



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

**REMOCIÓN DE COMPUESTOS FARMACÉUTICOS EN REACTORES  
CON BIOMASA INMOVILIZADA**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
M. en I. YOLANDA FLORES VELÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL:  
DRA. PETIA MIJAYLOVA NACHEVA  
INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA

COMITÉ TUTOR:  
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ – INSTITUTO DE INGENIERÍA  
DR. SIMÓN GONZÁLEZ MARTÍNEZ – INSTITUTO DE INGENIERÍA

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE 2017

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ  
Secretario: DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ  
1er. Vocal: DRA. GABRIELA ELEONORA MOELLER CHÁVEZ  
2do. Vocal: DR. SIMÓN GONZÁLEZ MARTÍNEZ  
3er. Vocal: DRA. PETIA MIJAYLOVA NACHEVA

Lugar donde se realizó la tesis:  
INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA

**TUTOR DE TESIS:**

DRA. PETIA MIJAYLOVA NACHEVA



-----  
**FIRMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA)

Agradezco a las siguientes personas:

A mi familia, por ser parte esencial de mi vida, en especial a mis padres por acompañarme siempre, porque ellos son una de mis motivaciones para seguir adelante.

Antonio Flores quien me enseñó a hacer siempre mi mejor esfuerzo, luchar por lo que quieres y recordarme que al final todo habrá valido la pena.

A mi tutora, la Dra. Petia Mijaylova Nacheva por la oportunidad de trabajar a su lado y brindarme todo lo necesario para realizar esta investigación. Gracias por infundirme ánimo, por su tiempo y su confianza. La aprecio y valoro inmensamente su apoyo en esta etapa tan importante de mi vida.

A mi comité tutor:

Dr. Germán Buitrón Méndez y Dr. Simón González Martínez, agradezco su apoyo, su orientación y sus valiosas aportaciones en cada tutorial para mejorar el trabajo. Su ejemplo me ha dejado grandes enseñanzas y me inspira a tratar de ser cada vez mejor persona. Los admiro y siento un gran orgullo al decir que ustedes han formado parte de mi comité tutorial.

A mi comité revisor:

Dra. Gabriela Moeller Chávez, quien además de ser mi revisor fue mi profesora y siempre ha sido una excelente persona conmigo. Dra. Georgina Fernández Villagómez, quien ha sido mi revisor de Tesis en dos ocasiones, contribuyendo significativamente en mi formación.

A la Dra. Ana María Sandoval, Norma Ramírez y Juana Cortés, por permitirme trabajar en los laboratorios a su cargo.

A Toñito, Isidro, Ernest, Hebe y Josué por los momentos compartidos durante el desarrollo experimental.

A aquellas personas que en algún momento me dieron palabras de ánimo y pidieron para que todo marchara bien en mi vida.

A quienes me iluminaron, me acompañaron y me guiaron para continuar en el camino.

## RESUMEN

Se evaluó la biodegradación de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol usando un consorcio amonio-nitrito oxidante, consorcio nitrito oxidante y biomasa heterótrofa, las pruebas se realizaron en lote a diferentes tiempos de retención. El consorcio amonio-nitrito oxidante presentó los mayores porcentajes de biodegradación de ácido mefenámico y metoprolol (85 y 64.5 % respectivamente) después de 24 d de incubación, este consorcio también fue capaz de biodegradar 78.6 % de fluoxetina. El consorcio heterótrofo mostró la mayor habilidad para biodegradar fluoxetina (84.7 %), este también tuvo un alto potencial de biodegradación de ácido mefenámico y metoprolol (66.4 y 58.4 % respectivamente). El consorcio nitrito oxidante presentó la más baja biodegradación de los tres fármacos (menos del 48 %). La determinación de los fármacos seleccionados en la fase líquida y la biomasa mostraron que la biodegradación fue el principal mecanismo de remoción de los tres compuestos. Las cinéticas de biodegradación de los tres fármacos se ajustaron a un modelo de pseudo primer orden. Los valores de  $K_{biol}$  para el ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol determinados con los tres consorcios indicaron que la biomasa amonio-nitrito oxidante y heterótrofa permiten una biodegradación parcial y lenta de los compuestos, mientras que en el consorcio nitrito oxidante no se espera una biodegradación sustancial. El metoprolol fue el compuesto menos biodegradable. La sorción de ácido mefenámico y fluoxetina en la biomasa tuvo una contribución significativa para su remoción (5-14 %). Los menores coeficientes de sorción obtenidos para el metoprolol indicaron que la sorción en la biomasa es baja (3-5 %) y la contribución de este proceso a la remoción global puede ser despreciable.

Se estudió el desempeño de cuatro reactores de lecho sumergido aireado para la remoción de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol del agua residual municipal. Se compararon dos materiales de soporte (cintas de polietileno y cubos de poliuretano), se investigaron los efectos de las diferentes cargas orgánicas (3, 6, 9 y 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>) y la recirculación del efluente. Las bajas cargas orgánicas, altos tiempos de retención de sólidos y la recirculación del efluente incrementaron la remoción de los tres compuestos farmacéuticos. Las mayores remociones se alcanzaron al trabajar con carga orgánica de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación del efluente, tiempos de residencia hidráulica de 3.1-4.3 h y tiempos de retención de sólidos de 19-32 d. Bajo esta condición, las remociones de fluoxetina, ácido mefenámico y metoprolol fueron hasta 95, 82 y 73 % respectivamente.

Se utilizó la tecnología de secuenciación de nueva generación para identificar la comunidad bacteriana desarrollada en ambos materiales de soporte a las diferentes cargas orgánicas. *Nitrosomonas* y *Nitrospira* fueron los géneros dominantes de bacterias nitrificantes. El incremento de la carga orgánica resultó en un decremento de la abundancia relativa de las bacterias nitrificantes, los reactores con cubos de poliuretano mostraron mayor abundancia relativa de *Nitrosomonas* y *Nitrospira*, por lo tanto, estos alcanzaron mayor actividad nitrificante que las cintas de polietileno durante todas las fases experimentales. Los reactores con cubos de poliuretano mostraron mayores remociones de los fármacos comparado con las cintas de polietileno, lo que puede ser atribuido a la mayor actividad nitrificante, así como a la mayor abundancia relativa de *Nitrosomonas* encontrada en estos reactores.

Se usó un modelo cinético de pseudo primer orden para describir la remoción de los tres fármacos en los biorreactores de lecho sumergido aireado. De acuerdo a los valores de las constantes de remoción usando ambos materiales de soporte, la fluoxetina y el metoprolol pueden clasificarse como altamente degradables y el ácido mefenámico puede clasificarse como moderadamente degradable. El reactor con cubos de poliuretano mostró mayores constantes de remoción en comparación con el empacado con cintas de polietileno. Se determinaron los coeficientes de sorción ( $\log K_d$ ) de cada fármaco en la biomasa inmovilizada inactiva. Los valores de  $\log K_d$  del ácido mefenámico y la fluoxetina indicaron su tendencia potencial a la sorción en la biomasa inmovilizada. Los más bajos coeficientes de sorción determinados para el metoprolol indicaron su baja sorción. Los coeficientes de sorción para la biomasa inmovilizada en las cintas de polietileno fueron ligeramente mayores que los valores obtenidos para los cubos de poliuretano. Los balances de masa realizados con los resultados obtenidos durante las fases experimentales permitieron determinar la contribución de cada proceso, biodegradación y sorción en la remoción global del compuesto. La biodegradación fue el mecanismo de remoción principal de los tres fármacos en los reactores con ambos materiales de soporte, mientras que la sorción tuvo una contribución menor al 2 % de la remoción global.

**Palabras clave:** Biodegradación · Biorreactores de lecho sumergido · Compuestos farmacéuticos · Consorcios microbianos

## ABSTRACT

The biodegradation of fluoxetine, mefenamic acid and metoprolol using ammonium-nitrite-oxidizing consortium, nitrite-oxidizing consortium and heterotrophic biomass was evaluated in batch tests at different retention times. The ammonium-nitrite-oxidizing consortium presented the highest biodegradation percentages for mefenamic acid and metoprolol (85 and 64.5 % respectively) after 24 d of incubation, this consortium was also capable to biodegrade 78.6 % of fluoxetine. The heterotrophic consortium showed the highest ability to biodegrade fluoxetine (84.7 %), it also had a high potential for biodegrading mefenamic acid and metoprolol (66.4 and 58.4 % respectively). The nitrite-oxidizing consortium presented the lowest biodegradation of the three pharmaceuticals (less than 48 %). The determination of the selected pharmaceuticals in the dissolved phase and the biomass showed that biodegradation was the major removal mechanism of the three compounds. Based on the obtained results, the biodegradation kinetics was adjusted to pseudo-first-order model for the three pharmaceuticals. The values of  $k_{\text{biol}}$  for fluoxetine, mefenamic acid, and metoprolol determined with the three consortiums indicated that ammonium-nitrite-oxidizing and heterotrophic biomass allow a partial and slow biodegradation of the compounds, while no substantial biodegradation can be expected using nitrite-oxidizing consortium. Metoprolol was the less biodegradable compound. The sorption of fluoxetine and mefenamic acid onto biomass had a significant contribution for their removal (5-14 %). The lowest sorption coefficients were obtained for metoprolol indicating that the sorption onto biomass is poor (3-5 %) and the contribution of this process to the global removal can be neglected.

The performance of four aerated submerged attached growth bioreactors was studied for the removal of fluoxetine, mefenamic acid and metoprolol from municipal wastewater. Two packing materials (polyethylene tapes and polyurethane cubes) were compared, the effects of different organic loads (3, 6, 9 and 12 gCOD·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>) and of the effluent recirculation were investigated. The low organic loads, high solid retention times and the use of effluent recirculation enhanced the removals of the three pharmaceutical compounds. The highest removals were achieved at organic load of 3 gCOD·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> and 50 % of effluent recirculation, with hydraulic residence times of 3.1-4.3 h and the solid retention times of 19-32 d. At this condition, the removals of the fluoxetine, mefenamic acid and metoprolol were up to 95, 82 and 73 % respectively.

Next Generation Sequencing Technology was used to identify the bacterial community developed using both support materials at the different organic loads. *Nitrosomonas* and *Nitrospira* were the dominant genus of nitrifying bacteria. The organic load increase resulted in a decrease of the relative abundance of the nitrifying bacteria, the reactors with polyurethane cubes showed higher relative abundance of *Nitrosomonas* and *Nitrospira*, therefore, they reached higher nitrifying activity than the polyethylene tapes during all the experimental phases. The reactors packed with polyurethane cubes showed higher pharmaceutical removals compared with the ones with polyethylene tapes, which can be attributed to the higher nitrifying activity, as well as the higher relative abundance of *Nitrosomonas* found in these reactors.

A pseudo-first-order kinetic model was used to describe the removal of the three pharmaceuticals in the aerated submerged attached growth bioreactors. According to the values of the removal constants using both support materials, the fluoxetine and metoprolol can be classified as highly degradable and the mefenamic acid can be classified as moderately degradable. The reactor with polyurethane cubes showed higher removal constants compared with the one packed with polyethylene tapes. The sorption coefficients ( $\log K_d$ ) for inactive immobilized biomass were determined for each pharmaceutical. The values of  $\log K_d$  for fluoxetine and mefenamic acid indicated their potential trend to sorb onto immobilized biomass. The lowest sorption coefficients determined for metoprolol indicated poor sorption. The sorption coefficients for the immobilized biomass using polyethylene tapes were slightly higher than the values obtained for the polyurethane cubes. The mass balance performed with the obtained results during the experimental phases allowed to determine the individual contribution of each process, biodegradation and sorption in the global compound removal. The biodegradation was the main removal mechanism of the three pharmaceuticals in the reactors with both packing materials, while the sorption had a contribution less than 2 % of the global removal.

**Keywords:** Biodegradation · Microbial consortiums · Pharmaceutical compounds · Submerged attached growth bioreactors

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	1
1.1 PROBLEMÁTICA DE LOS CONTAMINANTES FARMACÉUTICOS.....	1
1.2 COMPUESTOS SELECCIONADOS.....	2
1.2.1 Ácido mefenámico .....	4
1.2.2 Fluoxetina .....	4
1.2.3 Metoprolol.....	5
1.3 REMOCIÓN DE FÁRMACOS MEDIANTE TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS.....	6
1.3.1 Biodegradación.....	6
1.3.2 Sorción.....	7
1.3.3 Volatilización.....	8
1.4 PROPIEDADES DE LOS COMPUESTOS FARMACÉUTICOS SELECCIONADOS.....	9
1.5 BIODEGRADACIÓN DE FÁRMACOS EN LODOS ACTIVADOS NITRIFICANTES.....	10
1.5.1 Efecto del tiempo de retención de sólidos (TRS).....	10
1.5.2 Nitrificación y cometabolismo en la biodegradación de fármacos.....	11
1.5.3 Papel de la enzima amonio monooxigenasa .....	12
1.5.4 Papel de las bacterias heterótrofas.....	13
1.5.5 Caminos de degradación de los compuestos farmacéuticos.....	14
1.6 PROCESOS AEROBIOS CON BIOMASA INMOVILIZADA.....	18
1.7 REMOCIÓN DE FÁRMACOS EN PROCESOS CON BIOMASA INMOVILIZADA.....	19
1.8 MATERIALES DE SOPORTE Y CARACTERÍSTICAS DE LA BIOMASA INMOVILIZADA.....	22
1.9 RECIRCULACIÓN DEL EFLUENTE.....	24
1.10 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS/MASAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS.....	25
1.10.1 Extracción en fase sólida (EFS).....	26
1.10.2 Derivatización.....	27
1.10.3 Método analítico en sólido.....	28
1.11 SECUENCIACIÓN Y DIVERSIDAD MICROBIANA.....	28
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	31
2.1 Hipótesis.....	31
2.2 Objetivo General.....	31
2.3 Objetivos Específicos.....	31
2.4 Alcances.....	31
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	32
3.1 ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE LODO ACTIVADO.....	32
3.2 PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD.....	34
3.3 CINÉTICAS DE BIODEGRADACIÓN .....	35

---

3.4 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE SORCIÓN ( $K_d$ ) .....	36
3.4.1 Determinación del tiempo equilibrio .....	36
3.4.2 Coeficiente de sorción.....	36
3.5 SISTEMA EXPERIMENTAL CON BIOMASA INMOVILIZADA .....	37
3.5.1 Fases experimentales .....	38
3.6 DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE SORCIÓN ( $K_d$ ) EN LA BIOMASA INMOVILIZADA .....	41
3.6.1 Determinación del equilibrio de sorción .....	41
3.6.2 Isotermas de sorción .....	41
3.7 CÁLCULOS DE LOS BALANCES DE MASA .....	42
3.7.1 Cálculo del flujo másico .....	42
3.7.2 Producción de sólidos .....	42
3.7.3 Método 1 para los balances de masa .....	43
3.7.4 Método 2 para los balances de masa .....	44
3.8 CINÉTICAS DE REMOCIÓN DE LOS FÁRMACOS CON BIOMASA INMOVILIZADA EN EMPAQUES DE CINTAS DE POLIETILENO Y CUBOS DE POLIURETANO.....	44
3.9 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS FARMACÉUTICOS .....	45
3.9.1 Tratamiento de la muestra en fase líquida.....	45
3.9.2 Método analítico en sólido .....	46
3.9.3 Equipos .....	47
3.9.4 Condiciones de operación del equipo .....	48
3.10 EXTRACCIÓN DE ADN .....	48
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
4.1 PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD .....	50
4.1.1 Enriquecimiento de los consorcios microbianos .....	50
4.1.2 Biodegradabilidad y cinéticas .....	52
4.1.3 Equilibrio de sorción .....	61
4.1.4 Coeficientes de sorción $K_d$ .....	61
4.2 REACTORES CON BIOMASA INMOVILIZADA.....	63
4.2.1 Cantidad de biomasa y tiempos de retención de sólidos.....	63
4.2.2 Desempeño de los reactores en la remoción de la materia orgánica.....	65
4.2.3 Remoción de nitrógeno amoniacal en los reactores.....	69
4.2.4 Remoción de los fármacos en los reactores .....	75
4.2.5 Sorción de los fármacos en la biomasa inmovilizada.....	90
4.3 COEFICIENTES DE SORCIÓN EN LA BIOMASA INMOVILIZADA.....	92
4.3.1 Tiempo de equilibrio.....	92
4.3.2 Coeficientes de sorción $K_d$ .....	93

---

4.4 BALANCES DE MASA EN LOS REACTORES CON BIOMASA INMOVILIZADA.....	94
4.5 CINÉTICAS DE REMOCIÓN DE LOS FÁRMACOS CON BIOMASA INMOVILIZADA EN EMPAQUES DE CINTA DE POLIETILENO Y CUBOS DE POLIURETANO.....	101
4.5.1 Constantes de remoción.....	101
4.6 DIVERSIDAD BACTERIANA EN LOS REACTORES CON BIOMASA INMOVILIZADA.....	107
4.6.1 Filos y clases.....	107
4.6.2 Géneros de las bacterias más abundantes.....	110
4.6.3 Características de los principales géneros.....	112
4.6.4 Relación entre la comunidad bacteriana y las condiciones de operación.....	118
4.6.5 Abundancia relativa de las bacterias amonio y nitrito oxidantes.....	122
4.6.6 Relación entre la remoción de fármacos, las condiciones de operación y la comunidad bacteriana.....	123
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>126</b>
<b>6. REFERENCIAS.....</b>	<b>129</b>
<b>7. PUBLICACIONES Y MEMORIAS EN CONGRESOS.....</b>	<b>140</b>
ANEXO 1.....	141
ANEXO 2.....	152
ANEXO 3.....	154
ANEXO 4.....	155
ANEXO 5.....	159
ANEXO 6.....	161
ANEXO 7.....	163
ANEXO 8.....	168



<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.1.</b> Enzima amonio monooxigenasa en la transformación cometabólica de EE2.....	13
<b>Figura 1.2.</b> Estructuras químicas de los metabolitos del ácido mefenámico después de la transformación con hongos white rot fungus.....	15
<b>Figura 1.3.</b> Productos identificados en la degradación fotoquímica de la fluoxetina.....	16
<b>Figura 1.4.</b> Posibles caminos de degradación del metoprolol.....	17
<b>Figura 1.5.</b> Estructura de los cartuchos OASIS HLB.....	27
<b>Figura 1.6.</b> Estructura de los derivatizantes.....	27
<b>Figura 1.7.</b> Pasos para el análisis de compuestos farmacéuticos.....	28
<b>Figura 3.1.</b> Pruebas de biodegradabilidad.....	35
<b>Figura 3.2.</b> Diagrama de los reactores de lecho sumergido aireado y materiales de empaque.....	38
<b>Figura 3.3.</b> Determinación de los coeficientes de sorción en la biomasa inmovilizada.....	42
<b>Figura 3.4.</b> Sistema experimental para las cinéticas de remoción en la biomasa inmovilizada.....	45
<b>Figura 3.5.</b> Procedimiento de extracción en fase sólida.....	46
<b>Figura 3.6.</b> Procesamiento de las muestras para el análisis de fármacos.....	46
<b>Figura 3.7.</b> Procedimiento de análisis de los fármacos en muestras en fase líquida y sólida.....	47
<b>Figura 3.8.</b> Cromatógrafos de gases acoplados a espectrometría de masas.....	47
<b>Figura 3.9.</b> Extracción de ADN.....	48
<b>Figura 3.10.</b> Procedimiento de extracción de ADN de las muestras de biomasa.....	49
<b>Figura 4.1.</b> Desempeño de la biomasa en los tres reactores.....	50
<b>Figura 4.2.</b> Tasas de remoción y producción en los tres reactores. ....	51
<b>Figura 4.3.</b> Fotografías de las biomosas.....	51
<b>Figura 4.4.</b> Concentraciones de los fármacos en la fase líquida y fase sólida durante las pruebas de biodegradabilidad.....	53
<b>Figura 4.5.</b> Remociones de los fármacos usando los diferentes consorcios microbianos.....	54
<b>Figura 4.6.</b> Porcentajes de biodegradación y sorción usando los diferentes consorcios microbianos...	55
<b>Figura 4.7.</b> Tasas de remoción de los fármacos con los diferentes consorcios microbianos...	56
<b>Figura 4.8.</b> Desempeño de la biomasa en las pruebas de biodegradabilidad.....	57
<b>Figura 4.9.</b> Modelo cinético de pseudo primer orden .....	59
<b>Figura 4.10.</b> Evolución de los fármacos en función del tiempo en la fase líquida.....	61
<b>Figura 4.11.</b> Isotermas de sorción de los fármacos en las diferentes biomosas.....	62
<b>Figura 4.12.</b> Evolución de la biomasa durante las fases experimentales.....	63
<b>Figura 4.13.</b> Biomasa y TRS promedio en los reactores.....	64
<b>Figura 4.14.</b> Seguimiento de la DQO durante la experimentación.....	67
<b>Figura 4.15.</b> Remociones promedio de DQO en las diferentes fases experimentales.....	68

<b>Figura 4.16.</b> Seguimiento del N-NH <sub>4</sub> durante la experimentación.....	70
<b>Figura 4.17.</b> Seguimiento del N-NO <sub>2</sub> y N-NO <sub>3</sub> presentes en el efluente durante la experimentación.....	72
<b>Figura 4.18.</b> Evolución de la nitrificación en las diferentes fases experimentales.....	73
<b>Figura 4.19.</b> Seguimiento de los fármacos durante la experimentación (reactores PE1 y PU1).....	77
<b>Figura 4.20.</b> Seguimiento de los fármacos durante la experimentación (reactores PE2 y PU2).....	80
<b>Figura 4.21.</b> Tasas de remoción promedio de los fármacos durante las fases experimentales .....	82
<b>Figura 4.22.</b> Remociones promedio de los fármacos durante las fases experimentales.....	84
<b>Figura 4.23.</b> Concentraciones de los fármacos en la biomasa inmovilizada durante la experimentación.....	91
<b>Figura 4.24.</b> Evolución de los fármacos en función del tiempo en la fase líquida para la determinación del tiempo de equilibrio.....	92
<b>Figura 4.25.</b> Isotermas de sorción de los fármacos en los dos tipos de soporte.....	93
<b>Figura 4.26.</b> Porcentajes de biodegradación y sorción en los reactores con cintas de polietileno.....	95
<b>Figura 4.27.</b> Porcentajes de biodegradación y sorción en los reactores con cubos de poliuretano...	96
<b>Figura 4.28.</b> Flujos másicos de los fármacos en el influente y efluente de los reactores con biomasa inmovilizada.....	98
<b>Figura 4.29.</b> Tasas de remoción, biodegradación y sorción en los reactores con biomasa inmovilizada.....	99
<b>Figura 4.30.</b> Porcentajes de biodegradación y sorción en los reactores con biomasa inmovilizada (Método 1).....	101
<b>Figura 4.31.</b> Evolución de los fármacos en función del tiempo para la fase líquida en los dos soportes...	102
<b>Figura 4.32.</b> Remociones de los fármacos, DQO y N-NH <sub>4</sub> durante las cinéticas de remoción en los reactores con biomasa inmovilizada.....	103
<b>Figura 4.33.</b> Seguimiento de nitrógeno en función del tiempo para la fase líquida en los dos soportes	104
<b>Figura 4.34.</b> Tasas de remoción de los fármacos con los diferentes tipos de soporte.....	105
<b>Figura 4.35.</b> Modelo cinético de pseudo primer orden en los reactores con biomasa inmovilizada.....	105
<b>Figura 4.36.</b> Visualización Krona. ....	108
<b>Figura 4.37.</b> Distribución de los filos de bacterias.....	109
<b>Figura 4.38.</b> Distribución de las clases de bacterias. ....	110
<b>Figura 4.39.</b> Diagramas de Venn de los diferentes géneros de bacterias más abundantes (≥0.5 %)	111
<b>Figura 4.40.</b> Porcentajes de los géneros más abundantes de <i>α-Proteobacteria</i> .....	113
<b>Figura 4.41.</b> Porcentajes de los géneros más abundantes de <i>β-Proteobacteria</i> .....	115
<b>Figura 4.42.</b> Porcentajes de los géneros más abundantes de <i>γ-Proteobacteria</i> .....	116
<b>Figura 4.43.</b> Porcentajes de los géneros más abundantes de diversas clases.....	118

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.1.</b> Compuestos farmacéuticos.....	3
<b>Tabla 1.2.</b> Concentraciones y remociones reportadas de los compuestos farmacéuticos.....	5
<b>Tabla 1.3.</b> Propiedades de los compuestos farmacéuticos.....	10
<b>Tabla 3.1.</b> Composición del agua residual sintética .....	33
<b>Tabla 3.2.</b> Métodos de análisis para el seguimiento del proceso.....	34
<b>Tabla 3.3.</b> Parámetros operacionales de los reactores con biomasa inmovilizada.....	39
<b>Tabla 3.4.</b> Métodos de análisis, puntos y frecuencia de muestreo en los reactores con biomasa inmovilizada.....	40
<b>Tabla 4.1.</b> Constantes de biodegradación en los diferentes consorcios microbianos.....	59
<b>Tabla 4.2.</b> Coeficientes de sorción en los diferentes consorcios microbianos.....	62
<b>Tabla 4.3.</b> Cantidad de biomasa y tiempos de retención de sólidos.....	64
<b>Tabla 4.4.</b> Análisis estadístico de las diferencias entre las cantidades de biomasa y TRS obtenidas con los diferentes materiales de soporte a la misma carga orgánica con y sin recirculación.....	65
<b>Tabla 4.5.</b> Remoción de materia orgánica medida como DQO en las diferentes fases experimentales .....	68
<b>Tabla 4.6.</b> Remoción de N-NH <sub>4</sub> en las diferentes fases experimentales.....	71
<b>Tabla 4.7.</b> N-NO <sub>2</sub> y N-NO <sub>3</sub> en los efluentes de los reactores en las diferentes fases experimentales .....	73
<b>Tabla 4.8.</b> Análisis estadístico de las diferencias entre las remociones de DQO y N-NH <sub>4</sub> obtenidas con los diferentes materiales de soporte a la misma carga orgánica .....	74
<b>Tabla 4.9.</b> Análisis estadístico de las diferencias entre las remociones de DQO y N-NH <sub>4</sub> obtenidas con y sin recirculación a la misma carga orgánica para cada material de soporte.....	75
<b>Tabla 4.10.</b> Remoción de los fármacos en los reactores PE1 y PU1.....	78
<b>Tabla 4.11.</b> Remoción de los fármacos en los reactores PE2 y PU2.....	81
<b>Tabla 4.12.</b> Análisis estadístico de las diferencias entre las remociones de los fármacos obtenidas con los diferentes materiales de soporte a la misma carga orgánica .....	85
<b>Tabla 4.13.</b> Análisis estadístico de las diferencias entre las remociones de los fármacos obtenidas con y sin recirculación a la misma carga orgánica para cada material de soporte.....	86
<b>Tabla 4.14.</b> Comparación de resultados de la remoción de los fármacos con lodos activados y biorreactores con membranas .....	88
<b>Tabla 4.15.</b> Análisis estadístico de las diferencias entre las concentraciones de los fármacos en la biomasa inmovilizada con los diferentes materiales de soporte a la misma carga orgánica.....	90
<b>Tabla 4.16.</b> Coeficientes de sorción en la biomasa inactiva en los dos tipos de soporte.....	93
<b>Tabla 4.17.</b> Constantes de remoción en los dos tipos de soporte .....	106
<b>Tabla 4.18.</b> Abundancias relativas de los géneros de bacterias en las cintas de polietileno ....	120
<b>Tabla 4.19.</b> Abundancias relativas de los géneros de bacterias en los cubos de poliuretano....	121

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 PROBLEMÁTICA DE LOS CONTAMINANTES FARMACÉUTICOS

Los fármacos en el agua son una clase de contaminantes emergentes usados en medicina humana y veterinaria, estos compuestos aún en pequeñas concentraciones pueden causar impactos negativos en la salud humana u organismos acuáticos, los efectos toman lugar a concentraciones en el rango de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Escher *et al.*, 2011; Vulliet *et al.*, 2011; Petrie *et al.*, 2015). Los fármacos de uso común que se han detectado frecuentemente en el agua son los analgésicos-antiinflamatorios,  $\beta$ -bloqueadores, fármacos de psiquiatría, reguladores de lípidos, antihistamínicos, agentes de contraste, antibióticos, antidiabéticos, agentes anticancerígenos y hormonas (Deblonde *et al.*, 2011; Tadkaew *et al.*, 2011; Martínez Bueno *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que los fármacos se distribuyen profusamente en el ambiente, han sido identificados en ríos y otras corrientes superficiales de agua, en aguas subterráneas y en el agua potable (Ternes, 1998; Stuart *et al.*, 2012; Birkholz *et al.*, 2014), esto porque no toda la sustancia activa es absorbida por el cuerpo, una parte de la dosis es metabolizada, otra es excretada sin cambios o como conjugados glucurónidos o conjugados de sulfato por medio de la orina y las heces (Ternes *et al.*, 2004). Las principales fuentes de entrada de compuestos farmacéuticos en el medio ambiente son las aguas residuales municipales sin tratar e incluso tratadas, debido a que no todas las plantas de tratamiento están diseñadas para eliminarlos (Verlicchi *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2014b), las actividades de ganadería y las aguas residuales de los hospitales también representan un problema, ya que usualmente no reciben ningún tratamiento y llegan a las aguas residuales municipales (Escher *et al.*, 2011; Lapworth *et al.*, 2012).

