_3^-}$ de 100 ± 0.01) y fue transformado hasta N₂, obteniendo un Y_{N_2} de 1.13 ± 0.05. No se cuantificó la producción de N-NO₂⁻ o algún otro intermediario de la desnitrificación.

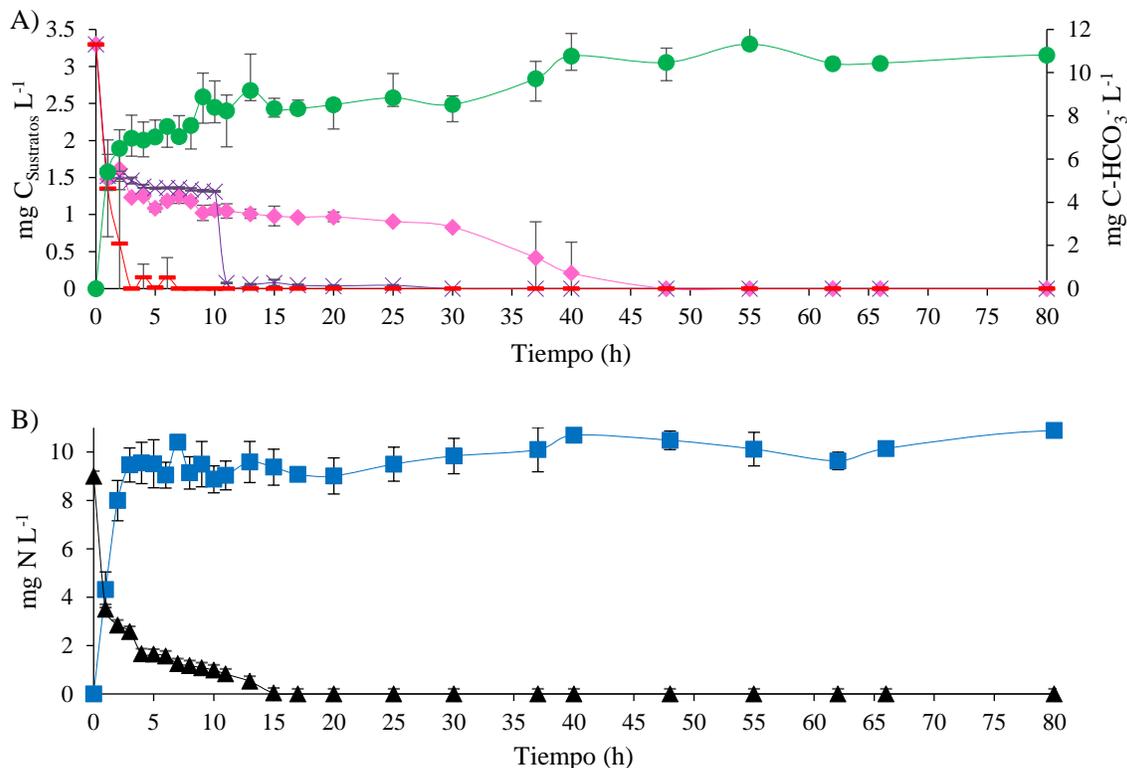


Figura 6.14. Perfil cinético de ensayos desnitrificantes con (mg L^{-1}) (3.3) C-E2, (3.3) C-AMP y (3.3) C- CH_3COO^- en mezcla y N-NO_3^- a una C/N de 1.1. A) Compuestos carbonados: (♦) C-E2, (x) C-AMP, (—) C- CH_3COO^- (●) C- HCO_3^- ; B) Compuestos nitrogenados: (▲) N-NO_3^- y (■) N_2 .

Posteriormente, se realizaron ensayos con 10 mg L^{-1} de C-E2, C-AMP y C- CH_3COO^- de cada uno como mezcla de fuente de electrones y se añadió la suficiente concentración de N-NO_3^- para mantener una C/N de 1.1. Los resultados del perfil cinético resultante se muestran en la Figura 6.15, donde C- CH_3COO^- fue consumido a la 1 h de reacción ($E_{\text{C-CH}_3\text{COO}^-}$ de 100 ± 0.01), seguido de C-AMP a las 48 h de experimento ($E_{\text{C-AMP}}$ de 100 ± 0.01) y, por último, C-E2 después de 144 h de prueba ($E_{\text{C-E2}}$ de 100 ± 0.01). Todos los sustratos fueron transformados hasta C- HCO_3^- con un $Y_{\text{C-HCO}_3^-}$ de 0.86 ± 0.01 , dado que no se cuantificó la producción de metabolitos secundarios (Tabla 6.11). En el caso de los compuestos nitrogenados, N-NO_3^- fue consumido en 80 h de prueba ($E_{\text{N-NO}_3^-}$ de 100 ± 0.01) y fue transformado hasta N_2 , obteniendo un Y_{N_2} de 0.97 ± 0.01 . En estos ensayos, se cuantificó la producción transitoria de hasta 1.8 mg de $\text{N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$.

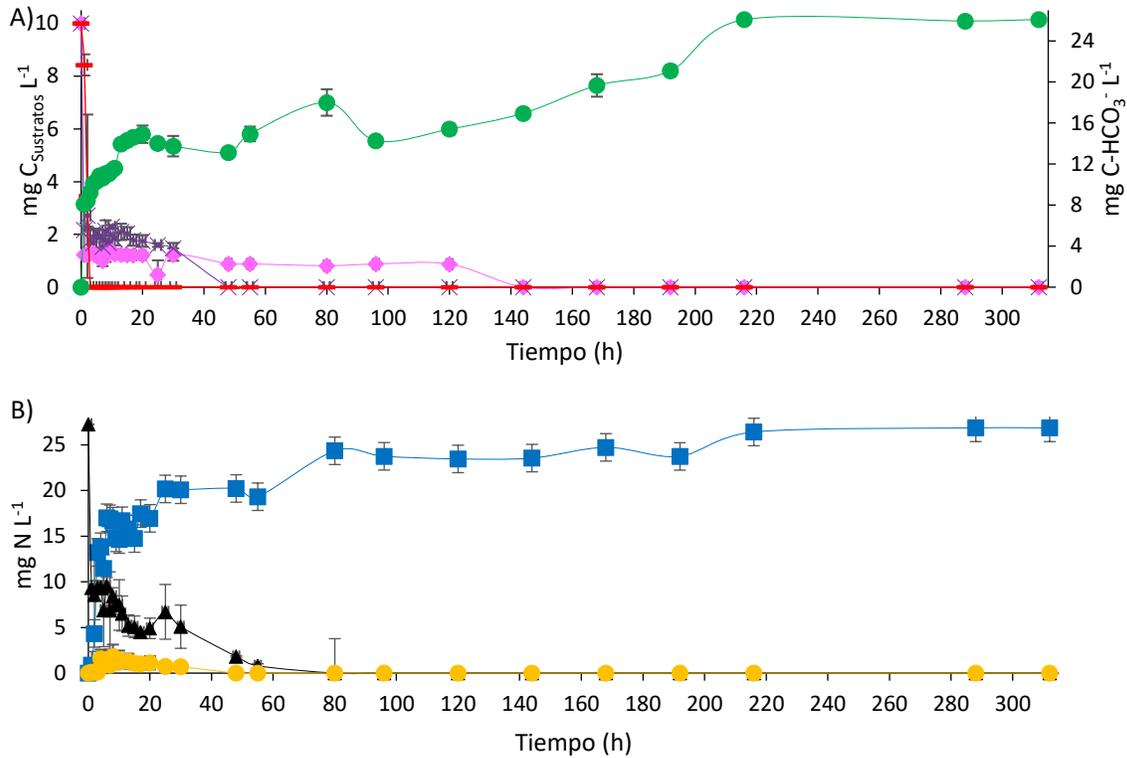


Figura 6.15. Perfil cinético de ensayos desnitrificantes con (mg L^{-1}) (10) C-E2, (10) C-AMP y (10) C-CH₃COO⁻ en mezcla y N-NO₃⁻ a una C/N de 1.1. A) Compuestos carbonados: (●) C-E2, (x) C-AMP, (—) C-CH₃COO⁻ (●) C-HCO₃⁻; B) Compuestos nitrogenados: (▲) N-NO₃⁻, (●) N-NO₂⁻ y (■) N₂.

Por otro lado, la Figura 6.16 muestra el perfil obtenido en los ensayos con 10 mg L^{-1} de C-E2 y C-CH₃COO⁻ de cada uno en mezcla. Se agregó la suficiente concentración de N-NO₃⁻ para mantener una C/N de 1.1. C-CH₃COO⁻ fue consumido en 10 h de reacción con $E_{\text{C-CH}_3\text{COO}^-}$ de 100 ± 0.01 y C-E2 después de 25 h de prueba con $E_{\text{C-E2}}$ de 99.13 ± 1.49 . Las fuentes carbonadas fueron transformadas únicamente hasta C-HCO₃⁻ y se estimó un $Y_{\text{C-HCO}_3^-}$ de 0.96 ± 0.02 . No se cuantificó la producción de metabolitos secundarios (Tabla 6.11). N-NO₃⁻ fue consumido en 17 h de prueba con una $E_{\text{N-NO}_3^-}$ de 100 ± 0.01 y fue transformado hasta N₂ con un Y_{N_2} de 1.12 ± 0.07 . En estos ensayos no se cuantificó la acumulación de intermediarios del proceso desnitrificante.

