



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**BIODEGRADACIÓN DE AMPICILINA MEDIANTE DESNITRIFICACIÓN:
CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y FISIOLÓGICA**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGIA**

PRESENTA:

I.B.I. YENY RUTH BANDA SORIANO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Microbiana W-004 del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, gracias al apoyo otorgado por el Consejo Divisional de la DCBS de la UAM-I

Miembros del Jurado

Directora de Tesis
Dra. Flor de María Cuervo López



Revisor Externo
Dra. Emir Martínez Gutiérrez



Agradecimientos.

Agradezco de todo corazón a la Dra. Flor de María Cuervo López, por su asesoría, tiempo y motivación para realizar este trabajo, Ya que sin su ayuda esto hubiese sido difícil. Fue un privilegio contar con su guía y su ayuda.

A la Dra. Emir Martínez Gutiérrez por su colaboración en este trabajo, sugerencias, disposición y críticas constructivas y el tiempo para la revisión de esta tesis.

A los Dres. Anne-Claire Texier y Felipe Martínez, por su tiempo y sus consejos en las revisiones de este trabajo y el manejo de equipos dentro del laboratorio.

A los compañeros del W004, Miguel Arellano, Miguel Jardines, Julio, Leydi Juan, Aarón y Lynet. Gracias por su compañía y ayuda.

A mis padres y hermanos, por creer en mí, darme el apoyo y el calor de hogar que necesite en todo momento y que siempre me impulsan a intentar cosas nuevas y salir adelante. Gracias por estar conmigo.

A Gerardo, que siempre me ayudo con mis dudas externas y darme ese jalón para seguir adelante y no darme por vencida.

Dedicatorias.

Dedico este trabajo de manera especial a mis padres José y Enedina pues ellos fueron el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, sentaron en mi las bases y valores de responsabilidad, educación y dedicación.

A mis hermanos David, Daniel, Jesús y Ulises ustedes son mi ejemplo del tipo de persona que quiero ser y mi motivación para ser alguien en esta vida.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Desnitrificación	6
3.1. Microbiología de la desnitrificación	6
3.2. Bioquímica de la desnitrificación	8
3.3. Factores que afectan la desnitrificación	10
1.1.1. Oxígeno	10
1.1.2. Óxidos de nitrógeno	10
1.1.3. Temperatura y pH.....	10
1.1.4. Relación C/N	11
4. Antecedentes	12
5. Justificación	15
6. Hipótesis.....	15
7. Objetivos	16
7.1. Objetivos Generales	16
7.2. Objetivos Particulares	16
8. Metodología.....	17
8.1. Reactor desnitrificante UASB.....	17
8.2. Medio de cultivo	17
8.3. Ensayos en lote	17
8.4. Evaluación de los cultivos.....	18
9. Métodos analíticos.....	21
9.1. Cuantificación de nitrato NO_3^- y nitrito NO_2^-	22
9.2. Cuantificación de carbono total (CT), orgánico (CO) e inorgánico (CI)	23
9.3. Cuantificación de acetato.....	24
9.4. Cuantificación de gases	25
9.5. Cuantificación de Ampicilina	26
9.6. Cuantificación de sólidos suspendidos.	27
9.7. Balance de Nitrógeno y Carbono	27

10. Resultados	28
11. Conclusiones.....	50
12. Referencias	51

Resumen

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento acerca de la eliminación de ampicilina (AMP) de aguas residuales usando a la desnitrificación como proceso de tratamiento biológico. El trabajo se realizó en cuatro etapas. En una primera etapa se estabilizaron lodos desnitrificantes en un reactor UASB de 0.8L operando en continuo. Para esto se establecieron las siguientes condiciones: una velocidad de carga de 250 mg C-Acetato/Ld con una relación carbono-nitrógeno (C/N) de 2.0 y un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 2 días.

En la segunda etapa del trabajo, se realizó la evaluación cinética y metabólica de la desnitrificación en ensayos en lote utilizando diferentes concentraciones de acetato (20, 40, 60, 80, 100 mg C/L) como fuente de electrones. Los ensayos se realizaron en botellas serológicas de 160 mL a relaciones C/N: 0.86 y 1.1 para ser utilizados como referencia. Bajo las mismas condiciones, en una tercera etapa se evaluó el comportamiento cinético y metabólico de la desnitrificación con diferentes concentraciones de AMP (20, 40, 60, 80, 100 mg C/L) y dos relaciones C/N: 0.68 y 0.86. Finalmente, en ensayos en lote y con los lodos previamente expuestos a AMP, lavados con solución salina y alimentados nuevamente con acetato y nitrato, se evaluó la recuperación del proceso desnitrificante. En todos los casos, la evaluación cinética de la desnitrificación se realizó mediante las velocidades específicas de consumo de acetato ampicilina y nitrato (q_{AC} , q_{AMP} , q_{NO_3}), así como producción de nitrógeno molecular y bicarbonato (q_{N_2} y q_{HCO_3}), mientras que la evaluación metabólica se realizó a través de eficiencias de consumo de nitrato (E_{NO_3}), acetato (E_{AC}) y ampicilina (E_{AMP}) y de los rendimientos de producción de nitrógeno molecular y bicarbonato (Y_{N_2} y Y_{HCO_3}).

En el reactor UASB se obtuvieron E_{NO_3} y E_{AC} cercanas al 90% y Y_{HCO_3} Y_{N_2} de 0.8, con una velocidad volumétrica de N_2 y de HCO_3 de 160.33 ± 1.80 y 149.99 ± 1.90 mg/Ld respectivamente, las cuales indicaron que se alcanzó el estado estacionario desnitrificante. En los ensayos desnitrificantes de referencia con acetato, se obtuvieron eficiencias de consumo de 100% y rendimientos de productos cercanos a 1, sin haber presencia de intermediarios. Las velocidades específicas de consumo y producción determinadas bajo estas condiciones sirvieron como referencia para la evaluación del efecto de la AMP. En los ensayos con C-AMP como única fuente de electrones y a las dos relaciones C/N evaluadas, se obtuvieron rendimientos de N_2 , HCO_3 y CO_2 entre el 0.8, 0.6 y 0.3 respectivamente. Asimismo, se observó la presencia de dos intermediarios carbonados y de pequeñas concentraciones de N_2O como

intermediario nitrogenado, resultando en Y_{N_2O} de 0.22. Se determinó un efecto inhibitorio de la AMP sobre el proceso desnitrificante puesto las velocidades de consumo y producción disminuyeron entre un 60 y 80% respecto a las obtenidas en los ensayos de referencia con acetato. Finalmente, en la cuarta etapa, los ensayos de recuperación mostraron que con los lodos previamente expuestos a AMP, lavados con solución salina y alimentados nuevamente con acetato y nitrato, se obtuvieron E_{NO_3} y E_{AC} de 100% y rendimientos de HCO_3 , CO_2 y N_2 cercanos a 1, sin encontrar la presencia de los intermediarios carbonados o nitrogenados. También se determinó la recuperación de las velocidades específicas de consumo y producción entre un 25 y 50%, por lo que se puede decir que la inhibición ejercida de la AMP sobre el proceso desnitrificante es reversible.

Introducción

Hoy en día, las actividades humanas van en incremento y como consecuencia de esto, los contaminantes aumentan de igual manera. La contaminación no solo afecta al suelo o aire, sino también al agua (Siemens et al., 2008). A esto se suma la falta de plantas de tratamiento de aguas residuales y que solo una fracción de las aguas residuales, ya sean industriales o municipales, es tratada. Por ejemplo, en México, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), reportó que en el 2014 solo el 20% de agua residual es tratada (CONACyT, 2014), mientras que en el mismo año el Sistema de información Nacional del Agua (SINA) reportó, que se recolectan 228.70 m³/s de aguas residuales, de las cuales solo se trata cerca del 48% (Sistema de información Nacional del Agua, 2016). Así pues, la contaminación continúa en aumento y los contaminantes presentes en el agua representan un peligro tanto para el medio ambiente como para el ser humano.

Existe una gran variedad de contaminantes en el agua, los cuales dependen del origen de las aguas, por ejemplo, municipal o industrial. En el segundo caso, dependerá del tipo de industria y proceso que se lleva a cabo. Los contaminantes pueden ser inorgánicos, tales como sales y metales; radioactivos, que pueden ser el resultado de la producción de petróleo, gas o las actividades mineras, y químicos orgánicos, incluyendo a las sustancias sintéticas y volátiles (Informe sobre el agua, 2014). Todos estos contaminantes, ya sea en su forma original o bien como un intermediario de éstos, pueden generar problemas en el bienestar humano.

Los compuestos nitrogenados, como el nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amonio (NH_4^+) y óxido nitroso (N_2O) son contaminantes que pueden ser encontrados en efluentes tanto industriales como municipales (Gerardi 2002). La ingesta de nitrato puede causar metahemoglobinemia y la de nitrito cáncer, mientras que concentraciones altas de amonio pueden llegar a ser tóxicos para los peces (Rina 2005). Para la eliminación de compuestos contaminantes de efluentes tanto industriales como municipales, se han implementado sistemas de tipo fisicoquímico y biológico (Linderberg et al., 2006). En la Figura 1 se muestran las diferentes vías metabólicas realizadas por microorganismos especializados, que transforman los compuestos nitrogenados desde amonio (NH_4^+) hasta nitrógeno molecular (N_2). Sin embargo, por sí solo, este proceso natural resulta insuficiente para descontaminar las aguas, debido a las concentraciones altas de nitrógeno que se han introducido al ambiente.

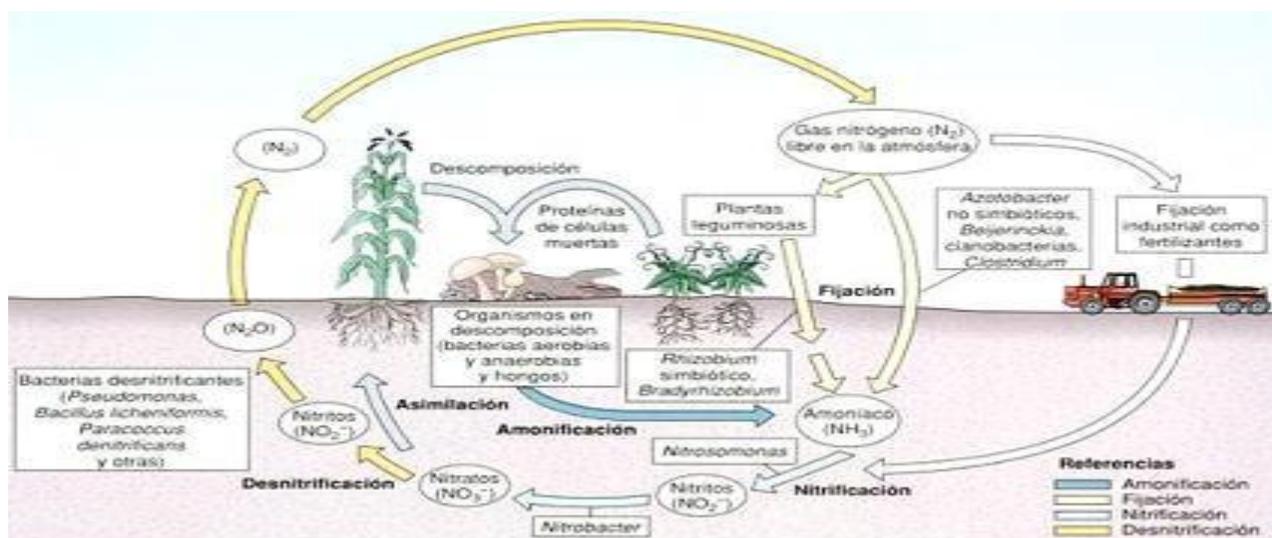


Figura 1 Ciclo del nitrógeno (Tortora et al., 2007)

Aunados a los compuestos nitrogenados, la presencia de compuestos carbonados en las aguas residuales es cada vez mayor. Una fracción importante está constituida por los denominados compuestos orgánicos emergentes, entre los cuales se encuentran los fármacos, antibióticos, hormonas, antidepresivos, analgésicos, productos de cuidado personal, entre otros (Suarez et al., 2010).

En países de Europa y Asia se ha detectado la presencia de fármacos y antibióticos en las plantas de tratamiento y aguas residuales (Behera et al., 2011; Suarez et al., 2010). Esto se debe principalmente a la generación de aguas residuales agroindustriales, de hospitales, que contienen desechos biológicos como la orina o heces, o bien domésticas (Mitchell et al., 2013). México no es una excepción de esto, ya que, en el Valle del Mezquital, Siemens et al. (2008) reportan la presencia de diversos productos farmacéuticos en concentraciones mayores a $1\mu\text{g/L}$, el cual es el límite de acción de la FDA (Food Drugs & Administration). La presencia de dichos fármacos reportados en el Valle del Mezquital es comparable con algunos países de Europa y Asia, donde en estos continentes exceden el límite mencionado. Asimismo, la procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO) ha señalado que el desecho de fármacos sin tratamiento previo, podrían generar daños en la salud ya sea en la salud o al medio ambiente (Revista Profeco nov. 2007). Los antibióticos son sustancias potentes que combaten infecciones bacterianas. Para el año de 1996, Estados Unidos reportó un saldo de ventas de antibióticos mayor a 8 billones de dólares y en todo el mundo aproximadamente de 23 billones de dólares (Elander 2003).

Se ha estimado que en España el consumo total de antibióticos fuera de tratamiento médico es de 250 a 300 ton/año (Dorival et al., 2013). Mientras que, en México, se ha calculado que aproximadamente 63000 ton son usadas en pollos, cerdos y/o ganado (Riesgo en el uso de antibióticos en la industria ganadera, 2015). La presencia de antibióticos en las aguas residuales es una problemática preocupante, ya que puede causar resistencia en los microorganismos que están en contacto con ellas, pueden volver las aguas más tóxicas (Reinthaler et al., 2002) y finalmente, disminuir la posibilidad de su reutilización (Suarez et al. 2010). Entre los antibióticos más comúnmente encontrados en aguas residuales se reportan a los β -lactámicos, como la penicilina. Este antibiótico fue descubierto en el año de 1928 por Alexander Fleming y usada por primera vez para tratamiento médico en 1948 (Raynor 1997). El núcleo de penicilina el ácido 6-aminopenicilánico (6APA), descubierto en los años 50'S, ha permitido desarrollar varios productos semisintéticos derivados de penicilina (Elander 2003), como el caso de la ampicilina, amoxicilina, y trimetropina. La ampicilina (AMP), fue obtenida por condensación en los inicios de los años 60'S. Es un antibiótico de amplio espectro con actividad antimicrobiana sobre bacterias anaerobias, Gram positivas y algunas Gram negativas. Inhibe la síntesis de la pared celular, lo que lleva a la destrucción de la pared y lisis celular (Ampicilina, 2010). Generalmente se han usado tratamientos fisicoquímicos para eliminar antibióticos y aunque los métodos biológicos podrían ser buenas alternativas para la eliminación de estos compuestos, su uso ha sido poco estudiado. Resulta necesario entonces, buscar otras alternativas biológicas, como la desnitrificación, para la eliminación de estos compuestos de las aguas residuales.

Desnitrificación

La nitrificación y desnitrificación son dos de las vías biológicas del ciclo biológico más utilizadas en el tratamiento de aguas. Donde la nitrificación es la conversión u oxidación biológica del amonio (NH_3^+) a nitrato pasando por nitrito (NO_2^-) como intermediario, en un medio aerobio (Ferguson 1998).

El nitrógeno fijado en la biosfera, es decir, el nitrógeno orgánico, es finalmente regresado a la atmósfera en forma de nitrógeno molecular por las bacterias desnitrificantes (Martínez 2007). La desnitrificación se describe como la respiración anaerobia de algunos microorganismos (anaerobios facultativos), en el cual se reducen el nitrato (NO_3^-), a nitrógeno molecular (N_2) con el fin de obtener energía para la actividad y síntesis celular (crecimiento y reproducción). Es una vía desasimilativa que requiere de una fuente de electrones para llevar a cabo la reducción de nitrato (Gerardi 2002).

Microbiología de la desnitrificación

Aunque varios grupos de organismos son capaces de realizar la desnitrificación, incluyendo los hongos y los protozoos, los organismos desnitrificantes son bacterias anaerobias facultativas. (Gerardi 2002). Un gran número de géneros microbianos son capaces de realizar la desnitrificación (Tabla 1). (Gerardi 2002).

La mayoría de organismos desnitrificantes reducen los iones nitrato hasta nitrógeno molecular sin la acumulación de productos intermedios. Sin embargo, algunos microorganismos carecen de alguna enzima clave para desnitrificar completamente, y la falta de estos sistemas enzimáticos no permite la producción de nitrógeno molecular, lo cual lleva a la acumulación de productos intermedios, se dice que estos microorganismos no pueden llamarse desnitrificantes verdaderas (Gerardi 2002).