Los resultados de estudios de toxicología han revelado que los fármacos provocan efectos de toxicidad aguda y crónica sobre ciertos organismos acuáticos (Escher *et al.*, 2011; Richardson y Kimura, 2016). Es conveniente monitorear los compuestos con los más altos riesgos medioambientales y más persistentes, en la mayoría de los casos, la evaluación del riesgo ambiental de los fármacos está basada en estudios de toxicidad de los compuestos individuales, sin embargo se debe considerar que los fármacos no se encuentran solos en el ambiente, sino como una mezcla de diferentes sustancias activas, sus metabolitos y productos de transformación. La toxicidad de las mezclas de fármacos puede ser impredecible y difícil de evaluar, incluso la presencia simultánea de varios fármacos en el ambiente podría resultar en efectos aditivos o sinérgicos, produciendo mayor toxicidad a los organismos que la prevista para las sustancias activas individuales (Santos *et al.*, 2010; Vulliet y Cren-Olivé, 2011). Esto hace necesario profundizar en el conocimiento sobre la remoción de los fármacos en el tratamiento de aguas residuales municipales, de esta manera se puede prevenir su liberación al ambiente.

Hay un vacío en la legislación respecto a la contaminación ambiental por fármacos. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (U.S. EPA) ha creado la nueva Lista de Contaminantes Candidatos (CCL por sus siglas en inglés), ésta incluye contaminantes prioritarios no regulados que pueden ser considerados en futuras regulaciones. En Febrero del 2015, la U.S. EPA publicó la CCL-4 para toma de decisiones regulatorias y recolección de información, la lista contiene 100 químicos, 12 contaminantes microbianos e incluye los fármacos eritromicina, nitroglicerina,  $17\alpha$ -etinilestradiol,  $17\alpha$ -estradiol, estrona,  $17\beta$ -estradiol, estriol, equilenin, equilin, mestranol y noretindrona (Richardson y Kimura, 2016). En respuesta a la preocupación sobre los impactos que pueden ocasionar los niveles traza de fármacos y productos de cuidado personal en el ambiente, en Diciembre del 2007 la U.S. EPA publicó el método 1694 para la determinación de estos compuestos en agua, suelo, sedimento y biosólidos. En Noviembre del 2015 fue creado un método EPA (Método 542) para medir 12 fármacos y productos de cuidado personal en agua

potable, este método incluye la cuantificación de carbamazepina, diazepam, diclofenaco, enalapril, eritromicina, fluoxetina, gemfibrozil, naproxeno, fenitoina, sulfametoxazol, triclosan y trimetoprima.

Por su parte, la Comisión Europea ha incluido compuestos farmacéuticos en una lista de químicos considerados un riesgo para la seguridad de las aguas superficiales. La Unión Europea (Decisión de ejecución de la Comisión (UE) 2015/495 de Marzo de 2015) estableció la lista de sustancias para un amplio seguimiento en el ámbito de la política del agua conforme a la directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo. De acuerdo con el Artículo 8b(1) de la Directiva 2008/105/CE, diclofenaco, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -etinilestradiol, estrona y eritromicina deben ser incluidos en la lista, con el fin de reunir datos de monitoreo y facilitar la determinación de medidas apropiadas para hacer frente al riesgo que presentan esas sustancias.

## 1.2 COMPUESTOS SELECCIONADOS

Para realizar este estudio se seleccionaron tres fármacos considerando el siguiente criterio:

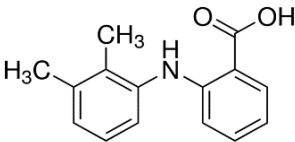
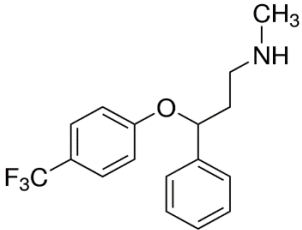
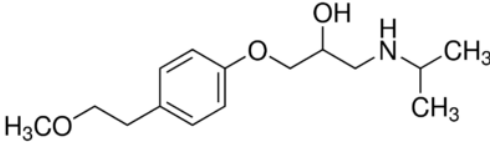
1. Fármacos pertenecientes a diferentes clases terapéuticas, cuyos efectos toxicológicos representan un riesgo para el ambiente acuático, aún a las concentraciones detectadas en influentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales.
2. Fármacos que no son completamente removidos en las plantas de tratamiento biológico de aguas residuales.

Así se seleccionaron el ácido mefenámico (analgésico/antiinflamatorio), la fluoxetina (psiquiatría) y el metoprolol ( $\beta$ -bloqueador). La Tabla 1.1 presenta la estructura y fórmula química de los compuestos.

Dentro del amplio grupo de los analgésicos-antiinflamatorios, el ácido mefenámico, el diclofenaco y el ibuprofeno son los más tóxicos para los organismos acuáticos a las concentraciones detectadas en el agua, seguido del ácido salicílico y naproxeno (Escher *et al.*, 2011; Roos *et al.*, 2012; Verlicchi *et al.*, 2012; Mansour *et al.*, 2016). Los tres últimos muestran altas eficiencias de remoción en plantas de tratamiento biológico de aguas residuales (remociones mayores al 80 %), por lo tanto, se seleccionó el ácido mefenámico ya que al igual que el diclofenaco (compuesto extensamente estudiado), presenta remociones menores y variables, desde 2 hasta 90 % (Rosal *et al.*, 2010; Kovalova *et al.*, 2011; Tadkaew *et al.*, 2011; Martínez Bueno *et al.*, 2012; Grandclément *et al.*, 2017).

Se seleccionó la fluoxetina porque es el fármaco de psiquiatría que representa el mayor riesgo para los organismos acuáticos, seguido del diazepam. Según estudios donde se han evaluado los riesgos medioambientales de 10 compuestos psiquiátricos (amitriptileno, carbamazepina, diazepam, fluoxetina, gabapentin, lorazepam, norfluoxetina, oxcarbazepina, paroxetina y ácido valproico) en efluentes secundarios de lodos activados convencionales y biorreactores con membranas, la fluoxetina es el fármaco psiquiátrico de mayor riesgo para los peces, invertebrados, algas y *Daphnias* (Escher *et al.*, 2011; Roos *et al.*, 2012; Verlicchi *et al.*, 2012; Mansour *et al.*, 2016). Se ha reportado que las concentraciones medidas de fluoxetina en el agua residual se encuentran en el rango de toxicidad crónica para los organismos bénticos (Richardson y Kimura 2016). Mediante los procesos de lodos activados convencionales se han logrado remociones entre el 33 y 70 % (Kovalova *et al.*, 2012).

Tabla 1.1. Compuestos farmacéuticos

Compuesto	Estructura	Fórmula química	Peso molecular g·mol <sup>-1</sup>	Número CAS
<b>Ácido Mefenámico</b>		C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>	241.29	61-68-7
<b>Fluoxetina</b>		C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO	309.3	56296-78-7
<b>Metoprolol</b>		C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	267.36	56392-17-7

En el grupo de los  $\beta$ -bloqueadores se encuentran el acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, carazolol, celiprolol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, propranolol, sotalol y timolol (Gabet-Giraud *et al.*, 2010). Entre éstos, solo el metoprolol y el propranolol están clasificados como potencialmente tóxicos para los organismos acuáticos (Cleuvers *et al.*, 2005; Tünay *et al.*, 2010; Roos *et al.*, 2012). Se seleccionó el metoprolol debido a que ha sido detectado con los valores más altos en influentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, ríos y otras corrientes de agua (Ternes, 1998; Gabet-Giraud *et al.*, 2010; Deblonde *et al.*, 2011), además en comparación con el propranolol, presenta menores remociones mediante tratamientos biológicos, desde 0 % al 74 % mediante lodos activados y biorreactores con membranas, mientras que para el propranolol se logran remociones desde 7 al 96 % (Radjenović *et al.*, 2009; Kovalova *et al.*, 2012; Grandclément *et al.*, 2017).

No hay estudios que indiquen la toxicidad a la salud humana por la presencia en el agua del ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol. Pomati *et al.* (2006) investigaron los efectos de la mezcla de 13 fármacos a las bajas concentraciones detectadas en el ambiente (0.01-1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): atenolol, bezafibrato, carbamazepina, ciclofosfamida, ciprofloxacina, furosemida, hidroclorotiazida, ibuprofeno, lincomicina, ofloxacina, ranitidina, salbutamol, y sulfametoxazol, ellos encontraron que los niveles ambientales detectados inhibieron el crecimiento de las células embrionarias en humanos de 10 a 30 % comparado a los controles.

Por otro lado, no se espera que la adición de fármacos en bajas concentraciones afecte a las comunidades microbianas en los reactores biológicos. Se han observado cambios estructurales significativos, como la reducción de la biodiversidad de bacterias a concentraciones mayores a 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, diclofenaco y ácido clófrico, las cuales son poco probables en las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (Kraigher *et al.*, 2008). Además, la actividad nitrificante del lodo activado es alta independientemente de la concentración de los fármacos ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, diclofenaco y ácido clófrico, en el intervalo de 50-500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Kraigher y Mandic-Mulec, 2011).

### 1.2.1 Ácido mefenámico

El ácido mefenámico es un agente no esteroideo con actividad analgésica y antiinflamatoria, se emplea para combatir el dolor producido por el daño sobre algún tejido del organismo y para el tratamiento de la artritis reumatoide y osteoartritis (Mendoza, 2008). El ácido mefenámico se ha detectado en influentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales a concentraciones de  $4.54 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $2.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente (Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005; Miège *et al.*, 2009), en aguas superficiales se han detectado hasta  $0.326 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Kim *et al.*, 2009). Un hospital en Suiza encontró en sus aguas residuales concentraciones de  $6.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Kovalova *et al.*, 2012), además ha sido detectado frecuentemente en agua subterránea en cantidades mayores a  $366 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (Lapworth *et al.*, 2012). El ácido mefenámico no es eliminado completamente durante el tratamiento biológico, su eficiencia de remoción en las plantas de tratamiento de lodos activados varía desde 2 hasta 90 % y en biorreactores con membranas desde 8 a 92 % (Kovalova *et al.*, 2012). La Tabla 1.2 presenta las concentraciones de los fármacos en diferentes tipos de agua, así como sus remociones en los procesos de lodos activados y biorreactores con membranas.

El ácido mefenámico se encuentra entre los fármacos clasificados con más alto riesgo para el ambiente acuático, su concentración prevista sin efecto en algas verdes es  $0.79 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Escher *et al.*, 2011), mientras que para *Daphnias* es  $0.428 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Jones *et al.*, 2002), por lo que en diferentes escenarios tales como aguas residuales hospitalarias, municipales y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales puede tener coeficiente de riesgo mayor a uno, lo cual indica alto riesgo toxicológico (Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005; Escher *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Fluoxetina

La fluoxetina es un antidepresivo, indicado para el tratamiento de diferentes formas de depresión, para el trastorno obsesivo compulsivo, en el síndrome premenstrual, en el tratamiento de la bulimia nerviosa y en el síndrome doloroso crónico (Mendoza, 2008). La fluoxetina se ha encontrado en los influentes y efluentes de plantas de tratamiento en concentraciones de  $2.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $0.929 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente (Miège *et al.*, 2009; Al Aukudy *et al.*, 2014), en aguas residuales hospitalarias se han detectado  $0.54 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Escher *et al.*, 2011), en aguas superficiales  $0.44 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Birkholz *et al.*, 2014) y en agua subterránea hasta  $0.056 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Barnes *et al.*, 2008). Los tratamientos de lodos activados convencionales remueven entre el 33 y 70 %, mientras que los biorreactores con membranas hasta 96 % de remoción (Kovalova *et al.*, 2012). La fluoxetina es considerada un compuesto disruptor endocrino, las concentraciones de  $0.32 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  causan un decremento en la producción de huevos en peces zebra (Lister *et al.*, 2009), también reduce el número de embriones de los caracoles *Potamopyrgus antipodarum*, expuestos vía agua en un intervalo de concentración entre  $0.64$  y  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , presentando una máxima concentración sin efecto observable de  $0.47 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , se ha reportado que los efectos significativos en la reproducción ocurren a  $2.25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , concentraciones comparables a las concentraciones medidas en aguas residuales municipales, lo cual significa alto riesgo toxicológico (Nentwig, 2007; Neptune, 2010; Deblonde *et al.*, 2011). La concentración prevista sin efecto para las algas verdes es  $6.9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Escher *et al.*, 2011). Por su parte, los peces expuestos a  $0.54 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  muestran efectos en el metabolismo de la glucosa y una disminución en la ingesta de alimentos, además la fluoxetina es bioacumulable en peces, especialmente en el hígado y tejido muscular, se han encontrado concentraciones de  $120 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  en el hígado y  $0.11 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  en músculo (Nakamura *et al.*, 2008; Mennigen *et al.*, 2010).

### 1.2.3 Metoprolol

El metoprolol es un  $\beta$ -bloqueador cardioselectivo, se administra vía oral o intravenosa para la prevención de migrañas, tratamiento de hipertensión, angina, insuficiencia cardiaca, entre otras (Brunton *et al.*, 2012). Se han reportado concentraciones de  $4.9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $1.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en influentes y efluentes de plantas de tratamiento respectivamente (Deblonde *et al.*, 2011). Un hospital en Suiza encontró en sus aguas residuales concentraciones de  $1.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , se obtuvo un 55 % de eliminación mediante un biorreactor con membranas de ultrafiltración sumergidas (Kovalova *et al.*, 2012). Además, en aguas superficiales de Alemania se han llegado a detectar  $2.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de metoprolol (Ternes *et al.*, 1998). En las aguas residuales de la ciudad de México se ha encontrado este compuesto, en el Emisor Profundo El Salto se han medido  $1.8$ - $2.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de metoprolol, en el agua residual de los canales del Valle del Mezquital, en el canal Dendho hasta  $2.4$ - $3.10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , los  $\beta$ -bloqueadores también han sido detectados en agua subterránea en cantidades hasta de  $0.06 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Siemens *et al.*, 2008).

La exposición aguda de las truchas arcoíris a tan solo  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de metoprolol produce alteraciones citológicas en el hígado y riñón, así como las concentraciones arriba de  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ocasionan cambios estructurales en las branquias (Santos *et al.*, 2010). Igualmente, los efectos encontrados en peces expuestos a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de metoprolol incluyen la reducción de las reservas de glucógeno y la aparición de material de membrana dentro de las células, además de una dilatación y orientación irregular del retículo endoplasmático (Triebkorn *et al.*, 2007). En algas causa inhibición de la fotosíntesis (Escher *et al.*, 2011; Radjenovic *et al.*, 2011). La eficiencia de remoción del metoprolol en las plantas de tratamiento de lodos activados varía desde 0 hasta 65 % y en biorreactores con membranas desde 0 a 74 % (Kovalova *et al.*, 2012).

**Tabla 1.2.** Concentraciones y remociones reportadas de los compuestos farmacéuticos

Compuesto	Agua residual municipal	Efluente plantas de tratamiento	Agua residual hospitalaria	Agua superficial	Agua subterránea	Remoción Lodos activados	Remoción MBR
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					%	
Ácido Mefenámico	1.6-3.2 <sup>d</sup>	0.8-2.3 <sup>d</sup>	6.14 <sup>n</sup>	0.242 <sup>c</sup>		2-92 <sup>n</sup>	
	4.54 <sup>b</sup>	0.09-2.4 <sup>h</sup>	5.38 (PEC*) <sup>i</sup>	0.003-0.326 <sup>g</sup>	0.366 <sup>o</sup>	2-50 <sup>d</sup>	8-92 <sup>n</sup>
	0.136-3.2 <sup>h</sup>					1.8 <sup>j</sup>	
Fluoxetina	0.585-1.827 <sup>j</sup>	0.223-0.929 <sup>h</sup>	0.54 (PEC*) <sup>i</sup>	0.141 <sup>m</sup>		33-70 <sup>n</sup>	96 <sup>n</sup>
	5.85 <sup>k</sup>	0.012-0.219 <sup>j</sup>	0.069 <sup>p</sup>	0.012 <sup>d</sup>	0.056 <sup>e</sup>	61.9 <sup>i</sup>	76.8 <sup>j</sup>
	0.01-2.3 <sup>q</sup>		0.019-0.1 <sup>q</sup>	0.44 <sup>r</sup>		33.0 <sup>o</sup>	80 <sup>q</sup>
Metoprolol	0.02-4.9 <sup>k</sup>	0.019-1.7 <sup>k</sup>					
	0.21-3.1 <sup>f</sup>	0.73-2.2 <sup>a</sup>	1.325-25 <sup>n,p</sup>	0.45-2.2 <sup>a</sup>	>.010 <sup>n̄</sup>	0-83 <sup>n</sup>	0-74 <sup>n</sup>
	0.02-1.2 <sup>q</sup>	0.01-0.688 <sup>h</sup>	0.018-25 <sup>q</sup>		0.06 <sup>f</sup>	6.5 <sup>j</sup>	26 <sup>q</sup>
	0.05-7.0 <sup>r</sup>	0.8-1.2 <sup>i</sup>				7.0 <sup>q</sup>	

**Referencias:** <sup>a</sup>Ternes *et al.*, 1998; <sup>b</sup>Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005; <sup>c</sup>Bound y Voulvoulis, 2006; <sup>d</sup>Fent *et al.*, 2006; <sup>e</sup>Barnes *et al.*, 2008; <sup>f</sup>Siemens *et al.*, 2008; <sup>g</sup>Kim *et al.*, 2009; <sup>h</sup>Miège *et al.*, 2009; <sup>i</sup>Lundström *et al.*, 2010; <sup>j</sup>Rosal *et al.*, 2010; <sup>k</sup>Deblonde *et al.*, 2011; <sup>l</sup>Escher *et al.*, 2011; <sup>m</sup>Mesquita *et al.*, 2011; <sup>n</sup>Kovalova *et al.*, 2012; <sup>n̄</sup>Lapworth *et al.*, 2012; <sup>o</sup>Stuart *et al.*, 2012; <sup>p</sup>Orias y Perrodin, 2013; <sup>q</sup>Al Aukudy *et al.*, 2014; <sup>r</sup>Birkholz *et al.*, 2014.

\* PEC – Concentración Ambiental Prevista



### 1.3 REMOCIÓN DE FÁRMACOS MEDIANTE TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

Las condiciones aerobias y anóxicas son favorables para la remoción de fármacos en procesos de tratamiento biológico de aguas residuales. Suarez *et al.* (2010) y Luo *et al.* (2014a) han dividido los compuestos farmacéuticos en grupos con respecto a su biodegradabilidad:

- Compuestos altamente biodegradables bajo condiciones aerobias y anóxicas, tales como el ibuprofeno, la fluoxetina y los estrógenos naturales (remoción mayor al 70 % en condiciones aerobias y 65 % bajo condiciones anóxicas).
- Fármacos altamente biodegradables bajo condiciones aerobias pero persistentes en condiciones anóxicas, tales como el diclofenaco, naproxeno, 17 $\alpha$ -etinilestradiol, roxitromicina y eritromicina.
- Compuestos biodegradables bajo condiciones anóxicas, los cuales presentan menores remociones en condiciones aerobias, tales como los medios de contraste de rayos X yodados.
- Moderadamente biodegradables bajo condiciones aerobias y anóxicas como el citalopram.
- Resistentes a la transformación biológica como el sulfametoxazol, trimetoprima, carbamazepina y diazepam (remoción menor al 25 %).

La biodegradación y la sorción son los dos mecanismos principales en la remoción de fármacos mediante tratamientos biológicos, la biodegradación es considerada la vía principal de eliminación, en particular para compuestos hidrofílicos no persistentes (Ternes y Joss 2006; Majewsky *et al.*, 2011). Generalmente los fármacos son removidos en mayor grado en procesos aerobios en comparación a las condiciones anaerobias, en reactores anaerobios se puede llevar a cabo una remoción por sorción en la estructura de los gránulos de la biomasa, el sulfametoxazol, trimetoprima y naproxeno son altamente eliminados bajo condiciones anaerobias (mayor a 80 %), mientras que la carbamazepina, diazepam, diclofenaco, fluoxetina e ibuprofeno son recalcitrantes (Alvarino *et al.*, 2014).

#### 1.3.1 Biodegradación

La constante de biodegradación ( $k_{\text{biol}}$ ) depende de la degradabilidad de cada compuesto y la composición de la biomasa en el reactor. Joss *et al.* (2006) han propuesto tres grupos de compuestos de acuerdo a su degradabilidad con relación a los sólidos suspendidos:

- $k_{\text{biol}} < 0.1$  [ $\text{L}\cdot\text{gSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ]: no hay remoción sustancial debido a la degradación biológica (< 20 %), para compuestos con coeficiente de sorción  $K_d$  mayor a  $1 \text{ L}\cdot\text{gSS}^{-1}$ , la remoción puede ser mayor debido a la transferencia al lodo.
- $0.1 < k_{\text{biol}} < 10$  [ $\text{L}\cdot\text{gSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ]: remoción parcial (entre 20 y 90 %).
- $k_{\text{biol}} > 10$  [ $\text{L}\cdot\text{gSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ]: más del 90 % de remoción por degradación biológica, la eficiencia de degradación es fuertemente dependiente de la configuración del reactor.

Fernandez-Fontaina *et al.* (2016) han clasificado a los compuestos farmacéuticos de acuerdo a su  $k_{\text{biol}}$  respecto a los sólidos suspendidos volátiles:

- $k_{\text{biol}} > 1$  [ $\text{L}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ]: altamente biodegradable.
- $1 > k_{\text{biol}} > 0.5$  [ $\text{L}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ]: moderadamente biodegradable.
- $0.5 > k_{\text{biol}} > 0.1$  [ $\text{L}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ]: lentamente biodegradable.
- $k_{\text{biol}} < 0.1$  [ $\text{L}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ]: recalcitrante.

Se asume que la composición del lodo tiene influencia debido a la biodiversidad de la biomasa activa, de acuerdo a la tasa de crecimiento específica, cada especie de microorganismos tiene su tiempo de retención mínimo requerido para permitir el establecimiento de una población estable. Para la eliminación de un número significativo de microcontaminantes, un tiempo de retención de sólidos mayor o igual a 10 d (remoción de nutrientes) ha mostrado ser crucial para la biodegradación (Poseidon, 2004; Clara *et al.*, 2005).