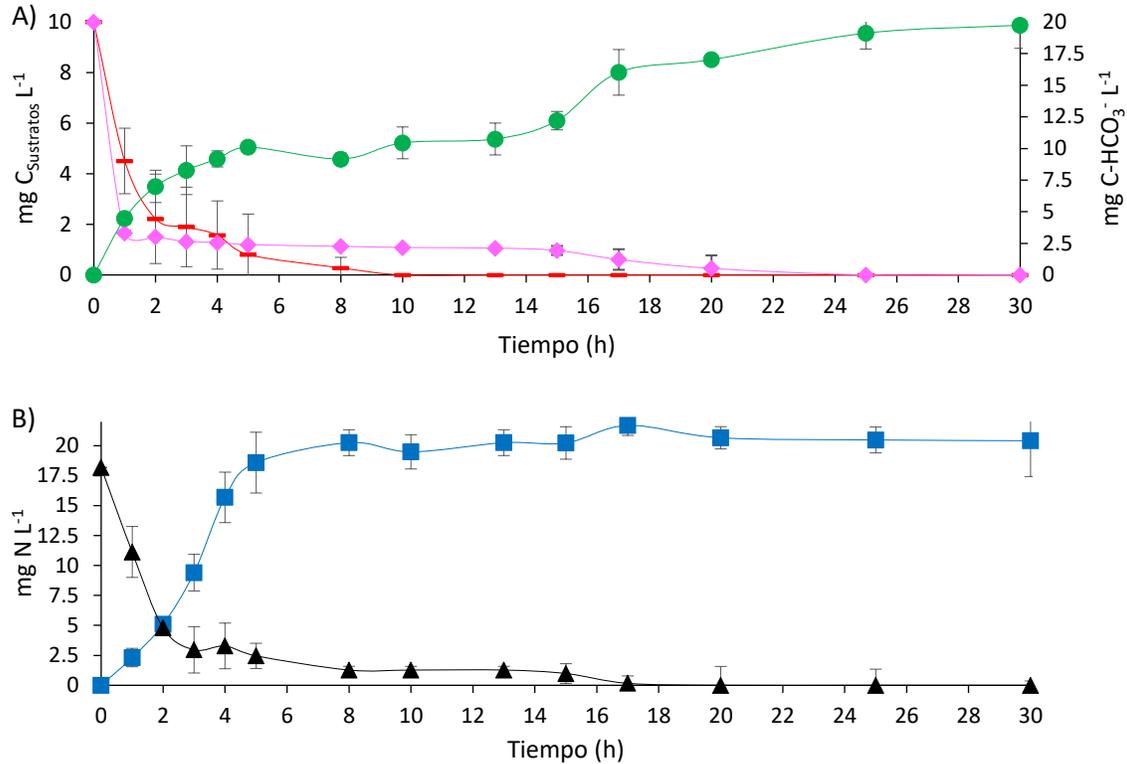


Figura 6.16. Perfil cinético de ensayos desnitrificantes con (mg L⁻¹) (10) C-E2 y (10) C-CH₃COO⁻ en mezcla y N-NO₃⁻ a una C/N de 1.1. A) Compuestos carbonados: (♦) C-E2, (—) C-CH₃COO⁻ (●) C-HCO₃⁻; B) Compuestos nitrogenados: (▲) N-NO₃⁻ y (■) N₂.

Por último, el perfil cinético resultante de los ensayos con una mezcla de 10 mg L⁻¹ de C-E2 y C-AMP de cada uno, se muestran en la Figura 6.17. Cabe mencionar que, en estos ensayos, se agregó la suficiente concentración de N-NO₃⁻ para mantener una C/N de 1.1. En el perfil obtenido, se observa que C-AMP fue el primer sustrato carbonado en ser consumido, en 80 h de reacción y con una E_{C-AMP} de 100 ± 0.06 . C-E2 fue biodegradado posterior a 120 h de prueba, pero con una E_{C-E2} de 98.88 ± 0.44 . Ambos sustratos carbonados fueron transformados exclusivamente hasta C-HCO₃⁻ y se estimó un $Y_{C-HCO_3^-}$ de 1.01 ± 0.05 . No se cuantificó la producción de metabolitos secundarios (Tabla 6.11). N-NO₃⁻ fue consumido en 5 h de prueba con una $E_{N-NO_3^-}$ de 100 ± 0.01 y fue transformado hasta N₂ con un Y_{N_2} de 1.09 ± 0.03 . En estos ensayos no se cuantificó la acumulación de intermediarios del proceso desnitrificante.

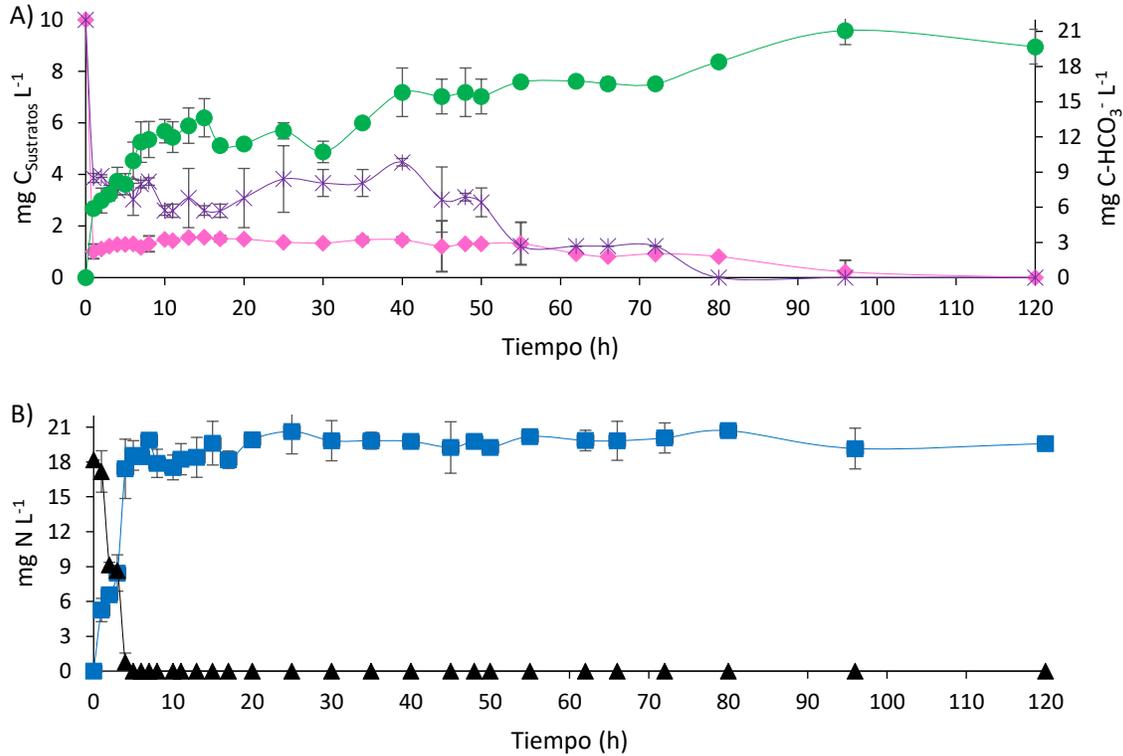


Figura 6.17. Perfil cinético de ensayos desnitrificantes con (mg L^{-1}) (10) C-E2 y (10) C-AMP en mezcla y N-NO_3^- a una C/N de 1.1. A) Compuestos carbonados: (\blacklozenge) C-E2, (\times) C-AMP y (\bullet) C-HCO_3^- ; B) Compuestos nitrogenados: (\blacktriangle) N-NO_3^- y (\blacksquare) N_2 .

En la tabla 6.11 se muestran los resultados obtenidos del cálculo de las eficiencias de consumo de sustratos y los rendimientos en todos los ensayos. En todos los casos se obtuvieron E superiores al 99 % y los Y fueron cercanos a 1. Aun cuando en los ensayos con la mezcla de $\text{C-CH}_3\text{COO}^-$, C-E2 y C-AMP se observó la producción transitoria de N-NO_2^- , no afectó al Y_{N_2} .

Tabla 6.11. Eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de productos de los ensayos desnitrificantes con C-E2, C-AMP y C-CH₃COO⁻ en mezcla.

Ensayo (mg L ⁻¹)	Eficiencias (%)				Rendimientos (Y)	
	C-E2	C-AMP	C-CH ₃ COO ⁻	N-NO ₃ ⁻	C-HCO ₃ ⁻	N ₂
(3.3) C-E2, C-AMP, C-CH ₃ COO ⁻	99.20 ± 2.24	100 ± 0.47	100 ± 0.01	100 ± 0.01	1.02 ± 0.06	1.13 ± 0.05
(10) C-E2, C-AMP, C-CH ₃ COO ⁻	100 ± 0.01	100 ± 0.01	100 ± 0.01	100 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.97 ± 0.01
(10) C-E2 y C-CH ₃ COO ⁻	99.13 ± 1.49	-	100 ± 0.01	100 ± 0.01	0.96 ± 0.02	1.12 ± 0.07
(10) C-E2 y C-AMP	98.88 ± 0.44	100 ± 0.06	-	100 ± 0.01	1.01 ± 0.05	1.09 ± 0.03

En cuanto al balance de materiales mostrado en la Tabla 6.12, no se generaron metabolitos carbonados y todos los sustratos fueron transformados únicamente hasta HCO₃⁻. Asimismo, no se acumularon intermediarios del proceso desnitrificante y todo NO₃⁻ fue transformado hasta N₂, como único producto del proceso.