Tabla. 1 Géneros de bacterias con capacidad desnitrificante (Modificación Cadena A. 2004 y Cuervo-López et al. 2009)

Género	Morfología	Características fisiológicas
<u>Rhodopseudomonas</u>	Diplococo	Fototrofo
<u>Alcaligenes</u>	Bacilo	
<u>Arthrobacter</u>	Coco	
<u>Chromobacter</u>	Coco	Heterótrofos Aerobios
<u>Flavobacterium</u>	Bacilo	
<u>Pseudomonas</u>	Bacilo	
<u>Corynebacterium</u>	Bacilo	
<u>Enterobacter</u>	Bacilo	
<u>Escherichia</u>	Bacilo	Heterótrofos Anaerobios facultativos
<u>Moraxella</u>	Diplococo	
<u>Propionibacterium</u>	Bacilo	
<u>Acetobacter</u>	Bacilo	
<u>Azospirillum</u>	Espiroqueta	Heterótrofos Fermentativos
<u>Bacillus</u>	Bacilo	
<u>Wolinella</u>	Bacilo	
<u>Agrobacterium</u>	Bacilo	
<u>Pseudomonas</u>	Bacilo	Heterótrofos Fijadores de N ₂
<u>Rhizobium</u>	Bacilo	
<u>Rhodopseudomonas</u>	Diplococo	
<u>Xanthomonas</u>	Bacilo	Heterótrofo Fito patógeno
<u>Achromobacter</u>	Bacilo	
<u>Acinetobacter</u>	Diplococo	
<u>Enterobacter</u>	Bacilo	
<u>Kingella</u>	Diplococo	Heterótrofos Patógenos
<u>Neisseria</u>	Coco	
<u>Spirillum</u>	Espiroqueta	
<u>Wolinella</u>	Bacilo	
<u>Alcaligenes</u>	Bacilo	
<u>Paracoccus</u>	Coco	Litotrofos Utilizadores de H ₂
<u>Pseudomonas</u>	Bacilo	
<u>Thiobacillus</u>	Bacilo	
<u>Thiomicrospira</u>	Espiroqueta	Litotrofos Utilizadores de S ₂
<u>Thiospaera</u>	Bacilo	
<u>Nitrosomonas</u>	Bacilo	Litotrofos Utilizadores de NH ₄
<u>Halobacterium</u>	Diplococo	Quimio heterótrofa

Bioquímica de la desnitrificación

La desnitrificación es la reducción desasimilatoria de nitrato a nitrógeno gas. El término fue usado por primera vez en 1886 en Francia (Gerardi 2002). Este proceso respiratorio requiere de cuatro enzimas para producir tres intermedios obligatorios antes de la producción del producto final (Shapleing J. 2013). En la Figura 2 se muestra la vía de desnitrificación. Una ventaja de este proceso respiratorio es su capacidad para eliminar simultáneamente materia carbonada y nitrogenada, ya que, para la reducción de nitrato a nitrógeno molecular, se requiere de la presencia de un donador de electrones. Peña-Calva et al., (2003) demuestran que por medio de la vía desnitrificante se puede inclusive eliminar hasta compuestos carbonados aromáticos como lo son el tolueno, benceno y xileno.

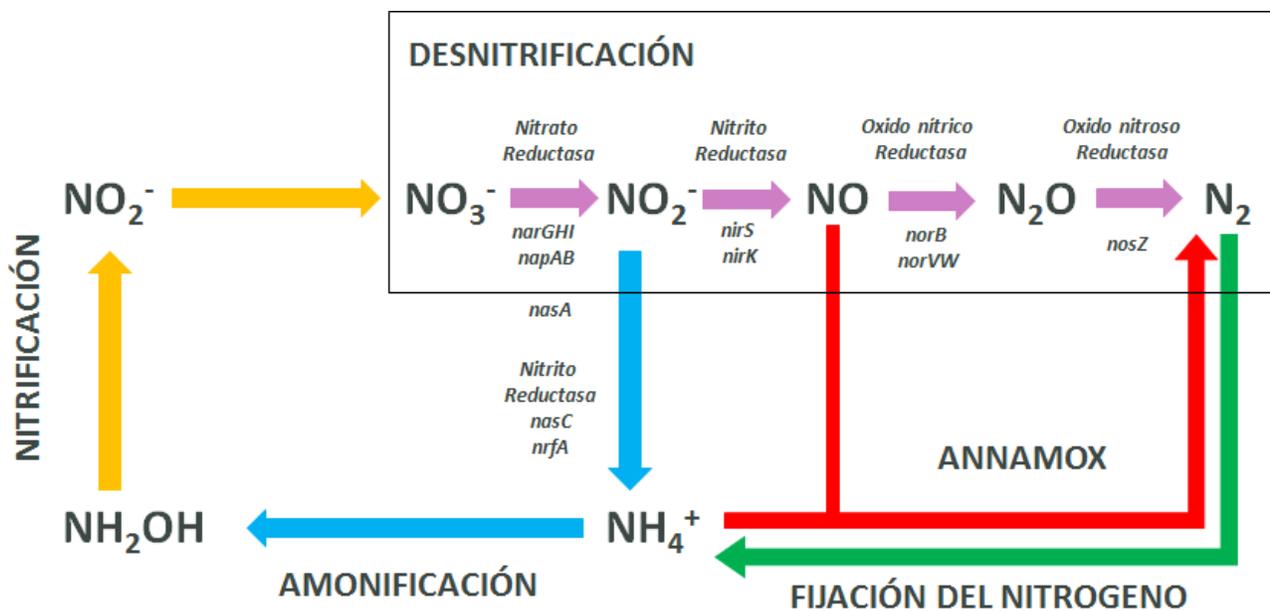


Fig. 2 Vía de la desnitrificación en el ciclo del nitrógeno (Modificación Álvarez et al. 2014)

Etapas 1: Reducción de nitrato a nitrito

El nitrato entra a la célula bacteriana, donde es reducido a nitrito por la enzima nitrato reductasa (Nar), se han identificado cuatro clases de nitrato reductasas, donde dos de ellas son enzimas respiratorias, una está acoplada a la membrana y la otra está localizada en espacio periplásmico (Cuervo-López et al., 2009), son similares a otras nitrato reductasas desasimilatorias, contienen hierro, sulfuro lábil, y molibdeno (Knowles 1982). Son proteínas solubles, donde las nitrato reductasas asimilatorias se inhiben por amoníaco, mientras que la

síntesis de la nitrato reductasa que se encuentra en el espacio periplásmico se inhibe por la presencia de oxígeno, por lo tanto, solo se sintetizan en condiciones anóxicas (Berks et al., 1995; Zumft 1997). También se ha reportado que la actividad de la enzima es inhibida por azida, tiocianato, cianuro, cloranfenicol, dinitrofenol y nigericina (Cuervo-López 2003).

Etapa 2: Reducción de nitrito a óxido nítrico

La posterior reducción del nitrito a óxido nítrico se lleva a cabo por la enzima nitrito reductasa (Nir) que está ubicada en el periplasma. Estudios han mostrado la existencia de dos nitrito reductasas con estructuras y grupos prostéticos diferentes, una de ellas es una proteína y tiene al cobre como grupo prostético y la otra es el citocromo cd1 con un grupo hemo como cofactor. La actividad del cobre como grupo prostético es inhibida por la acción quelante del dietilditiocarbamato. La actividad de la enzima nitrito reductasa puede ser inhibida por su propio producto, el óxido nítrico (Cuervo-López et al., 2009).

Etapa 3: Óxido nítrico a óxido nitroso

Luego, el óxido nítrico es reducido por la enzima óxido nítrico reductasa (Nor) a óxido nitroso, la cual está localizada en la membrana. El óxido nítrico (NO) es un compuesto muy tóxico para bacterias, hongos, parásitos y virus. Los microorganismos desnitrificantes coordinan la reducción del nitrito, con la reducción del óxido nítrico. La concentración de NO dentro de la célula en el estado estacionario desnitrificante, se mantiene baja, entre 1 y 30 nM. (Cuervo-López 2003). La óxido nítrico reductasa, también conocido como citocromo bc₁, la cual ha sido purificada de varias *Pseudomonas* y otras bacterias, solo es sintetizada bajo condiciones anaerobias. Su actividad puede disminuir por algunos detergentes como tritón X-100, el largo de la cadena de los ácidos grasos volátiles afecta el grado de inhibición, azida, cianuro, cloranfenicol, nitrito y óxido nítrico inhiben la reducción de NO y la nigericina causa acumulación de NO (Cuervo-López et al., 2009).

Etapa 4: Óxido nitroso a nitrógeno molecular

Por último, el óxido nitroso formado es reducido a nitrógeno molecular mediante la acción de la enzima óxido nitroso reductasa (Nos), es una enzima soluble localizada en el periplasma. La óxido nitroso reductasa está compuesta por cuatro subunidades que contienen cobre y están organizados en dos diferentes centros binucleares y la síntesis de esta enzima es reprimida ante la presencia de oxígeno (Berks et al., 1995; Cuervo-López et al., 2009). La

actividad de la enzima puede ser inhibida por acetileno, aunque es sabido que esta reacción es reversible, otros inhibidores pueden ser azida, tiocianato, cianuro formando un ligando con el cobre (Cuervo-López 2003.) De igual manera, se presenta una inhibición de la óxido nitroso reductasa ante la presencia de S^{2-} en concentraciones de 8 $\mu\text{M/g}$ a 0.3 mM/g (Knowles 1982).

Factores que afectan la desnitrificación

Existen varios factores que pueden inducir, controlar o afectar el proceso respiratorio, en términos generales se tratan del oxígeno, la presencia de óxidos de nitrógeno. También habrá que tomar en consideración la temperatura y pH, asimismo como el tipo de fuente de carbono y la relación carbono-nitrógeno (C/N). A continuación, se dará una breve descripción acerca de los factores que afectan la desnitrificación

Oxígeno

La desnitrificación es inhibida en presencia de O_2 , esta es reversible si se hace un cambio a condiciones de anaerobiosis, cuando el O_2 es removido, la actividad de las reductasas se puede recuperar en un periodo de 40 min a 3 horas (Knowles 1982). La evidencia indica que la inhibición es más notable en el primer paso de la desnitrificación, la reducción del nitrato, la cual puede ser afectada en un rango de concentración de O_2 de 0.058 a 7.7 mg/L , pero esto depende de la sensibilidad del cultivo y de la concentración celular. (Cuervo-López et al., 2009)

Óxidos de nitrógeno

El efecto causado por NO_3^- es probablemente el mejor estudiado. En bajas concentraciones de NO_3^- se controla la velocidad de la reacción de desnitrificación con una cinética de primer orden y en un sistema que no ha sido expuesto a (NO_3^-), promueve la actividad de las reductasas. Sin embargo, en altas concentraciones inhibe la óxido nítrico reductasa por lo que se acumula nitrito (NO_2^-), de igual manera inhibe la óxido nitroso reductasa y por lo tanto aumenta la concentración de óxido nitroso (N_2O) sin llegar al producto final. (Knowles 1982).

Temperatura y pH

La tasa de desnitrificación se relaciona positivamente con el pH, donde el proceso opera propiamente en rango de pH de 6 a 9 alcanzando altas eficiencias y rendimientos de nitrógeno molecular sin formación de intermediarios. Cuando el pH es menor a 5, se obtiene óxido nítrico y de igual manera, la óxido nitroso reductasa es inhibida progresivamente obteniendo N_2O como producto final. (Cuervo-López et al.; 2009 Knowles 1982). En pH de 6 a 7 la

concentración de óxido nítrico es menor y en pH de 7 a 9 se produce nitrógeno molecular. (Cuervo-López et al., 2009)

En el caso de la temperatura, el proceso respiratorio biológico se lleva a cabo en rangos de temperatura de 5 a 35°C. La temperatura tiene efecto en la velocidad de consumo y crecimiento de los microorganismos. Los efectos de bajas y altas temperaturas se relacionan principalmente con los cambios fisiológicos en la estructura de la membrana celular (Cuervo-López et al., 2009).

Relación C/N

Siendo la desnitrificación una vía desasimilatoria, la relación C/N es un factor importante para la orientación del proceso biológico. Se ha observado que esta variable está relacionada con la acumulación de intermediarios involucrados en la desnitrificación además de que este factor puede orientar el proceso respiratorio hacia el proceso de amonificación (Fig. 2, conversión de amonio a nitrito) (Martínez 2007). El establecimiento del valor de C/N radica en tres zonas: 1) C/N menor a la estequiométrica, genera un desnitrificación incompleta 2) C/N estequiométrica, genera un desnitrificación completa teniendo N₂ como producto final y 3) C/N mayor a la estequiométrica, genera desnitrificación y fuente de electrones residual, además que se ha observado que cuando la relación C/N es mucho mayor hay presencia de metanogénesis con desnitrificación (Cuervo-López et al., 2009).

Antecedentes

El método biológico más ampliamente utilizado para el tratamiento de aguas residuales es el de los lodos activados. Estudios recientes han mostrado que es posible la eliminación de algunos antibióticos como la ampicilina mediante este tratamiento, sin embargo, la presencia de antibióticos no se resuelve al 100%, ya que alguna fracción de los compuestos se queda adsorbida en el lodo. Asimismo, dada la naturaleza del proceso respiratorio, se genera una gran cantidad de lodos que posteriormente deberá ser tratada. Por lo general, a fin de obtener eficiencias de eliminación altas, este método se usa de manera combinada con algún método mecánico o fisicoquímico (Mitchell et al., 2013), lo cual incrementa su costo.

Watkinson et al. (2007), realizaron un estudio de remoción de varios fármacos, entre ellos varias clases de penicilinas, utilizando los procesos de lodos activados y osmosis inversa. La combinación de ambos procesos resulta en porcentajes de eliminación muy variables, desde el 11 hasta el 99%, esto es, aunque se usó una combinación de procesos, aun detectan cantidades importantes de fármacos al final del proceso. Aunado a esto, los autores no reportan los productos asociados con el proceso biológico.

Zhang y de los Reyes III (2012), realizaron un estudio en el que observan el efecto de la adición de penicilina en un sistema de lodos activados con actividad nitrificante. Los autores encontraron que la exposición de los lodos activados a 100 mg/L de penicilina durante un periodo de 75 días, inhibía su crecimiento y la vía nitrificante en un rango del 8-64%, además que la presencia del antibiótico afectaba a uno de los microorganismos del consorcio nitrato-oxidante. En este trabajo tampoco se reporta cuál fue el destino de la penicilina, es decir, si el lodo nitrificante la utilizó como fuente de carbono y/o energía.

Bing y Tong (2009) realizaron un estudio de biodegradación y adsorción con lodos activados utilizando 11 clases de antibióticos, entre ellos dos B-lactámicos, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, macrólidos y otros, en dos tipos de agua: salada y dulce. Los autores observaron que los B-lactámicos son más biodegradables que las otras clases de antibióticos, sin embargo, no se logran saber cuál es el destino de los antibióticos biodegradados.

Otro método ampliamente usado para la depuración de las aguas residuales es la digestión anaerobia. En este sentido, Mitchell et al. (2013), realizaron un experimento con antibióticos como sulfametazina, ampicilina, florfenicol y tilosina, usados en la medicina veterinaria, a fin

de evaluar su degradación mediante digestión anaerobia. Los autores reportan que la mayoría de estos antibióticos no se absorbe en el cuerpo del animal y se desechan por medio de residuos biológicos (estiércol). Asimismo, indican que se logra la biodegradación de ampicilina, de 0.35 a 350mg/L, en donde las concentraciones mayores de 100 mg/L de ampicilina provocan una inhibición del 5% en la producción de biogás.

Suarez et al. (2010) realizaron un experimento en el cual, bajo condiciones nitrificantes y desnitrificantes, logran la biodegradación de varios antibióticos y productos de cuidado personal que se llegan a encontrar en aguas residuales. Los autores reportan remociones de estos compuestos desde el 6 hasta el 99% en un reactor bajo condiciones nitrificantes y del 1 hasta el 85% en un reactor bajo condiciones desnitrificantes. Sin embargo, sólo se limitan a indicar la desaparición de los compuestos contaminantes sin mostrar información sobre el destino de éstos, si se formaron o no intermediarios y no indican los productos generados. Esto es, no se sabe con claridad cuáles son los productos formados después del proceso de eliminación, si hubo un efecto sobre el metabolismo de los lodos depuradores o si la eliminación de antibióticos estuvo asociada a algún proceso respiratorio.

Se han realizado algunos estudios para eliminar concentraciones de ciprofloxacino entre 24 y 40 mg CIP/L (Zhanguang et al., 2013) así como quinolonas utilizando a la desnitrificación y nitrificación (Dorival-Garcia et al., 2013). En el primer caso, se reporta una eficiencia de biotransformación baja (12.1-25.2%) y que concentraciones mayores que estas provocan inhibición de la vía desnitrificante. En el caso de las quinolonas, los autores reportan porcentajes de biodegradación entre 2 y 60% y porcentajes de adsorción del compuesto en los lodos desde un 50 hasta un 80%. En ninguno de estos casos se indican los productos asociados al proceso respiratorio.

Existen algunos estudios sobre la eliminación de antibióticos mediante la desnitrificación. Por ejemplo, Costanzo et al. (2005), quienes trabajaron con varios antibióticos como la ampicilina, norfloxacino y ofloxacino entre otros, y un lodo proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales en Australia. Los autores reportan que la adición de amoxicilina afecta la velocidad de desnitrificación y que, de los lodos depuradores expuestos a los antibióticos, entre un 50 y 75% de ellos resultaron resistentes a la amoxicilina.

Por otro lado, Zhang et al. (2015), estudiaron el efecto tóxico de antibióticos sobre los lodos desnitrificantes. Los autores muestran que la respectiva presencia de 0.534, 0.162, 0.474 y

0.920 g/L de penicilina, cloranfenicol y 2,4-dinitrofenol y polimixina B causa una inhibición sobre la actividad desnitrificante, siguiendo el orden de toxicidad de cloranfenicol > y 2,4-dinitrofenol > penicilina > polimixina B, siendo esta última la menos tóxica con un grado de inhibición del 26.3%. La combinación de penicilina + cloranfenicol; penicilina + 2,4-dinitrofenol; cloranfenicol + 2,4-dinitrofenol; y penicilina + cloranfenicol + 2,4-dinitrofenol; muestran efectos aditivos y antagonistas como parte del proceso inhibitorio. Todos estos trabajos indican que, hasta el momento, se cuenta con poca información sobre la factibilidad de utilizar exitosamente a la desnitrificación para la eliminación de antibióticos como la ampicilina, así como el destino final del compuesto. Sería adecuado tener más información al respecto de este proceso.

Justificación

Aproximadamente entre el 20 y 30% de los fármacos y antibióticos consumidos por seres humanos y animales, son excretados del cuerpo por medio de orina y heces, razón por la cual éstos entran en las aguas residuales. Existen varias alternativas para eliminar estos compuestos, como son los métodos mecánicos, fisicoquímicos y biológicos. Se han hecho estudios sobre la eliminación de antibióticos con tratamientos biológicos como lodos activados, digestión anaerobia o bajo condiciones nitrificantes. Sin embargo, poco se sabe sobre el destino de los antibióticos eliminados mediante estas vías.