### 1.3.2 Sorción

Los mecanismos relevantes para la sorción de contaminantes en la materia particulada durante el tratamiento de aguas residuales son la absorción y adsorción. El término sorción es una expresión general para un proceso en el cual el componente se mueve desde una fase para acumularse en otra, principalmente en los casos en que la segunda fase es sólida. La sorción al lodo es un mecanismo que depende de ciertos factores como el pH, potencial redox, la naturaleza química del sorbente, la molécula sorbida y la composición del lodo. Puede ocurrir por medio de dos mecanismos: 1) absorción en la cual las moléculas o átomos de una fase interpenetran casi uniformemente en los de otra fase, es decir la sustancia se difunde en un líquido o sólido, esto ocurre debido a las interacciones hidrofóbicas de los grupos alifáticos y aromáticos de un compuesto con la membrana celular lipofílica de los microorganismos, o la fracción de lípidos de los sólidos suspendidos; 2) adsorción que ocurre cuando un soluto se acumula en la superficie de un sólido o un líquido (adsorbente), formando una película de moléculas o átomos, debido a las interacciones electrostáticas de grupos positivamente cargados de compuestos como los fármacos con las superficies negativamente cargadas de los microorganismos (Poseidon, 2004; Verlicchi *et al.*, 2012).

La sorción de los compuestos farmacéuticos durante el tratamiento biológico de aguas residuales es dependiente de su hidrofobicidad, la remoción por sorción en los sólidos suspendidos es un mecanismo importante para los compuestos hidrofóbicos, la sorción incrementa con la hidrofobicidad, se espera mayor sorción de compuestos no polares en el lodo (Rosal *et al.*, 2010). El coeficiente de partición octanol-agua  $K_{\text{ow}}$  permite establecer la hidrofobicidad de un compuesto, los fármacos con  $\log K_{\text{ow}} < 2.5$  indican bajo potencial de sorción, elevados valores ( $\log K_{\text{ow}} > 4$ ) muestran alto potencial de sorción debido a su naturaleza hidrofóbica, mientras que los fármacos con  $\log K_{\text{ow}} > 2.5$  pero  $< 4.0$  presentan un potencial de sorción medio (Rogers, 1996). La mayor parte de los compuestos farmacéuticos poseen valores de  $\log K_{\text{ow}} < 3$ , por lo que la sorción al lodo activado no se considera relevante, asimismo los fármacos como el gemfibrozil poseen altos valores de  $\log K_{\text{ow}}$ , pero los valores de las constantes de disociación ( $\text{pK}_{\text{a}}$ ) pueden ser más bajos que el pH del agua residual, por lo tanto, son detectados principalmente en su forma ionizada en el agua residual y no en el lodo (Sui *et al.*, 2010). Algunos fármacos son ácidos o bases, para éstos  $K_{\text{ow}}$  puede ser una medida inadecuada, el coeficiente de partición liposoma-agua  $D_{\text{lipw}}$  (pH 7) a un valor de pH definido ha reemplazado el  $K_{\text{ow}}$  como un descriptor para la sorción en procesos de tratamiento biológico, el  $D_{\text{lipw}}$  (pH 7) es el coeficiente de distribución que corrige la especiación a pH 7 en el caso de ácidos orgánicos y bases, debido a que la partición en las membranas no solo depende de la hidrofobicidad de un compuesto, sino también de su carga (Escher *et al.*, 2011).

Los compuestos que tienden a ser sorbidos en los sólidos se espera que sean mejor eliminados en los procesos de lodos activados, mientras que los compuestos polares tales como el metoprolol se encuentran más probablemente en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Luo *et al.*, 2014a). Los fármacos que presentan baja solubilidad en agua, pueden sorberse a las partículas y a los coloides, por lo tanto también pueden ser descargados en los efluentes acuosos (Daughton y Ternes, 1999). Además, una vez que se ha llevado a cabo la sorción de fármacos en los biosólidos, solo puede ocurrir sorción adicional cuando se producen nuevos biosólidos que proporcionan nueva superficie disponible (Joss *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2014b).

El coeficiente de distribución sólido-agua ( $K_d$ ) ha sido usado para determinar la sorción de fármacos en biomasa o lodo, relaciona la cantidad de un compuesto sorbido a un sólido comparado a la cantidad disuelta en solución al equilibrio, es clave para entender la movilidad de un fármaco a través de los sistemas y su disponibilidad para degradación (Brooks y Huggett, 2012). Los compuestos con  $K_d > 500 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $\log K_d > 2.7$ ) tienden a sorberse al lodo y a las partículas, la mayoría de los compuestos farmacéuticos poseen un  $\log K_d < 2.7$ , por lo que se espera que la sorción no sea significativa, una alta constante de sorción ( $\log K_d > 4$ ) confirma una buena tendencia a la sorción y a crear interacciones electrostáticas (Verlicchi *et al.*, 2012). Gros *et al.* (2010) encontraron que la remoción de los compuestos que son biodegradables (alto  $k_{\text{biol}}$ ) y tienen bajo  $\log K_d$  está más influenciada por el tiempo de residencia hidráulica (TRH), mientras que en los compuestos con bajo  $k_{\text{biol}}$  y alto  $K_d$ , la remoción está más influenciada por el tiempo de retención de sólidos, sin embargo, existen otros compuestos como el ibuprofeno que muestran alto  $k_{\text{biol}}$  y  $K_d$  que son eficientemente removidos independientemente del tiempo de residencia hidráulica y tiempo de retención de sólidos.

En general, los compuestos farmacéuticos exhiben un amplio rango de comportamientos de sorción, los cuáles son altamente dependientes de las características químicas de cada compuesto y de las propiedades del lodo. Por lo tanto, el comportamiento de sorción varía de compuesto a compuesto y es difícil de predecir, debido a que la sorción está controlada por las interacciones con los grupos funcionales (Kibbey *et al.*, 2007). Un número de mecanismos tales como intercambio catiónico, complejación superficial y puentes de hidrógeno pueden estar involucrados en los procesos de sorción, además la materia orgánica y el pH pueden afectar la sorción (Monteiro y Boxall, 2010). Las variaciones en las concentraciones de los fármacos en la fase acuosa pueden producirse por los procesos de sorción-desorción (Radjenović *et al.*, 2009), el contaminante puede ser reversiblemente retenido en el lodo y después puede ser liberado nuevamente en la fase acuosa, el equilibrio de sorción-desorción está relacionado con el coeficiente de sorción  $K_d$  (Joss *et al.*, 2006). La complejidad de las interacciones sorbato-sorbente significa que los enfoques desarrollados para predecir la sorción de fármacos en biomasa pueden ser inapropiados, debido a que el comportamiento de la sorción está influenciado por las propiedades del sistema, los coeficientes de sorción deben ser medidos para cada tipo de fármaco en cada tipo de biomasa.

### 1.3.3 Volatilización

La volatilización depende de la cantidad de aire que entra en contacto con el agua residual y la constante de Henry ( $K_H$ ), esta constante indica la separación líquido-gas, si  $K_H > 3 \times 10^{-3} \text{ atm}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  se observa volatilización en biorreactores con aireación, generalmente los compuestos farmacéuticos tienen valores de  $K_H < 10^{-5} \text{ atm}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ , ya que éstos en su mayoría son compuestos hidrofílicos, debido a que están hechos para ser eficientes en ambientes acuosos como la sangre, por lo tanto, la volatilización no es relevante para la remoción de los fármacos en el tratamiento de aguas residuales municipales (Poseidon, 2004; Luo *et al.*, 2014b).

## 1.4 PROPIEDADES DE LOS COMPUESTOS FARMACÉUTICOS SELECCIONADOS

La estructura de los compuestos juega un papel importante en determinar su resistencia a la biodegradación. Se espera que cada fármaco seleccionado presente distinto comportamiento en el tratamiento de aguas residuales, éste dependerá de su estructura y propiedades fisicoquímicas.

El ácido mefenámico, de acuerdo a su alto coeficiente de partición octanol-agua  $\log K_{ow}$  de 5.12-5.4 y coeficiente de sorción  $\log K_d$  de 2.46-2.73, se espera que tienda a sorberse al lodo, pero su valor de  $pK_a$  es bajo (3.89-4.48), generalmente por debajo del pH del agua residual, por lo que también se espera que se encuentre en su forma ionizada en el agua y no en el lodo, debido a la especiación de su forma hidrofóbica a su forma hidrofílica, el compuesto puede convertirse en negativamente cargado, facilitando la repulsión de carga con los grupos negativamente cargados de la biomasa, por lo tanto se podría observar una mejora en su remoción bajo condiciones ácidas más que a condiciones neutras (Luo *et al.*, 2014a; Rattier *et al.*, 2014). La Tabla 1.3 presenta las propiedades de los fármacos en cuestión.

La fluoxetina al poseer alto  $\log K_{ow}$  (4.17) y alto  $\log K_d$  (2.9-4.0), tenderá a sorberse en el lodo. Los compuestos que tienden a sorberse en los sólidos se espera que sean mejor eliminados en los tratamientos de lodos activados (Luo *et al.*, 2014a).

El metoprolol tiene un  $\log K_{ow}$  de 1.76-1.88 y un valor de  $\log K_d$  de 0.2-1.9, por lo que se espera que posea un bajo potencial de sorción al lodo, los compuestos polares como el metoprolol se encuentran más probablemente en los efluentes de las plantas de tratamiento de lodos activados (Luo *et al.*, 2014a).

Según los coeficientes de biodegradación y sorción del ácido mefenámico,  $k_{biol}$  de 0.01-5.3  $L \cdot gSS^{-1} \cdot d^{-1}$  y  $\log K_d$  de 2.46-2.73, caen en el intervalo de no existir remoción sustancial debido a la degradación biológica y su remoción puede ser menor al 20 % o presentar una remoción parcial (entre 20 y 90 %). Los coeficientes de biodegradación del metoprolol ( $k_{biol}$  0.25-0.76  $L \cdot gSS^{-1} \cdot d^{-1}$ ) y la fluoxetina ( $k_{biol}$  9  $L \cdot gSS^{-1} \cdot d^{-1}$ ) también se encuentran en el intervalo de  $0.1 < k_{biol} < 10$  [ $L \cdot gSS^{-1} \cdot d^{-1}$ ], lo que indica una remoción parcial (entre 20 y 90 %) y su grado de remoción será fuertemente dependiente de la configuración del reactor (Joss *et al.*, 2006).

Para los compuestos con elevado  $\log K_d$  como es el caso de la fluoxetina, su remoción podría estar más influenciada por el tiempo de retención de sólidos, mientras el efecto del incremento del tiempo de retención de sólidos no ha llegado a ser claro para otros compuestos como el metoprolol (Vieno *et al.*, 2007).

Tabla 1.3. Propiedades de los compuestos farmacéuticos

Compuesto	Solubilidad en agua (mg·mL <sup>-1</sup> )	pK <sub>a</sub>	log K <sub>d</sub>	K <sub>biol</sub> (L·gSS <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )* (L·gSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )**	log K <sub>ow</sub>	log D <sub>lip</sub> (pH7)	K <sub>H</sub> (atm·m <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ) 25 °C
Ácido Mefenámico	0.2 <sup>l</sup>	3.89 <sup>k</sup>	2.46-2.73 <sup>b</sup>	*0.01-0.48 <sup>m</sup> *0.9-5.3 <sup>n</sup>	5.12 <sup>a</sup>	4.16 <sup>h</sup>	-
		4.48 <sup>h</sup>			5.4 <sup>k</sup>		
		4.2 <sup>e</sup>					
Fluoxetina	0.06 <sup>l</sup>	9.8 <sup>k</sup>	3.78-4.0 <sup>i</sup>	*9 <sup>g</sup>	1.22 <sup>j</sup>	3.28 <sup>h</sup>	8.90x10 <sup>-8j,l</sup>
		10.1 <sup>e</sup>	2.88-3.02 <sup>n̄</sup>	**0.6-1.3 <sup>n̄</sup>	4.17 <sup>k</sup>		
				**1.12-1.77 <sup>p</sup>			
Metoprolol	4.7 <sup>l</sup>	9.08 <sup>k</sup>	1.8 <sup>c</sup>	*0.35-0.4 <sup>c</sup>	1.76 <sup>k</sup>	1.25 <sup>h</sup>	1.40x10 <sup>-13l</sup>
	14 <sup>o</sup>	9.7 <sup>d</sup>	0.24-0.86 <sup>d</sup>	*0.4-0.6 <sup>k</sup>	1.88 <sup>o</sup>		
		9.6 <sup>e,k,o</sup>	0.8-1.9 <sup>f</sup>	*0.25-0.76 <sup>n</sup>			

**Referencias:** <sup>a</sup> Jones *et al.*, 2002; <sup>b</sup> Radjenović *et al.*, 2009; <sup>c</sup> Wick *et al.*, 2009; <sup>d</sup> Ramil *et al.*, 2010; <sup>e</sup> Rosal *et al.*, 2010; <sup>f</sup> Scheurer *et al.*, 2010; <sup>g</sup> Suarez *et al.*, 2010; <sup>h</sup> Escher *et al.*, 2011; <sup>i</sup> Hörsing *et al.*, 2011; <sup>j</sup> Mendez *et al.*, 2011; <sup>k</sup> Kovalova *et al.*, 2012; <sup>l</sup> Lahti, 2012; <sup>m</sup> Falás *et al.*, 2012; <sup>n</sup> Falás *et al.*, 2013; <sup>n̄</sup> Fernandez-Fontaina *et al.*, 2014; <sup>o</sup> Grossberger *et al.*, 2014; <sup>p</sup> Fernandez-Fontaina *et al.*, 2016.

El ácido mefenámico, la fluoxetina y el metoprolol son compuestos no heterocíclicos, mononucleares y poseen un grupo amino donador de electrones, esto hace a las moléculas más propensas al ataque por las bacterias aerobias. La fluoxetina y el ácido mefenámico poseen además grupos funcionales aceptores de electrones en su estructura, lo que hace a los compuestos menos susceptibles al catabolismo oxidativo, grupo funcional trifluorometil en el caso de la fluoxetina y grupo funcional carboxilo en el ácido mefenámico. Debido a que el ácido mefenámico y la fluoxetina contienen grupos aceptores y donadores de electrones, pueden mostrar una remoción variada y generalmente menor al 70 %. El metoprolol y la fluoxetina contienen un éter aromático-alifático, por lo que puede proceder la ruptura del éter, produciendo un derivado de fenol y un aldehído, también pueden presentar desde baja hasta alta remoción (Tadkaew *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2014a).

Además de las propiedades de los compuestos farmacéuticos, otros factores contribuyen en su remoción, principalmente los parámetros de operación como el tiempo de residencia hidráulica, tiempo de retención de sólidos, la concentración de biomasa y tipo de planta de tratamiento. Se ha reportado que los tiempos de residencia hidráulica mayores a 12 h y los tiempos de retención de sólidos mayores a 10 d contribuyen a incrementar la remoción de fármacos (Sui *et al.*, 2010).

## 1.5 BIODEGRADACIÓN DE FÁRMACOS EN LODOS ACTIVADOS NITRIFICANTES

### 1.5.1 Efecto del tiempo de retención de sólidos (TRS)

La remoción de compuestos farmacéuticos puede ser mejorada ajustando las condiciones de operación de los procesos biológicos. Se ha observado que la remoción incrementa con los altos tiempos de retención de sólidos, lo que permite el enriquecimiento de bacterias de lento crecimiento como las nitrificantes, estas bacterias secretan enzimas capaces de transformar los compuestos y pueden actuar en conjunto con las bacterias heterótrofas en la remoción (Kraigher y Mandic-Mulec, 2011; Verlicchi *et al.*, 2012). Un TRS mayor o igual a 10 d es fundamental para la biodegradación de un número significativo de fármacos (Poseidon, 2004; Clara *et al.*, 2005). El efecto positivo de incrementar el TRS se ha reportado para varios compuestos, en particular los esteroides estrogénicos, ketoprofeno, naproxeno, ácido clofibrico, gemfibrozil, fluoxetina y

citalopram (Neptune, 2010; Suarez *et al.*, 2010). Existen compuestos hidrofílicos-neutros como la fenacina, acetaminofen y pentoxifilina, así como algunos compuestos hidrofílicos-iónicos (bezafibrato, ibuprofeno y fenoprofeno) que son eliminados efectivamente aun a TRS de 8 d (Maeng *et al.*, 2013). En comparación con los sistemas de lodos activados convencionales, los biorreactores con membranas (BRM) alcanzan eficiencias de remoción más altas de compuestos persistentes como el diclofenaco, debido a que el TRS es más alto (15-80 d), con respecto a los lodos activados (7-20 d), así como es más alta la concentración de biomasa ( $9-10 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  en BRM y  $3-5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  en lodos activados) (Verlicchi *et al.*, 2012). Los resultados muestran un impacto significativo de la variación del TRS entre 10 d y 60-80 d en la eficiencia de transformación de la carbamazepina, diclofenaco, ibuprofeno, iopromida, naproxeno, roxitromicina y sulfametoxazol, en cambio el efecto positivo del incremento del TRS no ha llegado a ser claro para otros compuestos como los  $\beta$ -bloqueadores, (Joss *et al.*, 2005; Vieno *et al.*, 2007).

### 1.5.2 Nitrificación y cometabolismo en la biodegradación de fármacos

La actividad nitrificante contribuye significativamente a la biotransformación de fármacos, la actividad amonio oxidante parece ser un buen indicador para la estimación del potencial de biodegradación (Dawas *et al.*, 2014; Rattier *et al.*, 2014). El enriquecimiento de bacterias nitrificantes ha mostrado un incremento en la transformación del  $17\alpha$ -etinilestradiol, roxitromicina y eritromicina, los cuales son moderadamente transformados en las plantas de lodos activados convencionales y en los sistemas desnitrificantes (Suarez *et al.*, 2010). También se ha encontrado una buena correlación entre las constantes cinéticas de biodegradación y las tasas de nitrificación, la buena actividad nitrificante incrementa la biodegradación de fármacos como el ibuprofeno, naproxeno y trimetoprima, sin embargo para la fluoxetina no se ha encontrado esta correlación (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012).

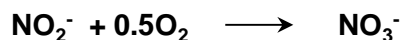
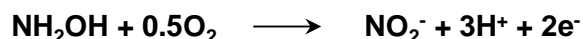
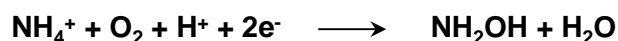
Los compuestos farmacéuticos son encontrados en concentraciones en el rango de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , razón por la cual no pueden ser considerados como única fuente de carbono o energía para la asimilación y crecimiento de la biomasa, en consecuencia, es necesaria la presencia de un sustrato de crecimiento u otro compuesto útil para el mantenimiento de la biomasa e inducir a las enzimas involucradas en la biodegradación, este proceso es llamado cometabolismo, al no ser la fuente de carbono primaria, la biodegradación de los fármacos podría verse afectada por la baja actividad biológica primaria, lo cual puede resultar en una energía insuficiente para la degradación cometabólica (Tran *et al.*, 2013). El cometabolismo de las bacterias nitrificantes puede ser uno de los mecanismos de degradación principal, puede ocurrir que las bacterias heterótrofas degraden los intermediarios formados (Yi y Harper, 2007; Neptune, 2010).

Las bacterias nitrificantes son capaces de cometabolizar una gran variedad de microcontaminantes que típicamente son resistentes a la biodegradación, tales como el medio de contraste iopromida y el antibiótico trimetoprima (Batt *et al.*, 2008). Los resultados han mostrado que las bacterias amonio oxidantes biodegradan  $17\alpha$ -etinilestradiol pero no trimetoprima, mientras que las bacterias heterótrofas son capaces de transformar trimetoprima y biomineralizar los metabolitos del  $17\alpha$ -etinilestradiol generados por las bacterias amonio oxidantes (Forrez *et al.*, 2011; Tran *et al.*, 2013). Otro estudio mostró que la remoción de diez fármacos en cultivos nitrificantes (ácido clofíbrico, gemfibrozilo, ibuprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco, indometacina, propifenazona y carbamazepina) es también debida a la diversidad de las bacterias nitrificantes autótrofas y heterótrofas presentes (Neptune, 2010). La actividad nitrificante incrementa la biotransformación de naproxeno e ibuprofeno, aunque los microorganismos heterótrofos también son capaces de degradarlos a una tasa más lenta (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2016).

Las bacterias autótrofas amonio oxidantes cometabolizan gran variedad de fármacos vía enzimas no específicas, tales como la enzima amonio monooxigenasa (Tran *et al.*, 2013). La biodegradación cometabólica llevada a cabo por esta enzima ha mostrado una habilidad superior en la remoción de fármacos que la biodegradación metabólica (Xu *et al.*, 2016).

### 1.5.3 Papel de la enzima amonio monooxigenasa

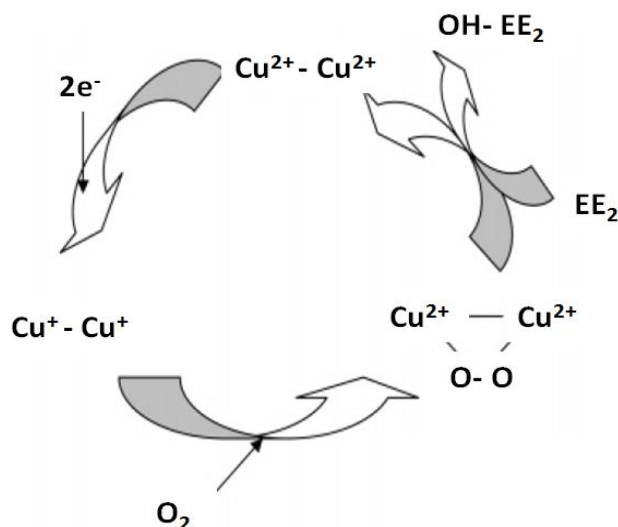
La bacteria amonio oxidante puede oxidar fármacos recalcitrantes en presencia de nitrógeno amoniacal, el cual juega un papel como un sustrato de crecimiento, la biodegradación cometabólica parece ser la responsable de la biotransformación inicial debido a la acción de la enzima amonio monooxigenasa, la cual cataliza el primer paso de la nitrificación (Forrez *et al.*, 2011; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012). Las bacterias amonio y nitrito oxidantes son aerobias quimioautótrofas, debido a que usan CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y requieren oxígeno disuelto para oxidar un compuesto inorgánico para obtener energía (WEF, 2010). Tres enzimas están involucradas en el proceso de nitrificación, la enzima amonio monooxigenasa, la enzima hidroxilamina oxidoreductasa y la enzima nitrito oxidoreductasa. En la primera etapa, la enzima amonio monooxigenasa oxida el amonio a hidroxilamina, los sustratos de esta enzima son el amonio, oxígeno y dos electrones. En la segunda etapa, se da la oxidación de hidroxilamina a nitrito por la actividad de la enzima hidroxilamina oxidoreductasa. Posteriormente en una tercera etapa, la oxidación del nitrito es catalizada por la enzima nitrito oxidoreductasa (Schmidt *et al.*, 2003; Moir, 2011; Bejarano *et al.*, 2012; Metcalf y Eddy, 2014).



En presencia de oxígeno, el nitrógeno amoniacal es transformado en hidroxilamina por la acción de la enzima amonio monooxigenasa a través de una reacción de hidroxilación, este paso requiere el poder reductor que es generado mientras la hidroxilamina se oxida a nitrito por la enzima hidroxilamina oxidoreductasa, por lo tanto, ambas enzimas son codependientes ya que generan el sustrato y electrones respectivamente, del mismo modo, la enzima amonio monooxigenasa es capaz de utilizar oxígeno elemental para introducir la función hidroxilo en los compuestos farmacéuticos (Yi y Harper, 2007). En ausencia de nitrógeno amoniacal, la hidroxilamina no es producida y el poder reductor es proporcionado por la respiración endógena, la respiración endógena de la enzima amonio monooxigenasa proporciona suficiente poder reductor para soportar la biotransformación de microcontaminantes orgánicos, aún en ausencia de nitrógeno amoniacal, sin embargo a largo plazo, el nitrógeno amoniacal debe ser suministrado para el mantenimiento de los microorganismos (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2016).

Los sitios activos de la enzima amonio monooxigenasa contienen iones de metal tales como iones de cobre. El sitio activo posee dos caras, una cara tiene sitios activos con una región de activación de oxígeno y la otra tiene una parte hidrofóbica, similar a la oxidación del sustrato primario, la oxidación de sustratos secundarios (fármacos) por la enzima amonio monooxigenasa requiere reductores y electrones (Tran *et al.*, 2013). En este caso, se requiere el poder reductor que se obtiene de la oxidación de la hidroxilamina por la enzima hidroxilamina oxidoreductasa al generar NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y electrones, dos electrones entran al ciclo catalítico involucrando al sitio binuclear de cobre (Cu<sup>2+</sup>-Cu<sup>2+</sup>), localizado en el sitio activo de la enzima amonio monooxigenasa (Figura 1.1). Se sugiere que bajo condiciones aerobias, el oxígeno reacciona para convertir (Cu<sup>+</sup>-Cu<sup>+</sup>) en (Cu<sup>2+</sup>-Cu<sup>2+</sup>), de tal manera que el oxígeno queda enlazado al sitio binuclear como un radical

altamente electrofílico como el ion peróxido ( $O_2^-$ ). Esta forma oxigenada de la enzima amonio monooxigenasa reacciona con los sustratos secundarios, principalmente con los enlaces N-H, C-H o dobles enlaces para producir una forma de sitio de cobre binuclear ( $Cu^{2+}-Cu^{2+}$ ) y productos de degradación (Yi y Harper 2007; Forrez *et al.*, 2011). La enzima probablemente se encuentra hidroxilando los microcontaminantes como lo hace con el nitrógeno amoniacal, sin embargo, no es claro si otras enzimas presentes en los lodos activados nitrificantes, cuya actividad también se incrementa por las altas tasas de nitrificación, podrían estar involucradas en la biotransformación (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012).



**Figura 1.1.** Enzima amonio monooxigenasa en la transformación cometabólica de EE2 (Yi y Harper, 2007).

La enzima amonio monooxigenasa también puede tener afinidad más fuerte por el nitrógeno amoniacal en comparación a los microcontaminantes, oxidando preferentemente al nitrógeno amoniacal cuando sus concentraciones permanecen altas, aunque se ha identificado una asociación positiva entre la eliminación de microcontaminantes y la remoción de nitrógeno amoniacal, las plantas de tratamiento con la mayor remoción de nitrógeno amoniacal no necesariamente son más eficientes en remover todos los microcontaminantes. Entre los fármacos que muestran una asociación significativa con la remoción de nitrógeno amoniacal se encuentran el atenolol, isoproturon, ranitidina, valsartan y venlafaxina, estos compuestos presentan reacciones de oxidación como N-desalquilación en el caso de isoproturon, valsartan y venlafaxina, la hidroxilación ha mostrado ser el paso de transformación inicial en reacciones N-desalquilación, por otro lado la mayoría de los compuestos que presentan reacciones de sustitución no tienen relación con la remoción de nitrógeno amoniacal (Helbling *et al.*, 2012).