Tabla 6.12. Balance de materia de ensayos desnitrificantes en lote con C-E2, C-AMP y C-CH₃COO⁻ en mezcla.

Compuestos carbonados				
Ensayo (mg L ⁻¹)	Entrada			Salida
	C-E2	C-AMP	C-CH ₃ COO ⁻	C-HCO ₃ ⁻
(3.3) C-E2, C-AMP, C-CH ₃ COO ⁻	3.3 ± 0.01	3.3 ± 0.01	3.3 ± 0.01	10.71 ± 0.29
(10) C-E2, C-AMP, C-CH ₃ COO ⁻	10 ± 0.02	10 ± 0.01	10 ± 0.02	24.80 ± 2.47
(10) C-E2 y C-CH ₃ COO ⁻	10 ± 0.03		10 ± 0.02	18.63 ± 1.42
(10) C-E2 y C-AMP	10 ± 0.01	10 ± 0.01		18.92 ± 1.93
Compuestos nitrogenados				
Ensayo (mg L ⁻¹)	Entrada		Salida	
	N-NO ₃ ⁻		N ₂	
(3.3) C-E2, C-AMP, C-CH ₃ COO ⁻	9.00 ± 0.01		9.35 ± 0.38	
(10) C-E2, C-AMP, C-CH ₃ COO ⁻	27.27 ± 0.06		25.97 ± 1.50	
(10) C-E2 y C-CH ₃ COO ⁻	18.18 ± 0.01		20.52 ± 0.12	
(10) C-E2 y C-AMP	18.18 ± 0.01		19.87 ± 0.66	

6.6. Ensayos de recuperación con C-CH₃COO⁻

El inóculo de los ensayos con 20 mg C-E2 L⁻¹ y 20 mg C-AMP L⁻¹ fue tomado y expuesto a 20 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹, por separado y con la finalidad de evaluar el daño provocado por los fármacos y compararlo con los resultados obtenidos en los ensayos de referencia. A manera de ejemplo, en la Figura 6.18 se muestra el perfil cinético obtenido en los ensayos de recuperación del lodo expuesto previamente a 20 mg C-E2 L⁻¹. En este se observa que CH₃COO⁻ fue consumido por completo a 72 h de haber comenzado el ensayo y obteniendo E_{C-CH₃COO⁻} del 97.96 ± 1.79 %, como se presenta en la Tabla 6.13. Comparado con el ensayo de referencia, se observó que el tiempo de biodegradación de acetato aumentó hasta 70 h. A la par del consumo de CH₃COO⁻ se produjo HCO₃⁻ como único producto del proceso con un Y_{C-HCO₃⁻} de 0.87 ± 0.03. En el caso del consumo de las especies de nitrógeno, NO₃⁻ fue consumido a partir de la 1 h de prueba, dado que no se cuantificó a lo largo del ensayo. Asimismo, a la par del consumo de nitrato, se produjo N₂ y este alcanzó un Y_{N₂} de 1.05 ± 0.05. No se produjeron y acumularon intermediarios del proceso desnitrificante.

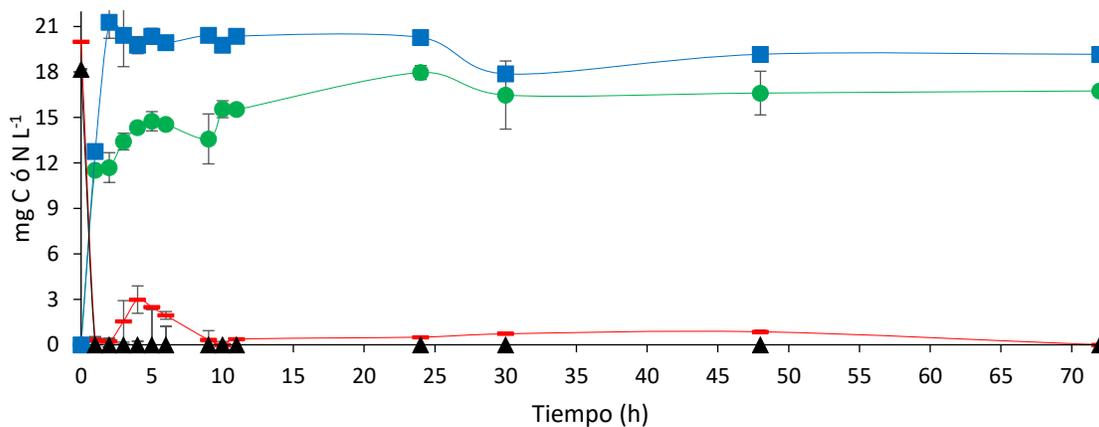


Figura 6.18. Perfil cinético de ensayo de recuperación con 20 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ y N-NO₃⁻ a una C/N de 1.1, pero con lodo previamente expuesto a 20 mg C-E2 L⁻¹. (—) C-CH₃COO⁻, (●) C-HCO₃⁻, (▲) N-NO₃⁻ y (■) N₂.

La Figura 6.19 muestra el perfil cinético obtenido en los ensayos de recuperación del lodo expuesto previamente a 20 mg C-AMP L⁻¹. En este se observa que CH₃COO⁻ fue consumido por completo en solo 1 h de ensayo, obteniendo una E_{C-CH₃COO⁻} del 100 ± 0.01 %, como se presenta en la Tabla 6.13. Comparado con el ensayo de referencia, se observó que el tiempo de biodegradación de acetato fue 1 h menor. A la par del consumo de CH₃COO⁻ se produjo

HCO_3^- como único producto del proceso con un $Y_{\text{C-HCO}_3^-}$ de 0.88 ± 0.01 . En el caso del consumo de las especies de nitrógeno, NO_3^- fue consumido a partir de la 1 h de prueba con $E_{\text{N-NO}_3^-}$ de 100 ± 0.01 %. Asimismo, a la par del consumo de nitrato, se produjo N_2 y este alcanzó un Y_{N_2} de 0.86 ± 0.06 . No se produjeron y acumularon intermediarios del proceso desnitrificante.

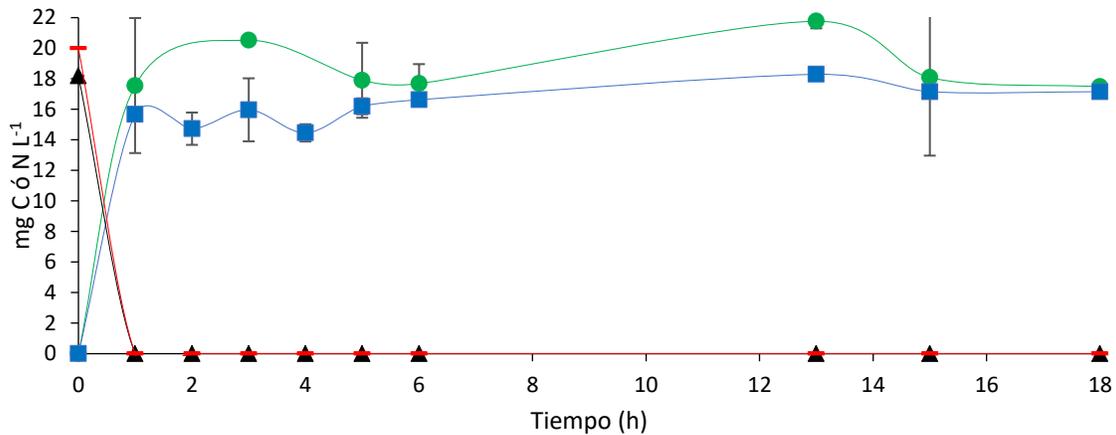


Figura 6.19. Perfil cinético de ensayo de recuperación con $20 \text{ mg C-CH}_3\text{COO}^- \text{ L}^{-1}$ y N-NO_3^- a una C/N de 1.1, pero con lodo previamente expuesto a $20 \text{ mg C-AMP L}^{-1}$. (—) $\text{C-CH}_3\text{COO}^-$, (●) C-HCO_3^- , (▲) N-NO_3^- y (■) N_2 .

La tabla 6.13 muestra los resultados del cálculo de las eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de los productos. En todos los casos se alcanzaron eficiencias cercanas al 100 % y rendimientos a 1, por lo que el proceso respiratorio del lodo no se vio afectado por su previa exposición a E2 y AMP, respectivamente. Cabe mencionar que el lodo utilizado, fue tomado de la planta de tratamiento de aguas residuales de Atotonilco de Tula, Hidalgo, la cual recibe gran cantidad de aguas contaminadas con diferentes compuestos orgánicos de todo tipo.

Tabla 6.13. Eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de productos de los ensayos desnitrificantes de recuperación con lodo de los ensayos con 20 mg C-E2 L⁻¹ y 20 mg C-AMP L⁻¹, como únicas fuentes de electrones.