La desnitrificación es una alternativa para la eliminación de contaminantes tanto carbonados como nitrogenados, que podría ser útil para la eliminación de antibióticos de las aguas residuales, pero existen pocos reportes en la literatura al respecto. No se ha mostrado que la eliminación de antibióticos sea por medio del proceso respiratorio, tampoco se conoce cuál es el destino de los antibióticos que se degradan por esta vía y poco se sabe sobre los efectos de estos compuestos sobre el proceso respiratorio. Considerando que la ampicilina es un antibiótico ampliamente utilizado para tratar enfermedades tanto humanas como veterinarias, podría utilizarse como modelo para evaluar la capacidad de un lodo desnitrificante para su eliminación, y generar información que permita proponer a la desnitrificación como posible tratamiento biológico. La utilización de variables de respuesta como eficiencias de consumo, rendimientos de conversión de sustratos y de generación de productos, así como velocidades del proceso, permitirán identificar los cuellos de botella cinéticos y metabólicos del proceso biológico, determinar los posibles efectos inhibitorios o tóxicos sobre éste y obtener información útil que permita proponer procesos biológicos que sean eficientes para la depuración de aguas residuales.

Hipótesis

El uso de un lodo desnitrificante previamente estabilizado en estado estacionario, permitirá que bajo condiciones desnitrificantes controladas, sea posible utilizar diferentes concentraciones de ampicilina como fuente de carbono y energía para lograr su mineralización.

Objetivos

Objetivos Generales

1. Evaluar y estudiar en cultivos en lotes, la capacidad de un lodo desnitrificante para eliminar y mineralizar diferentes concentraciones de ampicilina, utilizando un lodo sin previa exposición a este compuesto.

Objetivos Particulares

1. Estabilizar un lodo desnitrificante en régimen estacionario en un reactor tipo UASB, alimentado con un medio de cultivo definido, utilizando nitrato como fuente de nitrógeno y acetato como fuente de electrones.
2. Evaluar en cultivos en lote, el comportamiento cinético y metabólico de la desnitrificación en presencia de nitrato y acetato como fuente de electrones.
3. Evaluar en cultivos en lote, el comportamiento cinético y metabólico de la desnitrificación en presencia de nitrato y ampicilina como fuente de electrones,

Metodología

Reactor desnitrificante UASB

Se montó un reactor anaerobio de cama de lodos con flujo ascendente (Por sus siglas en inglés, UASB: upflow anaerobic sludge blanket) de 0.8 L de capacidad, alimentado en continuo y se mantuvo a una temperatura constante de 30°C, con tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 2 días. Este se inoculó con un lodo anaerobio proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa con 240mL los cuales contenían 0.083 ± 0.008 g SSV/L. El reactor UASB fue alimentado con una velocidad de carga de acetato de 233 g C-Acetato de sodio/Ld y de 189 g N-Nitrato de sodio/Ld obteniendo una C/N experimental de 1.2, durante los primeros 20 días, las eficiencias de consumo de N-Nitrato y de C-Acetato en la primera fase fueron del $90.65 \pm 9.63\%$ y $98.95 \pm 2.05\%$ respectivamente y los valores de rendimiento de Y_{HCO_3} y $Y_{\text{C-BM}}$ 0.82 ± 0.1 , 0.07 ± 0.041 , mientras que en la segunda fase se cambió la C/N a 2.07, manteniendo la velocidad de carga de acetato de 250 g C-Acetato de sodio/Ld, mientras que la velocidad de carga nitrato fue de 120.77 g N-Nitrato. Después de 35 días de operación las eficiencias de consumo de C-Acetato y N-Nitrato del $79.18 \pm 19.0\%$ y $91.19 \pm 20.39\%$ respectivamente, y los valores de rendimiento de Y_{N_2} , Y_{HCO_3} y $Y_{\text{C-BM}}$ que fueron 0.87 ± 0.21 , 0.52 ± 0.17 , 0.26 ± 0.17 . Los lodos obtenidos bajo estas condiciones fueron utilizados como inóculo para los ensayos en lote

Medio de cultivo

La composición del medio del cultivo para el reactor UASB fue la siguiente: 1000 mg/L de KH_2PO_4 50 mg/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 300 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200 mg/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 20 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Las fuentes de nitrógeno y carbono fueron proporcionadas por acetato y nitrato, con una relación C/N estequiometría de 1.2. (Cuervo-López et al., 2009)

Ensayos en lote

Medio de cultivo. La composición del medio mineral para los ensayos en lote fue la siguiente: 270 mg/L de KH_2PO_4 , 720 mg/L de K_2HPO_4 , 30 mg/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se adicionaron los siguientes elementos trazas 70 mg/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 7.5 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 mg/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 7 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 5 mg/L de MnCl_2 . Las fuentes de nitrógeno y carbono fueron proporcionadas por acetato, nitrato o ampicilina, dependiendo del ensayo.

Ensayos de referencia. Se llevaron a cabo en botellas serológicas de 160 mL con un volumen de trabajo de 128 mL de medio mineral, inoculadas con 1g SSV/L proveniente del reactor UASB ya estabilizado. Se adicionó medio mineral, nitrato y diferentes concentraciones de acetato (20, 40, 60, 80, 100, mg C/L) a dos relaciones C/N: 0.86 y 1.1 Posteriormente estas fueron selladas con tapas de goma y con contratapas de aluminio Se establecieron condiciones anóxicas en las botellas mediante el reemplazo de oxígeno en el espacio de cabeza con una corriente de helio. Luego estas fueron agitadas e incubadas a 30°C por aproximadamente 6 horas. A fin de establecer los perfiles desnitrificantes, bajo estas condiciones, se tomaron muestras a diferentes tiempos, donde cada botella representó una unidad experimental independiente y fueron desechadas después de su análisis. Se calcularon las variables de respuesta del proceso desnitrificante y los resultados cinéticos y fisiológicos obtenidos bajo estas condiciones se usaron como referencia.

Ensayos con ampicilina. Bajo las condiciones descritas anteriormente, se evaluó la capacidad del lodo desnitrificante para consumir y oxidar diferentes concentraciones de ampicilina (AMP), entre 20, 40, 60, 80, 100, (mg C/L) y diferentes relaciones C/N de 0.86 y 0.68. Bajo estas condiciones también se realizaron cinéticas a fin de determinar las variables de respuesta del proceso desnitrificante.

Ensayos de recuperación. Después de la exposición de los lodos ante AMP, se evaluó la capacidad del lodo desnitrificante para consumir y oxidar diferentes concentraciones de C-Acetato entre 20, 40, 60, 80, 100, (mg C/L) y diferentes relaciones C/N de 0.86 y 1.1. Bajo estas condiciones también se realizaron cinéticas a fin de determinar las variables de respuesta del proceso desnitrificante.

Ensayos abióticos. Se realizaron ensayos con el medio mineral previamente descrito, nitrato y ampicilina en ausencia de lodo desnitrificante. Asimismo, se realizaron ensayos con medio mineral, ampicilina y nitrato con biomasa estéril, para evaluar la posible pérdida de AMP por reacción química y adsorción por el lodo respectivamente.

Evaluación de los cultivos.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado. El comportamiento fisiológico y cinético se evaluó mediante el cálculo de la eficiencia de consumo de sustratos: nitrato (ϵ_{NO_3}), acetato (ϵ_{C-Ace}) y ampicilina (ϵ_{AMP}), y este se realizó de la siguiente manera:

$$\varepsilon_{C-Ace} = \left(\frac{(mg\ C - Ace_{entrada}) - (mg - C - Ace_{salida})}{mg\ C - Ace_{entrada}} \right) * 100 \quad (1.1)$$

$$\varepsilon_{NO_3} = \left(\frac{(mg\ N - NO_3_{entrada}) - (mg\ N - NO_3_{salida})}{mg\ N - NO_3_{entrada}} \right) * 100 \quad (1.2)$$

$$\varepsilon_{AMP} = \left(\frac{(mg\ C - AMP_{entrada}) - (mg - C - AMP_{salida})}{mg\ C - AMP_{entrada}} \right) * 100 \quad (1.3)$$

Donde:

mg (C-Ace, N-NO₃, C-AMP) _{entrada}: mg/L de C-Ace, N-NO₃ o C-AMP en el influente

mg (C-Ace, N-NO₃, C-AMP) _{salida}: mg/L de C-Ace, N-NO₃ o C-AMP en el efluente

100: factor de conversión para porcentaje

Los rendimientos de producción de nitrógeno molecular y bicarbonato de sodio, así como las velocidades de consumo de sustratos: nitrato, acetato y ampicilina, y de formación de productos: nitrógeno molecular y bicarbonato y se realizaron de la siguiente manera:

$$\gamma_{N_2} = \frac{mg\ N_2\ producidos}{mg\ N - NO_3\ consumidos} \quad (2.1)$$

$$\gamma_{HCO_3} = \frac{mg\ HCO_3\ producidos}{mg\ C - AMP\ consumidos} \quad (2.2)$$

Donde:

mg (N-NO₃, C-AMP) _{consumidos}: mg/L de N-NO₃ o C-AMP sobrantes en el efluente

mg (N₂, HCO₃) _{producidos}: mg/L de N₂ o HCO₃ producidos en el efluente

El cálculo de las velocidades específicas de consumo de C-Acetato (q_{AC}), N-Nitrato, (q_{NO₃}) y AMP (q_{AMP}) y de formación de C-Bicarbonato (q_{HCO₃}) y nitrógeno molecular (q_{N₂}), se realizó mediante la obtención de la pendiente durante la fase lineal del perfil de consumo o producción, con una biomasa constante, esta fue calculada por medio de la ecuación 3.1 y 3.2. Los valores de la pendiente durante la fase lineal representaron Qs. (Peña-Calva et al., 2004). En todos los casos el coeficiente de determinación (r²) fue mayor que 0.85.

$$q_s = \frac{ds}{dt} * \frac{1}{X} \quad (3.1)$$

$$q_s = \frac{Qs}{X} \quad (3.2)$$

S: concentración de sustrato (mg/L)

t: Tiempo en horas

Qs: la velocidad volumétrica (mg/L t)

qs: La velocidad específica (mg/mg SSV t)

X: Biomasa constante (mg SSV/L)

Métodos analíticos

Para cada método analítico, se realizaron al menos tres curvas de calibración. Los coeficientes de determinación mayores a 0.97 y los coeficientes de variación menores que 6% indicaron la linealidad y reproducibilidad de los datos obtenidos (Tabla 2).

Tabla 2. Coeficientes de correlación, pendientes y ordenadas al origen de las curvas de calibración realizadas

Compuesto medido	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de determinación r^2
Nitrato	2581.8 ± 84.8	9391.8 ± 1.6	0.98 ± 0.02
Nitrito	2271.2 ± 52.2	5719.8 ± 2046.6	0.97 ± 0.03
Acetato	98.4 ± 4.8	223.1 ± 61.0	0.97 ± 0.01
Gases CO ₂	420.1 ± 66.5	1791.9 ± 4.0	0.98 ± 0.01
Gases N ₂	422.1 ± 68.8	4260.5 ± 56.3	0.98 ± 0.01
Gases N ₂ O	104.1 ± 0.0	30.9 ± 0.0	0.99 ± 0.00
TC	160.6 ± 30.4	104.2 ± 4.0	0.99 ± 0.01
IC	103.7 ± 20.2	269.5 ± 4.0	0.99 ± 0.01
Ampicilina	7009.4 ± 200.9	0 ± 0	0.98 ± 0.01

Cuantificación de nitrato NO_3^- y nitrito NO_2^-

La concentración de nitrato y nitrito se cuantificó mediante una electroforesis capilar, empleando un analizador de iones (CIA 4000, Waters). El aparato consta de un capilar de sílice fundida de 60 cm de longitud y 70μ de diámetro interno, al cual se le aplica una corriente de 35 mA y un voltaje de 20KV. Como sistema de detección se utiliza una lámpara de luz ultravioleta con una longitud de onda fija de 214 nm. Se usa una solución de Na_2SO_4 0.01M adicionada de 5mL de OFM Anion-BT (waters) como electrolito para generar el campo magnético. Para realizar el análisis de las muestras, se depositan 0.5 ml de muestra previamente filtrada por una membrana de nylon de 13 mm de diámetro y tamaño de poro de $0.45\mu\text{m}$. Un ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de nitrato y nitrito, así como la ecuación obtenida se muestra en la Figura 3.

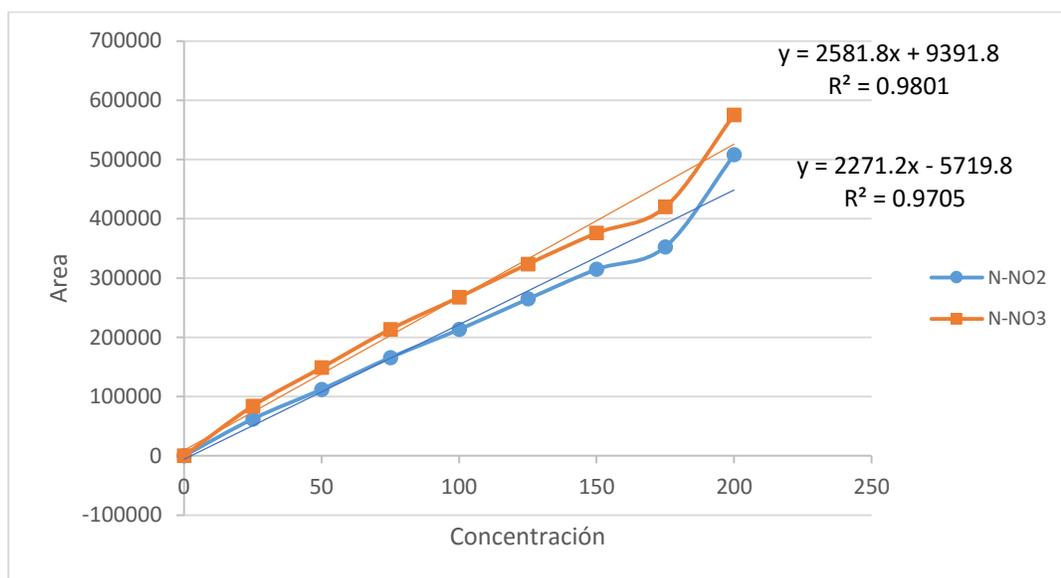


Figura 3. Ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de nitrato y nitrito por electroforesis capilar

Cuantificación de carbono total (CT), orgánico (CO) e inorgánico (CI)

La cuantificación de carbono orgánico e inorgánico se realizó mediante un analizador de carbono orgánico total modelo TOC- 5000 (Shimadzu). El equipo analiza por separado el carbono total y el inorgánico. El sistema cuenta con un inyector que toma la muestra y la envía por medio de una corriente de aire de alta pureza, a un tubo de combustión que tiene una temperatura de 680° C. En el tubo de combustión el carbono es oxidado a CO₂ y transportado a un vaso de reacción de carbono inorgánico. Posteriormente es secado y enfriado por medio de un deshumificador, para finalmente ser pasado a una celda donde es detectado mediante un analizador de infrarrojo. El CO₂ cuantificado genera como señal un pico, cuya área es calculada por un procesador de datos. El área obtenida es proporcional a la concentración de carbono en la muestra y es calculada con base a una curva de calibración previamente elaborada. Un ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de carbono total e inorgánico, así como la ecuación obtenida se muestra en la Figura 4.

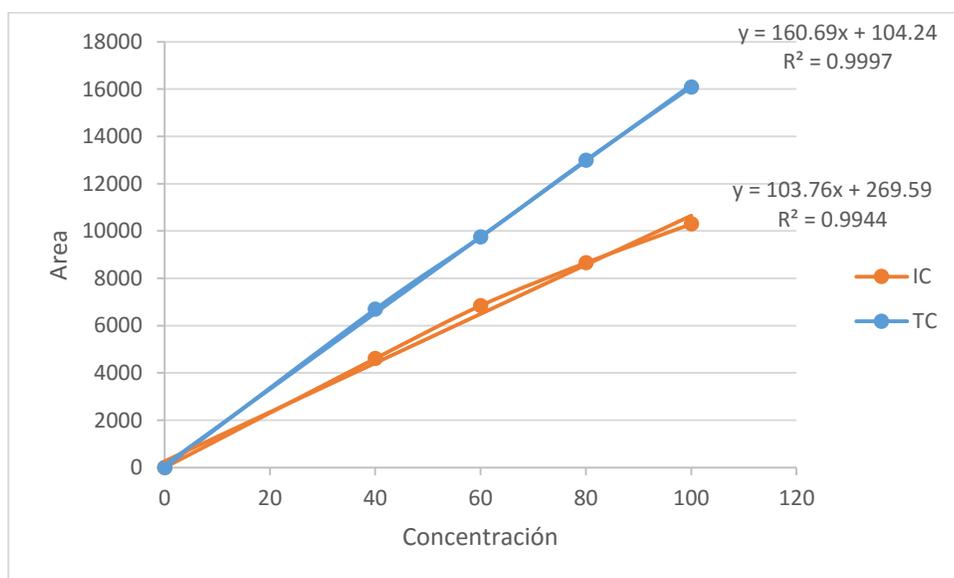


Figura 4. Ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de TC e IC

Cuantificación de acetato

El acetato se cuantificó mediante un cromatógrafo de gases Varian Star 3400, con detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna de acero inoxidable de 1.2m de longitud y 1/8" de diámetro interno, empacada con Porapaq Q malla 80-100. El gas acarreador fue nitrógeno con un flujo de 30 mL/min. Para la medición de acetato, se utilizó 1 ml de muestra previamente filtrada con una membrana de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro, a la cual se le adicionó 0.1 ml de HCl 3N con el fin de acidificarla y tener el ácido acético sin disociar. Se inyectó al cromatógrafo una muestra de 3µL con una jeringa de 10 µL. Un ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de acetato, así como la ecuación obtenida se muestra en la Figura 5.