#### 1.5.4 Papel de las bacterias heterótrofas

La biodegradación de fármacos puede ser atribuida a las actividades cometabólicas de microorganismos autótrofos y heterótrofos, los estudios han mostrado que la biodegradación de fármacos en agua residual es debida a la actividad cometabólica de microorganismos autótrofos, mientras que los microorganismos heterótrofos degradan los fármacos ya sea vía cometabolismo o metabolismo (Tran *et al.*, 2013). Además, las bajas relaciones alimento microorganismo a largos tiempos de retención de sólidos (condiciones oligotróficas) pueden permitir a los microorganismos usar los fármacos como fuente de carbono (Maeng *et al.*, 2013).



Para elucidar la contribución de las bacterias autótrofas y las bacterias heterótrofas en la biodegradación de fármacos se ha usado alitiourea, un inhibidor de la enzima amonio monooxigenasa, usado para suprimir la actividad de oxidación del nitrógeno amoniacal. Cuando se utiliza alitiourea para inhibir la actividad de la bacteria amonio oxidante, el porcentaje de remoción de iopromida disminuye de 97 % a 86 %, mientras que la remoción de trimetoprima disminuye de 70 % a 25 %, lo cual indica que la bacteria amonio oxidante junto con otros microorganismos heterótrofos son responsables de su degradación (Batt *et al.*, 2006). Es difícil concluir que alitiourea inhibe selectivamente la actividad de la bacteria amonio oxidante, es probable que también inhiba algunas enzimas de bacterias heterótrofas relevantes para la remoción de fármacos (Falás *et al.*, 2012). Se ha visto que alitiourea reduce la remoción biológica de varios microcontaminantes pero no la inhibe completamente, compuestos como el ibuprofeno, fenopropeno, naproxeno, ácido clofibrato, 17 $\beta$ -estradiol y estrona son biodegradados aún en la presencia de alitiourea donde no se observa nitrificación, sugiriendo que las bacterias heterótrofas también juegan un papel importante en su eliminación (Maeng *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2013).

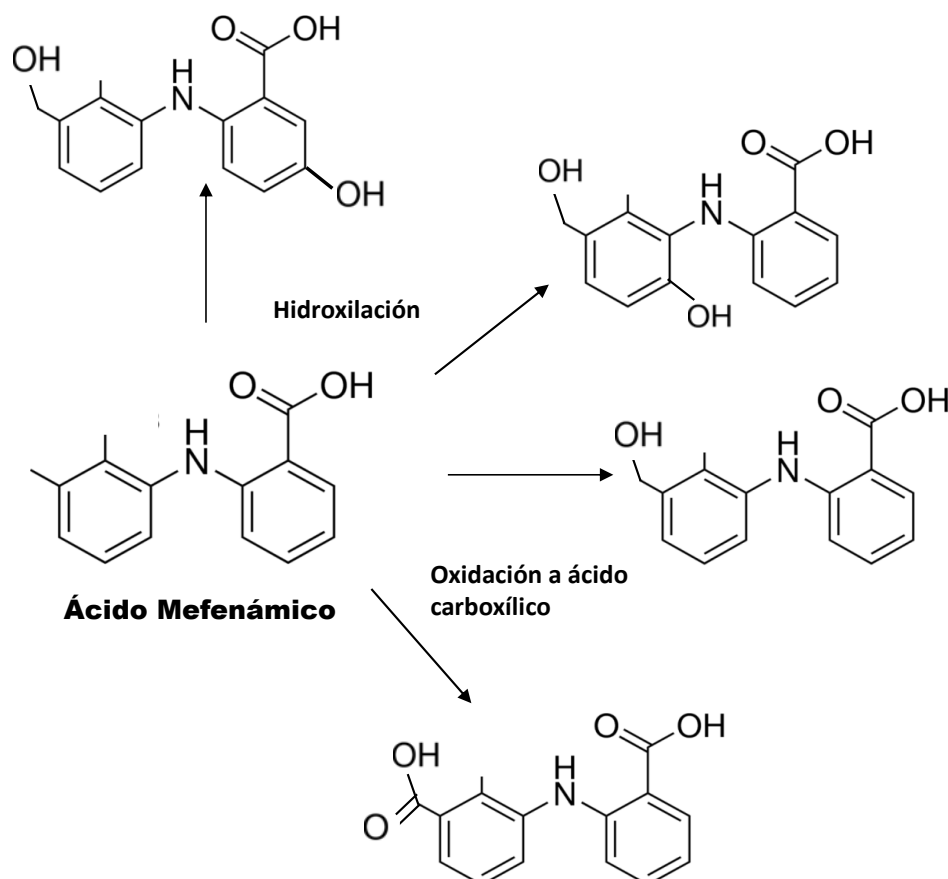
Se ha indicado que la degradación heterótrofa más que la degradación autótrofa por los microorganismos amonio oxidantes son la principal causa de la remoción de varios fármacos, incluyendo ácido mefenámico y metoprolol (Tran *et al.*, 2009; Majewsky *et al.*, 2011; Falás *et al.*, 2012; Maeng *et al.*, 2013; Falás *et al.*, 2016). La actividad heterótrofa incrementa la biotransformación de sulfametoxazol, alcanzando eficiencias de biotransformación de 93 % bajo condiciones heterótrofas, bajo condiciones de nitrificación y nitratación se alcanzan remociones de 44 % y 66 %, respectivamente, el sulfametoxazol puede ser transformado por las bacterias heterótrofas como cosustrato o como única fuente de carbono y nitrógeno. La fluoxetina ha mostrado un comportamiento similar, ésta puede ser degradada más rápidamente bajo condiciones heterótrofas, aunque la sorción también juega un papel predominante (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2016). Por lo tanto, las bacterias nitrificantes son capaces de incrementar la biodegradación de fármacos, pero el papel de los microorganismos heterótrofos también debe ser considerado.

### **1.5.5 Caminos de degradación de los compuestos farmacéuticos**

La biodegradación cometabólica por la enzima amonio monooxigenasa puede involucrar reacciones de hidroxilación y oxidación durante la nitrificación (Xu *et al.*, 2016). Un factor clave que favorece la biotransformación de fármacos en lodo activado nitrificante es la disponibilidad de cadenas lineales con grupos alquilo, así como los carbonos secundarios y terciarios que pueden ser hidroxilados fácilmente por la acción de la enzima amonio monooxigenasa (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2016). El ataque por el oxígeno reactivo de la enzima amonio monooxigenasa también puede ocurrir contra enlaces N-H, C-H, o dobles enlaces, otras dos reacciones que han sido observadas son deshidrogenación/oxidación y deshalogenación (Forrez *et al.*, 2011). Además la enzima amonio monooxigenasa es capaz de oxidar éteres aromáticos a través de O-desalquilación o hidroxilación (Suarez *et al.*, 2010; Alvarino *et al.*, 2014). Los estudios han mostrado que los principales productos de la transformación de fármacos como 17 $\alpha$ -etinilestradiol e ibuprofeno son productos de la hidroxilación (Quintana *et al.*, 2005; Yi y Harper, 2007; Ferrando-Climent *et al.*, 2012). Se ha reportado que el lodo nitrificante incrementa la transformación del 17 $\alpha$ -etinilestradiol via hidroxilación, convirtiéndose en productos hidrofílicos que se caracterizan por tener una actividad estrogénica más baja (Suarez *et al.*, 2010; Alvarino *et al.*, 2014). Los intermediarios hidroxilados pueden servir como sustrato para los microorganismos heterótrofos (Yi y Harper, 2007).

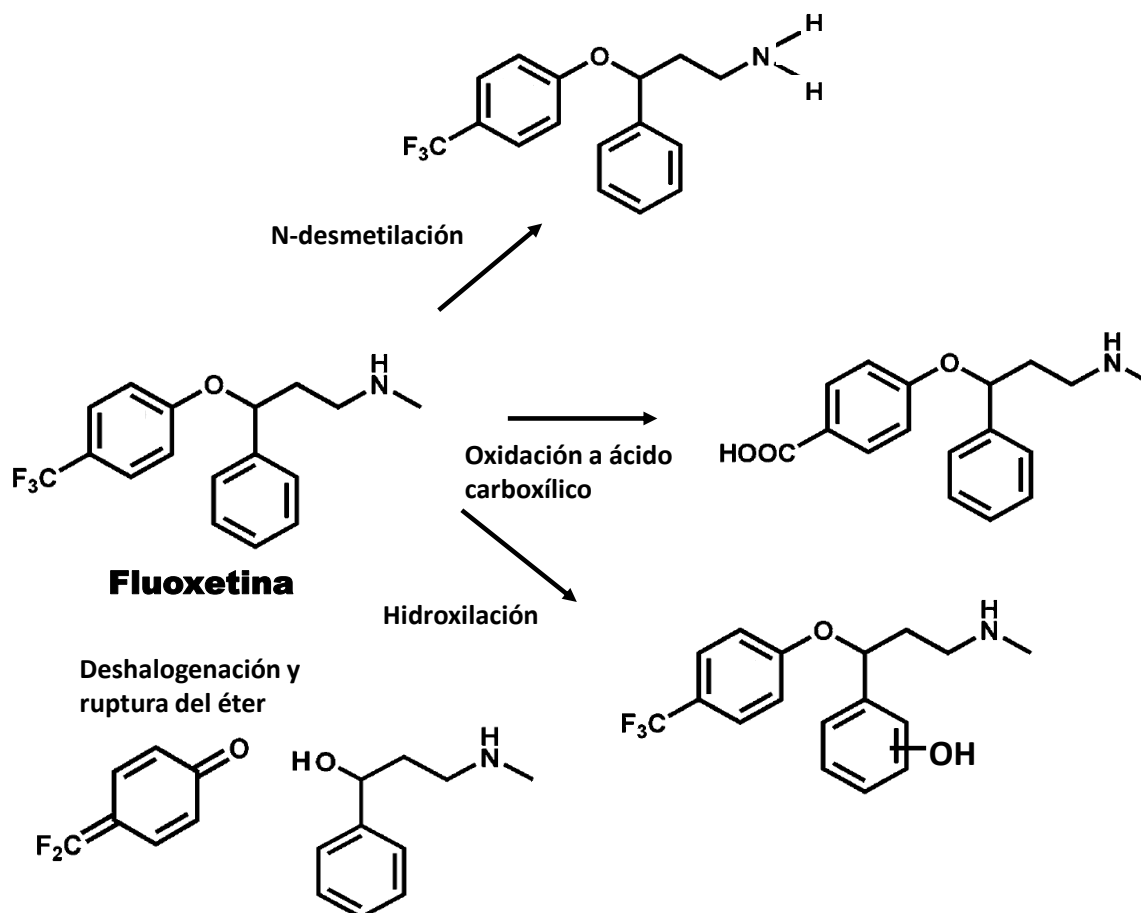
Los estudios han sugerido la biotransformación de ácido mefenámico a ácido mefenámico mono-hidroxilado (3'-hidroximetil ácido mefenámico, 3'-carboxi ácido mefenámico) y ácido mefenámico

di-hidroxilado (3'-hidroximetil-5'-hidroxiácido mefenámico, 3'-hidroximetil-6'-hidroxiácido mefenámico) (Hata *et al.*, 2010). Se ha demostrado que la fluoxetina es susceptible a la fotodegradación, los caminos de transformación pueden ser O-desalquilación, hidroxilación en un anillo, ruptura del éter y una oxidación a ácido carboxílico, resultado de la defluoración del grupo trifluorometil (Petrovic y Barceló, 2010). En las Figuras 1.2, 1.3 y 1.4 se dan los esquemas de los caminos de degradación reportados para los tres fármacos.



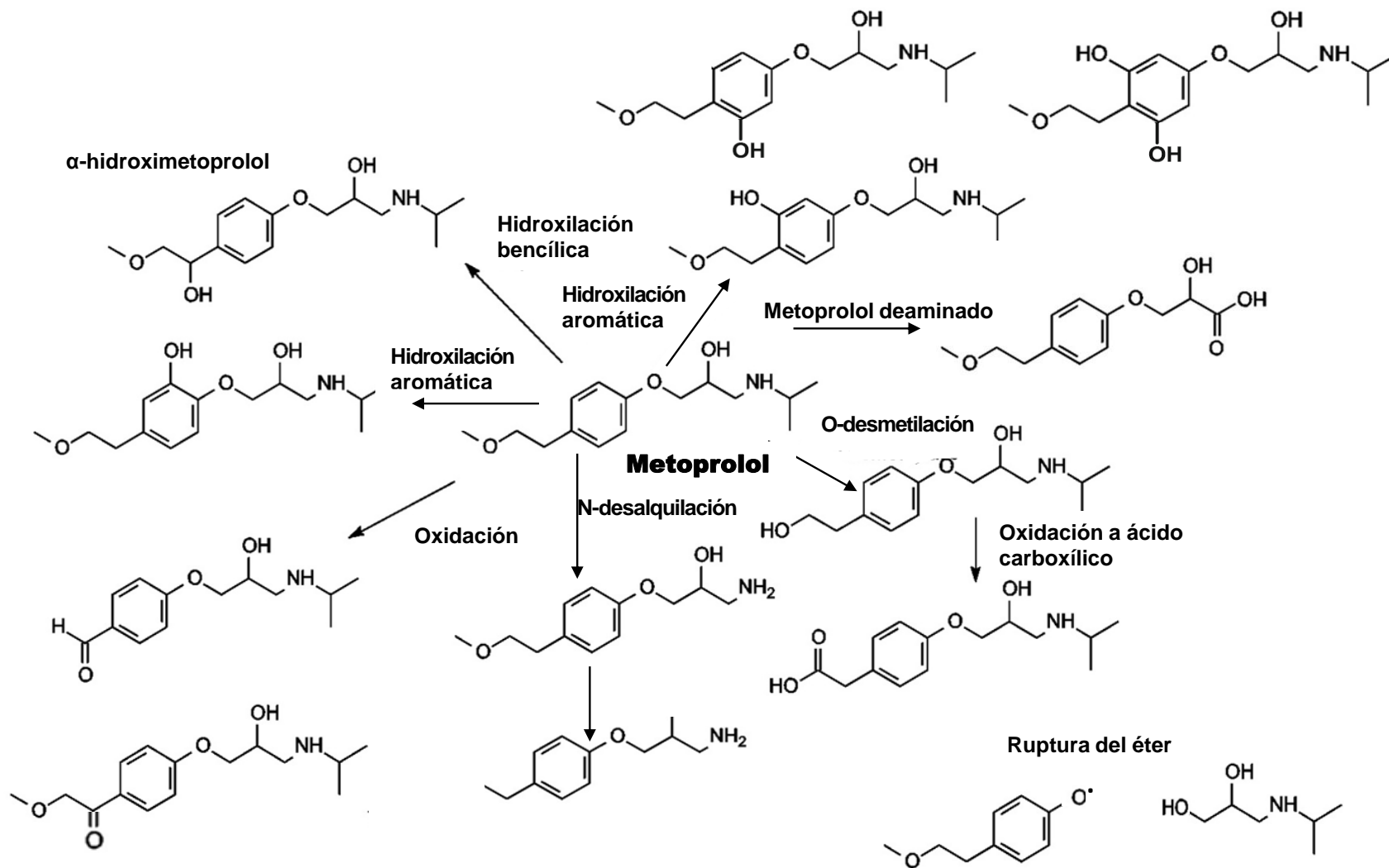
**Figura 1.2.** Estructuras químicas de los metabolitos del ácido mefenámico después de la transformación con hongos white rot fungus (Hata *et al.*, 2010).

En el caso del metoprolol, dos productos de la hidroxilación han sido identificados bajo condiciones aerobias: 4-(2-hidroxi-3-(isopropilamino) propoxi) fenol y 1-(4-(2-hidroxi-3-(isopropilamino) propoxi) fenil)-2-metoxietanona. Los caminos de fragmentación de estos productos de transformación incluyen la N-desalquilación correspondiente a una pérdida del grupo isopropilo, oxidación a benzaldehído, deshidrogenación y ruptura del éter, produciendo un derivado del fenol y un aldehído, el metoprolol ácido (oxidación a ácido carboxílico) y O-desmetilmetoprolol (O-desmetilación) son otros productos de transformación (Rubirola *et al.*, 2014). Es sabido que la degradación aerobia de compuestos con fragmento éter aromático-alifático como la fluoxetina y metoprolol puede proceder por ruptura del éter (O-desalquilación) (Tadkaew *et al.*, 2011).



**Figura 1.3.** Productos identificados en la degradación fotoquímica de la fluoxetina (Petrovic y Barceló, 2010).

El ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol poseen una amina secundaria, dos principales reacciones oxidativas iniciales en el grupo funcional amino han sido observadas para los sistemas de lodos activados: 1) N-oxidación y 2)  $\alpha$ -C-hidroxilación seguido por N-desalquilación, oxidación a amida o deshidratación. Adicionalmente, varias reacciones N-acilación, llamadas N-formilación, N-acetilación, N-propionilación, N-malonilación, N-succinilación y probablemente desaturación a productos N-fumarilados han sido observadas. Las reacciones de N-oxidación involucran la introducción directa de un átomo de oxígeno en el nitrógeno del grupo funcional amino, resultando en productos de hidroxilamina para las aminas secundarias. Además, los productos N-hidroxilados de aminas secundarias son conocidos por ser transformados a productos tales como nitronas, se ha sugerido especialmente la N-acetilación, N-formilación y N-succinilación como productos de transformación. Para la amina secundaria de la fluoxetina, las reacciones de N-desalquilación, N-acetilación o la combinación de N-desmetilación, N-propionilación y N-succinilación son posibles. Las reacciones que no involucran grupos funcionales amino son O-desmetilación, hidroxilación a otros grupos además de las aminas o el  $\alpha$ -C, desaturación, oxidación de un producto hidroxilado a un producto carbonilo o ácido carboxílico, deshidratación de un alcohol alifático a un alqueno y combinaciones de varias reacciones, incluyendo la descarboxilación y  $\beta$ -oxidación (Gulde *et al.*, 2016).



**Figura 1.4.** Posibles caminos de degradación del metoprolol (Johansson *et al.*, 2007; Kujawa-Roeleveld y Schuman, 2008; Wilde *et al.*, 2013; Rubiola *et al.*, 2014).

## 1.6 PROCESOS AEROBIOS CON BIOMASA INMOVILIZADA

Los sistemas que utilizan biomasa inmovilizada son una alternativa para el tratamiento biológico de aguas residuales que contienen fármacos, ya que por su largo tiempo de retención de sólidos, favorecen el desarrollo de bacterias de lento crecimiento como las nitrificantes (Wu *et al.*, 2009; Bassin *et al.*, 2011; Falås *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2014a). Las biopelículas son un conjunto de microorganismos que se desarrollan sobre una superficie gracias a las sustancias poliméricas extracelulares, producidas por los microorganismos o resultado de la lisis celular, las sustancias poliméricas extracelulares son responsables de la morfología, arquitectura, propiedades fisicoquímicas y actividad bioquímica de los agregados microbianos, las biopelículas no solo están compuestas de microorganismos, la mayor cantidad de la biopelícula está compuesta de las sustancias poliméricas extracelulares, constituidas principalmente por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y sustancias húmicas que mantienen a las células unidas entre sí y adheridas a la superficie (Wuertz *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2012). Los polisacáridos y las proteínas son los mayores componentes, corresponden al 75-89 % de la composición de la biopelícula. La matriz de sustancias poliméricas extracelulares actúa como una barrera en la cual prevalece el transporte difusivo sobre el transporte convectivo, una función atribuida a las sustancias poliméricas extracelulares es su efecto protector hacia los microorganismos en la biopelícula contra condiciones adversas, por ejemplo se ha observado más resistencia a la toxicidad y cambios de las condiciones del medio, las células en una biopelícula pueden tolerar altas concentraciones de biocidas (Simões *et al.*, 2010).

La principal ventaja de los sistemas con biomasa inmovilizada es que pueden retener alta cantidad de biomasa y obtener altos tiempos de retención de sólidos en los reactores, mayor en comparación con los sistemas que usan microorganismos suspendidos, lo cual permite reducir los requerimientos de tamaño de los reactores, se asegura mayor actividad metabólica y tolerancia de los microorganismos a las altas cargas de contaminantes (Srinandan *et al.*, 2012). Los procesos con biomasa inmovilizada pueden dividirse en tres clases: 1) procesos con biomasa inmovilizada no sumergidos, 2) procesos de biomasa suspendida con biomasa inmovilizada (lecho móvil) y 3) procesos aerobios de lecho sumergido. En el primero, el agua se mueve a lo largo del medio estacionario no sumergido y en el segundo el material de empaque se mueve en el tanque de aireación de la biomasa suspendida. Los procesos aerobios de lecho sumergido consisten de tres fases: empaque, biopelícula y líquido, incluyen los reactores de flujo descendente, reactores de flujo ascendente y reactores de flujo ascendente de lecho fluidizado, el tipo y tamaño del empaque es el factor principal que afecta el desempeño de los procesos de lecho sumergido (Metcalf y Eddy, 2014). Dependiendo de las condiciones de crecimiento y las condiciones hidrodinámicas del sistema, el grosor de las biopelículas varía desde 70  $\mu\text{m}$  hasta 10,000  $\mu\text{m}$ , las concentraciones de sólidos suspendidos volátiles pueden variar en el intervalo de 40 a 100  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Ibrahim *et al.*, 2012; Metcalf y Eddy, 2014), pueden estar formadas por varias especies de microorganismos los cuales interactúan entre sí, ya sea en forma simbiótica o compitiendo por el espacio y por los sustratos disponibles (González, 2006).

Se ha determinado que los reactores con biomasa inmovilizada son capaces de retener grandes cantidades de biomasa, remover materia orgánica y nitrógeno (Mijaylova *et al.*, 2008; Mijaylova y Moeller, 2010; Bassin *et al.*, 2011; Falås *et al.*, 2012). Las bacterias heterótrofas típicamente tienen una tasa de crecimiento máxima cinco veces más alta que las bacterias autótrofas nitrificantes (Li y Bishop, 2004). Los microorganismos con la más alta tasa de crecimiento se encontrarán en el exterior de la biopelícula, mientras que los microorganismos de más lento crecimiento se encontrarán en el interior, como resultado los microorganismos de lento crecimiento se encontrarán protegidos ante posibles condiciones adversas del medio (Wuertz *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2012), por lo tanto la presencia de bacterias heterótrofas crea un

ambiente adecuado para el desarrollo de las bacterias nitrificantes que viven dentro de la biopelícula (Bassin *et al.*, 2012).

Se ha visto también que existe una competencia entre las bacterias heterótrofas y las bacterias nitrificantes autótrofas por el oxígeno disuelto y el espacio (Li y Bishop, 2004). Las bacterias heterótrofas son capaces de utilizar más oxígeno y espacio que las nitrificantes, así inhiben significativamente la nitrificación cuando el oxígeno suministrado y el espacio son limitados. Por una parte, el suministro de oxígeno es un factor de influencia para la remoción de nitrógeno amoniacal y por otra parte, uno de los parámetros críticos para la nitrificación es la concentración de materia orgánica en el agua residual, ya que tiene un impacto en el desarrollo y función de las bacterias nitrificantes, la proporción demanda química de oxígeno/nitrógeno (DQO/N) puede afectar el desempeño de la nitrificación (Bassin *et al.*, 2012). Al incrementar la carga orgánica, se reduce el TRS y la capacidad de las bacterias nitrificantes para desarrollarse en el medio (González *et al.*, 2002).

### **1.7 REMOCIÓN DE FÁRMACOS EN PROCESOS CON BIOMASA INMOVILIZADA**

Existe aún una cantidad limitada de estudios enfocados a la remoción de fármacos en reactores con biomasa inmovilizada (Grandclément *et al.*, 2017). Se ha estudiado la remoción de estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) y 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) en aguas residuales municipales mediante biofiltros aerobios de flujo descendente, operados en lote secuenciado y empacados con soportes tipo Kaldnes K1, el biofiltro a escala laboratorio (30 L) logró remociones de 64 %, 85 % y 84 % para E1, E2 y EE2 respectivamente, mientras que el biofiltro a escala piloto (3.5 metros de altura y 1 m de diámetro) mostró remociones de 60 % de E1 y 69 % de E2, mayores a las obtenidas en lodos activados convencionales (53 y 41 % respectivamente). El mejor desempeño del biofiltro puede explicarse por el alto TRS ( $\approx 180$  d) (Balest *et al.*, 2008). Igualmente Forrez *et al.* (2009) investigaron la remoción de EE2 en biorreactores aerobios de lecho fijo sumergido y flujo ascendente, empacados con soportes Kaldnes K1, se obtuvo 96 % de remoción de EE2 a TRH de 4.3 d y carga volumétrica de 11  $\mu\text{gEE2}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , la nitrificación fue el principal mecanismo de remoción ya que la adición de alitiourea inhibió la remoción de EE2. Por otro lado se encontró que la eliminación no es afectada significativamente por la ausencia de nitrógeno amoniacal en la alimentación, por lo que el cometabolismo de EE2 no pudo ser confirmado, además de la biopelícula, se realizaron pruebas usando 500 mL del efluente del reactor, donde se adicionaron 80  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de EE2, el resultado fue la remoción del 90 % del compuesto en 12 días, sugiriendo el lavado de las bacterias responsables de la degradación.