Concentración (mg L ⁻¹)	E (%)		Y		
	C-CH ₃ COO ⁻	N-NO ₃ ⁻	C-HCO ₃ ⁻	N ₂	C-CO ₂
20 ^a	97.96 ± 1.79	100 ± 0.01	0.87 ± 0.03	1.05 ± 0.05	-
20 ^b	100 ± 0.01	100 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.86 ± 0.06	-

^a Ensayo con lodo previamente expuesto a 20 mg C-E2 L⁻¹; ^b Ensayo con lodo previamente expuesto a 20 mg C-AMP L⁻¹

6.7. Evaluación cinética de ensayos en lote

Los resultados del cálculo de las velocidades específicas de consumo de sustratos y generación de productos de todos los ensayos en lote se resumen en la Tabla 6.14. En esta se muestra que en los ensayos de referencia con C-CH₃COO⁻ como única fuente de electrones, la tendencia de la $q_{C-CH_3COO^-}$ fue en aumento y estuvo relacionada con el incremento de la concentración inicial de C-CH₃COO⁻. Así también, la $q_{C-HCO_3^-}$ mostró un comportamiento similar en los ensayos de referencia. Sin embargo, cuando se utilizó C-E2 y C-AMP como únicas fuentes de electrones y en mezcla, la $q_{C-HCO_3^-}$ en todos los ensayos fue menor en 9 y hasta 291 veces, comparado con la $q_{C-HCO_3^-}$ obtenida en los ensayos de referencia. Esto sugiere que la presencia de E2 y AMP genera efectos inhibitorios en las enzimas encargadas de oxidarlos. Así también, las propiedades fisicoquímicas de E2 y AMP les confieren cierta persistencia, la cual se ve reflejada en la $q_{C-HCO_3^-}$. Asimismo, en los ensayos de recuperación con lodo previamente expuesto a E2 y AMP, la $q_{C-HCO_3^-}$ fue 91.22 y 88.07 % igual a la obtenida en los ensayos de referencia.

En el caso de las especies nitrogenadas se puede observar que la $q_{N-NO_3^-}$ fue menor en los ensayos con E2 y AMP, por separado y en mezcla en magnitudes que van de 2.28 hasta 40.49 veces menores en comparación con las velocidades de consumo de N-NO₃⁻ obtenidas en los ensayos de referencia. Esto sugiere que la presencia de estradiol y ampicilina inhibe el proceso respiratorio del lodo. Incluso se ha mencionado que E2 genera inhibición competitiva en las enzimas (Li et al., 2020). Este mismo comportamiento se presentó en la q_{N_2} , puesto que las diferencias entre lo obtenido en los ensayos con E2 y AMP, comparado con los ensayos de referencia fue de 1.39 y hasta 89.76 veces menores. Por ello, estradiol y

ampicilina genera efectos negativos en el proceso metabólico de lodos desnitrificantes, dadas sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, ambos sustratos fueron consumidos completamente.

Tabla 6.14. Velocidades específicas de generación de productos y consumo de sustratos de ensayos de referencia a diferentes concentraciones de C-CH₃COO⁻.

Compuestos carbonados				
Ensayo (mg L ⁻¹)	q_{Sustratos}			q_{Productos}
	C-E2	C-AMP	C-CH₃COO⁻	C-HCO₃⁻
(10) C-CH ₃ COO ⁻	-	-	7.97 ± 0.04	5.13 ± 0.29
(20) C-CH ₃ COO ⁻	-	-	13.54 ± 0.65	23.39 ± 6.38
(30) C-CH ₃ COO ⁻			22.93 ± 1.95	22.51 ± 1.82
(50) C-CH ₃ COO ⁻			13.74 ± 1.62	13.86 ± 0.88
(10) C-E2	2.09 ± 0.24	-	-	0.51 ± 0.02
(20) C-E2	8.84 ± 0.01	-	-	0.08 ± 0.001
(10) C-AMP		1.08 ± 0.11	-	3.25 ± 0.45
(20) C-AMP		18.25 ± 5.13	-	0.03 ± 0.002
(3.3) C-E2, C-AMP, C-CH ₃ COO ⁻	0.49 ± 0.06	0.53 ± 0.04	1.46 ± 0.11	2.72 ± 0.33
(10) C-E2, C-AMP, C-CH ₃ COO ⁻	2.36 ± 0.01	0.35 ± 0.03	4.42 ± 0.23	0.39 ± 0.03
(10) C-E2 y C-CH ₃ COO ⁻	10.88 ± 0.01	-	3.85 ± 0.26	1.36 ± 0.16
(10) C-E2 y C-AMP	2.83 ± 0.01	2.04 ± 0.31	-	0.60 ± 0.04
(20) ¹⁴ C-CH ₃ COO ⁻	-	-	4.03 ± 0.25	4.68 ± 0.43
(20) ¹³ C-CH ₃ COO ⁻	-	-	12.41 ± 0.84	20.60 ± 0.50
Compuestos nitrogenados				
Ensayo (mg L ⁻¹)	q_{Sustratos}		q_{Productos}	
	N-NO₃⁻		N₂	
(10) C-CH ₃ COO ⁻		12.56 ± 1.47		10.08 ± 1.47
(20) C-CH ₃ COO ⁻		13.95 ± 0.01		50.83 ± 1.31
(30) C-CH ₃ COO ⁻		3.21 ± 0.30		4.43 ± 0.48
(50) C-CH ₃ COO ⁻		43.15 ± 7.72		17.51 ± 2.17
(10) C-E2		1.04 ± 0.08		0.56 ± 0.01
(20) C-E2		3.97 ± 0.38		3.20 ± 0.30
(10) C-AMP		1.76 ± 0.18		11.00 ± 0.01
(20) C-AMP		9.65 ± 4.63		17.91 ± 4.99
(3.3) C-E2, C-AMP, C-CH ₃ COO ⁻		1.80 ± 0.15		3.95 ± 0.36
(10) C-E2, C-AMP, C-CH ₃ COO ⁻		8.83 ± 3.04		3.04 ± 0.39
(10) C-E2 y C-CH ₃ COO ⁻		5.32 ± 0.41		4.16 ± 0.17
(10) C-E2 y C-AMP		4.30 ± 0.56		1.71 ± 0.09
(20) ¹⁴ C-CH ₃ COO ⁻		10.14 ± 0.01		21.23 ± 0.01

(20) ^B C-CH ₃ COO ⁻	13.15 ± 0.67	6.48 ± 1.25
--	--------------	-------------

^AEnsayos de recuperación con lodo expuesto a E2 y ^BAMP.

Diferentes reportes han estudiado procesos biológicos para la biodegradación de E2 y AMP, incluso algunos otros compuestos farmacéuticos con propiedades fisicoquímicas similares. Castellanos et al. (2021) reportaron q_{C-E2} de 1.41 $\mu\text{g g SSV}^{-1} \text{h}^{-1}$ en biorreactores de lecho móvil nitrificantes con 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de una mezcla con otros estrógenos sintéticos, entre ellos E2. Estos resultados fueron hasta 346 veces menores a la q_{C-E2} más pequeña ($0.49 \pm 0.06 \text{ mg C-E2 g SSV}^{-1} \text{h}^{-1}$) obtenida en los ensayos desnitrificantes y hasta 7715 veces menor, comparado con la q_{C-E2} más alta obtenida en los ensayos con 10 mg C-E2 L^{-1} en mezcla con 10 mg C-CH₃COO⁻ L^{-1} . Incluso en lo reportado por Castellanos et al. (2021) se obtuvieron velocidades de consumo de otros estrógenos menores a los de E2 como q_{E1} y q_{EE2} de 1.16 y 1.09 $\text{mg g SSV}^{-1} \text{h}^{-1}$. Amin et al. (2018) reportaron velocidades de consumo de E2 y sus metabolitos como E1 y EE2, en biorreactores nitrificantes bajo tiempos de retención hidráulicos de 11 días, iguales a 0.00141, 0.00116 y 0.00109 $\text{mg gr SSV}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectivamente. Estas son 346, 421 y 448 veces menor a las q_{C-E2} más baja obtenida en el presente trabajo en los ensayos con E2 en mezcla con AMP y CH₃COO⁻, respectivamente.

Incluso, si se comparan las velocidades obtenidas en el presente trabajo con lo reportado por otros autores, se puede encontrar que la q_{C-E2} y q_{C-AMP} fueron hasta 17.53 y 109.93 veces mayores a las reportadas por Peña et al. (2004) durante la eliminación de compuestos recalcitrantes provenientes de la industria petroquímica como Tolueno y Xileno, por un lodo desnitrificante.

En el caso del consumo de AMP, Ramírez et al. (2020) reportaron una q_{C-AMP} de 1.2 $\text{mg C-AMP g SSV}^{-1} \text{h}^{-1}$ por un lodo nitrificante en ensayos en lote con una concentración inicial de 50 mg C-AMP L^{-1} . Esta q_{C-AMP} es 15.4 veces menor a la obtenida en los ensayos realizados con 20 mg C-AMP L^{-1} como única fuente de electrones. Islas et al. (2017) obtuvieron una q_{C-AMP} de $0.7 \pm 0.0002 \text{ mg C-AMP g SSV}^{-1} \text{h}^{-1}$ con una concentración inicial de 10 mg C-AMP L^{-1} y en mezcla con 100 mg C-CH₃COO⁻ L^{-1} . Esta velocidad fue hasta 25 veces menor a la obtenida en el ensayo del presente trabajo con 20 mg C-AMP L^{-1} como única fuente de electrones.