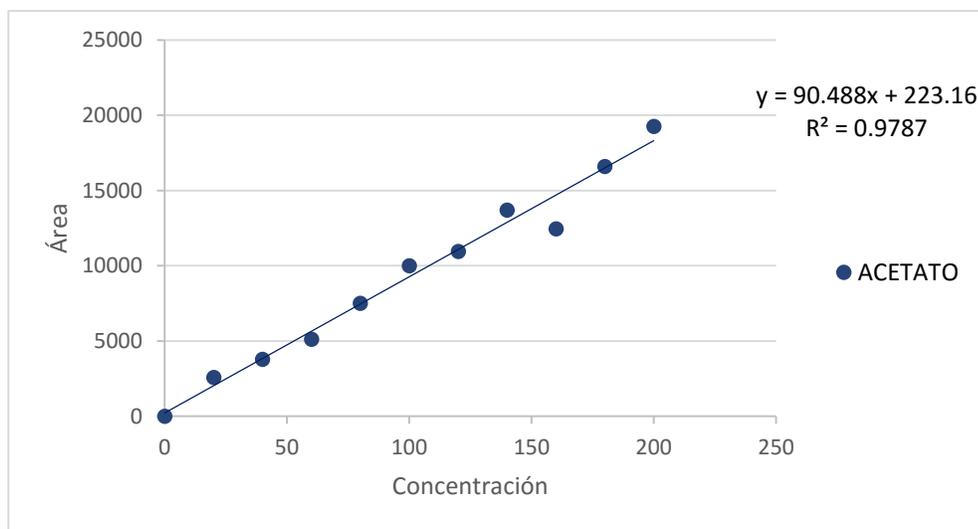


Figura 5. Ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de Acetato por cromatografía de gases

Cuantificación de gases

El nitrógeno molecular, el metano, bióxido de carbono y óxido nitroso presentes en el gas generado se analizaron en una sola corrida mediante un cromatógrafo de gases Varian Star 3300. Se utilizó un detector de conductividad térmica equipado con una columna empacada con Porapaq Q malla 80-100. El gas acarreador fue helio con un flujo de 16 mL/min. Se preparó una curva estándar con una mezcla de nitrógeno molecular (40%), bióxido de carbono (30%), y óxido nitroso (30%) El volumen de inyección fue de 0.05 mL y el volumen del gas generado se ajustó a condiciones estándar de temperatura y presión. Un ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de gases, así como la ecuación obtenida se muestra en la Figura 6.

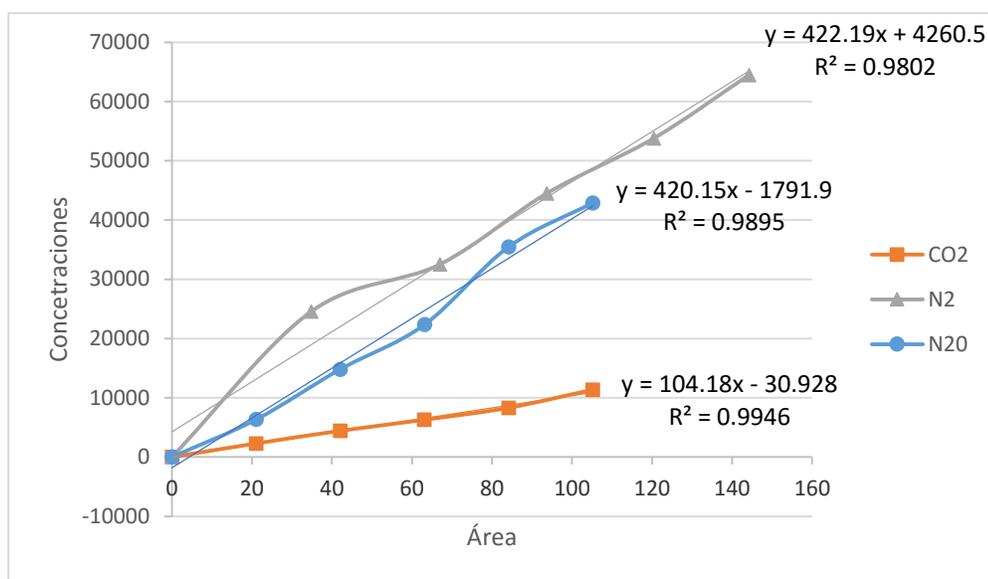


Figura 6. Ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de Dióxido de carbono, nitrógeno molecular y Óxido nitroso por cromatografía de gases

Cuantificación de Ampicilina

El análisis de ampicilina se llevó a cabo por medio de un HPLC Perkin Elmer Series 200 equipado con un detector UV a una longitud de onda de 230nm y con un flujo isocrático de 1mL/min. Se utilizó una columna X-Terra C-18 y una fase móvil compuesta de 809 mL de agua, 100 mL de acetonitrilo, 80 mL de metanol, 10 mL de buffer de fosfatos y 1 mL de ácido acético 1M. Se inyectó un volumen de 20 mL. Un ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de ampicilina, así como la ecuación obtenida se muestra en la Figura 7.

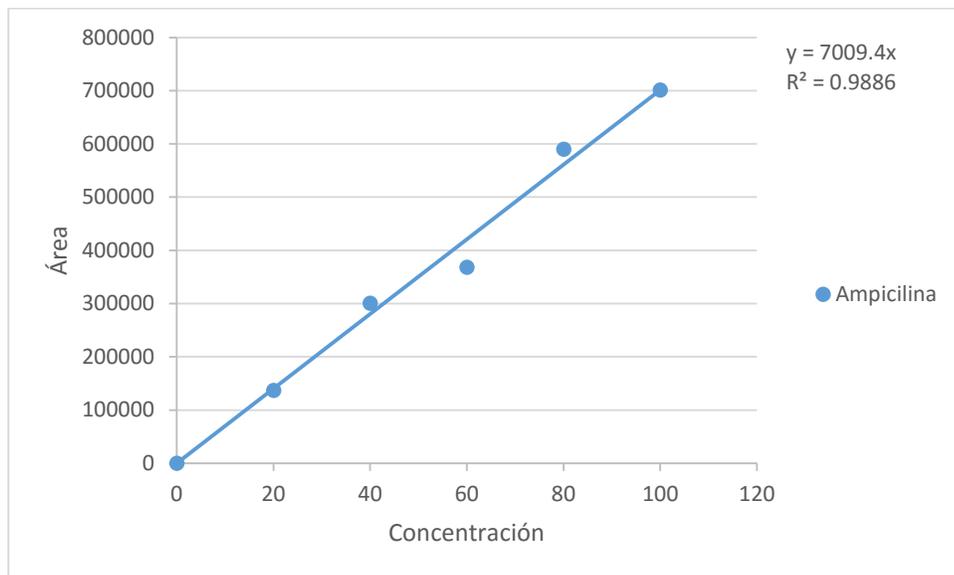


Figura 7. Ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de Ampicilina por HPLC

Cuantificación de sólidos suspendidos.

Se realizó de acuerdo a los métodos APHA 1989. Se utilizan 10 mL de lodos. Los sólidos suspendidos totales (SST), se cuantificaron por medio del secado de la muestra durante 1h a 110°C. Para obtener los sólidos suspendidos fijos (SSF), los sólidos resultantes del secado, se calcinan durante 1h a 550°C. Los cuales se obtienen acuerdo a las siguientes formulas.

$$SST \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(A - B) * 1000}{Vol.muestra} \quad (4)$$

Donde:

A= peso de la muestra en g

B= peso del crisol en g

$$SSF = \frac{(A - B) * 1000}{Vol.muestra} \quad (5)$$

Donde

A= peso calcinado de la muestra en g

B= peso del crisol en g

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se obtuvieron por la diferencia de los sólidos suspendidos totales (SST) y los sólidos suspendidos fijos (SSF), como se muestra en la siguiente fórmula.

$$SSV = SST - SSF \quad (6)$$

Balance de Nitrógeno y Carbono

Este se realizó en estado estacionario, se consideraron las especies carbonadas y nitrogenadas de alimentación, generación y efluentes, calculándose de la siguiente manera:

$$\left| \frac{dC}{dt} \right|_{Reactor} = D(N - NO_3^-_E - (N - NO_3^-_S + N - BM_S)) - QN_2 = 0 \quad (7)$$

$$\left| \frac{dC}{dt} \right|_{Reactor} = D(C_E - (C_S + C - HCO_3^-_S + C - BM_S)) - QCO_2 = 0 \quad (8)$$

Donde:

D es la tasa de disolución

E corresponde al valor de entrada

S corresponde al valor de salida

Q es la producción volumétrica de gas expresada mg (C, N) /Ld

Resultados

Reactor UASB desnitrificante

El reactor UASB se mantuvo operando bajo las condiciones descritas en la Fase 1 de la sección de Metodología durante 20 días. Bajo estas condiciones de operación, se encontró que las velocidades de descarga de nitrato y acetato fueron muy cercanas a cero (Figura 8 y 9, fase 1), por lo que el consumo de ambos compuestos a lo largo del tiempo fue alto. De hecho, después de 20 días, el lodo logró obtener una eficiencia de consumo de N-Nitrato (E_{NO_3}) y de C-Acetato (E_{AC}) del 90.65 ± 9.63 y $98.95 \pm 2.05\%$ respectivamente. Los sustratos consumidos fueron transformados mayoritariamente a nitrógeno molecular y bicarbonato, con una formación de biomasa mínima, como lo muestran los valores de rendimiento de Y_{HCO_3} , Y_{N_2} , y Y_{C-BM} (Tabla 3). Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos por Martínez Hernández en el 2007, quien realizó la estabilización de un lodo desnitrificante en un reactor UASB alimentado con C-Acetato y N-Nitrato.

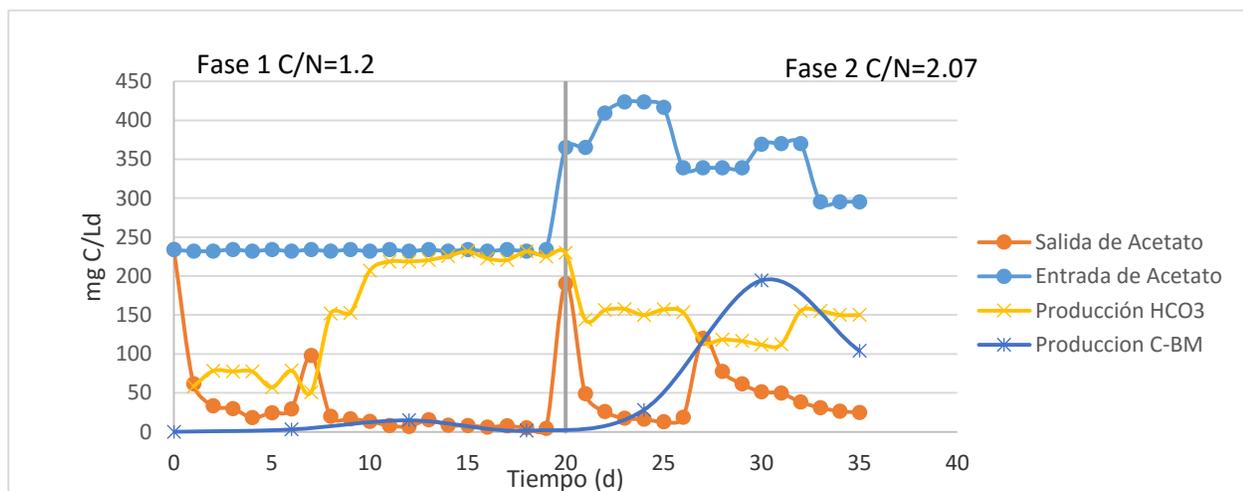


Figura 8. Perfil de compuestos carbonados en un reactor tipo UASB

Con el fin de obtener una producción de biomasa mayor, se agregaron en la fase 2 de operación, 350 ml de SSV y se aumentó la relación C/N a 2.07. Durante esta fase y después de 35 días de operación, el lodo logró obtener una eficiencia de consumo de C-Acetato y N-Nitrato del 79.18 ± 19.0 y $91.19 \pm 20.39\%$ respectivamente. La presencia de carbono residual en el efluente es debida a que la C/N de 2.07 es mayor a la estequiométrica.

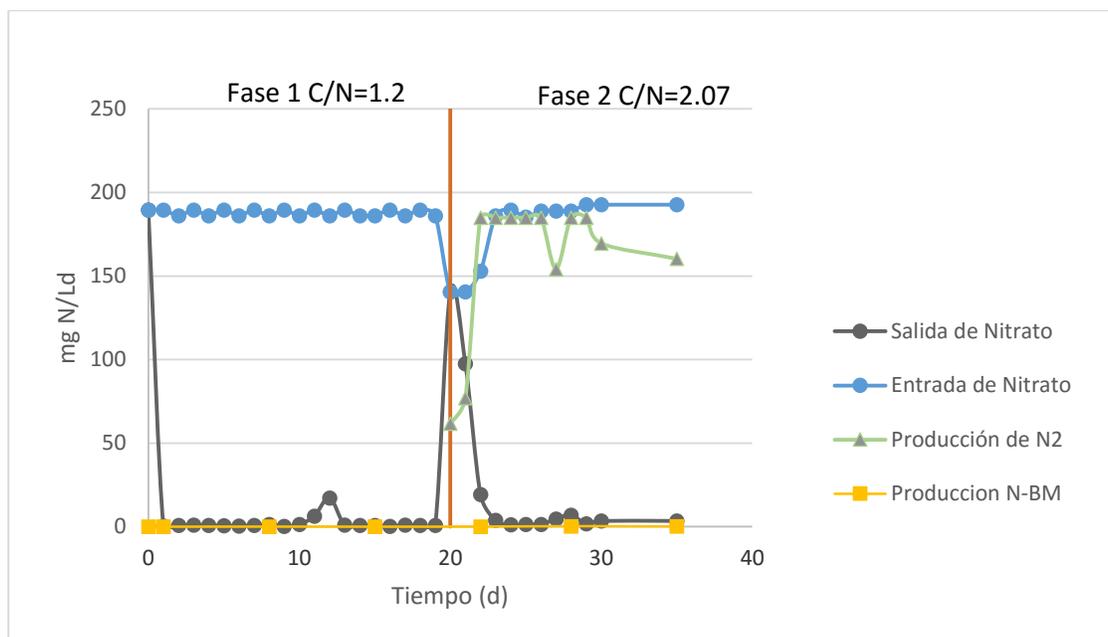


Figura 9. Perfil de compuestos nitrogenados en un reactor tipo UASB

Bajo estas condiciones, el proceso se orientó a la producción de biomasa, por lo que los sustratos consumidos fueron transformados a bicarbonato, nitrógeno molecular y biomasa, como lo muestran los valores de rendimiento de Y_{N_2} , Y_{HCO_3} y Y_{C-BM} en las Tablas 3 y 4. De hecho, al inicio del experimento se tenían 0.083 ± 0.088 g SSV/L y después de seis semanas de operación, se cuantificó una producción de biomasa (BM) desnitrificante estabilizada de 9.67 ± 6.71 g SSV/L, correspondiente a una velocidad de producción de 0.22 g SSV/LD, por lo que durante todo el experimento se obtuvo un incremento en la biomasa de 44-49%.

Tabla 3. Velocidad de carga, descarga, eficiencias y rendimientos de compuestos carbonados en el reactor UASB

Fase	Entrada (mg/Ld)	Salida (mg/Ld)	E (%)	Y_{HCO_3}	Y_{C-BM}
Fase 1					
Carbono	232.87 ± 0.86	21.77 ± 22.47	90.65 ± 9.63	0.82 ± 0.11	0.07 ± 0.06
Fase 2					
Carbono	359.38 ± 36.02	72.38 ± 55.19	79.18 ± 19.0	0.52 ± 0.17	0.26 ± 0.17

Tabla 4. Velocidad de carga y descarga, eficiencias (E) y rendimientos (Y) de compuestos nitrogenados en el reactor UASB

Fase 1	Entrada (mg/Ld)	Salida (mg/Ld)	E (%)	Y N2	Y N-BM
Nitrógeno	187.80±1.71	1.95±3.83	98.95±2.05	-----	8.25E-5±6.65E-5
Fase 2	Entrada (mg/Ld)	Salida (mg/Ld)	E (%)	Y N2	Y N-BM
Nitrógeno	181.78±17.72	13.17±2.45	91.19±20.39	0.87±0.21	0.001±0.0006

En la Figura 10 se puede visualizar el crecimiento de la biomasa a lo largo de la operación del reactor. Todos estos resultados, indican que las condiciones experimentales utilizadas en ambas fases permitieron que el lodo inoculado en el reactor consiguiera llegar a una respiración desnitrificante en estado estacionario y que fuera posible incrementar la producción de biomasa desnitrificante.

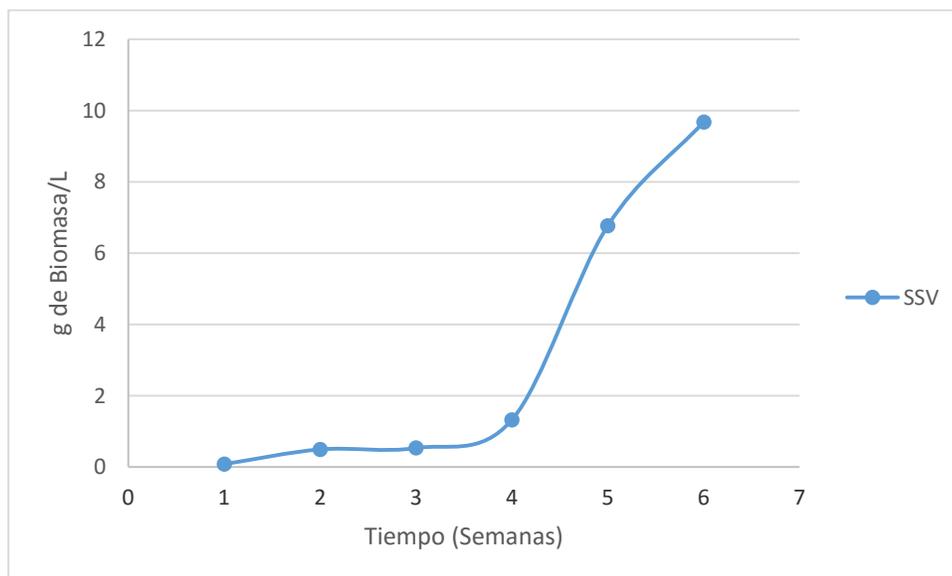


Figura 10. Perfil de crecimiento de Biomasa desnitrificante durante 6 semanas en un reactor tipo UASB

El balance de materiales que se muestra en la Tabla 5 permitió constatar que el nitrato y acetato alimentados al reactor UASB fueron transformados a nitrógeno molecular, bicarbonato y biomasa. Asimismo, indica que el porcentaje de recuperación de los sustratos alimentados fue mayor que 85.20%.