También se han empleado biofiltros en lote secuenciado de flujo descendente de 3 m de altura y 22.5 cm de diámetro, cada uno con un medio distinto (80 cm de arena y 80 cm de carbón activado granular), después del tratamiento con arena, los fármacos como el diclofenaco, hidroclorotiazida, metoprolol, oxazepam, temazepam, tramadol y venlafaxina tuvieron remociones menores al 20 %, en cambio mediante el carbón activado granular, la carbamazepina, diclofenaco, eritromicina, metoprolol, roxitromicina, sulfametoxazol y trimetoprima tuvieron remociones mayores al 90 %. La mayor efectividad del carbón activado puede deberse a mayor cantidad de biomasa adherida en la superficie y a los efectos combinados de adsorción y biodegradación, la adsorción incrementa el tiempo de residencia de los fármacos dentro del biofiltro favoreciendo su biodegradación, se dice que la biomasa expuesta a compuestos orgánicos en concentraciones traza se puede adaptar con el tiempo, incluso puede llegar a ser capaz de degradar compuestos persistentes (Reungoat *et al.*, 2011).

Falàs *et al.* (2012) realizaron una comparación de la remoción de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fármacos ácidos, utilizaron experimentos en lote con soportes y lodos activados, se demostró que los reactores con soportes tipo Kaldnes K1 y Biofilm Chip presentan mayor remoción de fármacos como el ácido mefenámico, diclofenaco, ketoprofeno, gemfibrozil y ácido clofíbrico, en comparación con el lodo activado nitrificante, se dieron dos explicaciones potenciales para las diferencias observadas: mayor cantidad de microorganismos de lento crecimiento capaces de degradar fármacos (debido al mayor TRS en la biopelícula de los soportes) y la estratificación de la comunidad microbiana debido a los gradientes de sustrato y redox dentro de la biopelícula. Los microorganismos adaptados a los sustratos orgánicos fácilmente biodegradables son localizados en la parte exterior de la biopelícula, los microorganismos adaptados a los sustratos orgánicos restantes y difícilmente degradables son localizados en la parte interior de la biopelícula. Asimismo, debido a su mayor área superficial, los soportes Biofilm Chip lograron mayores tasas de remoción comparados con los soportes Kaldnes K1. La capacidad de nitrificación fue más baja para la biomasa inmovilizada que para el lodo activado nitrificante, esto indicó que las bacterias amonio y nitrito oxidantes no son las responsables principales de la remoción de fármacos ácidos en los reactores con soportes, por lo que la mayor remoción puede deberse a bacterias heterótrofas. Las constantes de remoción de ibuprofeno y naproxeno no mostraron dependencia de la capacidad de nitrificación en los reactores con biopelícula, mientras que se observó una tendencia positiva entre la capacidad de nitrificación y las constantes de remoción para ketoprofeno, ácido clofídrico y ácido mefenámico. Por otro lado, se observó disminución de la remoción de diclofenaco, ketoprofeno, gemfibrozil, naproxeno e ibuprofeno cuando se adicionó alitiourea para inhibir la nitrificación. Alitiourea inhibe la actividad de la enzima amonio monooxigenasa, pero también se ha planteado la posibilidad de inhibición de otras bacterias, lo cual puede explicar la reducción de la remoción de fármacos en presencia del inhibidor, parece ser que el proceso de nitrificación por sí mismo no tiene influencia en la eficiencia de biodegradación y que las bacterias que contribuyen son encontradas en biopelículas nitrificantes. Luego, Falàs *et al.* (2013) evaluaron tres reactores paralelos en lote (lodo anóxico, lodo aerobio y proceso híbrido biopelícula-lodo activado), emplearon soportes Biofilm Chip a 35 % de llenado, los reactores fueron alimentados con  $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada fármaco, operados con TRH de 12 h y recirculación de lodo del 70 %. Aquí la capacidad de nitrificación fue más alta para la biomasa inmovilizada en comparación con el lodo aerobio suspendido, cinco compuestos mostraron remociones en los tres tipos de reactores (atenolol, bezafibrato, levetiracetam, sulfametoxazol y N4-acetilsulfametoxazol). El ácido mefenámico y el metoprolol no fueron removidos bajo condiciones anoxicas, el ácido mefenámico fue removido más rápidamente en el proceso con soportes que en el lodo aerobio, mientras que el metoprolol fue mejor removido en el lodo aerobio. Interesantemente cuando la biomasa inmovilizada se trajo a suspensión, las características de degradación de los fármacos cambiaron, se sugiere que la adaptación microbiana a los gradientes en la biopelícula puede favorecer la degradación de algunos fármacos, incluso el diclofenaco que es persistente en el lodo aerobio puede ser removido en el proceso híbrido.

Para examinar el efecto de la actividad microbiana, Rattier *et al.* (2014) usaron biofiltros de antracita granular para tratar un efluente terciario fortificado con  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de microcontaminantes. Los resultados confirmaron el impacto positivo del crecimiento de una biopelícula en la remoción de compuestos como el ibuprofeno, acetaminofen, naproxeno, ketoprofeno, lincomicina y eritromicina, esto es indicativo de la capacidad de las enzimas para utilizar los fármacos como sustrato secundario, contrario a esto, el diclofenaco, sulfadiazina, trimetoprima, sulfametoxazol, citalopram, propranolol, hidroclorotiazida, carbamazepina, roxitromicina, atenolol, metoprolol, tramadol, venlafaxina y fenitoína presentan remociones menores al 20 %. En presencia de azida de sodio (sin actividad microbiana aerobia) la remoción de fármacos es despreciable a excepción del atenolol, trimetoprima y diazinon, descartándose el proceso de sorción para atenolol y trimetoprima, se indica que la presencia de azida de sodio puede crear un nicho de bacterias

facultativas anaerobias capaces de la degradación. A través de la inhibición con aliltiourea se mostró que las bacterias nitrificantes tienen un papel en la degradación de fármacos como ketoprofeno, gemfibrozil, furosemida y acetaminofen, esto no significa que la biodegradación por nitrificación sea el único camino, no pudo establecerse que la biodegradación sea controlada por la enzima amonio monooxigenasa, solo se pudo mostrar la conexión entre la inhibición de la enzima y la degradación de los fármacos, mientras tanto, la remoción de otros como ibuprofeno, naproxeno, valsartan, indometacina, eritromicina y roxitromicina no es afectada por la presencia del inhibidor y pueden ser degradados por microorganismos distintos a los nitrificantes. La remoción de metoprolol fue despreciable en los tres tipos de operación de los biofiltros.

Existe un estudio sobre la remoción de fármacos usando cubos de poliuretano de 2 cm en reactores de lecho móvil, este estudio fue realizado con agua residual sintética, donde los fármacos fueron adicionados a una concentración  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y los reactores trabajaron con tiempos de residencia hidráulica de 24 h. Los resultados mostraron que la eliminación de los compuestos incrementó con el aumento en la proporción de llenado de los soportes, a una proporción de llenado del 20% se obtuvieron mayores remociones de acetaminofen (76.3 %), carbamazepina (39.5 %), diclofenaco (76.1 %), fenoprofeno (34.6 %), gemfibrozil (83.5 %), ketoprofeno (79.2 %) y naproxeno (98.3 %), en comparación a una proporción de llenado del 10 % (44.7 %, 17.1 %, 58.6 %, 14.5 %, 63.2 %, 47.6 % y 60.8 % de eliminación respectivamente). Las mayores remociones fueron debidas al incremento de microorganismos inmovilizados en los soportes, de manera que la biodegradación es el principal mecanismo de remoción en reactores de lecho móvil con un volumen de llenado de cubos del 20 %, debido a sus grupos funcionales donadores de electrones, se lograron remociones de 93.7 % de ibuprofeno, 91.1 % de ácido salicílico y 83.5 % de primidona, mientras que la carbamazepina fue resistente al tratamiento debido a los átomos de cloro en su molécula, en el caso de las hormonas la remoción fue mayor al 85 % ya que poseen elevada hidrofobicidad (Luo *et al.*, 2014b).

Casas *et al.* (2015) estudiaron la remoción de fármacos en agua residual hospitalaria, emplearon un tren de tratamiento de tres reactores en serie con un volumen de 3 L, éstos con la finalidad de obtener la mayor remoción de carbono orgánico total en el reactor 1, la nitrificación en el reactor 2 y la remoción de los fármacos en el reactor 3, cada reactor trabajó con un tiempo de residencia hidráulica de 6 h y cada uno estuvo empacado con 500 soportes AnoxKaldnes K5, resultando en una proporción de llenado del 50 %, el mezclado se realizó mediante aireación. Los resultados mostraron que la remoción de los fármacos, materia orgánica y nitrificación ocurrió principalmente en el reactor 1, la degradación de los fármacos ocurrió en paralelo con la remoción de materia orgánica y nitrógeno, indicando que la remoción fue principalmente por cometabolismo. Dentro del grupo de los analgésicos, la remoción de diclofenaco estuvo alrededor del 30 %, el ibuprofeno pudo ser completamente degradado, mientras que la fenazona y el tramadol presentaron remociones menores al 20 %. Las remociones de los  $\beta$ -bloqueadores atenolol, metoprolol, propranolol y sotalol estuvieron entre el 5 y 40 %, las mayores remociones fueron para el atenolol. El antidepresivo venlafaxina obtuvo poca degradación y el citalopram no fue removido.

Luo *et al.* (2015) investigaron la remoción de fármacos en un reactor de lecho móvil, un biorreactor aerobio con membranas sumergidas y un sistema híbrido de reactor de lecho móvil con biorreactor aerobio con membranas sumergidas, los reactores fueron alimentados con agua sintética con una demanda química de oxígeno de  $320\text{-}360 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , nitrógeno amoniacal de  $13\text{-}16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada fármaco. El reactor de lecho móvil tuvo un volumen de trabajo de 40 L, como soportes se emplearon cubos de poliuretano de 2 cm con una proporción de llenado de 20 %, el TRH fue de 6 h. El biorreactor con membranas también trabajó con TRH de 6 h, las membranas fueron de microfiltración con un tamaño de poro de  $0.2 \mu\text{m}$ . El sistema híbrido tuvo TRH de 24 h. Al comparar el desempeño del reactor de lecho móvil con el biorreactor con membranas se observó mayor remoción de algunos fármacos en el reactor de lecho móvil



(carbamazepina, metronidazol, 17 $\alpha$ -etinilestradiol, 17 $\beta$ -estradiol, ketoprofeno, primidona, ácido salicílico, estriol, estrona e ibuprofeno), en cambio el biorreactor con membranas obtuvo mayor remoción de fenoprofeno, diclofenaco, gemfibrozil y acetaminofen. Durante el tratamiento en el sistema híbrido se encontró que los compuestos hidrofóbicos presentaron remociones mayores al 80 %. Los cálculos del balance de masa indicaron que la degradación biológica fue el mecanismo de remoción principal.

## 1.8 MATERIALES DE SOPORTE Y CARACTERÍSTICAS DE LA BIOMASA INMOVILIZADA

Las características de los materiales de soporte influyen en el desempeño de los reactores (Metcalf y Eddy, 2014). La selección de los materiales de soporte en este estudio estuvo basada en el trabajo previo de Mijaylova *et al.* (2008), quienes estudiaron el desempeño de reactores de lecho sumergido aireado para el tratamiento de agua residual doméstica, usaron siete diferentes clases de materiales de empaque con áreas específicas en el intervalo de 760-1200 m<sup>2</sup>·m<sup>-3</sup> (granos de polipropileno, esferas cerámicas, granos de tezontle, granos de polietileno de alta densidad, granos de polietileno de baja densidad, cubos de poliuretano y cintas de polietileno). El estudio concluyó que los mayores TRS (hasta 39 días) fueron obtenidos en los reactores con cintas de polietileno y cubos de poliuretano, ambos soportes poseen alto porcentaje de porosidad del medio (99 %), favorecieron la acumulación de biomasa y presentaron casi 99 % de remoción de nitrógeno amoniacal, razón por la cual, los cubos de poliuretano y las cintas de polietileno se seleccionaron para estudiar la remoción de los fármacos.

Mijaylova *et al.* (2010) reportaron que la biopelícula desarrollada en los reactores con cintas de polietileno es delgada, ésta favorece la difusividad y transferencia de masa en la biopelícula, puede ser completamente penetrada por la materia orgánica, el nitrógeno amoniacal y el oxígeno, proporcionando remociones globales de 69-72 % de nitrógeno total al trabajar con 50-100 % de recirculación del efluente. En el caso de los cubos de poliuretano, la biomasa es retenida de dos formas diferentes: la primera es una biopelícula gruesa sobre la superficie externa, la otra es depositada o atrapada en el interior de los espacios vacíos de los cubos, un gradiente distintivo de oxígeno disuelto ocurre hacia el interior de los cubos, resultando en condiciones anaerobias en la parte profunda del cubo (Guo *et al.*, 2010). El poliuretano tiene muchos poros que proporcionan interespacios en los cuales los microorganismos pueden crecer y facilitan el transporte de compuestos en la biomasa inmovilizada (Quan *et al.*, 2012). Se ha reportado que las bacterias nitrificantes *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* son encontradas en los espacios interiores de la esponja de poliuretano más que dentro de la biopelícula adherida a la superficie, la transferencia de oxígeno también ocurre dentro de los poros (Chu y Wang, 2011). Su estructura porosa permite el establecimiento de una zona anóxica, además permite el almacenamiento de carbono para el proceso de nitrificación-desnitrificación simultánea sin la adición de una fuente de carbono externa, aun cuando se trata agua residual con baja relación DQO/N (Lim *et al.*, 2011). El crecimiento de la biomasa inmovilizada solo puede alcanzar cierta profundidad en el poliuretano, el proceso de nitrificación ocurre bajo condiciones aerobias, por lo tanto la remoción de nitrógeno amoniacal es afectada por el tamaño de los cubos. Se han realizado estudios donde se han probado diferentes tamaños, se ha observado mayor remoción de nitrógeno amoniacal con los cubos más pequeños, debido a la presencia de mayor área específica de superficie externa disponible para el crecimiento de la biomasa. Los estudios muestran que las dimensiones de 1-2 cm tienen el mejor desempeño en términos del crecimiento de la biomasa, remoción de contaminantes como nitrógeno y fósforo total, en comparación con cubos de mayor tamaño (Guo *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2011; Quan *et al.*, 2012).

En las biopelículas delgadas el oxígeno puede penetrar totalmente, mientras que en las biopelículas gruesas, el oxígeno solo puede penetrar aproximadamente hasta 300  $\mu$ m (Flemming *et al.*, 2000), se ha encontrado que el oxígeno penetra completamente en las biopelículas de

menos de 300  $\mu\text{m}$  de grosor (Hibiya *et al.*, 2004). En los sistemas con biodiscos, el oxígeno disuelto decrece a cero alrededor de los 500  $\mu\text{m}$ , la profundidad de la zona aerobia depende del oxígeno suministrado y la tasa de agotamiento, así la biopelícula puede estar estratificada en dos zonas separadas que permiten el proceso de nitrificación-desnitrificación simultánea: la zona aerobia, en la cual ocurre la nitrificación y biodegradación de materia orgánica, la zona anóxica en la cual sucede la desnitrificación y degradación adicional de materia orgánica, la mayor cantidad de nitrógeno amoniacal es oxidado en los 200-400  $\mu\text{m}$  de la biopelícula, la mayor parte del nitrato es generado justo debajo de la zona activa oxidante de amonio (400-800  $\mu\text{m}$ ) (Li y Bishop, 2004). Por otro lado, se ha observado que el grosor de la biopelícula en el intervalo de 200-500  $\mu\text{m}$  no tiene un efecto significativo en la remoción de nitrógeno amoniacal, sin embargo, la producción de nitrato disminuye al disminuir el grosor de la biopelícula a 300  $\mu\text{m}$  o menos, se sugiere que las bacterias nitrato oxidantes en las biopelículas más delgadas se encuentran limitadas de espacio, mientras que las biopelículas más gruesas tienen mayor capacidad para el establecimiento de las bacterias nitrato oxidantes, las bacterias nitrato oxidantes se encuentran localizadas más adentro de la biopelícula que las amonio oxidantes (Piculell *et al.*, 2016).

Una capa de difusión separa la biopelícula del volumen del líquido que fluye sobre la superficie, los sustratos, oxígeno y nutrientes se difunden a través de la capa de difusión hasta penetrar a la biopelícula, los productos de biodegradación de la biopelícula entran al volumen del líquido después de difundirse a través de esta capa (Metcalf y Eddy, 2014). La densidad y grosor de la biopelícula juegan un papel importante en la difusión, una biopelícula densa dificulta la transferencia de oxígeno disuelto, el carbono orgánico y otros compuestos, en una biopelícula densa las microcolonias crecen juntas, por lo cual solo quedan canales de pequeño diámetro en toda la estructura, en general la densidad de la biopelícula incrementa con la profundidad, mientras que la porosidad y diámetro de poro disminuyen con la profundidad, esto conduce a una disminución de la difusividad efectiva de sustratos y nutrientes en la biopelícula, lo cual decrece la actividad metabólica al alcanzar la profundidad en la biopelícula (Wuertz *et al.*, 2008). Además una biopelícula densa limita el espacio para el crecimiento de bacterias como las nitrificantes, a más bajas densidades de la biopelícula, la distancia de transferencia de oxígeno disuelto es mayor y proporciona mayor espacio para el crecimiento de nitrificantes, generalmente la biopelícula formada en cubos de poliuretano con alta carga orgánica volumétrica es compacta y gruesa, un decremento gradual de la carga orgánica causa una reducción del grosor de la biopelícula, la biopelícula formada con bajas cargas orgánicas es delgada y porosa, pero si la carga orgánica es menor de  $2.0 \text{ kgDQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ , algunas partes de la superficie de los soportes no son cubiertas por los microorganismos, se obtiene una remoción de nitrógeno amoniacal de 95 % cuando la carga orgánica es menor de  $3.25 \text{ kgDQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ , pero disminuye cuando la carga excede  $3.5 \text{ kgDQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ , en este estudio también se observó que las bacterias amonio y nitrato oxidantes dominantes fueron *Nitrosomonas* y *Nitrospira* (Quan *et al.*, 2012). Bajo suficiente suministro de oxígeno, la transferencia de contaminantes es considerada el factor limitante para alcanzar altas eficiencias de remoción, por lo tanto, facilitar la transferencia de masa es un método para incrementar el desempeño de los reactores con biomasa inmovilizada (Wei *et al.*, 2012).

Otros estudios han comparado diferentes medios de soporte de la biopelícula en reactores secuenciales por lotes, los soportes tipo Kaldnes (medio de polietileno), Liapor (medio cerámico) y Linpor (medio plástico con alta porosidad). El reactor empacado con soportes Kaldnes obtuvo una transformación completa de nitrógeno amoniacal después de la cuarta hora de aireación. Los reactores empacados con Liapor y Linpor removieron el nitrógeno amoniacal durante las primeras tres horas de reacción aerobia, indicando una fuerte actividad de las bacterias nitrificantes, el reactor empacado con Linpor presentó una mejor nitrificación cuando se incrementó la carga orgánica sobre  $3.0 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ , permitiendo la nitrificación total al final del ciclo, la mejor nitrificación con Linpor estuvo relacionada con el alto tiempo de retención de sólidos (22.9 d), en comparación con Liapor (5.4 d) y Kaldnes (10 d). Los medios Linpor permiten a los

microorganismos crecer dentro del gran número de poros en las partes más profundas del material, por lo que se encuentran mayores cantidades de microorganismos en comparación con Kaldnes y Liapor, además los microorganismos que crecen dentro de Linpor son más resistentes a las fuerzas de corte durante el retrolavado, por lo que se tienen mayores TRS (Valdivia *et al.*, 2007). En otro estudio se comparó el desempeño de dos reactores de lecho móvil, uno empacado con polímero de policaprolactona y uno con soportes de poliuretano, el reactor con polímero de policaprolactona obtuvo hasta 72 y 56 % de remoción de carbono orgánico total y nitrógeno amoniacal, respectivamente, los soportes de poliuretano presentaron mayores remociones, 90 y 65 % respectivamente. Los cubos de poliuretano pertenecen al tipo de medio de soporte Linpor, el cual tiene alta porosidad y es un medio ideal para la inmovilización de la biomasa por su alta área específica (casi  $900 \text{ m}^2\text{-m}^{-3}$ ) (Chu y Wang, 2011).

## 1.9 RECIRCULACIÓN DEL EFLUENTE

El beneficio de la recirculación es la dilución de los compuestos en la corriente del influente, como consecuencia hay una reducción de la demanda química de oxígeno, lo que hace a las bacterias nitrificantes más competitivas, incrementando la eficiencia de la nitrificación y la concentración de oxígeno disuelto en el líquido. La recirculación se usa para incrementar la nitrificación en filtros percoladores de plástico y rocas, cuando se incrementa la tasa de recirculación, se observa un incremento en el desempeño de la nitrificación de 67 % a 87 % (EPA 832-F-00-015). En un reactor con biomasa inmovilizada, el creciente flujo de entrada que resulta de la recirculación ocasiona velocidades más altas del fluido a través del reactor, provocando el desprendimiento de exceso de biopelícula, además se alcanza una distribución más homogénea del sustrato y oxígeno, mejorando la transferencia de masa, la recirculación también aporta ventajas al reducir el tamaño del reactor (Rittman y McCarty, 2001). La hidrodinámica juega un papel importante, mayor velocidad de flujo puede conducir a una mejor transferencia de masa del sustrato a la biopelícula (Wuertz *et al.*, 2008).

En un reactor de membrana con biopelícula se observó que las tasas de degradación son diferentes dependiendo de la recirculación: con un flujo de recirculación de  $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , se presenta la tasa más lenta de consumo de sustrato (acetato de sodio), seguido de un flujo de recirculación de  $120 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , mientras que la mayor tasa de degradación de sustrato se presenta con un flujo de recirculación de  $350 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Se considera que el cambio en la tasa de consumo se debe a un aumento en el coeficiente de transferencia de masa interfacial. Es necesario considerar que al incrementar el flujo de recirculación, se incrementan también los esfuerzos de corte sobre la superficie de la biopelícula, por lo que la biopelícula puede comprimirse ocasionando que sus poros y canales se cierren parcial o totalmente (González-Brambila y López-Isunza, 2008).

Se ha estudiado también el efecto de la recirculación del efluente en el desempeño de un biorreactor aerobio de lecho sumergido, empacado con cintas de polietileno, los resultados indican que no hay un efecto significativo de la recirculación en las eficiencias de remoción de la demanda química de oxígeno y fósforo total. En cambio, la recirculación incrementa las remociones de nitrógeno total, las remociones obtenidas con recirculación fueron 14-20 % más altas que sin recirculación (Mijaylova y Moeller, 2010).

Acerca de la remoción de compuestos farmacéuticos, hacen falta estudios que relacionen el efecto de la carga orgánica, la recirculación del efluente y la diversidad de bacterias en reactores de lecho sumergido aireado con diferentes medios de soporte. De todo lo anterior, se ha planteado que las bajas cargas orgánicas y la recirculación del efluente favorecerán la biodegradación de los fármacos, debido a la mayor transferencia de masa y al incremento en la nitrificación. De acuerdo a otros estudios, una alternativa al problema de contaminación por fármacos es optimizar la nitrificación durante el tratamiento del agua residual, aplicando tiempos

de retención de sólidos mayores a 10 días y tiempos de residencia hidráulica lo suficientemente largos ( $\geq 8$  h) para que las enzimas reaccionen con los compuestos (Sui *et al.*, 2010; Forrez *et al.*, 2011). Se ha sugerido que los tiempos de residencia hidráulica cortos en reactores con biomasa inmovilizada son compensados por la alta concentración de biomasa, así como la mayor capacidad de remoción de fármacos por unidad de volumen (Falås *et al.*, 2012). Otra estrategia para incrementar la biodegradación cometabólica de fármacos es mantener el sustrato de crecimiento (nitrógeno amoniacal) durante el cometabolismo (Tran *et al.*, 2013). Ya se ha demostrado el cometabolismo de compuestos estrogénicos durante la nitrificación, en cambio en el caso de otros fármacos es necesario hacer más estudios para saber a qué grado contribuye la nitrificación en su remoción (Forrez *et al.*, 2011).

Es importante notar que los mecanismos de remoción varían de compuesto a compuesto, por lo que el papel de la biodegradación y la sorción son específicos de cada uno. Se conoce poco acerca de los grupos de bacterias en la contribución individual a la remoción de fármacos, esto es crucial para la optimización de la remoción. Por lo tanto, se requieren aún más estudios para explorar el papel de los diferentes consorcios microbianos en los procesos de biodegradación de fármacos. Parece ser que el proceso de nitrificación por sí mismo no tiene influencia en la biodegradación y que las bacterias que contribuyen son encontradas en biopelículas nitrificantes (Falås *et al.*, 2012), la contribución de los autótrofos y heterótrofos en la biotransformación ha sido evaluada mediante la adición de inhibidores, la nitrificación ha sido suprimida por la adición de alitiourea, un inhibidor de la enzima amonio monooxigenasa, pero también la inhibición de otras bacterias podría ser observada, lo cual puede explicar la reducción en la remoción de fármacos en la presencia de este inhibidor (Falås *et al.*, 2012), por tal razón, es necesario estudiar la contribución de diferentes consorcios microbianos en la biodegradación de los fármacos sin la presencia de inhibidores.

Los lodos activados y los biorreactores con membranas han sido evaluados y estas tecnologías muestran diferentes eficiencias para remover fármacos, mientras la eficiencia de los procesos con biomasa inmovilizada ha sido menos estudiada (Falås *et al.*, 2012; Kovalova *et al.*, 2012; Falås *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2014b; Grandclément *et al.*, 2017). A pesar de los estudios, se conoce poco acerca de la capacidad de los sistemas con biomasa inmovilizada para remover fármacos en aguas residuales municipales, se necesita mayor investigación para encontrar los mecanismos fundamentales que incrementan su remoción, aún a cortos tiempos de residencia hidráulica, favoreciendo las comunidades microbianas responsables de la biodegradación.