Ruan et al. (2020) reportaron $q_{N-NO_3^-}$ de 5.72 y 5.82 $mg\ N-NO_3^-\ L^{-1}\ h^{-1}$ al exponer una cepa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* RAD-2 a 50, 100, 150, 200 y 300 $\mu g\ L^{-1}$ de ciprofloxacino y $q_{N-NO_3^-}$ de 6.21 y 6.46 con la misma concentración, pero de oxitetraciclinas. Estas velocidades fueron menores a lo obtenido en el presente trabajo con lodos desnitrificantes y en presencia de compuestos recalcitrantes y tóxicos como E2 y ampicilina.

Por otro lado, en algunos estudios en los que se ha trabajado con un lodo desnitrificante y expuesto a compuestos considerados como CEs se han reportado velocidades de consumo de NO_3^- -N menores a las del presente trabajo. González et al. (2012), reportó una velocidad de consumo de NO_2^- por un lodo desnitrificante de $8.88 \pm 0.12\ mg\ g\ SSV^{-1}\ d^{-1}$ ($0.37\ mg\ NO_2^-$ -N $g\ SSV^{-1}\ h^{-1}$) con 50 $mg\ p$ -cresol-C. Esta $q_{NO_2^-}$ es 1.08 veces menor a la reportada en este trabajo con AMP como único donador de electrones.

Esto evidencia que lodos provenientes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Atotonilco de Tula, Hidalgo y en Estado Estacionario Desnitrificante (EED) tuvieron mejor desempeño que los procesos ya reportados en la literatura. El proceso respiratorio no fue afectado por la presencia de E2 y AMP, por separado y en mezcla, dado que se obtuvieron eficiencias de biodegradación superiores al 99% y rendimientos cercanos a 1 en la producción, únicamente, de HCO_3^- y N_2 . Comparado con los procesos fisicoquímicos como los procesos de oxidación avanzada donde se generan radicales libres, HCO_3^- y N_2 representan un beneficio para el medio ambiente, dado que son compuestos considerados como inócuos y no alteran los ciclos biogeoquímicos de forma negativa.

6.8. Evaluación de toxicidad de efluentes de ensayos en lote

Los resultados obtenidos de la evaluación de toxicidad de los efluentes de los ensayos desnitrificantes con C-E2 y C-AMP a una concentración de 20 $mg\ L^{-1}$, se muestran en las Figuras 6.20 y 6.21, respectivamente.

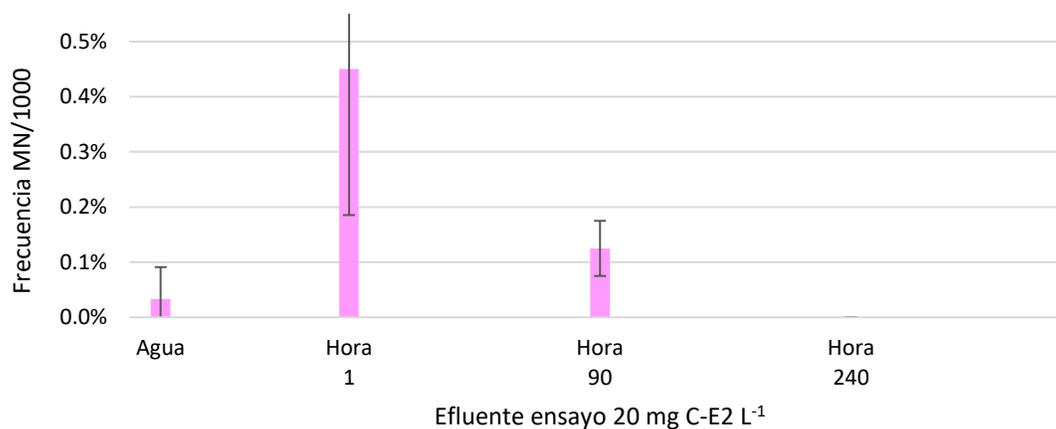


Figura 6.20. Comparación de frecuencia de MN inducidos por efluentes del ensayo con 20 mg C-E2 L⁻¹. (■) Frecuencia de MN/1000 células de *Vicia faba*.

En la Figura 6.20, se muestra que la frecuencia de MN disminuyó en relación al consumo de E2 y NO₃⁻ en la cinética del ensayo con 20 mg C-E2 L⁻¹. Los porcentajes disminuyeron de un 0.45 % a la 1 h de reacción, hasta a 0 % en 240 h, lo que representa una reducción del 100 % en la toxicidad. Contrario a ello, Orozco et al. (2018) evaluaron efectos genotóxicos mediante el bioensayo de MN y cometa. Esto al exponer a especies de carpa común (*Cyprinus carpio*) a diferentes concentraciones de E2 (1 ng L⁻¹, 1 µg L⁻¹ y 1 mg L⁻¹). El tiempo de exposición fue de 12 hasta 96 h a esas concentraciones. Se obtuvo que, a mayores tiempos de exposición, frecuencias de MN mayores y con 1 mg E2 L⁻¹ la frecuencia fue la más alta en comparación con las otras concentraciones. Este comportamiento y el daño en las células puede estar relacionado con la formación de metabolitos como 2- y 4-hidroxiestradiol (2-OH-E2 y 4-OH-E2) durante la biotransformación natural de E2.

En un estudio similar realizado por Orozco et al. (2019), evaluaron la toxicidad de 1 ng L⁻¹ y 1 µg L⁻¹ de E2 al oxidarse por medio de un proceso fotocatalítico con TiO₂ y una lámpara UV de 400 W (λ de 254 nm) en tanques de 20 L que contenían organismos adultos de carpa común (*Cyprinus carpio*). Los resultados reportados en este estudio muestran un 85 % de oxidación de E2 en solo 60 min. Sin embargo, al aumentar el tiempo del proceso fotocatalítico y con ello disminuir la concentración de E2 en agua, aumenta la concentración de E2 en sangre de los organismos. El grado de lipoperoxidación y la presencia de hydroperoxidos en sangre de los organismos aumentó en relación al tiempo de reacción en el proceso fotocatalítico. Esto por la formación de semiquinonas en el proceso, las cuales al

reaccionar con O_2 generan quinonas que forman el radical superóxido que es responsable de la oxidación celular. Estos resultados son totalmente contrarios a lo obtenido en los ensayos desnitrificantes, donde la toxicidad disminuyó en relación al consumo y biotransformación de E2.

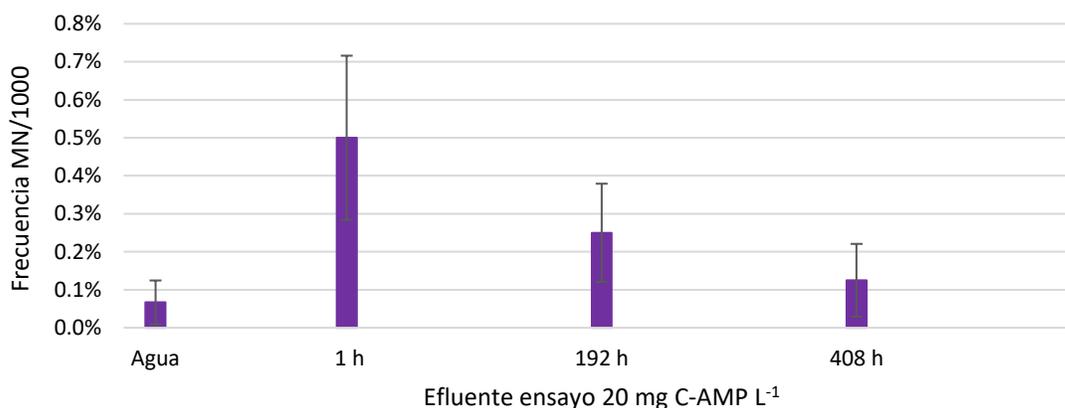


Figura 6.21. Comparación de frecuencia de MN inducidos por efluentes del ensayo con 20 mg C-AMP L⁻¹. (■) Frecuencia de MN/1000 células de Vicia faba.

En el caso de la evaluación de los efluentes de los ensayos con 20 mg C-AMP L⁻¹, se puede observar un comportamiento similar al de la Figura 6.20, donde la frecuencia de MN disminuyó conforme aumentaba el consumo de C-AMP. En este ensayo, los porcentajes disminuyeron de 0.5 % en la 1 h de reacción, hasta 0.125 % en la 408 h. Esto representó una baja en la toxicidad del efluente del 75 %.