Tabla 5. Balance de materia de C y N en ambas fases del periodo de experimentación

<u>Carbono</u>	<u>C-E (mg/L)</u>	<u>C-s (mg/L)</u>	<u>C-HCO3 (mg/L)</u>	<u>C-BM (mg/L)</u>	<u>Total</u>
Fase 1	232.87	21.77	158.07	28.07	89.28%
Fase 2	359.38	72.38	140.15	108.83	89.42%
<u>Nitrógeno</u>	<u>N-NO3 E(mg/L)</u>	<u>N-NO3 S (mg/L)</u>	<u>QN2 (mg/L)</u>	<u>N-BM (mg/L)</u>	<u>Total</u>
Fase 1	180.87	1.95	-----	0.01	-----
Fase 2	181.78	13.17	141.55	0.17	85.20%

Ensayos en lote: controles abióticos

Para verificar que no hubiese pérdidas de sustratos por reacción química, se realizaron ensayos control abióticos en ausencia de lodo desnitrificante, suplementados con medio mineral, C-Acetato y N- Nitrato, así como ensayos control con medio mineral, C-Acetato y N-Nitrato e inoculados con 1 g SSV /L previamente esterilizados en autoclave (60 min a 122 °C), para cuantificar la posible pérdida de estos compuestos por sorción en los lodos desnitrificantes. Para el caso de los ensayos adicionados con ampicilina, se realizaron ensayos abióticos con C-AMP y N- Nitrato durante 24 horas en ausencia y presencia de luz y con biomasa desnitrificante estéril en oscuridad para verificar que no hubiese pérdidas de AMP por reacción química, por fotólisis o por sorción en los lodos desnitrificantes. Para determinar la pérdida por reacción química, se colocó el medio mineral con AMP y N, sin BM y se mantuvo en oscuridad. Ensayos preparados de la misma forma, pero expuestos a la luz se usaron para determinar la pérdida de AMP por fotólisis.

En el caso de los ensayos abióticos con medio mineral más las fuentes de C y N, y con biomasa estéril, se puede observar que durante 7 horas las pérdidas de los compuestos debidas a reacción química y por sorción, son del 5%, por lo que, no son significativas (Figura 11).

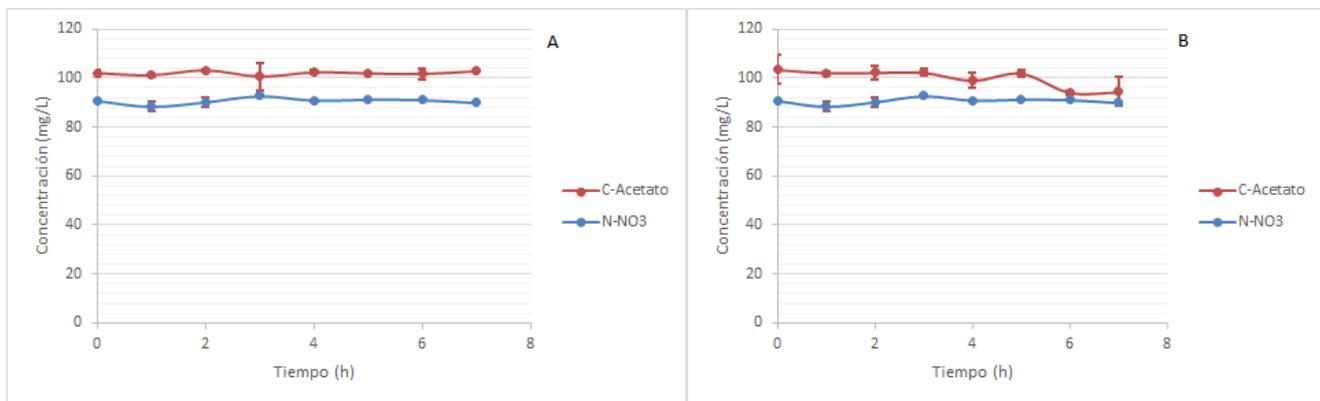


Figura 11. Ensayos abióticos con C-Acetato y N-Nitrato en ausencia de biomasa A) y con biomasa estéril B).

Los ensayos abióticos en presencia de AMP y con biomasa estéril, indican que hubo una pérdida de AMP y NO_3 asociadas a reacciones foto líticas del 12 y 5% respectivamente (Figura 12). Asimismo, de acuerdo con la Figura 15, las pérdidas de estos compuestos debidas a la sorción, son del 5 y 8% de AMP y NO_3 respectivamente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, son comparables con los reportados por Peña Calva et al. (2004), donde las pérdidas por volatilización o reacción química en ensayos desnitrificantes en presencia de Benceno, Tolueno y Xileno, son cercanos al 2%, pero difieren de los encontrados por Bing y Tong (2010), quienes reportan que en un estudio de biodegradación de ampicilina con lodos activados en aguas saladas y aguas dulces, un 34% de la ampicilina permanecía adsorbida en el lodo. Todos estos resultados indican que, manteniendo las muestras en oscuridad, las pérdidas de AMP, NO_3 y acetato por reacción química, fotólisis y/o sorción, serán mínimas y que, en los subsecuentes ensayos bióticos, es decir, en presencia de biomasa desnitrificante activa, la desaparición de los sustratos será debida principalmente a la actividad biológica de los lodos desnitrificantes.

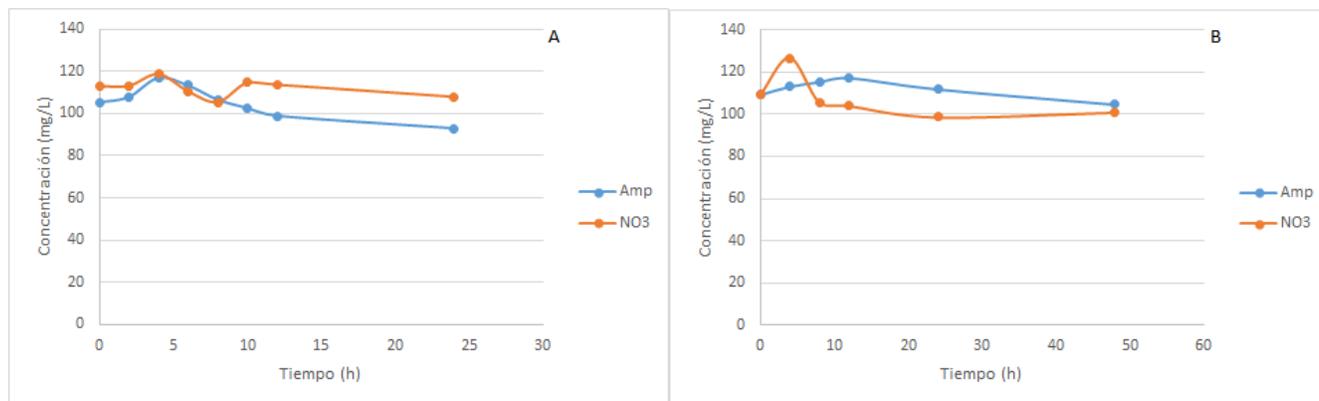


Figura 12. Ensayos abióticos con C-AMP y N-Nitrato en ausencia de biomasa A) y con biomasa estéril B).

Ensayos desnitrificantes de referencia

Una vez obtenidos los lodos desnitrificantes estabilizados, se procedió a realizar los estudios cinéticos desnitrificantes de referencia con C-Acetato y N-Nitrato. Se realizaron bajo dos diferentes relaciones C/N y diferentes concentraciones de Carbono: 20, 40, 60, 80 y 100 mg C/L. Se evaluaron dos relaciones C/N, una igual a 0.86, la cual tenía un exceso del 25% de N-Nitrato y a 1.1, que es la C/N estequiométrica.

En la Figura 13 se muestra a manera de ejemplo el perfil desnitrificante de consumo y producción obtenido al ensayar con 80 mg C-Acetato/L y ambas relaciones C/N. Como se puede observar, en ambos casos el consumo de acetato y nitrato fue simultaneo y completo. Asimismo, el acetato fue completamente oxidado a bicarbonato mientras que el nitrato fue reducido a N₂, de forma que la desnitrificación se realizó de manera completa en las 2 primeras horas de experimentación. Un comportamiento similar se obtuvo con las diferentes concentraciones de acetato ensayadas.

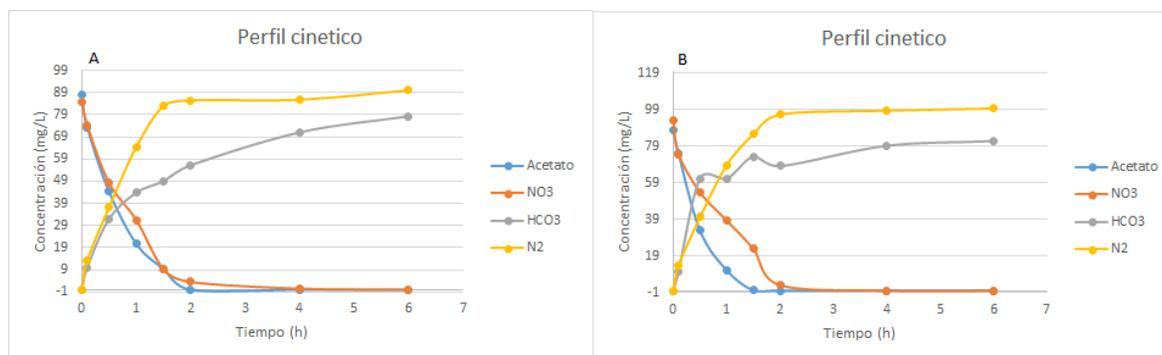


Figura 13. Ejemplos de perfil cinético de ensayos con 80 mg C-Acetato/L y N-Nitrato a dos una C/N: A) 1.1 y B) 0.86

Las eficiencias de consumo de acetato (E_A) y de nitrato (E_{NO_3}) encontradas con ambas relaciones C/N y las diferentes concentraciones ensayadas alcanzaron el 100%, como se muestra en la Tabla 6. Asimismo, los rendimientos de productos Y_{HCO_3} y Y_{N_2} fueron igual o mayores a 0.9. La presencia de los productos asociados al proceso biológico indica que el proceso desnitrificante se efectuó de manera completa y eficiente en todos los casos.

De acuerdo a lo esperado, en los ensayos con la relación C/N estequiométrica de 1.1, no se presentó carbono o nitrógeno residual y coinciden con los reportados por Martínez-Gutiérrez (2013), quien realizó un ensayo con C-Acetato y N-Nitrato con una relación C/N 1.1, obteniendo eficiencias del 100% y rendimientos de C- HCO_3 de 0.7. En el caso de la relación C/N de 0.86, se esperaba que hubiese nitrógeno residual, ya que tiene un 25% de exceso de N-Nitrato, pero este se consumió completamente. Este consumo podría estar sustentado por las sustancias exopoliméricas presentes en los lodos desnitrificantes, las cuales, además de mantener la estructura y estabilidad de lodos floculares o granulares, podrían actuar como fuente de electrones, como ha sido sugerido por Cuervo-López (2003), entre autores.

Tabla 6. Eficiencias de consumo y rendimientos de formación de productos obtenidos con las diferentes concentraciones de C-Acetato con una C/N=0.86 y 1.1

C/N_{25%}=0.86				
Concentración (mg/L)	E C-Acetato (%)	E N-NO₃ (%)	Y HCO₃	Y N₂
20	100±0	100±0	1.03±0.03	1.09±0.03
40	100±0	100±0	0.89±0.03	1.02±0.09
60	100±0	100±0	0.95±0.02	1.10±0.02
80	100±0	100±0	0.92±0.06	1.07±0.01
100	100±0	100±0	0.97±0.06	1.01±0.01
C/N_E=1.1				
Concentración (mg/L)	E C-Acetato (%)	E N-NO₃ (%)	Y HCO₃	Y N₂
20	100±0	100±0	1.03±0.04	1.20±0.23
40	100±0	100±0	0.82±0.04	1.07±0.26
60	100±0	100±0	0.70±0.02	1.21±0.21
80	100±0	100±0	0.89±0.00	1.19±0.21
100	100±0	100±0	0.86±0.00	0.81±0.22

Valores de rendimiento de C-BM y N-BM son menores de 0.06 y 0.01 respectivamente.

El balance de materiales confirma que en todos los casos la desnitrificación se llevó a cabo de manera completa y sin pérdidas significativas de sustratos o productos (Tabla 7), por lo que,

tanto las condiciones como los sistemas experimentales utilizados, resultaron adecuados para llevar a cabo el proceso biológico.

Tabla 7. Balance de materia de C y N a diferentes concentraciones y diferentes C/N=0.86 y 1.1

C/N_{25%}=0.86						
Concentración (mg/L)	C e (mg/L)	C s (mg/L)	C-HCO₃ s (mg/L)	C-BM (mg/L)	Total (mg/L)	Rec. (%)
20	22±0	0±0	22.74±0.80	0.25±0.00	22.99±0.81	104.53±3.69
40	44±0	0±0	39.21±1.66	0.32±0.00	39.53±1.65	89.84±3.78
60	66±0	0±0	63.35±1.71	0.33±0.02	63.68±1.68	96.49±2.55
80	88±0	0±0	81.89±6.50	0.28±0.01	82.17±6.49	93.37±7.37
100	110±0	0±0	107.49±7.37	0.26±0.01	107.75±7.36	97.95±6.69
Concentración (mg/L)	N e (mg/L)	N s (mg/L)	N₂ s (mg/L)	N-BM (mg/L)	Total (mg/L)	Rec. (%)
23	24±0	0±0	25.27±0.74	0.04±0.00	25.31±0.74	110.39±3.22
46.5	46.5±0	0±0	47.21±3.66	0.05±0.00	47.26±3.66	101.65±7.87
69	69±0	0±0	76.53±1.41	0.06±0.00	76.59±1.40	111.00±2.04
93	93±0	0±1	99.73±1.29	0.04±0.00	99.77±1.30	107.28±1.39
116	116±0	0±0	119.12±2.26	0.04±0.00	119.16±2.26	102.72±1.95
C/N_E=1.1						
Concentración (mg/L)	C e (mg/L)	C s (mg/L)	C-HCO₃ s (mg/L)	C-BM (mg/L)	Total (mg/L)	Rec. (%)
20	22±0	0±0	22.68±0.91	0.26±0.00	22.94±0.91	104.30±4.13
40	44±0	0±0	36.31±2.12	0.25±0.01	36.56±2.11	83.10±4.80
60	66±0	0±0	46.27±1.38	0.24±0.02	46.51±1.37	70.48±2.08
80	88±0	0±0	78.39±0.41	0.27±0.00	78.66±0.40	89.39±0.46
100	110±0	0±0	95.27±0.88	0.27±0.01	95.54±0.89	86.86±0.81
Concentración (mg/L)	N e (mg/L)	N s (mg/L)	N₂ s (mg/L)	N-BM (mg/L)	Total (mg/L)	Rec. (%)
18.1	22±0	0±0	24.42±0.87	0.04±0.00	24.46±0.87	111.21±3.96
36.3	42±0	0±0	43.98±2.78	0.04±0.00	44.02±2.78	104.82±6.62
54.5	60±0	0±0	67.60±0.56	0.04±0.00	67.64±0.56	112.74±0.94
72.7	85±0	0±0	90.10±3.45	0.05±0.00	90.15±3.45	106.06±4.06
90.9	120±0	0±0	105.92±4.03	0.04±0.00	105.96±4.03	88.30±3.36

En la Tabla 8 se muestran los valores de las velocidades específicas de consumo y producción de Acetato (q_{AC}), N-Nitrato, (q_{NO_3}) y de formación de C-Bicarbonato (q_{HCO_3}) y nitrógeno molecular (q_{N_2}) obtenidas en los ensayos con la relación C/N de 0.86. Se encontró que, en todos los casos, a mayor concentración de sustrato, mayor fue la velocidad, por lo que se puede decir que sigue el modelo cinético de Monod y que, bajo las condiciones experimentales, se encontraron en la región de una cinética de primer orden. Un comportamiento similar se

obtuvo en los ensayos realizados con la C/N de 1.1. Peña Calva et al. (2004) también reporta un comportamiento cinético de primer orden en ensayos desnitrificantes en lote alimentados con C-Acetato y N-Nitrato.

Las velocidades específicas de consumo y producción obtenidas en los ensayos de referencia se utilizarán para comparar con las velocidades específicas obtenidas al usar ampicilina como fuente de carbono y energía.

Tabla 8. Velocidades específicas para consumo de N-Nitrato y C-Acetato y producción de C-Bicarbonato y nitrógeno molecular, con una C/N=0.86 y 1.1

C/N_{25%} =0.86				
Concentración (mg/L)	q_{AC} mg/ g SSV h	q_{HCO3} mg/ g SSV h	q_{NO3} mg/ g SSV h	q_{N2} mg/ g SSV h
20	9.85±0.96	8.08±2.27	8.34±0.49	8.11±1.22
40	16.66±1.24	10.85±0.42	21.13±0.02	12.42±0.62
60	20.31±1.25	23.80±2.42	21.44±3.06	25.65±3.71
80	33.08±2.18	24.56±2.80	31.25±0.28	37.81±0.88
100	40.81±3.87	48.12±1.22	37.05±0.29	54.06±1.29
C/N_E =1.1				
Concentración (mg/L)	q_{AC} mg/ g SSV h	q_{HCO3} mg/ g SSV h	q_{NO3} mg/ g SSV h	q_{N2} mg/ g SSV h
20	15.04±7.76	3.83±0.33	11.01±0.08	5.93±1.44
40	17.75±0.81	10.36±0.97	20.50±1.92	10.93±3.20
60	27.46±0.05	16.93±2.10	24.07±1.48	21.29±0.88
80	32.67±1.36	21.09±3.06	34.72±3.04	36.60±1.61
100	32.45±3.64	29.13±3.99	33.31±0.29	43.24±6.32

Ensayos desnitrificantes con Ampicilina

Los ensayos cinéticos con C-Ampicilina y N-Nitrato se realizaron bajo dos diferentes relaciones C/N, a 0.68, la cual tenía un exceso del 25% de N-Nitrato y a 0.86, que es la C/N estequiométrica. También se utilizaron diferentes concentraciones de Carbono: 20, 40, 60,80, 100 mg C/L y se mantuvo el inóculo de 1g SSV/L. Los ensayos se realizaron durante 48 horas.