## **1.10 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS/MASAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS**

Una técnica utilizada para la determinación de compuestos farmacéuticos a niveles traza es la cromatografía de gases combinada con la espectrometría de masas, este acoplamiento reúne la capacidad de separación que ofrece el cromatógrafo con la sensibilidad y capacidad de aportar información estructural del espectrómetro, mediante esta técnica es posible obtener un espectro de masas de las especies que emergen de la columna cromatográfica (Ternes y Joss, 2006). La cromatografía de gases se basa en la distribución de los analitos entre una fase móvil compuesta por un gas inerte (argón, helio, nitrógeno o hidrógeno), este gas es llamado gas acarreador. La fase estacionaria inmovilizada consiste en una columna cromatográfica, la columna se encuentra en un horno cuya temperatura es controlada, se emplean columnas capilares de sílice fundida con diámetros internos inferiores a 1 mm y varios metros de longitud, frecuentemente entre 12 y 30 metros, la fase estacionaria puede ocupar la totalidad de la columna o depositarse únicamente en la pared interior, la columna se acopla con un puerto de inyección con temperatura y flujo controlado, la muestra es inyectada en la corriente del gas acarreador a una temperatura suficiente para asegurar la vaporización de todos los componentes, la muestra vaporizada es

transportada a través de la columna por el gas acarreador, el gas viaja a lo largo de la columna y sale a través de un detector (Rood, 2007). La técnica está basada en la diferencia de volatilidad de los compuestos, entre más volátil es el compuesto, más rápido alcanzará el final de la columna y la cámara de ionización, algunos parámetros tales como la temperatura, el flujo del gas, tipo y grosor de la fase estacionaria, longitud y diámetro de la columna pueden ser modificados para adoptar un método. La espectrometría de masas proporciona información estructural sobre las moléculas del analito para su identificación, en la espectrometría de masas aparecen dos clases principales de iones, el ion molecular que es la molécula completa del analito y fragmentos iónicos, los cuales contienen solo una parte de la estructura. Las moléculas ionizadas o sus fragmentos son separados de acuerdo a su relación masa carga ( $m/z$ ) en los campos eléctrico y/o magnético. El espectro de masas obtenido de los analitos o sustancias desconocidas bajo condiciones analíticas definidas son específicas para cada sustancia (Ternes y Joss, 2006). En el análisis de masas/masas ( $MS/MS$ ), de una mezcla de iones generados o colectados, se seleccionan aquellos iones que tienen un valor  $m/z$  particular, esta es la primera parte del análisis. Estos iones son fragmentados y los productos de la fragmentación son analizados en una segunda etapa del análisis de masas. Si la muestra original es una mezcla, la segunda etapa de  $MS$  puede usarse para obtener un espectro de masas para cada componente en la mezcla.  $MS/MS$  puede también usarse para eliminar interferencias en experimentos de monitoreo selectivo de iones donde se producen varias señales de iones de una  $m/z$  específica (Plascencia, 2003).

### **1.10.1 Extracción en fase sólida (EFS)**

En general, la extracción en fase sólida puede ser usada para tres propósitos:

- Concentración del analito.
- Remoción de componentes interferentes.
- Cambio de la matriz del analito según sea necesario para el análisis subsecuente.

Se emplean cartuchos de extracción (sorbente), los materiales de los cartuchos son polímeros constituidos por sílica o resinas orgánicas. Weigel *et al.* (2004) evaluaron siete sorbentes poliméricos de extracción en fase sólida (Bakerbond SDB-1, Lichrolut EN, Isolute Env+, Chromabond HR-P, Chromabond EASY, Absolut Nexus y Oasis HLB) con respecto a su habilidad para extraer fármacos ácidos, neutros y básicos simultáneamente del agua a pH neutro. Los mejores resultados se obtuvieron mediante cartuchos Oasis HLB, las recuperaciones cuantitativas fueron mayores al 83 %. El sorbente Oasis HLB es un copolímero hecho de dos monómeros con balance hidrofílico-lipofílico, el hidrofílico N-vinilpirrolidona y el lipofílico divinilbenzeno con partículas de 30  $\mu\text{m}$  y diámetro de poro de 84 Å. La Figura 1.5 muestra la estructura del material de los cartuchos, una de las características de estos cartuchos es la retención de un amplio rango de compuestos tanto polares como no polares, proporcionando altas y reproducibles recuperaciones para compuestos ácidos, básicos y neutros, además, este tipo de cartuchos retienen fuertemente los analitos ionizados (Huetos, 2004).

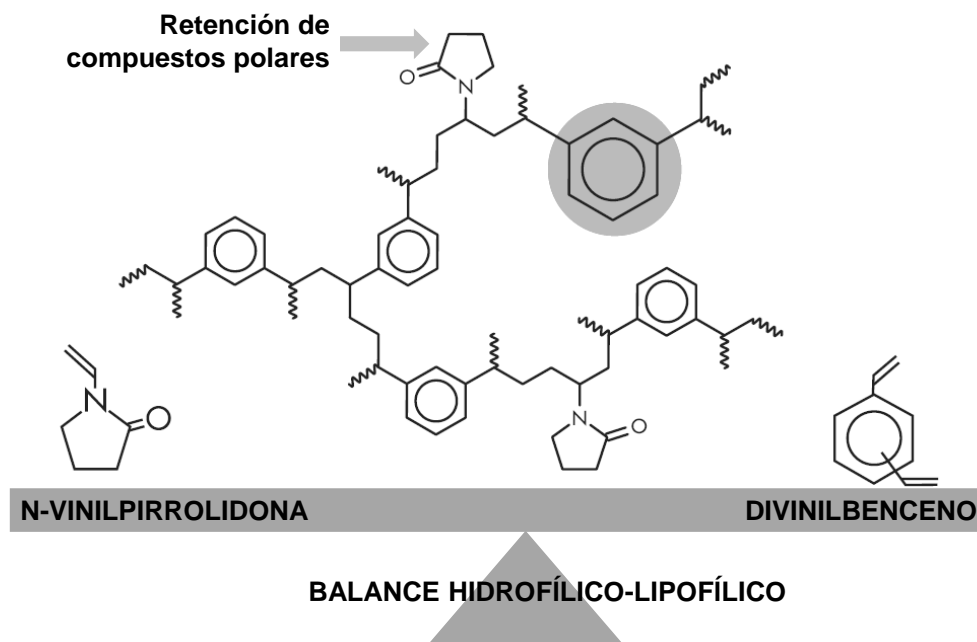


Figura 1.5. Estructura de los cartuchos OASIS HLB

### 1.10.2 Derivatización

La derivatización es un proceso químico que modifica las moléculas, especialmente las que contienen grupos funcionales polares. Las moléculas que contienen grupos tales como  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}$  son capaces de formar puentes de hidrógeno, por lo cual decrece su volatilidad, la derivatización consiste en sustituir la función polar de las moléculas gracias al agente derivatizante. Los métodos de derivatización pueden ser clasificados en cuatro grupos principales de acuerdo a los reactivos usados, sililación, acetilación, derivados de pentafluorobencilo y metilación (Ternes y Joss, 2006). La sililación es la técnica más ampliamente empleada para analizar fármacos que contienen grupos funcionales amino, tales como el ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol, comúnmente se usa MSTFA (*N*-Metil-*N*-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) y BSTFA (*N*,*O*-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida), sus fórmulas químicas se presentan en la Figura 1.6 (Jones *et al.*, 2003; Azzous *et al.*, 2010). Mediante la sililación, el hidrógeno del grupo ácido y amino es reemplazado por el grupo trimetilsilil, las aminas secundarias y los grupos hidroxilo de los compuestos generalmente no se derivatizan por MSTFA o BSTFA solo, aunque cuando se agrega un catalizador como trimetilclorosilano (TMCS), algunos de estos compuestos pueden ser derivatizados satisfactoriamente, el TMCS es el reactivo catalizador principal para la trimetilsililación de aminas, ácidos carboxílicos y fenoles (Bisceglia *et al.*, 2010).

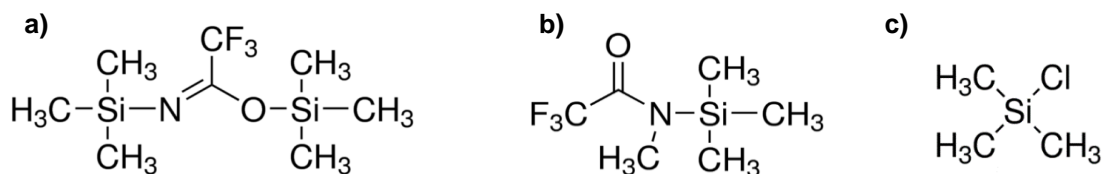


Figura 1.6. Estructura de los derivatizantes: a) BSTFA; b) MSTFA; c) TMCS

### 1.10.3 Método analítico en sólido

Los fármacos que son sorbidos y permanecen en el lodo de los reactores pueden ser extraídos mediante un método de extracción con solventes bajo tratamiento ultrasónico. En esta extracción sólido/líquido, un solvente orgánico es agregado a la muestra sólida y la extracción toma lugar bajo tratamiento ultrasónico. Esta técnica está basada en el efecto de cavitación, resultado del colapso de las burbujas de gas, lo cual produce pulsos de presión en el disolvente arriba de 500 bar. Usualmente, la muestra es extraída varias veces por un mezclado vigoroso con tratamiento ultrasónico por algunos minutos. El lodo líquido resultante es centrifugado y la fase orgánica sobrenadante es colectada y reducida en volumen por evaporación, posteriormente la muestra recibe el mismo tratamiento de las muestras líquidas (Ternes y Joss, 2006). La Figura 1.7 muestra los principales pasos para el análisis de fármacos.

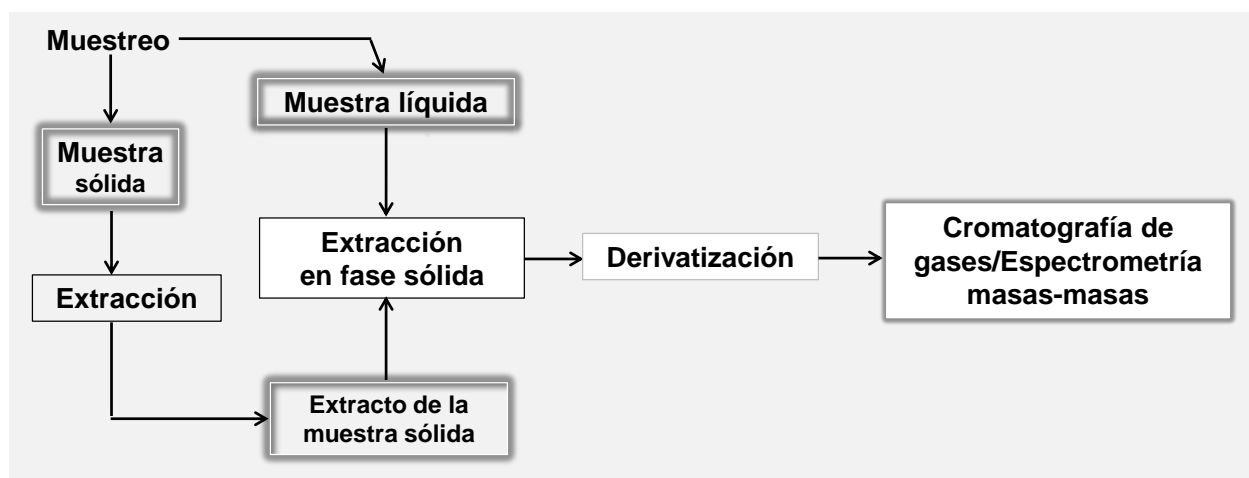


Figura 1.7. Pasos para el análisis de compuestos farmacéuticos

### 1.11 SECUENCIACIÓN Y DIVERSIDAD MICROBIANA

Los cambios en la comunidad microbiana de la biomasa inmovilizada pueden mostrar las condiciones que benefician la remoción de los fármacos en aguas residuales municipales. Los procesos con baja carga tienden a favorecer el desarrollo de bacterias de lento crecimiento, cuando se trabajan cargas orgánicas bajas, los microorganismos heterótrofos tienen menos sustrato para crecer y en la presencia de nitrógeno amoniacal, las condiciones son favorables para el crecimiento de bacterias nitrificantes que pueden beneficiar la remoción de los fármacos (Falås *et al.*, 2012). Al aumentar la carga orgánica, se reduce el tiempo de retención de sólidos y también la capacidad de las bacterias nitrificantes para desarrollarse en el medio, los microorganismos heterótrofos tienen más sustrato para crecer, beneficiando su mayor actividad respecto a las bacterias autótrofas (Quan *et al.*, 2012). Por lo tanto, si se desean altas poblaciones de microorganismos heterótrofos, se debe incrementar la tasa de flujo para permitir solo el establecimiento de microorganismos de rápido crecimiento (Wuertz *et al.*, 2008). De acuerdo a un estudio previo en reactores de lecho sumergido aireado, al aplicar cargas orgánicas en el intervalo de 0.8 a 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> se pueden obtener tiempos de retención de sólidos entre 10 y 39 días, favoreciendo el desarrollo de bacterias de lento crecimiento (Mijaylova *et al.*, 2008). Al identificar las diferencias en las comunidades bacterianas desarrolladas bajo diferentes condiciones de operación de los reactores, se pueden explicar las variaciones en la remoción de nutrientes y la remoción de los fármacos.

El dominio de las Bacterias junto con las Archaeas son consideradas los entes “vivos” más pequeños, una característica importante de las bacterias es la enorme variedad de fuentes de

energía que pueden usar para su crecimiento y mantenimiento (Rittman y McCarty, 2001). Las bacterias pueden usar tres tipos de fuentes de energía: compuestos orgánicos (metabolismo quimioheterótrofo), compuestos inorgánicos (metabolismo quimioautótrofo) y energía radiante (metabolismo fotosintético). En general, una sola especie no usa más de un tipo de fuente de energía y por esta razón, las bacterias frecuentemente son clasificadas como quimioheterótrofas, quimioautótrofas o fotosintéticas. En el metabolismo quimioheterótrofo, los materiales orgánicos sirven como fuente de energía y fuente de carbono. En el metabolismo quimioautótrofo los microorganismos son capaces de usar CO<sub>2</sub> como fuente de carbono, los microorganismos fotosintéticos obtienen su energía para crecimiento de la luz y su carbono de CO<sub>2</sub> o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (WEF, 2010). El filo es la subdivisión básica de las bacterias, la filogenia de las bacterias se desarrolla a partir de la elaboración de árboles filogenéticos moleculares, especialmente basados en los genes (genoma), los filos se dividen en clases, las clases se dividen en órdenes, los órdenes en familias, las familias en géneros y los géneros en especies (Tortora *et al.*, 2007). Por ejemplo, la distribución filogenética de las bacterias amonio oxidantes, ubica a los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrospira* dentro de la clase  $\beta$ -*Proteobacteria* y el filo *Proteobacteria*. Las bacterias nitrito oxidantes del género *Nitrobacter* se encuentran dentro de la clase  $\alpha$ -*Proteobacteria*, el género *Nitrococcus* y *Nitrospina* dentro de la clase  $\gamma$ -*Proteobacteria*, mientras que el género *Nitrospira* se encuentra dentro de la clase  $\delta$ -*Proteobacteria* (Metcalf y Eddy, 2014).

La extracción de ADN de la biomasa se ha empleado para la identificación de microorganismos en lodos activados y biopelículas (Wuertz *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). El ADN son las siglas del ácido desoxirribonucleico, representa el lenguaje que utilizan las células para crecer, multiplicarse y realizar determinadas funciones. El ADN consta de una cadena de nucleótidos, cada nucleótido está formado por la unión de tres fragmentos, un carbohidrato de la familia de las pentosas, una molécula de fosfato que se une a la pentosa y una tercera molécula que contiene nitrógeno y se denomina base nitrogenada, esta última también se une al carbohidrato. Lo que distingue genéticamente a un microorganismo de otros es el orden o secuencia de las bases nitrogenadas en las cadenas de ADN. La estructura de los genes está formada por fragmentos de ADN, por lo tanto un gen es un fragmento (o secuencia) de ADN, el conjunto de genes de un organismo forma un genoma, cada secuencia de ADN contenida en los genes es responsable de que la célula realice una función concreta. Entre los métodos de identificación de microorganismos se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), esta reacción permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN, lo que hace posible multiplicar la cantidad de ADN presente en una muestra, así se obtiene la cantidad suficiente que permita deducir si corresponde a algún tipo de microorganismo. Por otro lado, la secuenciación de ADN es una técnica que permite determinar el orden de las bases nitrogenadas en el material genético, entendiéndose como tal un fragmento de ADN, ARN, un gen o incluso el genoma completo de un organismo, cuando se habla de secuencia de ADN se refiere a la secuencia de nucleótidos y por consiguiente, al orden de las bases nitrogenadas (Duque, 2010).

La pirosecuenciación es una tecnología para la determinación de secuencias de ADN, ha mostrado excelente exactitud y precisión en los análisis de fragmentos de ADN (Fakruddin *et al.*, 2012). La pirosecuenciación es una herramienta eficiente para identificar la comunidad microbiana de los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Ye *et al.* (2011) emplearon la plataforma de pirosecuenciación 454 para el estudio de la comunidad microbiana de dos procesos, un reactor nitrificante a escala laboratorio y una planta de tratamiento de aguas residuales a gran escala (proceso anóxico-aerobio-anóxico-aerobio), ambos alimentados con agua residual salina. Se pudo observar que la comunidad microbiana fue diferente en cada proceso, la diversidad de bacterias en la planta de tratamiento fue más compleja que en el reactor nitrificante, aunque algunos géneros de bacterias halotolerantes como *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Aequorivita* y *Muricauda* estuvieron presentes solo en el reactor nitrificante. En



ambos procesos, las bacterias heterótrofas fueron dominantes sobre las bacterias autótrofas, las familias principales fueron *Phyllobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Comamonadaceae*, mientras que los géneros de bacterias nitrificantes dominantes fueron *Nitrosomonas* y *Nitrospira*. Quan *et al.* (2012) también emplearon la pirosecuenciación 454 para analizar la diversidad microbiana en biopelículas desarrolladas en cubos de poliuretano, los reactores de lecho móvil fueron alimentados con agua residual sintética con las características de un agua residual municipal, los tres filos dominantes encontrados fueron *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Verrucomicrobia*, la mayor abundancia relativa de las bacterias amonio y nitrito oxidantes se encontró a una mayor tasa de empaque del reactor (30-40 % en comparación a 20 %), indicando el desarrollo de las bacterias nitrificantes en la biomasa inmovilizada, sus géneros dominantes fueron *Nitrosomonas* y *Nitrospira* respectivamente.

Los métodos de Secuenciación de Nueva Generación tales como MiSeq de Illumina, proporcionan un modo directo para determinar bacterias, incluso aquellas especies de baja abundancia, estos métodos tienen como principal fundamento determinar múltiples secuencias cortas de un modo paralelo, produciendo millones de lecturas al mismo tiempo, permiten obtener genomas completos de organismos. MiSeq de Illumina es una plataforma de secuenciación masiva optimizada para un proceso de lectura de secuencias de ADN, la tecnología de secuenciación MiSeq ha sido empleada para identificar la diversidad microbiana en lodos activados y reactores con biopelícula (Ma *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Ma *et al.* (2015) emplearon MiSeq de Illumina para estudiar la comunidad microbiana en nueve plantas de tratamiento de aguas residuales de coque, las plantas operaron con diferentes procesos, tales como anaerobio-óxico (A/O), anaerobio-anóxico-óxico (A/A/O), anaerobio-óxico-óxico (A/O/O), A/A/O/O y A/O/A/O. El filo más abundante en las nueve plantas fue *Proteobacteria*, su abundancia estuvo en un rango de 65.18-90.38 %.  $\beta$ -*Proteobacteria* fue la clase principal (26.14-59.69 %), seguido de  $\alpha$ -*Proteobacteria* (10.3-26.45 %) y  $\gamma$ -*Proteobacteria* (5.50-18.66 %). Otras clases sobresalientes fueron *Clostridia*, *Sphingobacteria*, *Acidobacteria*\_GP4 y *Actinobacteria*. Las familias más abundantes fueron *Hydrogenophilaceae*, *Rhodocyclaceae* y *Comamonadaceae*. *Thiobacillus* y *Comamonas* fueron los géneros principales. Dentro de las bacterias amonio oxidantes, los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrospira* fueron los más importantes, aunque sus porcentajes de abundancia fueron menores al 1 %. MiSeq de Illumina se ha empleado también para el estudio de biopelículas desarrolladas en un reactor de lecho móvil con soportes plásticos, alimentado con agua residual sintética con una demanda química de oxígeno de  $390 \pm 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{N-NH}_4$  de  $40 \pm 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . En las biopelículas maduras se encontraron los filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, sus abundancias fueron de 30.5 %, 25.6 % y 22.2 %, respectivamente. Además el porcentaje de bacterias filamentosas alcanzó 37.8 % e incluyó *Actinobacteria*, *TM7*, *Haliscomenobacter* y *Sphaerotilus* (Zhu *et al.*, 2015). Tang *et al.* (2016) usaron también la plataforma de secuenciación MiSeq para la determinación de la comunidad microbiana de la biopelícula en un reactor de lecho móvil, se emplearon soportes de polipropileno en forma poliédrica, con el objetivo de mostrar su variación dinámica a través del tiempo de operación. Después de 7 días de alimentación con agua residual sintética, *Bacilli* fue la clase dominante (14.11 %), seguido de  $\alpha$ -*Proteobacteria* (13.17 %) y *Clostridia* (11.08 %). Después de 28 días,  $\gamma$ -*Proteobacteria* fue la clase dominante (51.48 %), seguido de  $\alpha$ -*Proteobacteria* (18.79 %) y  $\beta$ -*Proteobacteria* (8.56 %). Wang *et al.* (2016) también usaron la plataforma MiSeq de Illumina para analizar las comunidades microbianas de dos tipos de reactores (reactor anammox y reactor de nitrificación parcial), el filo y la clase dominante en el reactor anammox fue *Proteobacteria* (70.4 %) y  $\beta$ -*Proteobacteria* (66.3 %) respectivamente, mientras que los géneros dominantes fueron *Thauera*, *Dechloromonas* y *Nitrosomonas*. El filo dominante en el reactor de nitrificación parcial fue *Bacteroidetes* (52.2 %), la clase dominante fue *Sphingobacteria* (47.3 %) y los géneros fueron *Nitrosomonas*, *Thauera* y *Denitratisoma*.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

Es posible lograr la remoción de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol vía su biodegradación en reactores con biomasa inmovilizada, empleando medios de soporte que favorecen altos tiempos de retención de sólidos y el proceso de nitrificación.

El tipo de soporte y las condiciones de operación del reactor influyen en la composición del consorcio microbiano, por ende sobre la remoción de los fármacos.

### 2.2 Objetivo General

Determinar la remoción del ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol mediante reactores de lecho sumergido aireado con biomasa inmovilizada sobre diferentes medios de soporte.

### 2.3 Objetivos Específicos

- Evaluar la remoción del ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol mediante diferentes consorcios microbianos (amonio-nitrito oxidante, nitrito oxidante y bacterias heterótrofas).
- Comparar el desempeño de dos materiales de soporte de la biomasa en la remoción de los fármacos (cintas de polietileno y cubos de poliuretano) en reactores de lecho sumergido aireado.
- Determinar el efecto de los parámetros operacionales (carga orgánica, tiempo de retención de sólidos y recirculación del efluente) sobre la remoción de los compuestos farmacéuticos.
- Analizar la influencia de la nitrificación sobre la remoción de los fármacos en las diferentes condiciones de operación.
- Determinar las cinéticas de remoción y coeficientes de sorción de los fármacos en los reactores con biomasa inmovilizada.
- Investigar la contribución de la biodegradación y sorción en la remoción de los fármacos mediante reactores de lecho sumergido aireado.

### 2.4 Alcances

Se estudió la remoción de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol por tres diferentes consorcios microbianos (amonio-nitrito oxidante, nitrito oxidante y bacterias heterótrofas) y en reactores de lecho sumergido aireado, utilizando dos tipos de soporte (cubos de poliuretano y cintas de polietileno). Se trabajó con un agua residual real, fortificada con los compuestos farmacéuticos en concentraciones similares a las reportadas en aguas residuales municipales.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE LODO ACTIVADO

Se evaluó la biodegradación de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol en tres consorcios microbianos: consorcio amonio-nitrito oxidante, consorcio nitrito oxidante y bacterias heterótrofas. Los consorcios fueron enriquecidos a partir de biomasa proveniente de un reactor nitrificante-desnitrificante, se utilizaron tres reactores secuenciales por lotes, cada uno con un volumen efectivo de 10 L (Figura 3.1a), cada reactor fue inoculado con 10 L del lodo activado ( $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  SSVLM). Los ciclos de operación fueron de 24 h (23 h de aireación y 1 h de sedimentación, descarga del agua y alimentación), los reactores fueron operados sin extracción de lodo para evitar pérdidas de biomasa.

Se aplicaron diferentes estrategias de alimentación para cada reactor. La biomasa amonio-nitrito oxidante se obtuvo alimentando el primer reactor con sulfato de amonio como fuente de energía, la biomasa nitrito oxidante se obtuvo alimentando el segundo reactor con nitrito de sodio, la biomasa heterótrofa en el tercer reactor se alimentó con metanol como fuente de carbono y energía. La aireación en los reactores con biomasa amonio y nitrito oxidante fue suficiente para mantener una concentración de oxígeno disuelto (OD) superior a  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , el aumento de la concentración de OD puede acelerar la nitrificación, facilitando la alimentación de las bacterias nitrificantes (Gerardi, 2002; EPA, 2002).

Las bacterias autótrofas usan una fuente de carbono inorgánica ( $\text{CO}_2$ ), el dióxido de carbono es consumido en la forma de alcalinidad de bicarbonato (Gerardi, 2006), así la fuente de carbono en los dos primeros reactores (amonio y nitrito oxidante) fue suministrada como bicarbonato de sodio. En el caso del consorcio amonio-nitrito oxidante, el pH es un factor importante en la actividad nitrificante debido a la reducción de la alcalinidad durante la oxidación de nitrógeno amoniacal, la alcalinidad actúa como un buffer para prevenir los cambios en el pH. Al oxidarse el nitrógeno amoniacal, se produce ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), por lo tanto, para que pueda llevarse a cabo una buena nitrificación es esencial que el medio sea tamponado adecuadamente para contrarrestar su tendencia a acidificarse. Las bacterias nitrificantes prefieren la alcalinidad proporcionada por los bicarbonatos, por lo tanto, se adicionó la cantidad requerida de bicarbonato de sodio para evitar el decremento del pH en el reactor. Se tomó en cuenta que existe un modelo que indica que  $8.64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) son utilizados por cada  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de nitrógeno amoniacal oxidado (EPA, 2002), también se consideró que aproximadamente  $7.14 \text{ mg}$  de alcalinidad teórica como  $\text{CaCO}_3$  son destruidos por miligramo de iones amonio oxidados a nitritos (Gerardi, 2002; Metcalf y Eddy, 2014).