VII.- CONCLUSIONES

- ❖ Se logró alcanzar el Estado Estacionario Desnitrificante (EED) de un lodo metanogénico en sólo 90 días, con eficiencias en la biodegradación de acetato de sodio y nitrato de sodio de más del 99% y rendimientos de bicarbonato de sodio y nitrógeno molecular del 0.91.
- ❖ Durante la operación del reactor UASB no se observó la producción y acumulación de metabolitos e intermediarios propios del proceso desnitrificante.
- ❖ En ensayos realizados en presencia de lodo desnitrificante inactivo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al usar un lodo estéril, seco o previamente expuesto a luz UV.
- ❖ En ensayos realizados en ausencia de lodo desnitrificante inactivo, se descartaron pérdidas de acetato ampicilina y 17 β -estradiol y nitrato por absorción, reacción química y volatilización.
- ❖ En ensayos realizados en ausencia y presencia de lodo desnitrificante inactivo, se presentó una precipitación de AMP y E2 bajo condiciones desnitrificantes.
- ❖ Los ensayos de referencia mostraron la completa mineralización de 10, 20, 30 y 50 mg C-CH₃COO⁻ L⁻¹ con eficiencias de 100 % y rendimiento de bicarbonato y nitrógeno molecular de 1, sin la producción de intermediarios.
- ❖ El lodo desnitrificante tuvo la capacidad de biodegradar 10 y 20 mg C-AMP como única fuente de electrones a una relación C/N de 1.1, obteniendo E_{C-AMP}, y E_{N-NO₃}- superiores al 95 % y Y_{N₂} y Y_{HCO₃}- mayores a 0.9.
- ❖ El lodo desnitrificante tuvo la capacidad de biodegradar 10 y 20 mg C-E2 como única fuente de electrones a una relación C/N de 1.1, obteniéndose E_{C-E2} y E_{N-NO₃}- superiores al 95 % y Y_{N₂} y Y_{HCO₃}- mayores a 0.9.
- ❖ El lodo desnitrificante tuvo la capacidad de biodegradar diferentes mezclas de C-AMP y C-E2 a diferentes concentraciones como fuentes de electrones a una C/N de 1.1, logrando una completa mineralización de los sustratos en todos los casos.
- ❖ La mineralización completa de 17 β -estradiol y ampicilina se asoció con el origen del lodo, debido a que el lodo que se uso es proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Atotonilco y está continuamente expuesto a un gran número de contaminantes recalcitrantes domésticos e industriales.

- ❖ Durante los ensayos en lote, no se generaron metabolitos secundarios de 17β -estradiol ni de ampicilina.
- ❖ Durante el desarrollo de los ensayos con $10 \text{ mg C-AMP L}^{-1}$ se observó una producción transitoria de NO_2^- con $Y_{\text{NO}_2^-}$ de 0.0406.
- ❖ La evaluación del proceso respiratorio desnitrificante en la biodegradación 17β -estradiol, acetato y ampicilina se llevó a cabo eficiente y eficazmente. Dado que en todos los ensayos se obtuvieron eficiencias del 100% y rendimientos cercanos a 1.
- ❖ El mayor efecto negativo sobre la cinética del proceso respiratorio desnitrificante se presentó en el ensayo con $20 \text{ mg C-E2 L}^{-1}$ y $20 \text{ mg C-AMP L}^{-1}$ por separado, dado que se obtuvieron velocidades específicas de consumo de sustratos de hasta 280 veces menores comparadas con los ensayos de referencia.
- ❖ Durante los ensayos en lote con las diferentes mezclas se demostró que E2 fue más recalcitrante para ser biodegradado por el lodo desnitrificante.
- ❖ Con los resultados del balance de materia en la evaluación del reactor UASB, los ensayos en lote de referencia y los desnitrificantes con estradiol y ampicilina, se demuestra que a la relación trabajada el proceso es desasimilativo, debido a que los sustratos usados fueron transformados completamente a bicarbonato y a nitrógeno molecular con rendimientos cercanos a 1.
- ❖ En los ensayos de recuperación con lodo previamente expuesto a E2 y AMP, se presentó un efecto negativo en la cinética del lodo, dado que se obtuvieron velocidades específicas de hasta 3.99 y 6.44 veces menores a las obtenidas en los ensayos de referencia, respectivamente.
- ❖ La frecuencia de MN en los ensayos con $20 \text{ mg C-E2 L}^{-1}$ y $20 \text{ mg C-AMP L}^{-1}$ estuvo relacionada con la concentración de los fármacos y, por lo tanto, la genotoxicidad del efluente disminuye un 100 y 75 %, respectivamente, cuando se consumen por completo los sustratos.

VIII.- RECOMENDACIONES

- Evaluar la biodegradación de E2 y AMP a diferentes concentraciones y mezclas. Así como a diferentes relaciones C/N.
- Realizar análisis en espectrometría de masas con la finalidad de conocer y proponer rutas de biodegradación de E2 y AMP.
- Realizar un análisis microbiológico con la finalidad de conocer que bacterias son las responsables de biodegradar E2 y AMP en proceso desnitrificante.
- Aumentar el número de contaminantes en el agua sintética, con la finalidad de replicar las condiciones de un agua residual real, pero en laboratorio.
- Diseñar un tren de tratamiento de aguas residuales a escala piloto en el que se incluyan procesos con lodos desnitrificantes.
- Con los parámetros cinéticos encontrados, proponer el escalamiento del proceso a nivel industrial mediante procedimientos de diseño ya establecidos.
- Realizar un análisis financiero de la factibilidad del proceso desnitrificante como proceso secundario en el tratamiento de aguas residuales.
- Continuar evaluando la genotoxicidad de los efluentes de los ensayos, a fin de asegurar la nula toxicidad al finalizar el proceso.

IX.- Referencias.

- Albina, P., Durban, N., Bertron, A., Albrecht, A., Robinet, J. C. y Erable, B. (2021). Nitrate and nitrite bacterial reduction at alkaline pH and high nitrate concentrations, comparison of acetate versus dihydrogen as electron donors. *Journal of Environmental Management*, 280. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111859>
- Almakki, A., Jumas, E., Marchandin, H. y Licznar, P. (2019). Antibiotic resistance in urban runoff. *Science of the Total Environment*, 667, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.183>
- Amin, M. M., Bina, B., Ebrahim, K., Yavari, Z. y Mohammadi, F. (2017). Biodegradation of natural and synthetic estrogens in moving bed bioreactor. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2017.06.006>
- Anjali, R. y Shanthakumar, S. (2019). Insights on the current status of occurrence and removal of antibiotics in wastewater by advanced oxidation processes. *Journal of Environmental Management*, 246, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.090>
- APHA. (1999). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (L. S. Clesceri, A. E. Greenberg, & E. A.D., eds.). Washington D.C: WEF-APHA-AWWA.
- Banda, Y. R. (2018). *Caracterización fisiológica y cinética en un reactor de lote secuenciado (SBR) de un lodo desnitrificante alimentado con ampicilina*. [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM).
- Banda, Y. R. (2016). *Biodegradación de ampicilina mediante desnitrificación: caracterización cinética y fisiológica*. [Tesis especialidad]. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM).
- Beccari, M., Passino, R., Ramadori, R. y Tandoi, V. (1983). Kinetics of dissimilatory nitrate and nitrite reduction in suspended growth culture. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 55(1), 58–64.
- Beier, M., Feldkämper, I. y Freyschmidt, A. (2021). Model assisted identification of N₂O mitigation strategies for full-scale reject water treatment plants. *Water Science and Technology*, 84(2), 349–363. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.141>
- Bennett, J. L., Mackie, A. L., Park, Y. y Gagnon, G. A. (2018). Advanced oxidation processes for treatment of 17 β -Estradiol and its metabolites in aquaculture wastewater. *Aquacultural Engineering*, 83, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.08.003>
- Beristain, L., Martínez, S., De María Cuervo, F. de M. y Ramírez, F. (2015). Dynamics of a microbial community exposed to several concentrations of 2-chlorophenol in an anaerobic sequencing batch reactor. *Environmental Technology*, 36(14), 1776–1784. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1010595>

- Bernal, A. y Paolieri, D. (2022). The influence of estradiol and progesterone on neurocognition during three phases of the menstrual cycle: Modulating factors. *Behavioural Brain Research*, 417, 113593. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113593>
- Biancullio, F., Moreira, N. F. F., Ribeiro, A. R., Manaia, C. M., Faria, J. L., Nunes, O. C., Castro, S.M. y Silva, A. M. T. (2019). Heterogeneous photocatalysis using UVA-LEDs for the removal of antibiotics and antibiotic resistant bacteria from urban wastewater treatment plant effluents. *Chemical Engineering Journal*, 367, 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.02.012>
- Cadena, A., Texier, A. C., Martínez, I. G. y Hernández, J. G. (2019). Inhibitory effects of quinoid redox mediators on a denitrifying culture. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 40(10), 1306–1315. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1421264>
- Castellanos, R. M., Bassin, J. P., Bila, D. M. y Dezotti, M. (2021). Biodegradation of natural and synthetic endocrine-disrupting chemicals by aerobic granular sludge reactor: Evaluating estrogenic activity and estrogens fate. *Environmental Pollution*, 274, 116551. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116551>
- Castro, L. I., Cerro, M., Toledo, M. L., Gómez, L. M. y Saldívar-Santiago, M. D. (2021). Análisis de fármacos en aguas residuales de tres hospitales de la ciudad de Puebla, México. *Ingeniería Del Agua*, 25(1), 59-73. <https://doi.org/10.4995/ia.2021.13660>
- Cervantes, F. J. (2009). Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution. In *Water Intelligence Online*, 8. <https://doi.org/10.2166/9781780401799>
- Cervantes, F., Pérez, J. y Gómez, J. (2000). Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(2), 73–82.
- Chávez, A., Maya, C., Gibson, R. y Jiménez, B. (2011). The removal of microorganisms and organic micropollutants from wastewater during infiltration to aquifers after irrigation of farmland in the Tula Valley, Mexico. *Environmental Pollution*, 159(5), 1354–1362. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.01.008>
- Chen, F., Zheng, Y., Hou, L., Zhou, J., Yin, G. y Liu, M. (2019). Denitrifying anaerobic methane oxidation in marsh sediments of Chongming eastern intertidal fl at. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110681. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110681>
- Chen, X., Yin, H., Li, G., Wang, W., Keung, P., Zhao, H. y An, T. (2019). Antibiotic-resistance gene transfer in antibiotic-resistance bacteria under different light irradiation: Implications from oxidative stress and gene expression. *Water Research*, 149, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.019>
- COFEPRIS, 2011. Criterios para la Validación de Métodos Analíticos, México, D.F.:Secretaría de Salud.

- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2002. Guía de Validación de Métodos Analíticos, México, D.F.: CNQFB.
- Conthe, M., Lycus, P., Arntzen, M. Ø., Ramos, A., Frostegård, Å., Bakken, L. R., Kleerebezem, R. y Loosdrecht, M. C. M. Van. (2019). Denitrification as an N₂O sink. *Water Research*, 151, 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.087>
- Cuervo, F. de M., Martínez, E., Texier, A. C. y Gómez, J. (2017). Denitrification in the Presence of Chlorophenols: Progress and World' s largest Science. *Technology & Medicine Open Access book publisher*, (July). <https://doi.org/10.5772/intechopen.68860>
- Cuervo, F. de M., Martinez, F., Gutiérrez, M., Noyola, R. A. y Gómez, J. (1999). Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Water Science and Technology*, 40(8), 123–130. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00617-4](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00617-4)
- De Sotto, R., Lee, X. J. y Bae, S. (2022). Acute exposure effects of tetracycline, ampicillin, sulfamethoxazole, and their mixture on nutrient removal and microbial communities in the activated sludge of air-scouring and reciprocation membrane bioreactors. *Journal of Environmental Management*, 304(1), 114165. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114165>
- Djebbi, E., Yahia, M. N. D., Farcy, E., Pringault, O. y Bonnet, D. (2022). Acute and chronic toxicity assessments of 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinylestradiol (EE2) on the calanoid copepod *Acartia clausi*: Effects on survival, development, sex-ratio and reproduction. *Science of the Total Environment*, 807, 150845. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150845>
- Duan, H., Hu, J., Xiao, L., Lv, J., Zhang, Y. y Zhao, X. (2022). β -Estradiol inhibits melatonin synthesis and melatonin receptor expression in sheep granulosa cells. *Gene*, 814, 146128. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146128>
- Ebele, A. J., Abou, M. y Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>
- Egea, A., Gutiérrez, S. y Quiroga, J. M. (2019). Removal of emerging contaminants from wastewater through pilot plants using intermittent sand/coke filters for its subsequent reuse. *Science of the Total Environment*, 646, 1232–1240. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.399>
- Elizalde, A., Martínez, H., Galar, M., Dublán, O., Islas, H., Rodríguez, J., Castañeda, G., Lizcano, I. y Gómez, L. M. (2016). Effect of amoxicillin exposure on brain, gill, liver, and kidney of common carp (*Cyprinus carpio*): The role of amoxicilloic acid. *Environmental Toxicology*, 32(4), 1102–1120. <https://doi.org/10.1002/tox.22307>

- Ezeuko, A. S., Ojemaye, M. O., Okoh, O. O. y Okoh, A. I. (2021). Technological advancement for eliminating antibiotic resistance genes from wastewater: A review of their mechanisms and progress. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 106183. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106183>
- Fernández, L., Louvado, A., Esteves, V. I., Gomes, N. C. M., Almeida, A. y Cunha, Â. (2017). Biodegradation of 17 β -estradiol by bacteria isolated from deep sea sediments in aerobic and anaerobic media. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.029>
- García, J. (2012). Ensayo de genotoxicidad: micronúcleos. En: García, N. E., Gómez, C. M. A. y Juárez, S.L. (Comps). Manual de Técnicas en Genética y Ambiente. Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. p.103-116.
- Gómez, J. & Goma, G. (1986). Effect of different inoculum levels of heterogeneous mixed culture in acidogenic fermentation. *Biotechnology Letters*, 8(11), 833-836. 10.1007/BF01020834.
- González, G., Beristain, R., Cuervo, F. de M., Cervantes, F. J. & Gómez, J. (2012). Bioresource Technology Simultaneous oxidation of ammonium and p -cresol linked to nitrite reduction by denitrifying sludge. *Bioresource Technology*, 103, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.086>
- González, G., Cuervo, F. de M., Cervantes, F. J., Beristain, R. & Gómez, J. (2013). Nitrite as oxidizing power for p -cresol removal using a denitrifying sludge: kinetic study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88, 2176–2180. <https://doi.org/10.1002/jctb.4082>
- Han, H., Chen, C., Bai, M., Xu, T., Yang, H., Shi, A., Ding, G. y Li, J. (2020). Abundance and diversity of denitrifying bacterial communities associated with N₂O emission under long-term organic farming. *European Journal of Soil Biology*, 97, 103153. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103153>
- Hasan, M. K., Shahriar, A. y Jim, K. U. (2019). Water pollution in Bangladesh and its impact on public health. *Heliyon*, 5(8), e02145. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02145>
- Hassanpour, B., Geohring, L. D., Klein, A. R., Giri, S., Aristilde, L. y Steenhuis, T. S. (2019). Application of denitrifying bioreactors for the removal of atrazine in agricultural drainage water. *Journal of Environmental Management*, 239, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.03.029>
- Huang, B., Tang, J., He, H., Gu, L. y Pan, X. (2019). Ecotoxicological effects and removal of 17 β -estradiol in chlorella algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.129>

- I Islas, I., Romo, C. y Cuervo, F. de M. (2017). Ampicillin Mineralization by Denitrifying Process : Kinetic and Metabolic Effects. *Appl Biochem Biotechnol*, 186. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2483-7>
- Ilyas, H., Masih, I. y van Hullebusch, E. D. (2021). The anaerobic biodegradation of emerging organic contaminants by horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 83(11), 2809–2828. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.178>
- Khan, S., Naushad, M., Govarthanan, M., Iqbal, J. y Alfadul, S. (2022). Emerging contaminants of high concern for the environment: Current trends and future research. *Environmental Research*, 207, 112609. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112609>
- Kim, S. H., Tian, Q., Fang, J. y Sung, S. (2015). Removal of 17- β estradiol in water by sonolysis. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 102, 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.017>
- Kovacic, M., Kopicic, N., Kusic, H. y Bozic, A. L. (2018). Solar driven degradation of 17 β -estradiol using composite photocatalytic materials and artificial irradiation source: Influence of process and water matrix parameters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 361, 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.05.015>
- Lencioni, V., Bellamoli, F. y Paoli, F. (2020). Multi-level effects of emerging contaminants on macroinvertebrates in Alpine streams: From DNA to the ecosystem. *Ecological Indicators*, 117, 106660. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106660>
- Li, C., Gu, Z., Zhu, S. y Liu, D. (2020). 17 β -Estradiol removal routes by moving bed biofilm reactors (MBBRs) under various C/N ratios. *Science of the Total Environment*, 741. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140381>
- Li, C., Lan, L., Tadda, M. A., Zhu, S., Ye, Z. y Liu, D. (2020). Interaction between 17 β -estradiol degradation and nitrification in mariculture wastewater by *Nitrosomonas europaea* and MBBR. *Science of the Total Environment*, 705. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135846>
- Li, L., Ge, H., Gu, D., Meng, H., Li, Y., Jia, M., Zheng, C. y Zhou, X. (2018). The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance. *Microbiological Research*, 215, 126–129. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.07.005>
- Li, S., Liu, J., Sun, K., Yang, Z. y Ling, W. (2020). Degradation of 17 β -estradiol by *Novosphingobium* sp. ES2-1 in aqueous solution contaminated with tetracyclines. *Environmental Pollution*, 260, 114063. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114063>
- Lukač, J., Terzić, J., Maurice, L. D. y Lapworth, D. J. (2022). Emerging organic contaminants in karst groundwater: A global level assessment. *Journal of Hydrology*, 604. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2021.127242>