En la Figura 14 se muestran como ejemplo, los perfiles de consumo y producción obtenidos cuando se utilizó una concentración de 100 mg C-AMP/L y las dos relaciones C/N. Se puede observar que el lodo desnitrificante sí tuvo la capacidad para consumir a la ampicilina, sin embargo, a diferencia de los ensayos desnitrificantes donde se utilizó acetato como fuente de electrones, fue requerido más tiempo para lograr el consumo total de nitrato y AMP, puesto que se incrementó hasta en cinco veces su valor. Asimismo, es importante hacer notar que lodo desnitrificante fue capaz de utilizar a la ampicilina como donador de electrones para

reducir al nitrato presente en el ensayo, puesto que se observó el consumo simultáneo de ambos compuestos y su respectiva conversión a N_2 y bicarbonato. Sin embargo, se requirió de mayor tiempo para lograrlo que cuando se utilizó acetato como donador de electrones. Otra diferencia importante con respecto a los ensayos con acetato como fuente de electrones, es que, cuando se utilizó AMP, hubo la formación de intermediarios tanto carbonados (dos, no identificados), como nitrogenados (N_2O). Un comportamiento similar se presentó con las otras concentraciones de ampicilina ensayadas y con las dos relaciones C/N evaluadas.

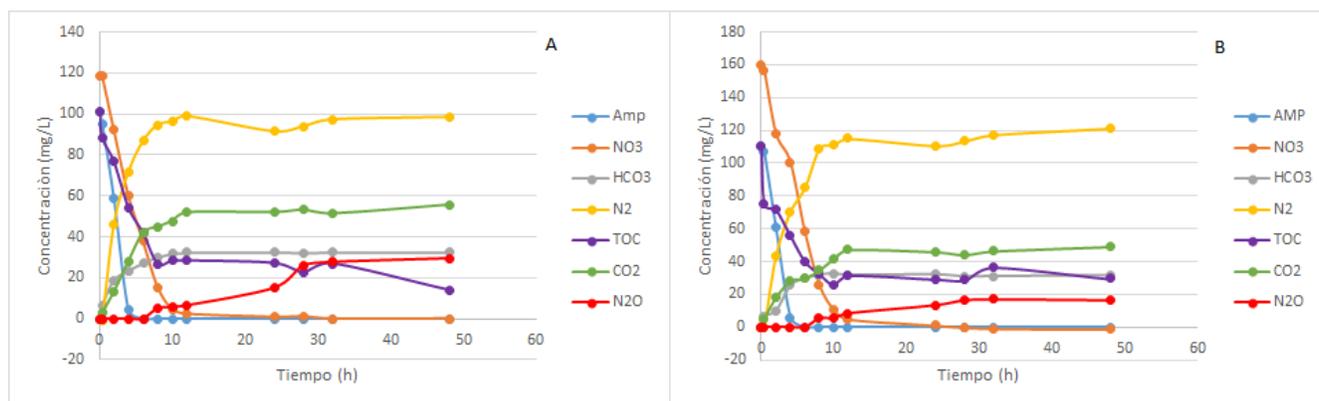


Figura 14. Ejemplos de perfil cinético desnitrificante de los ensayos con 100 mg C-AMP/L a dos relaciones C/N: A) 0.86 y B) 0.68

A pesar de que se requirió de más tiempo para el consumo de ampicilina, las eficiencias de consumo (E_{C-AMP}) encontradas con las diferentes concentraciones y ambas relaciones C/N fueron muy cercanas al 100%, lo que indica que, bajo las condiciones ensayadas, es posible eliminar completamente hasta 100 mg/L de carbono de AMP (Tabla 9). Asimismo, los rendimientos de Y_{HCO_3} y Y_{CO_2} indican que la AMP fue mayoritariamente mineralizada y que solo entre 10 y 30% del antibiótico se convirtió en intermediarios (Y_I). Esto evidencia que el lodo desnitrificante fue capaz de utilizar a la ampicilina como única fuente de electrones y de mineralizarla mediante la desnitrificación. Dado que bajo las condiciones experimentales y el tiempo de cultivo evaluados, los intermediarios permanecieron sin ser consumidos, se puede decir que resultaron ser recalcitrantes.

Tabla 9. Eficiencias y rendimientos de C-AMP y N-NO₃ con una C/N=0.86

C/N_E = 0.86						
Concentración (mg/L)	E C-AMP (%)	E N-NO₃ (%)	Y HCO₃	Y CO₂	Y N₂	Y N₂O
20	100±0	100±0	0.47±0.00	0.47±0.01	0.80±0.08	0.22±0.08
40	100±0	100±0	0.60±0.04	0.37±0.02	0.83±0.06	0.18±0.01
60	100±0	100±0	0.39±0.03	0.35±0.08	0.77±0.05	0.13±0.02
80	100±0	100±0	0.27±0.04	0.54±0.08	0.87±0.08	0.17±0.06
100	100±0	100±0	0.32±0.02	0.45±0.08	0.85±0.02	0.24±0.07
C/N_{25%} = 0.68						
Concentración (mg/L)	E C-AMP (%)	E N-NO₃ (%)	Y HCO₃	Y CO₂	Y N₂	Y N₂O
20	100±0	100±0	0.51±0.00	0.49±0.01	0.69±0.01	0.22±0.02
40	100±0	100±0	0.57±0.02	0.35±0.09	0.75±0.02	0.22±0.03
60	100±0	100±0	0.39±0.02	0.39±0.02	0.80±0.02	0.11±0.05
80	100±0	100±0	0.33±0.04	0.55±0.09	0.78±0.01	0.14±0.05
100	100±0	100±0	0.29±0.01	0.46±0.02	0.82±0.03	0.19±0.06

Valores de rendimiento de C-BM y N-BM son menores de 0.05 y 0.01 respectivamente.

En la literatura existen reportes que indican que ha sido posible la eliminación de hasta 0.534 g/L de Penicilina en condiciones desnitrificantes, pero, a diferencia del presente trabajo, no ha sido posible determinar su destino (Zhang et al., 2015). También se ha reportado que ha sido posible eliminar hasta 92 y 22 mg/L de fenol y 2-clorofenol respectivamente, utilizando un proceso desnitrificante, logrando eficiencias de eliminación del 100% y una mineralización completa de los compuestos carbonados (Martínez-Gutiérrez et al. 2011).

En la Figura 15, se ilustra como ejemplo, los intermediarios carbonados formados en el ensayo con 100 mg/L de concentración de ampicilina y C/N de 0.86. Se observa que en las primeras 5 horas del cultivo aparece uno de ellos y se consume mayoritariamente antes de las 10 horas, aunque permanece una pequeña fracción a lo largo del cultivo. El segundo intermediario registrado, aparece también al inicio del cultivo, se acumula a partir de las 8 horas del cultivo y se mantiene presente sin consumirse hasta el final del ensayo. De manera similar, Mitchell et al. (2013) indican que en un proceso metanogénico adicionado con concentraciones de AMP entre 35 y 350 mg/L, encuentran la presencia de un intermediario derivado de la AMP que fue consumido en aproximadamente 25 días. Sin embargo, al igual que en el presente trabajo, los autores tampoco identificaron al intermediario generado.

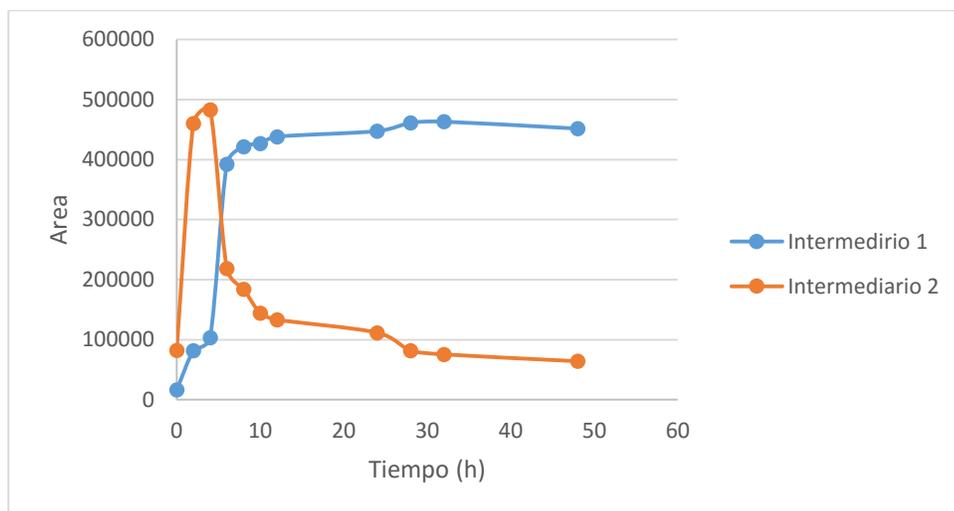


Figura 15. Perfil de formación de intermediarios carbonados en el ensayo adicionado con 100 mg C-AMP/L y C/N de 0.86

Olad y Nosrati (2015), utilizando un proceso de oxidación avanzada (AOP) y óxido de zinc, proponen una ruta de degradación de ampicilina, en la cual, se observa la degradación del anillo beta lactámico, además de la formación de ácido benzoico más la formación de un complejo tipo aromático (Figura 15).

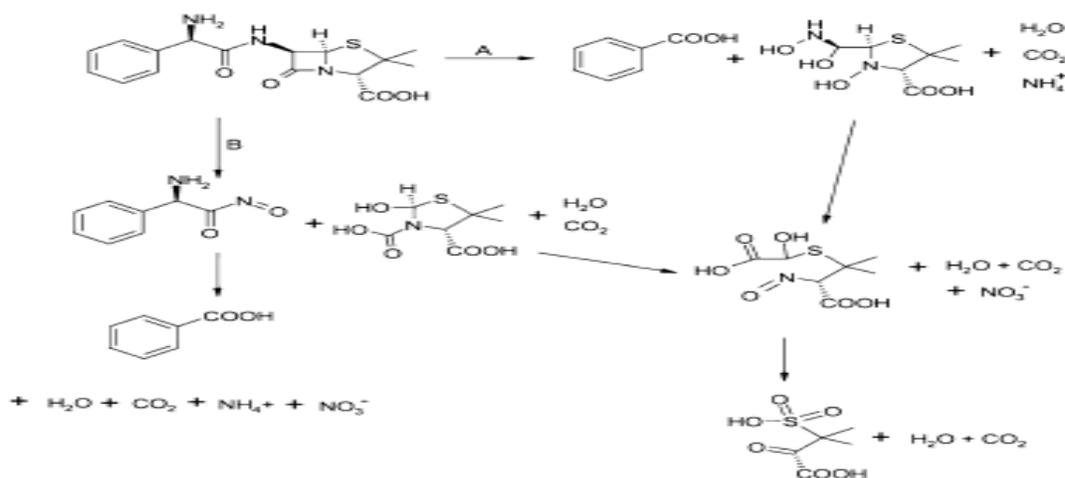


Figura 15. Vía propuesta para la degradación de ampicilina mediante un proceso de oxidación avanzada.

En el presente trabajo, el nitrato también fue consumido completamente y la mayor fracción de éste, fue reducido a N_2 como lo indican los valores de Y_{N_2} . Sin embargo, en todos los ensayos, independientemente de la concentración de AMP y la relación C/N utilizada, se detectó la formación de N_2O , alcanzando valores de Y_{N_2O} de hasta 0.24. Estos resultados sugieren que no es una limitación en la disponibilidad de aceptor de electrones lo que provoca la Biodegradación de Ampicilina...

acumulación de N_2O , sino por la presencia del antibiótico, una posible afectación en la actividad de la enzima nitroso óxido reductasa (Nos), que es la encargada de reducir el N_2O hasta el N_2 como producto final de la desnitrificación (Knowles 1982; Cuervo-López 2003). Hou et al. (2014) indican que al realizar la desnitrificación utilizando sedimentos costeros y en presencia de concentraciones mayores que 50 ng/L de sulfametazina, obtienen N_2O como producto de la desnitrificación, lo que sugiere que los antibióticos afectan la actividad de la enzima Nos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que la ampicilina puede ser usada como única fuente de electrones para reducir al nitrato, pero que hasta un 24% de este permanecerá reducido en forma de N_2O y prácticamente el 75% del nitrato sí será convertido hasta nitrógeno molecular. Dado que el N_2O es un producto con un efecto invernadero importante (Wrage et al., 2001; Álvarez et al., 2014), es necesario buscar la forma de evitar su acumulación.

Un balance de materiales indica las fracciones de los compuestos carbonados y nitrogenados formados en los diferentes ensayos y ambas relaciones C/N evaluadas (Tabla 10 y 11), corroborando que las pérdidas de sustratos durante el proceso no son significativas. Muestra también que al utilizar la relación de 0.68 se obtienen menos intermediarios carbonados y una formación de N_2O entre el 12 y 28%, mientras que con la relación estequiométrica (C/N= 0.86), sólo se forma entre un 9 y 17% de N_2O . Esto se puede atribuir al exceso de nitrógeno disponible en el medio al establecer la C/N de 0.68 o la concentración de ampicilina. Entonces, a fin de disminuir la producción de N_2O es recomendable utilizar la relación C/N estequiométrica a concentraciones bajas de ampicilina.

Tabla 10. Balance de materiales de C y N a las diferentes concentraciones, con una C/N=0.86

C/N_E = 0.86								
Concentración (mg/L)	C _e (mg/L)	C _s (mg/L)	C-HCO ₃ s (mg/L)	C-BM s (mg/L)	C-CO ₂ S (mg/L)	C-Inter (mg/L)	Total (mg/L)	Rec. (%)
20	23.3±0	0±0	12.18±0.7 3	0.02±0.00	10.35±0.3 2	1.98±0.01	24.53±1.20	100±5.27
40	40.6±0	0±0	21.76±0.4 3	0.03±0.00	13.10±1.4 1	8.55±1.89	43.44±2.84	100±6.99
60	65.1±0	0±0	21.98±1.5 5	0.08±0.00	22.38±1.1 1	22.00±4.0 8	66.44±1.5	100±2.05
80	82.9±0	0±0	22.24±0.8 9	0.09±0.00	31.61±1.7 6	32.53±2.6 7	86.47±3.3	100±4.30
100	101.2±0	0±0	27.24±1.2 9	0.04±0.00	40.27±1.0 5	39.54±3.5 3	107.09±6.09	100±5.82
Concentración	NO ₃ e (mg/L)	NO ₃ s (mg/L)	N ₂ s (mg/L)	N ₂ O s (mg/L)	N-BM s (mg/L)	Total (mg/L)	Rec. (%)	
23.25	26.27±0	0±0	21.08±0.8 6	3.65±0.24	0.00±0.00	24.73±1.81	100±6.36	
46.51	50.50±0	0±0	42.17±1.2 8	5.28±0.21	0.00±0.01	47.45±3.10	100±2.02	
69.76	79.76±0	0±0	61.82±2.8 1	10.92±0.3 5	0.00±0.02	72.74±6.51	110±4.27	
93.02	98.23±0	0±0	78.94±0.3	17.10±0.5 1	0.00±0.03	96.04±2.19	100±3.24	
116.27	118.4±0	0±0	98.48±3.2 6	10.44±0.6 7	0.00±0.04	108.92±9.52	93.67±6.22	

Tabla 11. Balance de materia de C y N a diferentes concentraciones, con una C/N=0.68

C/N_{25%} = 0.68								
Concentración (mg/L)	C _e (mg/L)	C _s (mg/L)	C-HCO ₃ s (mg/L)	C-BM s (mg/L)	C-CO ₂ S (mg/L)	C-Inter (mg/L)	Total (mg/L)	Rec. (%)
20	25.2±0	0±0	12.73±1.23	0.01±0.00	12.06±1.14	0±0	24.80±0.04	98.41±1.6 0
40	42.4±0	0±0	20.66±1.00	0.07±0.00	13.77±1.16	9.15±1.87	43.65±1.25	100±2.94
60	63.2±0	0±0	21.31±1.47	0.18±0.00	22.54±1.00	26.80±3.16	70.83±7.63	100±12.07
80	88.3±0	0±0	24.61±1.44	0.20±0.00	35.41±2.41	29.13±3.72	89.35±1.05	100±1.18
100	105.6± 0	0±0	26.72±1.08	0.03±0.00	37.56±1.37	41.55±3.72	105.86±0.26	100±0.24
Concentración (mg/L)	NO ₃ e (mg/L)	NO ₃ s (mg/L)	N ₂ s (mg/L)	N ₂ O s (mg/L)	N-BM s (mg/L)	Total (mg/L)	Rec. (%)	
29.41	31.74±0	0±0	22.14±1.32	8.83±0.70	0.00±0.00	30.97±1.50	100±5.30	
58.82	63.34±0	0±0	47.57±3.86	14.13±0.3 8	0.00±0.01	61.70±2.35	100±4.89	
88.23	89.50±0	0±0	72.49±2.58	10.55±0.2 6	0.00±0.02	83.04±6.46	94.11±5.88	
117.64	120.35±0	0±0	95.76±3.86	16.51±0.4 8	0.00±0.03	112.27±8.08	95.43±4.63	
147.05	160.32±0	0±0	121.31±3.7 5	28.03±0.3 4	0.00±0.04	149.34±11.0 2	100±1.55	

Valores de Carbono y Nitrógeno están dados en mg/L

En la literatura se ha reportado la eliminación de antibióticos como Trimetropina, Roxitromicina, Sulfametazol y Eritromicina a concentraciones de 19.3, 18, 21.1 y 20 ng/L respectivamente, bajo condiciones nitrificantes y desnitrificantes (Suarez et. al., 2010), sin embargo, sólo se señala la desaparición del antibiótico, sin mencionar su destino ni el de la fuente nitrogenada. Por otro lado, Liu et al. (2013) realizaron un ensayo adicionado con 50 mg/L ciprofloxacino bajo condiciones anóxicas y a exposiciones prolongadas del antibiótico, observando un proceso desnitrificante incompleto debido a una acumulación de N_2O y de NO_2 , a lo cual, los autores sugieren una inhibición en la enzima óxido nitrito reductasa. Hasta el momento, no existen datos en la literatura que indiquen que es posible llevar a cabo la eliminación de ampicilina mediante desnitrificación, en contraste, en este trabajo se muestran las evidencias claras de que es posible utilizar hasta 100 mg de ampicilina/L como único donador de electrones para reducir al nitrato y que es suficiente utilizar una relación C/N de 0.86, que corresponde al valor estequiométrico, dando como resultado mayoritario, la mineralización del antibiótico así como la formación de N_2 .