La fuente de carbono de las bacterias heterótrofas es orgánica, el reactor con la biomasa heterótrofa se alimentó con metanol como fuente de carbono. Para evitar la nitrificación en este reactor, la concentración de OD se mantuvo por debajo de  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ambos tipos de bacterias (autótrofas y heterótrofas) necesitan captar una serie de elementos químicos llamados macronutrientes (C, H, O, N, P, S, K, Mg) y micronutrientes o elementos traza (Cu, Zn), incluso el género *Nitrobacter* de las bacterias nitrito oxidantes es incapaz de oxidar nitrito en la ausencia de fosfatos (Van Hulle *et al.*, 2010), la composición del agua sintética usada para el enriquecimiento de los tres consorcios se muestra en la Tabla 3.1 (no se adicionaron los compuestos farmacéuticos), se tomó en cuenta que la biomasa utilizada para las pruebas de biodegradabilidad puede ser preacondicionada a las condiciones experimentales como la alimentación, pero no debe ser preadaptada a la sustancia de prueba como los fármacos (EPA 712-C-98-076).

**Tabla 3.1.** Composición del agua residual sintética

Compuesto	Amonio-nitrito oxidante <sup>e</sup>	Nitrito oxidante <sup>b, c, d</sup>	Heterótrofas <sup>a</sup>
	Concentración, mg·L <sup>-1</sup>		
CH <sub>3</sub> OH	–	–	850
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500-1600	–	200
NaNO <sub>2</sub>	–	350-750	–
NaHCO <sub>3</sub>	1000-3500	250	–
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200	300	100
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200	300	100
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	90	125	50
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3	10	10
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	40	80	50
EDTA · 2H <sub>2</sub> O	5	10	5
ZnSO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5
CuSO <sub>4</sub>	3	2.5	–

**Referencias:** <sup>a</sup> Li y Bishop, 2004; <sup>b</sup> Spieck y Bock, 2005; <sup>c</sup> Nogueira y Melo, 2006; <sup>d</sup> Spieck y Lipski, 2011; <sup>e</sup> Torres y Buitrón, 2012.

Las bacterias nitrificantes son muy sensibles al pH, el género *Nitrosomonas* tiene un pH óptimo entre 7.0 y 8.0, mientras que el intervalo de pH óptimo para el género *Nitrobacter* es 7.5 a 8.0 (EPA, 2002), por lo tanto, se midió el pH del agua de alimentación en los reactores, el pH promedio del agua sintética de alimentación al reactor amonio-nitrito oxidante fue de  $7.54 \pm 0.42$ ; en el reactor nitrito oxidante fue de  $7.36 \pm 0.19$  y el pH del reactor con biomasa heterótrofa fue de  $6.89 \pm 0.18$ . Las bacterias nitrificantes crecen óptimamente a temperaturas entre 25-30 °C, la temperatura de crecimiento del género *Nitrosomonas* es 5-30°C y 5-40°C para *Nitrobacter* (Gerardi, 2002). Los tres reactores fueron operados a temperatura ambiente (21-30 °C).

El enriquecimiento de los tres consorcios fue inferido a través de las actividades de las bacterias amonio oxidantes, nitrito oxidantes y heterótrofas. Durante el enriquecimiento del reactor amonio-nitrito oxidante, la concentración de nitrógeno amoniacal en el influente fue incrementada gradualmente desde 100 hasta 350 mgN-NH<sub>4</sub>·L<sup>-1</sup>. La concentración de nitrógeno de nitritos en el influente se incrementó de 250 a 495 mgN-NO<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup> en el reactor nitrito oxidante. En el reactor con biomasa heterótrofa la demanda química de oxígeno (DQO) del influente estuvo en el intervalo de 1215-1298 mg·L<sup>-1</sup>. Para determinar la actividad de la biomasa, se midió el consumo de N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub>, así como la producción de N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> en los reactores amonio y nitrito oxidantes, la DQO fue determinada en el reactor heterótrofo. Los sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) fueron determinados una vez a la semana en los tres reactores; el pH y la temperatura fueron medidos diariamente. La Tabla 3.2 muestra los métodos de análisis para el seguimiento del proceso. Para permitir el enriquecimiento de los consorcios, los reactores fueron operados hasta que se alcanzó la estabilización del proceso, indicado por porcentajes de

remoción de N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub> y DQO constantes y mayores del 90 %. Una vez alcanzada la estabilización, la biomasa fue usada para las pruebas de biodegradabilidad.

**Tabla 3.2.** Métodos de análisis para el seguimiento del proceso

Parámetro	Método
Temperatura	Potenciométrico
pH	Potenciométrico
OD	Electrodo
DQO	Espectrofotométrico (HACH)
N-NH <sub>4</sub> , N-NO <sub>2</sub> , N-NO <sub>3</sub>	Espectrofotométrico (HACH)
SST, SSV	Gravimétrico

### 3.2 PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD

Los consorcios amonio-nitrito oxidante, nitrito oxidante y bacterias heterótrofas fueron usados para llevar a cabo las pruebas de biodegradabilidad del ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol. Las pruebas de biodegradabilidad fueron realizadas en lote, se usaron botellas ámbar de 500 mL, cada botella fue llenada con 450 mL de agua residual sintética esterilizada (Tabla 3.1) y 50 mL de biomasa (inóculo) para obtener una concentración de biomasa de casi 400 mgSSV·L<sup>-1</sup>, de acuerdo a otros estudios, se ha observado que a mayor concentración de microorganismos agregados inicialmente al medio de prueba, menor será la variación entre las réplicas (EPA 712-C-98-076).

El agua sintética para la biomasa amonio-nitrito oxidante tuvo una concentración inicial de 150.5 mgN-NH<sub>4</sub>·L<sup>-1</sup>, el agua para la biomasa nitrito oxidante tuvo 400 mgN-NO<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup> y el agua para la biomasa heterótrofa tuvo una concentración inicial de 593 mgDQO·L<sup>-1</sup>. Los fármacos fueron adicionados al agua sintética para obtener concentraciones de 10 µg·L<sup>-1</sup>, para ello se prepararon soluciones madre de 1000 µg·mL<sup>-1</sup> de cada uno de los fármacos, las cuales fueron mantenidas a temperatura menor a 4°C, el ácido mefenámico y el metoprolol fueron disueltos en metanol y la fluoxetina en acetona. Los compuestos farmacéuticos fueron comprados a Sigma Aldrich, los números CAS fueron: ácido mefenámico (61-68-7), clorhidrato de fluoxetina (56296-78-7) y tartrato de metoprolol (56392-17-7).

Las botellas fueron incubadas a 30°C y mantenidas en agitación en un agitador orbital a 80 rpm (Figura 3.1b). El pH del medio se mantuvo entre 7.0-7.5 y se le suministró aire suficiente con la finalidad de mantener oxígeno en el medio. Se evaluaron diez tiempos de degradación (diez pruebas en duplicado), se tomaron las muestras a intervalos de 48 h durante los primeros 12 días y cada 96 h durante los siguientes 12 días, dos botellas fueron extraídas y sacrificadas para el análisis en cada tiempo de degradación. Se prepararon tres controles (en duplicado) para cada biomasa: 1) agua residual sintética con los compuestos farmacéuticos, 2) agua residual sintética (sin fármacos) y biomasa para asegurar la actividad microbiana, y 3) biomasa inactiva con los compuestos farmacéuticos (controles de sorción).



**Figura 3.1. Pruebas de biodegradabilidad.**

a) Consorcios microbianos en los reactores; b) Botellas ámbar en agitación

Se midió la concentración de los fármacos en la fase líquida y sólida (biomasa), los promedios fueron reportados y finalmente se realizó el balance de masa considerando la concentración de los fármacos en las dos fases. Para la cuantificación de los fármacos se utilizó un cromatógrafo de gases con trampa iónica VARIAN CP-3800 acoplado a un espectrómetro de masas/masas VARIAN SATURN 2200. El Anexo 1 contiene el desarrollo y validación de la técnica analítica. Además del seguimiento a las concentraciones de los fármacos, se midió la concentración de N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub> y DQO para evaluar la actividad de la biomasa, el consumo de N-NH<sub>4</sub> y N-NO<sub>2</sub>, así como la producción de N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> fueron determinados en las pruebas con la biomasa amonio-nitrito oxidante y nitrito oxidante. Para la biomasa heterótrofa fue medida la DQO.

### 3.3 CINÉTICAS DE BIODEGRADACIÓN

Se usó un modelo cinético de pseudo-primer orden para describir la remoción de los fármacos. Pseudo-primer orden se refiere a la proporcionalidad de la concentración del contaminante con la concentración de la biomasa (Joss *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2009; Suarez *et al.*, 2010; Dawas *et al.*, 2014), la disminución de la concentración del compuesto puede expresarse como:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{biol} X_{SSV} C \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$k_{biol}$  = constante de degradación, L·gSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>

$X_{SSV}$  = concentración de sólidos suspendidos volátiles, gSSV·L<sup>-1</sup>

$C$  = concentración del compuesto, µg·L<sup>-1</sup>

Los resultados obtenidos de las pruebas de biodegradabilidad fueron ajustados a pseudo primer orden graficando  $\ln(C/C_0)$  contra  $t$ , se realizó una regresión lineal para obtener los valores de  $R^2$ . Las gráficas fueron hechas con los resultados del balance de masa, donde se consideró la cantidad de los fármacos determinada en la fase líquida y la biomasa, así se tomó en cuenta la fracción biodegradada del ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol. Para determinar  $k_{biol}$ , cada pendiente fue dividida entre la concentración de SSV. Pseudo primer orden es frecuentemente usado para modelar la biodegradación de microcontaminantes, a pesar del hecho de que este modelo descarta el efecto de la actividad de la biomasa y no relaciona la degradación de los microcontaminantes con el sustrato primario (Urase y Kikuta 2005; Joss *et al.*, 2006; Helbling *et al.*, 2012; Dawas *et al.*, 2014; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012, 2014, 2016). Fernández-Fontaina

*et al.*, (2014) aplicaron un modelo cinético cometabólico tipo Monod para la biotransformación de microcontaminantes orgánicos en biomasa nitrificante, lo compararon con el modelo cinético de pseudo primer orden. En comparación con pseudo primer orden, el modelo cometabólico fue capaz de ajustarse mejor para ibuprofeno y naproxeno, por el contrario, la eritromicina, roxitromicina, galaxolida, tonalida, fluoxetina y sulfametoxazol se ajustaron mejor al modelo cinético de pseudo primer orden.

### 3.4 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE SORCIÓN ( $K_d$ )

#### 3.4.1 Determinación del tiempo equilibrio

Se alcanza una distribución definida del sorbente entre la fase sólida y líquida después de cierto tiempo de contacto (tiempo de equilibrio). Para determinar el tiempo necesario en establecer el equilibrio de la concentración de los fármacos en las fases líquida y sólida se empleó biomasa inactiva de cada uno de los tres consorcios microbianos. La biomasa fue inactivada adicionando  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Hg}_2\text{SO}_4$ , el tiempo de exposición fue de 24 h, después la biomasa se enjuagó varias veces con agua para eliminar el compuesto tóxico. Las pruebas se realizaron por duplicado en botellas ámbar de 500 mL, se empleó una solución de 450 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.01 M como fase líquida con una concentración de  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada fármaco, se adicionaron 50 mL de biomasa inactiva para obtener una concentración de SST de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  en cada botella, las botellas fueron mantenidas en agitación a 120 rpm en un agitador orbital. Se tomaron las muestras después de tiempos de exposición definidos (1, 3, 6, 12, 24 y 48 h), el equilibrio es indicado por valores constantes de compuesto con respecto al tiempo.

#### 3.4.2 Coeficiente de sorción

Una vez determinado el tiempo de equilibrio, se realizaron las pruebas para las isothermas de sorción utilizando la biomasa inactiva. Se usaron botellas ámbar con una solución de  $\text{CaCl}_2$  0.01M,  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de SST y seis diferentes concentraciones de los fármacos (0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 y  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Las pruebas se llevaron a cabo por duplicado, las botellas fueron agitadas a 120 rpm con un agitador orbital durante 24 h (tiempo de equilibrio). La cantidad del compuesto sorbido en la biomasa se calculó como la diferencia entre la cantidad de compuesto inicialmente presente en solución y la cantidad restante al final del experimento:

$$q_e = \frac{x}{m} = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

$q_e$ = concentración sorbida del compuesto después del equilibrio,  $\mu\text{g}_{\text{contaminante}}\cdot\text{g}_{\text{lodo}}^{-1}$

$x$  = masa sorbida,  $\mu\text{g}$

$m$  = masa del lodo, g

$C_0$ = concentración inicial del compuesto en la fase líquida,  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

$C_e$ = concentración final en la fase líquida del compuesto en equilibrio,  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

$V$  = volumen de la solución, L

Se obtuvieron las isotermas de sorción empleando un modelo lineal para determinar el coeficiente de distribución sólido-agua  $K_d$ , se empleó el modelo de Freundlich:

$$q_e = \frac{x}{m} = K_f C_e^{1/n} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

$K_f$  = factor de capacidad de Freundlich,  $(\mu\text{g}_{\text{compuesto}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{lodo}})(\text{L}_{\text{agua}} \cdot \mu\text{g}^{-1}_{\text{compuesto}})^{1/n}$   
 $1/n$  = parámetro de intensidad de Freundlich

La expresión más simple del equilibrio de sorción es la isoterma de sorción lineal, una forma especial de la isoterma de Freundlich que ocurre cuando el valor de  $n$  es 1. Cuando el valor de  $n$  es la unidad, el modelo de Freundlich se convierte en un modelo de sorción lineal simple, el cual describe la sorción como la partición entre las fases líquida y sólida (Zhao *et al.*, 2008). La isoterma lineal es válida para especies disueltas que están presentes a una concentración menor que la mitad de su solubilidad como es el caso de los compuestos farmacéuticos en estudio (Ternes y Joss, 2006). La isoterma de sorción lineal es expresada como:

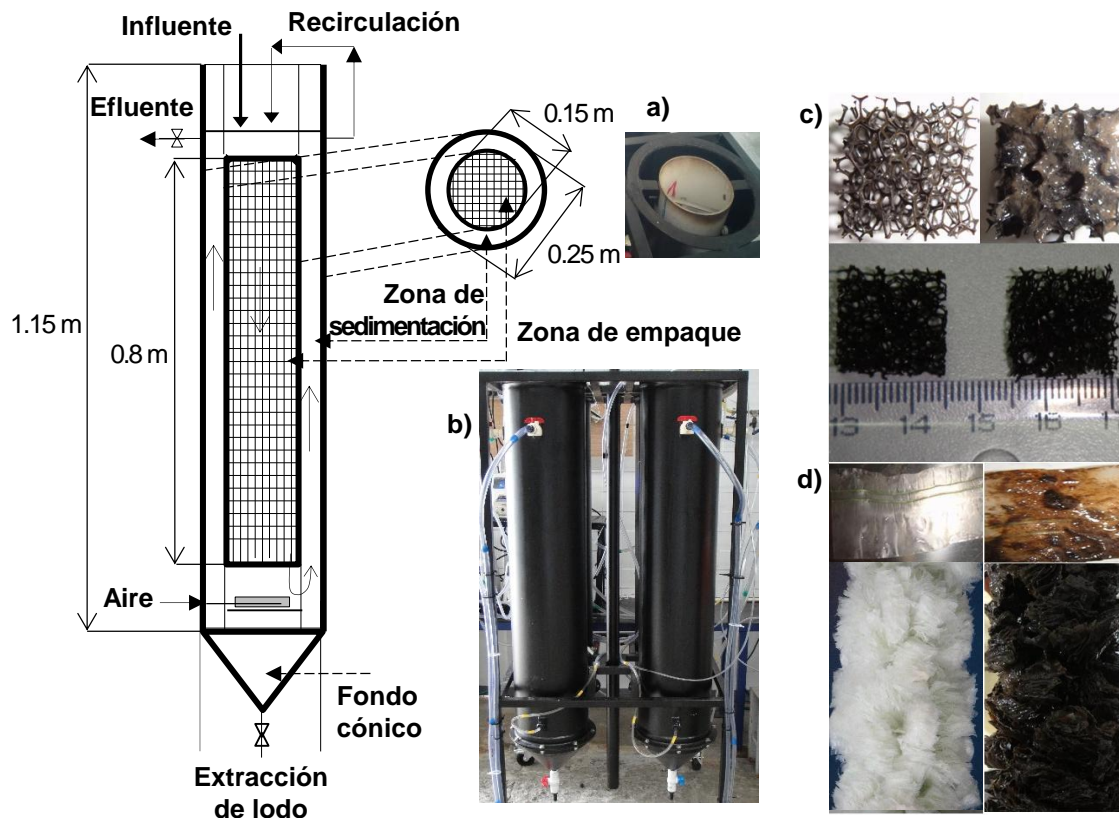
$$q_e = K_d \cdot C_e \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Los valores de los coeficientes de sorción  $K_d$  se obtuvieron graficando  $q_e$  contra  $C_e$ . La pendiente de la isoterma lineal es el coeficiente  $K_d$ .

### 3.5 SISTEMA EXPERIMENTAL CON BIOMASA INMOVILIZADA

Los experimentos con biomasa inmovilizada se llevaron a cabo en cuatro reactores de lecho sumergido aireado y de flujo descendente, cada reactor con una zona de empaque cilíndrica, una zona de sedimentación periférica y un fondo cónico para la extracción de sedimento acumulado. Los materiales de soporte de la biomasa fueron colocados en la zona cilíndrica de 0.15 m de diámetro y 0.8 m de altura del lecho. Dos reactores (PU1 y PU2) fueron empacados con 3250 cubos de poliuretano de 1.5 cm, elaborados con base poliéter, lo cual les permite ser utilizados en aplicaciones que implican el contacto con agua, su tamaño de poro fue de 10 PPI (10 poros por pulgada); los otros dos reactores (PE1 y PE2) fueron empacados con 3300 cintas de polietileno de 5 cm de largo y 3 cm de ancho, éstas soportadas por un eje vertical de acero inoxidable. Las áreas específicas de ambos materiales de empaque fueron de casi  $700 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ . El diagrama del sistema experimental es presentado en la Figura 3.2. Los reactores fueron continuamente alimentados con agua residual municipal, en flujo descendente a través de la zona de empaque y en flujo ascendente en la zona de sedimentación periférica. El efluente fue colectado en la parte superior de la zona de sedimentación y el lodo acumulado en la zona cónica fue extraído periódicamente mediante una válvula instalada en el fondo. Cada reactor se equipó con dos bombas peristálticas con ajuste de caudal, una para la alimentación y la otra para la recirculación del efluente. La aireación fue suministrada por difusores de piedra porosa instalados en el fondo; los niveles de OD fueron mantenidos mayores a  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .





**Figura 3.2. Diagrama de los reactores de lecho sumergido aireado y materiales de empaque.**  
 a) Vista superior de reactor; b) Vista lateral de dos reactores; c) Cubos de poliuretano; d) Cintas de polietileno

### 3.5.1 Fases experimentales

La biomasa inmovilizada fue desarrollada mediante el suministro de agua residual municipal en todos los reactores a una carga orgánica (CO) de  $3 \text{ gDQO} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ , se tomó en cuenta que una mayor carga orgánica podría reducir el tiempo requerido para formar la biomasa inmovilizada, pero la biopelícula formada podría ser compacta, dificultando el transporte de los contaminantes dentro de la misma (Bassin *et al.*, 2012), no se utilizó ningún inóculo. La adición de los fármacos comenzó después del desarrollo de la biomasa inmovilizada y estabilización del proceso (80% de remoción de DQO y  $\text{N-NH}_4$ ). Las concentraciones de los fármacos en el agua residual fueron seleccionadas de acuerdo a las concentraciones reportadas en los influentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. Tauxe-Wuersch *et al.* (2005) midieron  $4.54 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de ácido mefenámico en las aguas residuales municipales de plantas de tratamiento en Suiza. Deblonde *et al.* (2011) reportaron  $4.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de metoprolol en influentes de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales. Rosal *et al.* (2010) reportaron  $1.827 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de fluoxetina en aguas residuales urbanas, mientras Al Aukidy *et al.* (2014) reportaron  $2.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Por lo tanto, los fármacos fueron adicionados al agua residual para obtener casi  $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de fluoxetina y  $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de ácido mefenámico y metoprolol. Se prepararon soluciones madre de cada fármaco disueltos en metanol, las soluciones fueron almacenadas en viales ámbar a  $4^\circ\text{C}$  y usadas para adicionarse al agua residual municipal.

Se evaluó el efecto de diferentes cargas orgánicas en el desempeño de los reactores y en la remoción de los fármacos: 3.0, 6.0, 9.0 y 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>. Los parámetros operacionales de cada fase experimental son presentados en la Tabla 3.3. El efecto del 50% de recirculación del efluente fue evaluado para todas las cargas orgánicas. La variación de la carga orgánica se realizó mediante el incremento del caudal del influente a los reactores, por lo tanto, cuando la carga orgánica se incrementó ocurrió una disminución del TRH. Cada fase experimental fue evaluada por 60 d.

**Tabla 3.3.** Parámetros operacionales de los reactores con biomasa inmovilizada

Parámetro	Fase 1 Estabilización del proceso	Reactores PE1 y PU1				Reactores PE2 y PU2			
		Fase 2	Fase 3	Fase 4	Fase 5	Fase 2	Fase 3	Fase 4	Fase 5
Carga orgánica, gDQO m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	3.0	3.0	3.0	6.0	6.0	9.0	9.0	12.0	12.0
Caudal, L·d <sup>-1</sup>	96-151	83-120	79-108	200-254	199-281	248-360	236-332	401-508	398-528
TRH, h	2.3-3.5	2.8-4.1	3.1-4.3	1.3-1.7	1.2-1.7	0.9-1.4	1.0-1.4	0.7-0.8	0.6-0.9
Recirculación, %	0	0	50	0	50	0	50	0	50

Los cambios en la comunidad microbiana de la biomasa inmovilizada pueden mostrar las condiciones que benefician la remoción de los fármacos en agua residual municipal. El estudio consistió de cinco fases experimentales. La fase 1 correspondió al arranque, desarrollo y adaptación de la biomasa inmovilizada a las condiciones de operación del reactor, durante las fases 2-5 se aplicaron las diferentes cargas orgánicas para favorecer diferentes consorcios microbianos. Los procesos de biopelícula de baja carga orgánica tienden a favorecer el desarrollo de bacterias autótrofas de lento crecimiento, tales como las bacterias nitrificantes, las cuales pueden beneficiar la remoción de los fármacos (Falàs *et al.*, 2012). La condición de alta carga favorece el desarrollo de microorganismos heterótrofos, los cuáles crecen más rápido que los autótrofos, como resultado, la eficiencia de nitrificación disminuye (Quan *et al.*, 2012). De acuerdo a un estudio previo en reactores de lecho sumergido aireado con cintas de polietileno y cubos de poliuretano, al aplicar cargas orgánicas en el intervalo de 0.8 a 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> se obtienen tiempos de retención de sólidos (TRS) entre 10 y 39 días, favoreciendo el desarrollo de bacterias de lento crecimiento (Mijaylova *et al.*, 2008). De este modo, al aplicar las cargas orgánicas de 3 y 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> se puede evaluar el efecto de las bacterias nitrificantes en la remoción de los fármacos. Cuando se aplican las cargas orgánicas de 9 y 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>, los TRS disminuyen y los microorganismos heterótrofos tienen más sustrato para crecer, beneficiando su mayor actividad. Por otro lado, la recirculación reduce la resistencia a la transferencia de masa y la concentración de la materia orgánica en el influente disminuye, lo cual hace a las bacterias nitrificantes más competitivas, esto incrementa la eficiencia de nitrificación y la concentración de oxígeno disuelto (EPA, 2000). Para evaluar las diferencias entre los resultados obtenidos con ambos materiales de soporte, aplicando la misma carga orgánica y entre las condiciones con y sin recirculación, se realizó el análisis estadístico del desempeño y remoción de los fármacos mediante el programa Statgraphics. Los factores independientes fueron: material de soporte, carga orgánica y recirculación.

La DQO, N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> fueron medidos en los influentes y efluentes tres veces por semana, los sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) fueron determinados en los materiales de soporte una vez cada dos semanas; las muestras fueron tomadas de tres diferentes alturas del lecho (parte superior, central y baja), la biomasa fue desprendida con metanol y 20 min de

sonicación, la biomasa desprendida fue retenida mediante filtración con crisoles Gooch para la determinación de los sólidos, la biomasa en cada reactor fue calculada como un promedio de los SV determinados en las tres alturas. Para determinar el TRS, las concentraciones de SV fueron medidas en los efluentes (una vez por semana) y en el lodo extraído (una vez cada dos semanas). El tiempo de retención de sólidos promedio fue calculado tomando en cuenta la cantidad de biomasa inmovilizada en el sistema dividido entre la cantidad de biomasa que sale del sistema:

$$TRS = \frac{X}{Q_e X_e + Q_w X_w} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

$X$  = Cantidad de biomasa inmovilizada, mg

$Q_e$  = Flujo del efluente, L·d<sup>-1</sup>

$X_e$  = Concentración de biomasa en el efluente, mg·L<sup>-1</sup>

$Q_w$  = Flujo de exceso de lodo extraído, L·d<sup>-1</sup>

$X_w$  = Concentración de biomasa en el lodo extraído, mg·L<sup>-1</sup>

Los fármacos fueron medidos tres veces por semana en la fase líquida y una vez cada dos semanas en la fase sólida (biomasa y lodo extraído). En la Tabla 3.4 se enlistan los parámetros analizados, métodos, puntos y frecuencia de muestreo en el seguimiento del proceso.