- Madden, J. C., Enoch, S. J., Hewitt, M. y Cronin, M. T. D. (2009). Pharmaceuticals in the environment: Good practice in predicting acute ecotoxicological effects. *Toxicology Letters*, 185(2), 85–101. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.12.005>
- Manage, P. M. y Liyanage, G. Y. (2019). Antibiotics induced antibacterial resistance. *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology*, 429-448. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816189-0.00018-4>
- Martínez, E., Cuervo, F. de M., Texier, A. & Gómez, J. (2019). Physiologic impact of 2-chlorophenol on denitrification process in mixture with different electron sources. *3 Biotech*, 9(5), 1-9. [10.1007/s13205-019-1723-7](https://doi.org/10.1007/s13205-019-1723-7)
- Martínez, E., González, H., Martínez, S., Texier, A. C., Cuervo, F. de M. y Gómez, J. (2012). Effect of phenol and acetate addition on 2-chlorophenol consumption by a denitrifying sludge. *Environmental Technology*, 33(12), 1375–1382. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.627882>
- Martínez, F., Lema, J., Méndez, R., Cuervo, F. de M. & Gómez, J. (2004). Role of exopolymeric protein on the settleability of nitrifying sludges. *Bioresource Technology*, 94(1), 43-48. [10.1016/j.biortech.2003.11.010](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.11.010)
- Martínez, P. F., Díaz, C. y Moeller, G. (2019). Seguridad hídrica en México: diagnóstico general y desafíos principales. *Ingeniería Del Agua*, 23(2), 107. <https://doi.org/10.4995/ia.2019.10502>
- Martínez, S., Cuervo, F. de M. & Gómez, J. (2007). Toluene mineralization by denitrification in an up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Bioresource Technology*, 98, 1717–1723. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.046>
- Martínez, S., Olguín, E. J., Gómez, J. y Cuervo, F. de M. (2009). Acetate enhances the specific consumption rate of toluene under denitrifying conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(4), 679–687. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9321-z>
- Matich, E. K., Chavez, N. G., Aga, D. S. y Atila, G. E. (2019). Applications of metabolomics in assessing ecological effects of emerging contaminants and pollutants on plants. *Journal of Hazardous Materials*, 373, 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.02.084>
- Matsubara, M. E., Helwig, K., Hunter, C., Roberts, J., Subtil, E. L., & Coelho, L. H. G. (2020). Amoxicillin removal by pre-denitrification membrane bioreactor (A/O-MBR): Performance evaluation, degradation by-products, and antibiotic resistant bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192, 110258. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110258>
- Meza, E. R. (2008). *Efecto de distintos mediadores redox en la eliminación simultánea de sulfuro y p-cresol por vía desnitrificante*. [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM).

- Orozco, L., Gómez, L. M., Elizalde, A., Natividad, R., Fabian L. y SanJuan, N. (2019). 17- β -Estradiol: Significant reduction of its toxicity in water treated by photocatalysis. *Science of the Total Environment*, 669, 955–963. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.190>
- Orozco, L., Gutiérrez, A. A., SanJuan, N., Islas, H., García, S., Galar, M. y Gómez, L. M. (2018). 17 β -Estradiol induces cyto-genotoxicity on blood cells of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 191, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.030>
- Parida, V. K., Saidulu, D., Majumder, A., Srivastava, A., Gupta, B. y Gupta, A. K. (2021). Emerging contaminants in wastewater: A critical review on occurrence, existing legislations, risk assessment, and sustainable treatment alternatives. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105966. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105966>
- Peña, A., Olmos, A., Viniegra, G., Cuervo, F. de M. & Gómez, J. (2004). Denitrification in presence of benzene, toluene, and m-xylene. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 119(3), 195–208. <https://doi.org/10.1007/s12010-004-0002-0>
- Petrie, B., Barden, R. y Kasprzyk-hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, 72, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- Phan, H. V., Hai, F. I., Kang, J., Dam, H. K., Zhang, R., Price, W. E. y Nghiem, L. D. (2014). Simultaneous nitrification/denitrification and trace organic contaminant (TrOC) removal by an anoxic-aerobic membrane bioreactor (MBR). *Bioresource Technology*, 165(1), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.094>
- Purba, L. D. A., Md Khudzari, J., Iwamoto, K., Mohamad, S. E., Yuzir, A., Abdullah, N. y Hermana, J. (2022, February 1). Discovering future research trends of aerobic granular sludge using bibliometric approach. *Journal of Environmental Management*, 303. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114150>
- Rambags, F., Tanner, C. C., Stott, R. y Schipper, L. A. (2019). Bacteria and virus removal in denitrifying bioreactors: Effects of media type and age. *Ecological Engineering*, 138, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.06.021>
- Ramírez, J. E., Rangel, J. R., Limberger, C., Damasceno, S., Buitrón, G. & Cervantes, F. J. (2017). Denitrification of metallurgic wastewater: mechanisms of inhibition by Fe, Cr and Ni. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(2), 440–449. <https://doi.org/10.1002/jctb.5374>
- Ramírez, J. J., Cuervo, F. de M. & Texier, A. (2020). Ampicillin biotransformation by a nitrifying consortium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 3(36), 21. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-2798-3>

- Ruan, Y., Kumar, M., Cai, L., Lu, H., Xu, X. y Li, W. (2020). Simultaneous aerobic denitrification and antibiotics degradation by strain *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* RAD-2. *Bioresource Technology*, 313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123609>
- Saidulu, D., Gupta, B., Gupta, A. K. y Ghosal, P. S. (2021). A review on occurrences, eco-toxic effects, and remediation of emerging contaminants from wastewater: Special emphasis on biological treatment based hybrid systems. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105282. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105282>
- Salas, J. A., Cuervo, F. de M. & Texier, A. C. (2016). Simultaneous oxidation of ammonium and cresol isomers in a sequencing batch reactor: physiological and kinetic study. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(33), 25667–25675. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6293-1>
- Santos, F., Almeida, C. M. R., Ribeiro, I., Ferreira, A. C. y Mucha, A. P. (2019). Removal of veterinary antibiotics in constructed wetland microcosms – Response of bacterial communities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 894–901. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.078>
- Shareef, A., Angove, M. J., Wells, J. D. & Johnson, B. B. (2006). Aqueous Solubilities of Estrone, 17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol, and Bisphenol A. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 51(3), 879-881. [10.1021/je050318c](https://doi.org/10.1021/je050318c)
- Shitu, A., Liu, G., Muhammad, A. I., Zhang, Y., Tadda, M. A., Qi, W., Liu, D., Ye, Z. y Zhu, S. (2021). Recent advances in application of moving bed bioreactors for wastewater treatment from recirculating aquaculture systems: A review. *Aquaculture and Fisheries*, 7, 244–258. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.04.006>
- Skoog, D. A., West, D. M. y Holler, F.J. (1995). Fundamentos de química analítica. Novena edición. México. Editorial Cengage Learning.
- Sophia A., C. y Lima, E. C. (2018). Removal of emerging contaminants from the environment by adsorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.026>
- Taheran, M., Naghdi, M., Brar, S. K., Verma, M. y Surampalli, R. Y. (2018). Emerging contaminants: Here today, there tomorrow!. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 10, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.05.010>
- Tang, Y., Li, Y., Zhan, L., Wu, D., Zhang, S., Pang, R. y Xie, B. (2022). Removal of emerging contaminants (bisphenol A and antibiotics) from kitchen wastewater by alkali-modified biochar. *Science of the Total Environment*, 805, 150158. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150158>

- Usyskin, A., Hadar, Y., Yermiyahu, U. & Minz, D. (2020). Elevated CO₂ has a significant impact on denitrifying bacterial community in wheat roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 142, 107697. [10.1016/j.soilbio.2019.107697](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107697).
- Vargas, S. (2019). Escasez, trasvases y redistribución del agua en México. 14–29.
- Varsha, M., Senthil Kumar, P. y Senthil Rathi, B. (2022). A review on recent trends in the removal of emerging contaminants from aquatic environment using low-cost adsorbents. *Chemosphere*, 287, 132270. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132270>
- Wang, Y., Sun, Q., Li, Y., Wang, H., Wu, K. y Yu, C. P. (2019). Biotransformation of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol by four species of microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 723–732. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.061>
- Wiesmann, U. (1994). Biological nitrogen removal from wastewater. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 51, 113–154.
- Xu, H., Yu, Z. H., Ge, M. J., Shen, J. X., Han, F., Pan, C., Chen, J. J., Zhu, X. L., Hou, W. Y., Hou, Y. Q. y Lu, Y. P. (2021). Estradiol attenuates chronic restraint stress-induced dendrite and dendritic spine loss and cofilin1 activation in ovariectomized mice. *Hormones and Behavior*, 135, 105040. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2021.105040>
- Yu, C. P., Deeb, R. A. y Chu, K. H. (2013). Microbial degradation of steroidal estrogens. *Chemosphere*, 91(9), 1225–1235. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.112>
- Yu, N., Zhao, C., Ma, B., Li, S., She, Z., Guo, L., Zhang, Q., Zhao, Y., Jin, C. y Gao, M. (2019). Impact of ampicillin on the nitrogen removal, microbial community and enzymatic activity of activated sludge. *Bioresource Technology*, 272, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.048>
- Zhang, K., Zhang, Z., Hu, Z., Zeng, F., Chen, C., Yang, X. y Li, Y. (2020). Bacterial community composition and function succession under aerobic and anaerobic conditions impacts the biodegradation of 17 β -estradiol and its environmental risk. *Environmental Pollution*, 115155. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115155>
- Zhang, L., Sun, F., Wu, D., Yan, W. y Zhou, Y. (2020). Biological conversion of sulfamethoxazole in an autotrophic denitrification system. *Water Research*, 185. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116156>
- Zhang, Y. y Zhou, J. L. (2005). Removal of estrone and 17 β -estradiol from water by adsorption. *Water Research*, 39(16), 3991–4003. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.019>