Las velocidades específicas de consumo y producción en los ensayos desnitrificantes en presencia de AMP y con las dos relaciones C/N se muestran en la Tabla 12. Se puede observar que, en todos los casos, al aumentar la concentración de ampicilina, la q_{AMP} se incrementa, indicando que, bajo las condiciones experimentales establecidas, se presenta una cinética de primer orden. Un comportamiento similar se observa en las q_{NO_3} y q_{N_2} . De hecho, un incremento en todas las velocidades entre 2 y 7.6 veces se observó al aumentar la concentración de ampicilina de 20 y hasta 100 mg C/L. Asimismo, se encontró que los valores de velocidades específicas obtenidas con las dos diferentes relaciones C/N resultaron muy semejantes entre sí, por lo que el cambio en la relación C/N no tuvo un efecto significativo.

Tabla 12. Velocidades específicas para consumo de N-Nitrato y C-AMP y producción de C-Bicarbonato y nitrógeno molecular obtenidas con dos relaciones C/N.

C/N_E = 0.86				
Concentración	q _{AMP}	q _{HCO₃}	q _{NO₃}	q _{N₂}
	mg/ g SSV h	mg/ g SSV h	mg/ g SSV h	mg/ g SSV h
20	2.39±0.12	0.52±0.21	2.33±0.31	1.49±0.19
40	4.16±0.90	2.00±0.40	4.12±0.83	3.31±0.41
60	4.02±0.18	1.66±0.06	3.98±0.28	3.37±1.06
80	6.45±0.37	1.63±0.44	5.23±0.35	4.29±0.47
100	8.69±1.02	2.27±0.27	10.67±1.25	9.54±1.87
C/N_{25%} = 0.68				
Concentración	q _{AMP}	q _{HCO₃}	q _{NO₃}	q _{N₂}
	mg/ g SSV h	mg/ g SSV h	mg/ g SSV h	mg/ g SSV h
20	2.15±0.13	0.83±0.08	2.01±0.27	2.31±0.15
40	4.14±0.16	1.96±0.29	5.95±0.53	5.11±0.32
60	4.71±0.74	1.63±0.08	5.19±0.59	5.42±0.86
80	3.91±0.09	1.14 ±0.17	5.53±0.07	3.83±0.23
100	11.64±0.64	2.27±0.27	13.08±0.35	10.92±0.21

En la literatura se ha reportado que la presencia de una combinación de antibióticos puede ocasionar efectos aditivos y antagónicos sobre la velocidad de la actividad desnitrificante (Zhang et al., 2015), sin embargo, la ampicilina no fue evaluada dentro de estos antibióticos. Asimismo, Liu et al. (2013) realizaron un ensayo de remoción de ciprofloxacino bajo condiciones anóxicas encontrando un efecto inhibitorio sobre la producción de N₂. Por otro lado, Costanzo et al. (2005), trabajaron con varios antibióticos, entre ellos ampicilina a una concentración de 1000 µg/L, reportaron que la adición de amoxicilina afecta la velocidad de desnitrificación, siendo menor que en comparación contra un ensayo control en ausencia del antibiótico y que, debido a la exposición al antibiótico, los lodos depuradores resultaron resistentes a la amoxicilina.

En las figuras 16 y 17 se muestran las velocidades específicas obtenidas con C-AMP y N-Nitrato con ambas C/N en comparación con los ensayos de referencia. Las velocidades específicas de consumo y producción obtenidas al utilizar a la ampicilina como única fuente de electrones resultaron ser en promedio, entre un 71 y 88% menor que las obtenidas en los ensayos donde el acetato es utilizado como donador de electrones, por lo que, aunque es posible llevar a cabo la desnitrificación con AMP, el proceso respiratorio se realiza de manera más lenta. Como ejemplo particular, al comparar las velocidades específicas obtenidas al utilizar la relación C/N estequiométrica para acetato y ampicilina y cuando se adicionaron 100 mg C/L, las velocidades específicas obtenidas en los ensayos adicionados con acetato fueron

desde 2.6 hasta 4 veces mayores que las obtenidas con ampicilina. La menor velocidad de consumo y producción obtenida en los ensayos con ampicilina podría estar relacionada con el posible efecto que el antibiótico pueda causar a las membranas celulares bacterianas, y, por tanto, podría estar afectando también a las enzimas que se encuentran localizadas en la membrana celular y en el espacio periplásmico (*Nar*, *Nir*, *Nos*), o bien, al alterarse las membranas celulares, se podrían estar afectando los sistemas de transporte de sustratos al interior de la célula. Este efecto también podría deberse a la complejidad de la estructura de la ampicilina, ya que se requieren que se lleven a cabo mas reacciones para su mineralización.

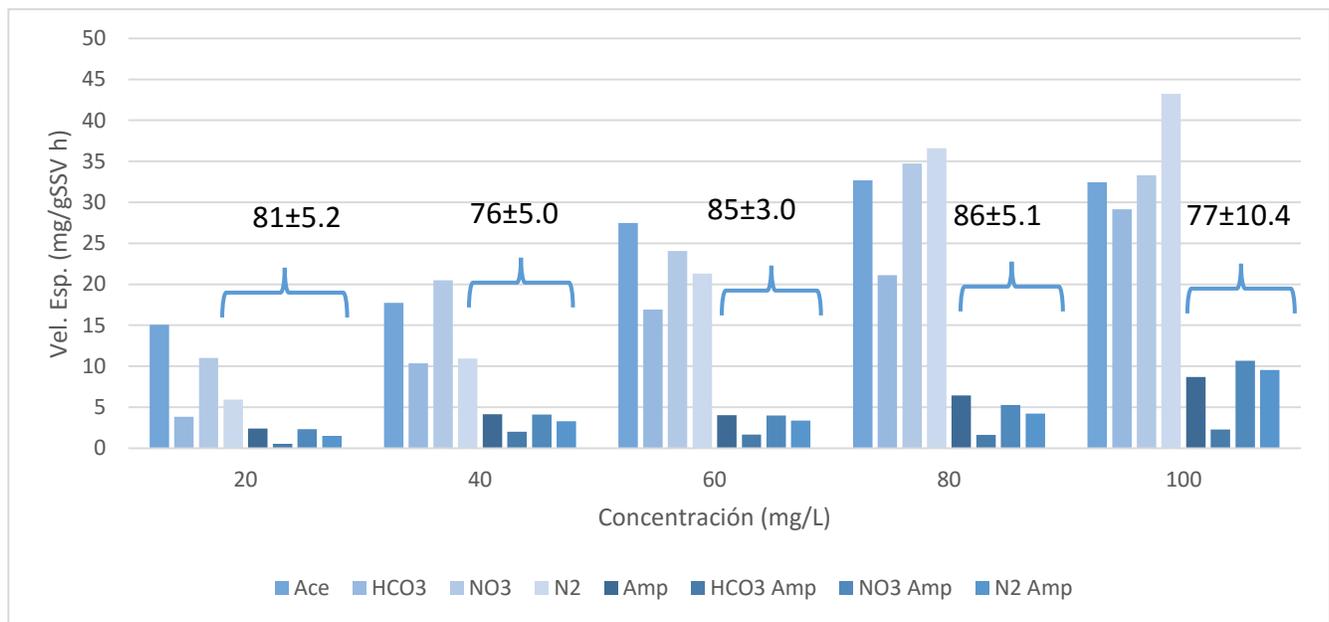


Figura 16. Comparación de velocidades específicas estequiométrica con C-AMP, los colores claros son velocidades de referencia y los colores oscuros velocidades obtenidas con ampicilina. Se señalan los promedios de pérdida de actividad en porcentaje y desviaciones estándar

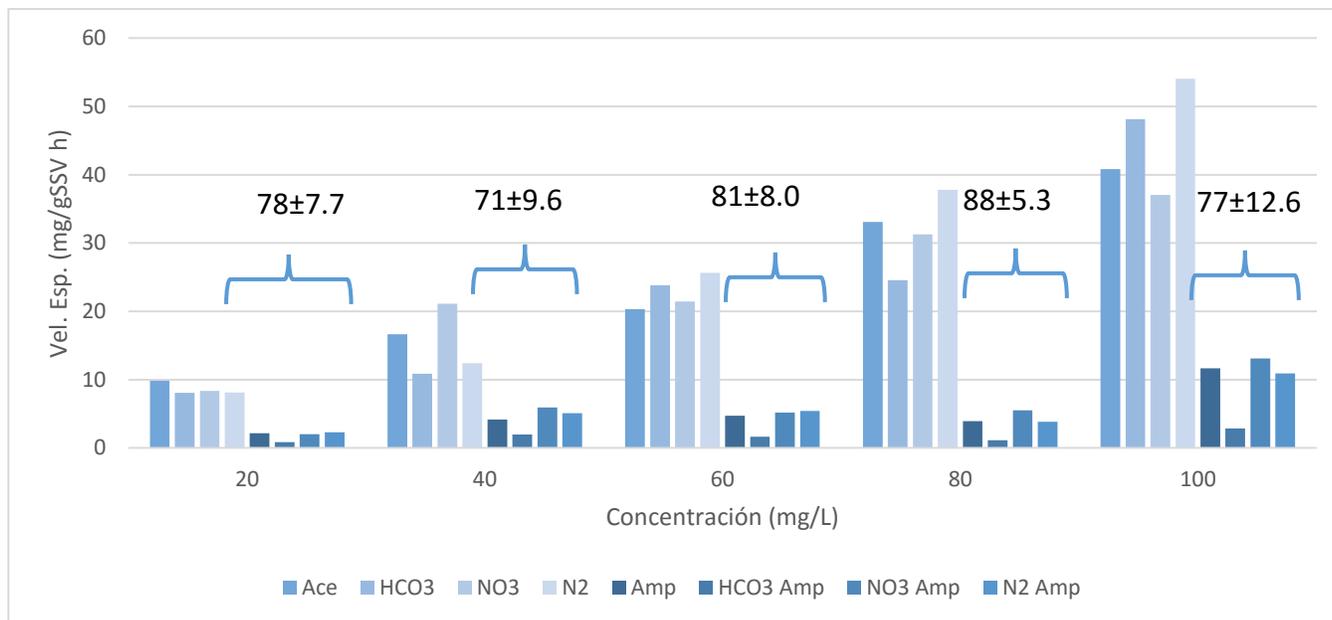


Figura 17. Comparación de velocidades específicas con un 25% de exceso de nitrógeno con C-AMP, los colores claros son velocidades de referencia y los colores oscuros velocidades obtenidas con ampicilina. Se señalan los promedios de pérdida de actividad en porcentaje y desviaciones estándar.

Ensayos de Recuperación de la desnitrificación

A fin de evaluar si la exposición al antibiótico ocasionó algún efecto sobre el lodo desnitrificante, al finalizar los ensayos en presencia con ampicilina los lodos desnitrificantes se lavaron y se procedió a realizar nuevamente un ensayo con C-Acetato y N-Nitrato como fuente de carbono y energía para determinar la actividad cinética y fisiológica de los lodos desnitrificantes. Estos ensayos se realizaron bajo las condiciones descritas en materiales y métodos, a las relaciones C/N de 0.86 y 1.1 y a las diferentes concentraciones de acetato: 20, 40, 60, 80, 100 mg C/L.

En la Figura 18, se muestra un ejemplo del perfil desnitrificante obtenido con 80 mg C-acetato/l y C/N = 0.86, en el que se observa que en 6 horas de cultivo el lodo desnitrificante fue capaz de consumir totalmente tanto al acetato como al nitrato y convertirlos respectivamente a HCO_3 y N_2 , sin formación de intermediarios carbonado o nitrogenados. Un comportamiento similar se obtuvo en los ensayos con las diferentes concentraciones de acetato y a las 2 relaciones C/N.

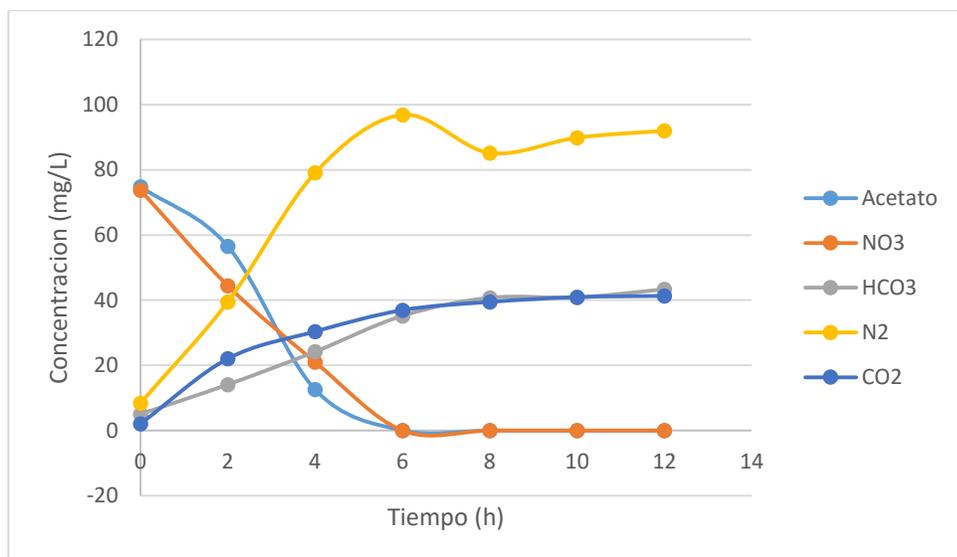


Figura 18. Ejemplo de perfil cinético desnitrificante obtenido con 80 mg C-Acetato/L y relación C/N: 0.86

Los valores obtenidos de eficiencia y rendimientos para este nuevo ensayo en ambas C/N se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Eficiencias de consumo y rendimientos de formación de productos obtenidos en los ensayos de recuperación con las relaciones C/N=0.86 y 1.1

C/N_{25%}=0.86							
Concentración (mg/L)	E C-Acetato (%)	E N-NO ₃ (%)	Y HCO ₃	Y CO ₂	Y N ₂	Y C-BM	Y N-BM
20	100±0	100±0	0.58±0.03	0.51±0.07	1.0±0.00	0.03±0.01	0.00±0.00
40	100±0	100±0	0.55±0.06	0.58±0.07	1.0±0.01	0.04±0.01	0.00±0.00
60	100±0	100±0	0.57±0.02	0.60±0.03	0.99±0.02	0.04±0.01	0.00±0.00
80	100±0	100±0	0.54±0.03	0.51±0.04	0.92±0.09	0.06±0.02	0.00±0.00
100	100±0	100±0	0.37±0.03	0.39±0.04	0.80±0.03	0.13±0.04	0.00±0.00
C/N_E=1.1							
Concentración (mg/L)	E C-Acetato (%)	E N-NO ₃ (%)	Y HCO ₃	Y CO ₂	Y N ₂	Y C-BM	Y N-BM
20	100±0	100±0	0.60±0.00	0.48±0.01	1.0±0.00	0.02±0.00	0.00±0.00
40	100±0	100±0	0.49±0.00	0.66±0.01	1.0±0.00	0.03±0.00	0.00±0.00
60	100±0	100±0	0.57±0.02	0.46±0.03	0.87±0.02	0.03±0.01	0.00±0.00
80	100±0	100±0	0.65±0.04	0.53±0.05	0.98±0.04	0.05±0.02	0.00±0.00
100	100±0	100±0	0.50±0.04	0.44±0.05	0.88±0.04	0.10±0.02	0.00±0.00

Estos resultados muestran que el lodo desnitrificante puede recuperar su actividad metabólica aun después de haber sido expuestos hasta 100 mg C-AMP/L. Sin embargo, estos lodos previamente expuestos a ampicilina, requirieron de 3 veces más tiempo para completar el

proceso desnitrificante en comparación con los lodos sin exposición al antibiótico, lo que indica que, aunque en términos metabólicos el lodo fue capaz de recuperarse a la exposición del antibiótico, siguió presentando una afectación cinética. De hecho, las velocidades obtenidas en los ensayos de recuperación fueron menores que las obtenidas en los ensayos de referencia cuando se utilizaron lodos que no habían estado en contacto con el antibiótico (Tabla 14).

Tabla 14. Velocidades específicas para consumo de N-Nitrato y C-AMP y producción de C-Bicarbonato y nitrógeno molecular obtenidas con dos relaciones C/N.

C/N_E = 1.1				
Concentración	q_{Ace}	q_{HCO_3}	q_{NO_3}	q_{N_2}
	mg/ g SSV h			
20	2.34±0.12	1.94±0.49	2.21±0.04	2.18±0.48
40	3.18±0.24	1.12±0.16	1.63±0.22	4.09±0.30
60	5.19±0.53	2.40±0.30	3.81±0.77	4.15±0.39
80	7.70±0.06	3.99±0.09	5.94±0.02	5.99±0.97
100	19.22±0.22	6.93±0.80	18.84±1.46	12.28±1.52
C/N_{25%} = 0.86				
Concentración	q_{Ace}	q_{HCO_3}	q_{NO_3}	q_{N_2}
	mg/ g SSV h			
20	2.56±0.54	2.36±0.17	2.18±0.56	2.60±0.63
40	2.86±0.18	0.91±0.24	2.19±0.19	3.78±0.05
60	5.45±0.56	2.74±0.10	5.24±0.06	6.19±0.40
80	8.48±0.45	3.64±0.28	8.20±0.70	8.58±1.23
100	16.37±0.43	5.10±0.57	23.96±1.41	8.92±0.65

En la Figura 19 y 20 se muestran las velocidades específicas de consumo y producción obtenidas en los ensayos de referencia (acetato+nitrato) y las obtenidas con los lodos previamente expuestos a AMP y en presencia nuevamente de acetato y nitrato. Se puede observar que las velocidades específicas obtenidas con los lodos expuestos al antibiótico son menores que las de los ensayos de referencia. Sin embargo, es importante hacer notar que estas velocidades resultaron ser mayores que las obtenidas en los ensayos en presencia de AMP. El porcentaje de recuperación con respecto a los ensayos de referencia fueron en promedio, desde un 17 hasta un 41%, lo cual indica que el efecto negativo sobre la cinética del proceso desnitrificante causado por la presencia de la ampicilina es reversible cuando los lodos vuelven a estar en ausencia del antibiótico.

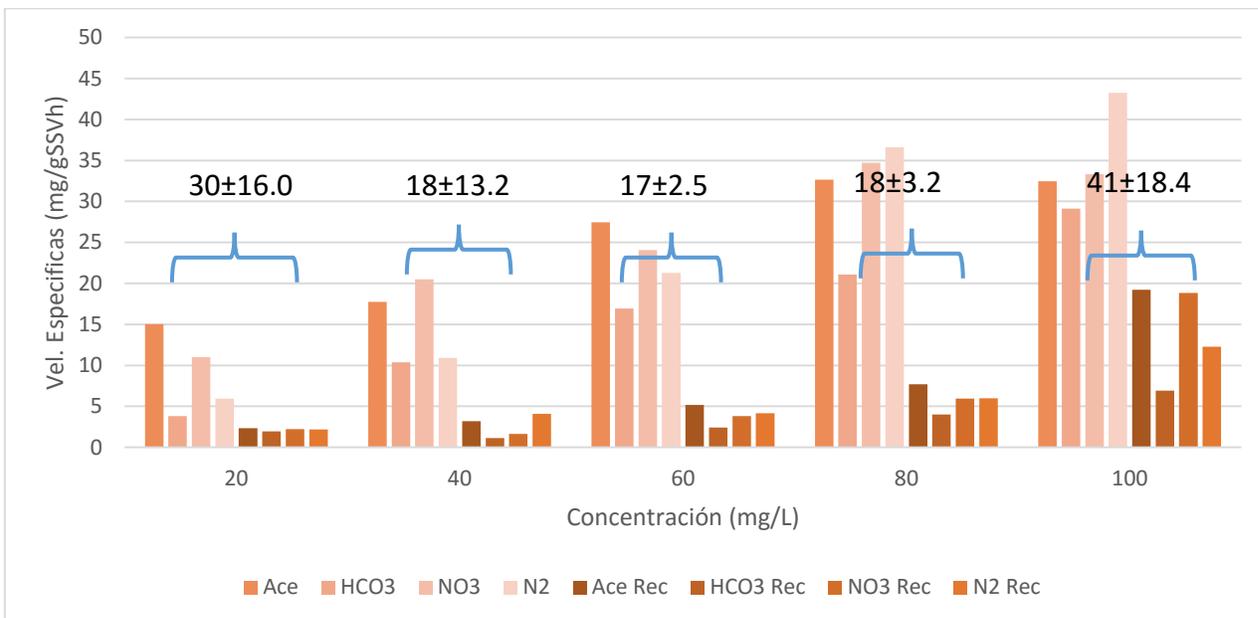


Figura 20. Comparación de velocidades específicas estequiométricas con C-Acetato, los colores claros son velocidades de referencia y los oscuros velocidades obtenidas con C-Acetato y N-NO₃, después de adicionar AMP. Se señalan los promedios de recuperación de actividad en porcentaje y desviaciones estándar

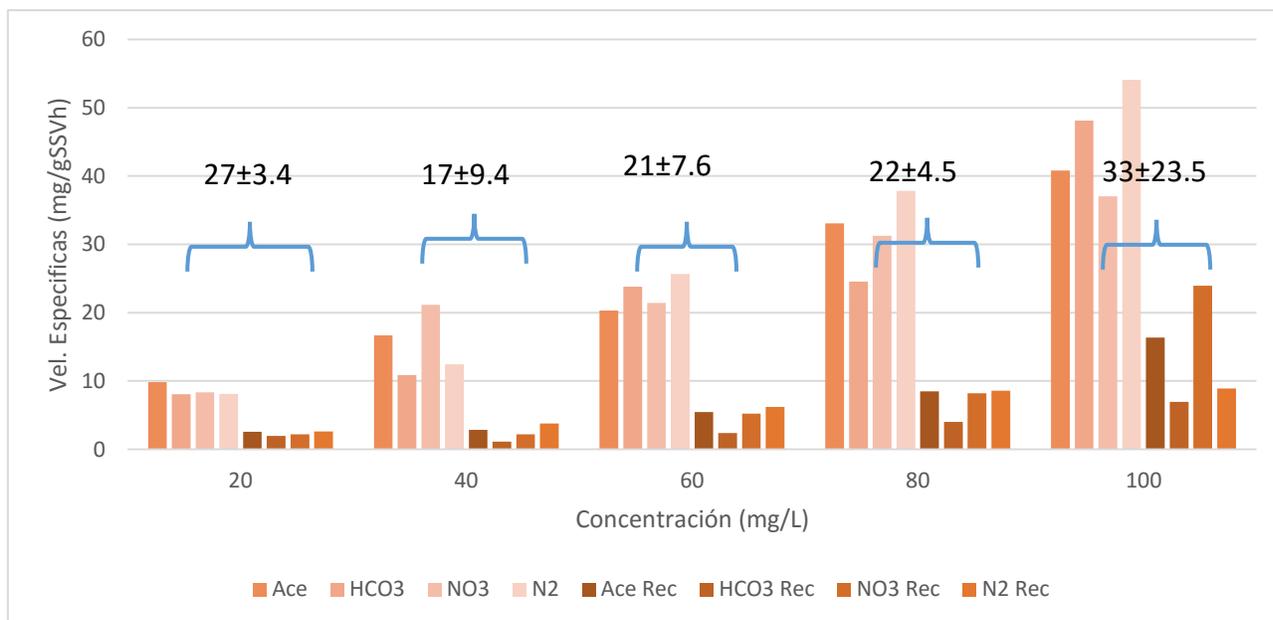


Figura 21. Comparación de velocidades específicas con un 25% de exceso de nitrógeno con C-Acetato, los colores claros son velocidades de referencia y los oscuros velocidades obtenidas con C-Acetato y N-NO₃, después de adicionar AMP. Se señalan los promedios de recuperación de actividad en porcentaje y desviaciones estándar

Todos estos resultados indican claramente que el lodo desnitrificante fue capaz de recuperarse completamente en términos metabólicos y parcialmente en términos cinéticos, de la exposición de hasta 100 mg C-AMP/L y sugieren la factibilidad de llevar a cabo el proceso desnitrificante para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con este antibiótico.

Conclusiones

En el reactor UASB operado en continuo, utilizando una relación C/N = 2.07 y un TRH de dos días, se logró llegar al estado estacionario desnitrificante con eficiencias de consumo de acetato y nitrato entre 80 y 90% y rendimientos de Y_{N_2} , Y_{HCO_3} y Y_{C-BM} , que fueron 0.87 ± 0.21 , 0.52 ± 0.17 , 0.26 ± 0.1 respectivamente. Bajo estas condiciones de operación, se logró generar en estado estacionario, lodo desnitrificante en calidad y cantidad adecuada para realizar la experimentación en lote.

Los ensayos de referencia mostraron que en ambas condiciones de experimentación (C/N 0.86 y 1.1), el proceso desnitrificante se llevó a cabo completamente y sin producción de intermediarios, puesto que se obtuvieron rendimientos mayores de 0.9 y eficiencias de 100% de consumo de sustratos, teniendo como resultado un proceso desnitrificante eficiente y desasimilativo.

Los lodos desnitrificantes mostraron la capacidad de utilizar hasta 100 mg C-AMP/L como única fuente de electrones para llevar a cabo la reducción del nitrato, dando como resultado la oxidación mayoritaria del antibiótico a HCO_3 y la formación mayoritaria de N_2 como productos de la desnitrificación. Asimismo, se determinó la formación de dos intermediarios carbonados y la producción de N_2O . Sin embargo, las velocidades específicas de consumo y producción fueron menores que las encontradas cuando la desnitrificación se lleva a cabo con acetato como fuente de electrones.

Los ensayos de recuperación utilizando los lodos previamente expuestos hasta 100 mg C-AMP/L, mostraron que el lodo desnitrificante fue capaz de recuperarse completamente en términos metabólicos y parcialmente en términos cinéticos, a la exposición del antibiótico y sugieren la factibilidad de llevar a cabo el proceso desnitrificante para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con este antibiótico

Referencias

- Alvarez L.; Bricio C.; Blesa A.; Hidalgo A.; Berenguer J. (2014) *Transferable Denitrification Capability of Thermus thermophiles*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 80 No. 1, pp. 19–28
- Ampicilina (17/12/2010). Recuperado el 24 de junio del 2015 de <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a052.htm>
- APHA (1985). Standard methods for examination of water and wastewater. 16th ed. American Public Health Association, Washington D.C
- Behera S. K.; Kim H. W.; Oh J. E.; Park H. S. (2011) *Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea*. July 2011. Science of the Total Environment Vol. 409 pp 4351-4360
- Berks B. C.; Ferguson S. J.; Moir J. W. B.; Richardson D. J. (1995) *Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions*. Biochimica et Biophysica Acta. Vol. 1232 No.3 pp97-173
- Bing L. and Tong Z. (2010) *Biodegradation and Adsorption of Antibiotics in the Activated Sludge Process*. Environmental Science & Technology Vol. 44 No. 9 pp 3468-3473
- Bruggink A.; Roos E. C.; Vroom E. (1998) *Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics*. Organic Process Research & Development. Vol. 2 No. 2 pp 128-133
- Cadena A. (2004) *Efecto de las quinonas en la oxidación anaerobia de materia orgánica recalcitrante por un lodo desnitrificante*. Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Cervantes F. J.; Meza-Escalante E. R.; Texier A.-C.; Gomez J. (2009) *Kinetic limitations during the simultaneous removal of p-cresol and sulfide in a denitrifying process*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology Vol. 36 pp. 1417-1424
- Cuervo-Lopez F. M.; Martínez Hernandez S.; Texier A. -C.; Gomez J. (2009) *Principles of denitrifying processes* En Francisco J. Cervantes (Ed.) *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution* Cap. 3 (pp.41-66). London
- Cuervo López, F. M. (2003). *Estudio biológico-físicoquímico de un lodo desnitrificante alimentado con diferentes fuentes de electrones*. Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Dorival-García N.; Zafra-Gomez A.; Navalón A.; González-Lopéz J.; Hontoria E.; Vílchez J. L. (2013) *Removal and degradation characteristics under aerobic, nitrifying and anoxic conditions*. Journal of Environmental Management Vol. 120 pp. 75-83
- Elander R. P. (2003) *Industrial production of b-lactam antibiotics*. Applied microbiology and biotechnology. Vol. 61 pp 385-392
- *En México solo el 20% de las aguas residuales son tratadas*. CONACyT. Recuperado el 02 de febrero del 2015 <http://www.conacyt.mx/agencia/index.php/planeta/129-en-mexico-solo-el-20-de-las-aguas-residuales-son-tratadas>
- Ferguson S. J. (1998) *Nitrogen cycle enzymology*. Current opinion in Chemical Biology Vol. 2 No. 2 pp 182-193
- Gerardi Michael H. (2002) *Nitrification and Denitrification in activated sludge process*; United Stated of America. John Wiley and Sons. ISBN 0-471-06508-0
- Hou L.; Yin G.; Liu M.; Zhou J.; Zheng Y.; Gao J.; Zong H.; Yang Y.; Gao L.; Tong C. (2014) *Effects of Sulfamethazine on Denitrification and the Associated N₂O Release in Estuarine and Coastal Sediments*. Environmental Science & Technology. Vol. 49 No. 1 pp. 326-333
- Informe sobre el agua 2014
- Knowles R. (1982) *Denitrification*. Microbiological Reviews Vol. 46 No. 1 pp 43-70
- Linderberg R. H.; Olofsson U.; Rendahl P.; Johansson M. I.; Tysklind M.; Andersson B. A. V. (2006) *Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and activated sludge treatment of sewage water and digestion of sludge*. Environmental Science & Technology Vol. 40 No. 3 pp 1042-1048
- Liu Z.; Sun P.; Pavlostathis S. G.; Zhou X.; Zhang Y. (2013) *Inhibitory effects and biotransformation potential of ciprofloxacin und anoxic/anaerobic condition*. Bioresource Technology. Vol. 50 pp 28-35
- Martínez Gutiérrez, E. (2013). *Estudio fisiológico de la oxidación del 2-Clorofenol por un lodo desnitrificante*. Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana
- Martínez-Gutiérrez E.; González-Márquez H.; Martínez-Hernández S; Texier A. C.; Cuervo-López F. M.; Gómez J. (2011) *Effect of phenol and acetate addition on 2-chlorophenol consumption by a denitrifying sludge*. Environmental Technology. Vol. 33 No. 12 pp. 1375-1382

- Martínez-Gutiérrez E.; Texier A. C.; Cuervo-López F. M.; Gómez J. (2014) *Consumption of 2-Chlorophenol Using Anaerobic Sludge: Physiological and Kinetic Analysis*. Applied Biochemistry and Biotechnology Vol. 174, Issue 6, pp 2171-2180
- Martínez Hernández S.; Olguín E. J.; Gómez J.; Cuervo-López F. M. (2009) *Acetate Enhances the Specific Consumption Rate of Toluene Under Denitrifying Conditions*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology Vol.57 No.679 pp.14717-1424
- Martínez Hernández, S. (2007). *Análisis ecofisiológico de la desnitrificación en presencia de acetato y tolueno*. Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Martínez S. (2007) *Análisis eco fisiológico de la desnitrificación en presencia de acetato y tolueno*. Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana
- Meza-Escalante E. R.; Texier A. C.; Cuervo-López F. M.; Gómez J.; Cervantes F. J. (2008) *Inhibition of sulfide on the simultaneous removal of nitrate and p-cresol by a denitrifying sludge*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology Vol. 83 pp 372-377
- Mitchell S. M.; Ullman J. L., Teel A. L., Watts R. J., Frear C. (2013) *The effects of the antibiotics ampicillin, florfenicol, sulfamethazine, and tylosin on biogas production and their degradation efficiency during anaerobic digestion*. Bioresource Technology Vol. 149 pp 244-252
- Olad A. and Nosrati R. (2015) *Use of response surface methodology for optimization of the photocatalytic degradation of ampicillin by ZnO/polyaniline nanocomposite*. Research on Chemical Intermediates Vol. 41 No. 3 pp. 1351-1363
- Peña-Calva A.; Olmos-Dichara A.; Viniegra-Gonzalez G.; Cuervo.Lopez F. M. and Gomez J. (2004) *Denitrification in Presence of Benzene, Toluene and m-Xylene Kinetics, Mass Balance and Yields*. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 119 No. 3 pp195-208
- *Riesgo del uso antibiótico en la industria ganadera (01/04/2015)*. Recuperado el 20 de abril del 2016 de <http://www.frontera.info/EdicionEnLinea/Notas/CienciayTecnologia/01042015/957025-Riesgo-en-el-uso-de-antibioticos-en-la-industria-ganadera.html>
- Siemens J.; Huschek G.; Siebe C.; Kaupenjohann M. (2008) *Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, México City-Mezquital Valley*. Water Research Vol. 42 pp 2124-2134

- Sistema de Información Nacional del Agua. *Descarga de aguas residuales nacional*. Recuperado el 13 de junio del 2016 http://201.116.60.25/sina/index_jquery-mobile2.html?tema=descargasResiduales
- Suarez S.; Lema J. M.; Omil F. (2010) *Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions*. Water Research Vol. 44 pp 3214-3224
- Raynor B. D. (1997) *Penicillin and Ampicillin*. Infectious Diseases update. Vol. 4 No. 4 pp 147-152
- Reinthaler F.F.; Posch J.; Feierl G.; Wüst G.; Haas D.; Ruckenbauer G.; Mascher F.; Marth E. (2002) *Antibiotic resistance of E. coli in sewage and sludge*. Water Research Vol. 37 pp1685-1690
- Revista PROFECO nov. 2007
- Rina N. (2005) *Estudio de la concentración de nitratos, nitritos y amonio en el agua de consumo del partido de moreno – provincia de Buenos Aires*. Ingenieria. Universidad de Flores
- Watkinson A. J.; Murby E. J.; Costanzo S. D. (2007) *Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling*. Water Research Vol.41 pp 4164-4176
- Tortora, G.; Funke, B.; Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (9 Ed). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Wrage N.; Velthof G. L.; Beusichem M. L. van; Oenema O. (2001) *Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide*; Soil Biology and Biochemistry Vol. 33 No 12-13 pp 1723-1732
- Zhang S.; de los Reyes F. L. (2012) *Effect of penicillin on Nitrite-Oxidizing Bacteria in Activated Sludge*. Applied Biochemistry and Biotechnology Vol. 166 pp. 1983-1990
- Zhang Z.; Zheng P.; Li W.; Wang R.; Ghulam A. (2015) *Effect of organic toxicants on the activity of denitrifying granular sludge*. Environmental Technology Vol 36 No. 6 pp 699-705
- Zumft W. G. (1997) *Cell biology and molecular basis of denitrification*. Microbiology and molecular biology reviews Vol. 61 No. 4 pp 533-616
- Zwietering M. H.; Jongenburger I.; Rombouts F. M.; Van't Riet K. (1990) *Modeling of the bacterial growth curve*. Applied and environmental microbiology Vol. 56 No. 6 pp 1875-1881