**Tabla 3.4.** Métodos de análisis, puntos y frecuencia de muestreo en los reactores con biomasa inmovilizada

Parámetro	Método de Análisis	Punto de muestreo	Frecuencia
Temperatura	Potenciométrico	Reactor	Diario
pH	Potenciométrico	Influente, efluente, reactor	Diario
Oxígeno disuelto (OD)	Electrodo	Reactor	Diario
Fármacos	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas/masas	Influente, efluente Biomasa, lodo extraído	3/semana 1/2semanas
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	Espectrofotométrico	Influente, efluente	3/semana
Sólidos Totales (ST)	Gravimétrico	Influente, efluente Reactor, lodo extraído, agua retrolavado	1/semana 1/2semanas
Sólidos Volátiles (SV)	Gravimétrico	Influente, efluente, Reactor, lodo extraído, agua retrolavado	1/semana 1/2semanas
Nitrógeno amoniacal (N-NH <sub>4</sub> )	Nessler (espectrofotométrico)	Influente, efluente	3/semana
Nitrógeno de nitritos (N-NO <sub>2</sub> )	Sulfato ferroso (espectrofotométrico)	Influente, efluente	3/semana
Nitrógeno de nitratos (N-NO <sub>3</sub> )	Reducción con cadmio (espectrofotométrico)	Influente, efluente	3/semana

## **3.6 DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE SORCIÓN ( $K_d$ ) EN LA BIOMASA INMOVILIZADA**

### **3.6.1 Determinación del equilibrio de sorción**

Se evaluó la sorción de los fármacos en la biomasa inmovilizada con cada tipo de soporte, para ello los reactores PE1 y PU1 fueron operados durante 37 días con una CO de  $6 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  sin la adición de los fármacos. Antes del inicio de las pruebas, se determinó la concentración de los fármacos en la biomasa inmovilizada en los dos soportes, se reportaron concentraciones menores a  $0.18 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (límite de cuantificación). Para las pruebas de sorción, se tomaron cintas y cubos con la biomasa inmovilizada en la parte central del reactor, después la biomasa fue inactivada adicionando una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), el tiempo de exposición fue de 24 h, posteriormente la biomasa se enjuagó varias veces con agua para eliminar el compuesto tóxico.

En las pruebas de la determinación del tiempo de equilibrio se emplearon recipientes de 4L, se adicionaron 3 L de solución de  $\text{CaCl}_2$  0.01 M, los fármacos a una concentración de  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (mayor concentración utilizada en las isotermas de sorción) y 294 cintas con biomasa inmovilizada inactiva (98 cintas por cada litro de solución). El recipiente fue mantenido en agitación a 120 rpm en un agitador orbital en un cuarto oscuro a  $25^\circ\text{C}$ . Se tomaron muestras por duplicado de 250 mL de la fase líquida a los siguientes tiempos: 3, 6, 12, 18, 24 y 48 h, por cada muestra líquida tomada se retiraron también 49 cintas (proporcional a la cantidad de la solución retirada). El equilibrio es indicado por valores constantes de compuesto con respecto al tiempo. El mismo procedimiento se siguió para los cubos de poliuretano (294 cubos en 3 L de solución).

### **3.6.2 Isotermas de sorción**

Una vez determinado el tiempo de equilibrio, se realizaron experimentos para obtener las isotermas de sorción, las pruebas se hicieron por duplicado usando 12 frascos de 1L para cada tipo de empaque, para ello se tomaron cintas y cubos con la biomasa inmovilizada en la parte central del reactor, se añadieron 49 cintas de polietileno con la biomasa inmovilizada en cada frasco y 49 cubos de poliuretano con la biomasa inmovilizada en cada frasco, la biomasa fue inactivada. Posteriormente, se adicionaron 500 mL de solución de  $\text{CaCl}_2$  0.01M en cada frasco y seis diferentes concentraciones de los fármacos ( $0.5, 1, 2.5, 5, 7.5$  y  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), dentro de este rango se encontraron las concentraciones de los influentes en el agua residual durante las fases experimentales. Los frascos fueron mantenidos en agitación a 120 rpm con un agitador orbital en un cuarto oscuro a  $25^\circ\text{C}$  (Figura 3.3). Después del tiempo de equilibrio (12 h para PE y 18 h para PU) se tomaron las muestras líquidas para su posterior análisis. Al finalizar las pruebas, se desprendió toda la biomasa de las cintas y de los cubos para realizar la medición de los ST en cada frasco. La cantidad del fármaco sorbido en la biomasa se calculó como la diferencia entre la cantidad del compuesto inicialmente presente en solución y la cantidad restante al final del experimento. Los coeficientes de sorción se determinaron de acuerdo a la ecuación 3.2 en el punto 3.4.2.

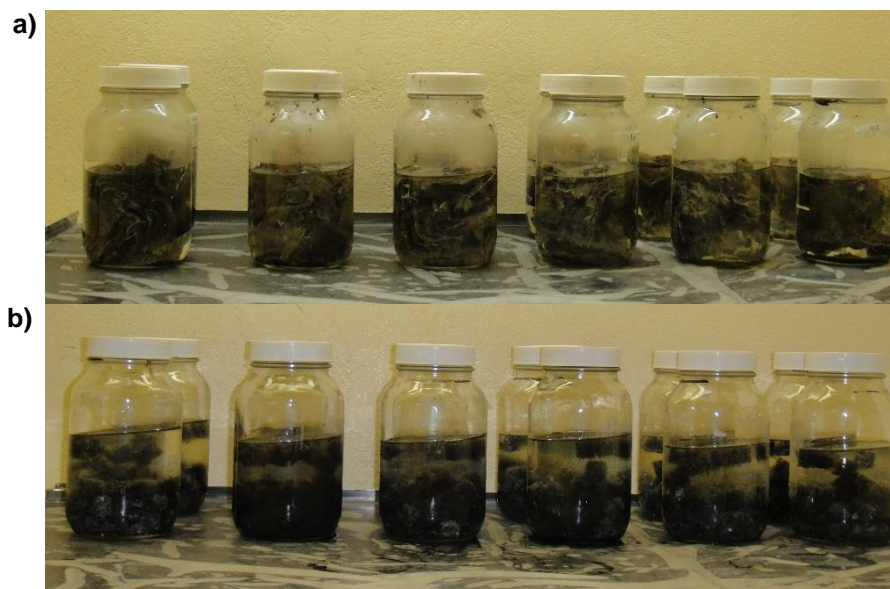


Figura 3.3. Determinación de los coeficientes de sorción en la biomasa inmovilizada.  
a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

### 3.7 CÁLCULOS DE LOS BALANCES DE MASA

Los balances de masa se realizaron considerando los mecanismos de degradación y sorción.

#### 3.7.1 Cálculo del flujo másico

Las ecuaciones para el cálculo del flujo másico de los compuestos farmacéuticos fueron las siguientes:

$$F_{inf} = Q_0 S_0 (1 + K_d SS_0)$$

$$F_{efl} = Q_e S_e (1 + K_d SS_e) \quad \dots \dots \dots \text{Clara et al., 2005}$$

$F_{inf}$ ,  $F_{efl}$  = Flujo másico del fármaco en el influente, efluente,  $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$

$Q_0$ ,  $Q_e$  = Flujo volumétrico del influente y del efluente,  $\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$

$S_0$ ,  $S_e$  = Concentración de fármaco en el influente, efluente,  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

$SS_0$ ,  $SS_e$  = Sólidos suspendidos en el influente, efluente,  $\text{kg}\cdot\text{L}^{-1}$

$K_d$  = Coeficiente de sorción,  $\text{L}\cdot\text{kgSST}^{-1}$

#### 3.7.2 Producción de sólidos

Una vez que se ha llevado a cabo la sorción de los fármacos en los biosólidos, solo puede ocurrir sorción adicional cuando se producen nuevos biosólidos que proporcionan nueva superficie disponible (Joss *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2014b), la producción de sólidos se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$P_{X,SV} = \frac{1}{Q} \left[ \frac{QY(S_0 - S_e)}{1 + (k_d)TRS} + \frac{(f_d)(k_d)YQ(S_0 - S_e)TRS}{1 + (k_d)TRS} \right]$$

$$P_{X,SV} = \frac{1}{Q} [ A + B ]$$

$$P_{X1,ST} = \frac{1}{Q} \left[ \frac{A}{\frac{SV}{ST}} + \frac{B}{\frac{SV}{ST}} \right] \dots\dots\dots\text{Metcalf y Eddy, 2014}$$

$$P_{X2,ST} = (P_{X1,ST})(Q)$$

- $P_{X,SV}$  = Producción de biomasa medida como SV,  $g \cdot L^{-1}$
- $P_{X1,ST}$  = Producción de sólidos,  $g \cdot L^{-1}$
- $P_{X2,ST}$  = Producción de sólidos,  $g \cdot d^{-1}$
- $Q$  = Flujo del agua residual,  $L \cdot d^{-1}$
- $Y$  = Coeficiente de producción de biomasa,  $gSSV \cdot g_{\text{sustrato}}^{-1}$
- $f_d$  = Fracción de biomasa que permanece como desechos celulares, (0.15)  $gSSV \cdot gSSV^{-1}$
- $k_d$  = Coeficiente de decaimiento endógeno,  $gSSV \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$

Los coeficientes de rendimiento de síntesis (Y) y decaimiento endógeno ( $k_d$ ) fueron determinados mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{TRS} = Y \frac{S_0 - S}{SSV \cdot TRH} - k_d \dots\dots\dots\text{Metcalf y Eddy, 2014}$$

Los valores fueron obtenidos graficando  $1/TRS$  contra  $(S_0 - S)/(SSV \cdot TRH)$ , la pendiente de la línea recta es Y y la ordenada al origen es  $k_d$ . El Anexo 2 muestra la determinación de los coeficientes.

**3.7.3 Método 1 para los balances de masa**

El método 1 para los balances de masa estuvo basado en las concentraciones medidas de los fármacos en la fase líquida, en la biomasa inmovilizada, en los sólidos producidos y en el lodo extraído.

$$F_s = P_{X2,ST}(S_b) + (Q_{le} S_{le} S_{le}) \dots\dots\dots\text{Luo et al., 2014b}$$

$$\text{Bio deg radación} = F_{inf} - F_{efl} - F_s$$

- $F_s$  = Flujo másico del fármaco en los sólidos,  $\mu g \cdot d^{-1}$
- $Q_{le}$  = Flujo volumétrico del lodo extraído,  $L \cdot d^{-1}$
- $S_b$  = Concentración del fármaco en la biomasa inmovilizada,  $\mu g \cdot g^{-1}$
- $S_{le}$  = Concentración del fármaco en el lodo extraído,  $\mu g \cdot g^{-1}$

### 3.7.4 Método 2 para los balances de masa

El método 2 consideró las concentraciones medidas de los fármacos en fase líquida, así como los coeficientes de sorción  $K_d$  determinados para cada compuesto en la biomasa inmovilizada en cada tipo de soporte, se tomó en cuenta la sorción a partir de los sólidos producidos.

$$F_{le} = Q_e S_e (1 + K_d SST_{le}) \quad \dots\dots\text{Clara et al., 2005}$$

$$F_{sp} = Q_e S_e K_d P_{X1,ST} \quad \dots\dots\text{Joss et al., 2005}$$

$$\text{Bio deg radación} = F_{inf} - F_{efl} - F_{le} - F_{sp}$$

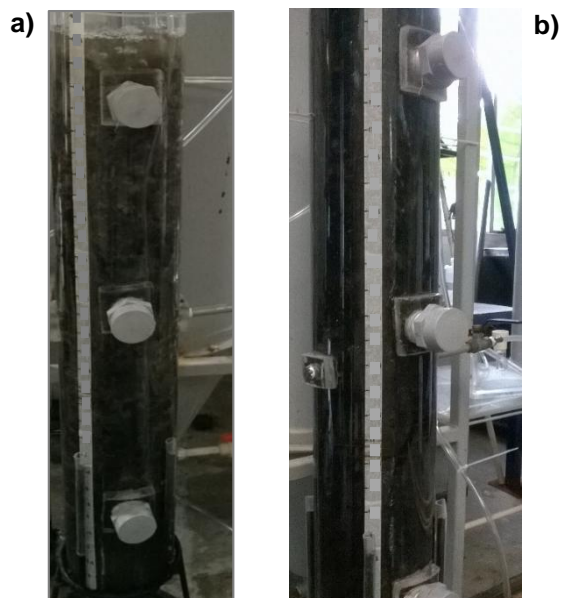
$F_{le}$ = Flujo másico del fármaco en el lodo extraído,  $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$

$F_{sp}$ = Flujo másico del fármaco en los sólidos producidos,  $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$

### 3.8 CINÉTICAS DE REMOCIÓN DE LOS FÁRMACOS CON BIOMASA INMOVILIZADA EN EMPAQUES DE CINTAS DE POLIETILENO Y CUBOS DE POLIURETANO

Las cinéticas de remoción con la biomasa inmovilizada se realizaron en reactores en lote con un volumen de trabajo de 14 L. Se utilizó la biomasa inmovilizada proveniente de los reactores PE1 (cintas de polietileno) y PU1 (cubos de poliuretano), los cuáles se encontraban trabajando con una CO de  $6 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50% de recirculación del efluente. Los empaques fueron retirados cuidadosamente de los reactores en donde se estudiaron las diferentes fases experimentales y se colocaron en el reactor que se presenta en la Figura 3.4.

Se tomaron muestras para la determinación de los ST y SV, la cantidad de sólidos volátiles en el reactor PE fue de  $6.83 \text{ gSV}\cdot\text{m}^{-2}$  ( $4.86 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y en el reactor PU fue de  $6.99 \text{ gSV}\cdot\text{m}^{-2}$  ( $4.94 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). El ácido mefenámico y el metoprolol fueron adicionados al agua residual para obtener una concentración inicial de casi  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , la fluoxetina se adicionó a una concentración de casi  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las pruebas se realizaron a temperatura ambiente,  $26 \text{ }^\circ\text{C}$  en el reactor PE y  $25.6 \text{ }^\circ\text{C}$  en PU, el pH del medio se mantuvo entre 7.0-7.3 en ambos reactores y la concentración de OD fue mayor a  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . La degradación fue seguida en los siguientes intervalos de tiempo: 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 y 360 min. En cada tiempo se tomaron 250 mL de muestra por medio de una llave colocada en el centro del reactor, las muestras fueron tomadas por duplicado. Las muestras fueron filtradas inmediatamente y se realizó la extracción en fase sólida para su posterior procesamiento y cuantificación de los fármacos. Además, con la finalidad de evaluar la actividad de la biomasa en los reactores, se dio seguimiento a la DQO,  $\text{N-NH}_4$ , así como la producción de  $\text{N-NO}_2$  y  $\text{N-NO}_3$ . Se aplicó el modelo cinético de pseudo primer orden para determinar la constante de remoción ( $k_{\text{biol}}$ ) de los fármacos (Ver ecuación 3.1 en el punto 3.3).



**Figura 3.4. Sistema experimental para las cinéticas de remoción en la biomasa inmóvilizada.**

a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

### **3.9 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS FARMACÉUTICOS**

Se desarrolló y se validó un método analítico mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas/masas (CG/MS/MS) para la detección y cuantificación de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol en aguas residuales y biomasa. El Anexo 1 contiene el desarrollo y validación del método.

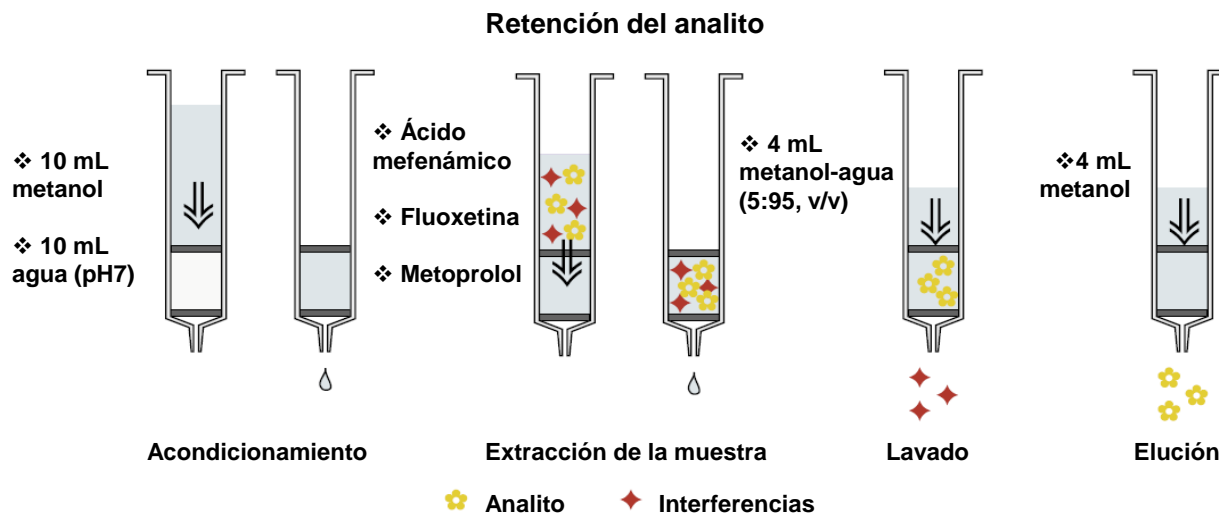
#### **3.9.1 Tratamiento de la muestra en fase líquida**

El primer paso fue la filtración de la muestra a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman) de 120 mm x 1.0  $\mu\text{m}$ .

#### **Extracción en fase sólida**

La extracción en fase sólida fue usada para concentrar los compuestos farmacéuticos y remover componentes interferentes, la extracción se realizó con cartuchos Oasis HLB, esto es con balance hidrofílico-lipofílico (el hidrofílico N-vinilpirrolidona y el lipofílico divinilbenzeno) con una capacidad de resina de 200 mg, partículas de 30  $\mu\text{m}$  y diámetro de poro de 84 Å. Los cartuchos fueron acondicionados con 10 mL de metanol y 10 mL de agua (grado HPLC), la muestra líquida se hizo pasar a través de los cartuchos mediante vacío en un manifold, el flujo debe ser lo suficientemente bajo para que las muestras que percolan a través del cartucho tengan una sorción eficiente en el material. Durante la extracción en fase sólida las moléculas del analito son retenidas en el adsorbente, las moléculas de disolvente e interferencias no son retenidas, para eliminar los componentes de interferencias restantes, se hicieron pasar 4 mL de solución metanol-agua (5:95, v/v) a través del material adsorbente. Después los cartuchos fueron secados con vacío durante 3 h para eliminar la humedad, los analitos fueron eluidos con 4 mL de metanol y finalmente, los extractos de la elución fueron concentrados mediante una corriente suave de nitrógeno para su posterior derivatización. En la Figuras 3.5 y 3.6 se observa el procedimiento de extracción en fase sólida y la reducción de las muestras con nitrógeno.





**Figura 3.5.** Procedimiento de extracción en fase sólida



**Figura 3.6. Procesamiento de las muestras para el análisis de fármacos.**

a) Extracción en fase sólida; b) Reducción con nitrógeno

### Derivatización

Los analitos fueron derivatizados mediante sililación usando el derivatizante BSTFA (*N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida) con 1% de trimetilclorosilano (TMCS), se usaron 100  $\mu$ L del derivatizante, la derivatización se llevó a cabo a 80°C durante 60 min. Después de la derivatización, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente, se llevó nuevamente a sequedad con nitrógeno, posteriormente se aforó a un volumen de 1 mL con tolueno para su inyección al cromatógrafo de gases.

### 3.9.2 Método analítico en sólido

El método analítico en sólido se empleó para las muestras de biomasa suspendida, biomasa inmovilizada y lodo extraído del fondo de los reactores, las muestras de biomasa inmovilizada fueron tomadas a tres diferentes alturas del lecho (parte superior, central y baja), la biomasa fue desprendida de los soportes con agua grado HPLC, las muestras fueron liofilizadas a -70°C, posteriormente se pesó el lodo seco y se adicionaron 25 mL de metanol, la extracción se realizó

mediante tratamiento ultrasónico durante 20 min, el sobrenadante obtenido fue filtrado y colectado en un matraz bola, el mismo procedimiento se realizó tres veces, los sobrenadantes fueron concentrados en un rotaevaporador hasta casi 1 mL. Finalmente la muestra fue reconstituida a 500 mL con agua grado HPLC para seguir el mismo método de las muestras líquidas. La Figura 3.7 presenta un resumen del procedimiento de análisis de las muestras en fase líquida y sólida.

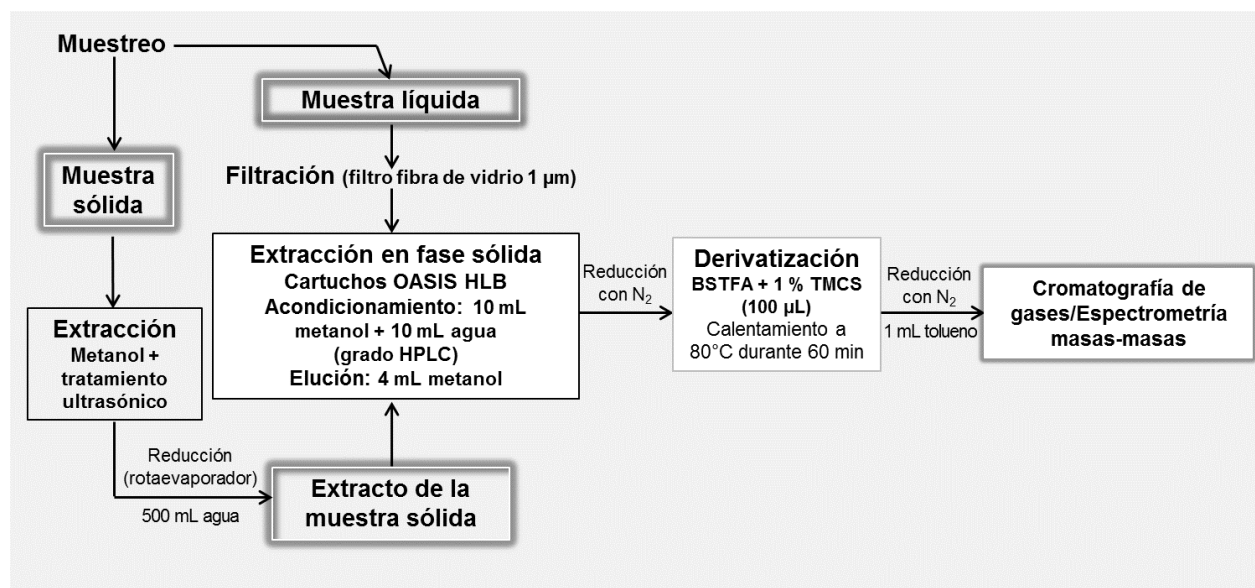


Figura 3.7. Procedimiento de análisis de los fármacos en muestras en fase líquida y sólida

### 3.9.3 Equipos

Para la cuantificación de los fármacos en las pruebas de biodegradabilidad de los diferentes consorcios microbianos se utilizó un cromatógrafo de gases con trampa iónica Varian CP-3800, acoplado a un espectrómetro de masas/masas Varian Saturn 2200, como fase estacionaria se usó una columna capilar de sílice fundida HP-5MS (5 %-fenil)-metilpolisiloxano de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25 µm de grosor, mientras que en la fase móvil, el gas acarreador fue helio. Para la cuantificación de los fármacos en los experimentos con biomasa inmovilizada se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu modelo TQ8040, acoplado a espectrometría de masas triple cuadrupolo, se usó una columna capilar de sílice fundida DB-5MS (5 %-fenil)-metilpolisiloxano de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25 µm de grosor. El gas acarreador también fue helio. Los equipos son presentados en la Figura 3.8.



Figura 3.8. Cromatógrafos de gases acoplados a espectrometría de masas.

a) Varian CP-3800; b) Shimadzu TQ8040

### 3.9.4 Condiciones de operación del equipo

Los estándares y muestras fueron inyectados por medio de un inyector automático. Durante el análisis cualitativo los iones característicos fueron: ácido mefenámico (223), fluoxetina (44) y metoprolol (72). En términos de condiciones de operación seleccionadas, el volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{L}$  a una temperatura de 260  $^{\circ}\text{C}$  y una velocidad de flujo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , se aplicó un modo de inyección splitless (lo cual significa que la totalidad del volumen de inyección fue usado para el análisis). La programación de aumento de temperaturas (rampa de temperatura), ya sea en forma continua o por etapas, permite separar los diferentes analitos sin correr el riesgo de decomponerlos. Se inició con una temperatura de 150  $^{\circ}\text{C}$  por 2 min; luego se aumentó a una velocidad de 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta llegar a 250  $^{\circ}\text{C}$  y finalmente se elevó la temperatura 15  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta 290  $^{\circ}\text{C}$ , como resultado se obtuvo un tiempo total de corrida de 14.67 min. El tiempo de retención es el tiempo que un compuesto tarda en recorrer la columna, éste se asigna al pico correspondiente, si la columna y todas las condiciones de funcionamiento de un equipo se mantienen constantes, el compuesto siempre tendrá el mismo tiempo de retención. El tiempo de retención del ácido mefenámico fue de 12.291 min, mientras que el tiempo de retención de la fluoxetina fue de 9.270 min y de 11.135 min para el metoprolol. Se seleccionaron las siguientes condiciones del espectrómetro de masas: electroionización con 70 eV, temperatura de la trampa del ion de 250  $^{\circ}\text{C}$ , voltaje del multiplicador de 180 V y monitoreo selectivo de iones (223+44+72). Pevio a la inyección de las muestras, se realizó una curva de calibración con cantidades conocidas de los analitos, el rango de calibración usado debe cubrir las concentraciones encontradas en las muestras (Ternes y Joss, 2006). El análisis en cada punto de la curva de calibración se realizó por triplicado.

Los métodos analíticos para la cuantificación de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol en fase líquida y sólida fueron validados. Se realizaron las curvas de calibración, se calculó la linealidad, límite de detección y cuantificación, exactitud y precisión. El procedimiento de validación y los resultados se encuentran en el Anexo 1.

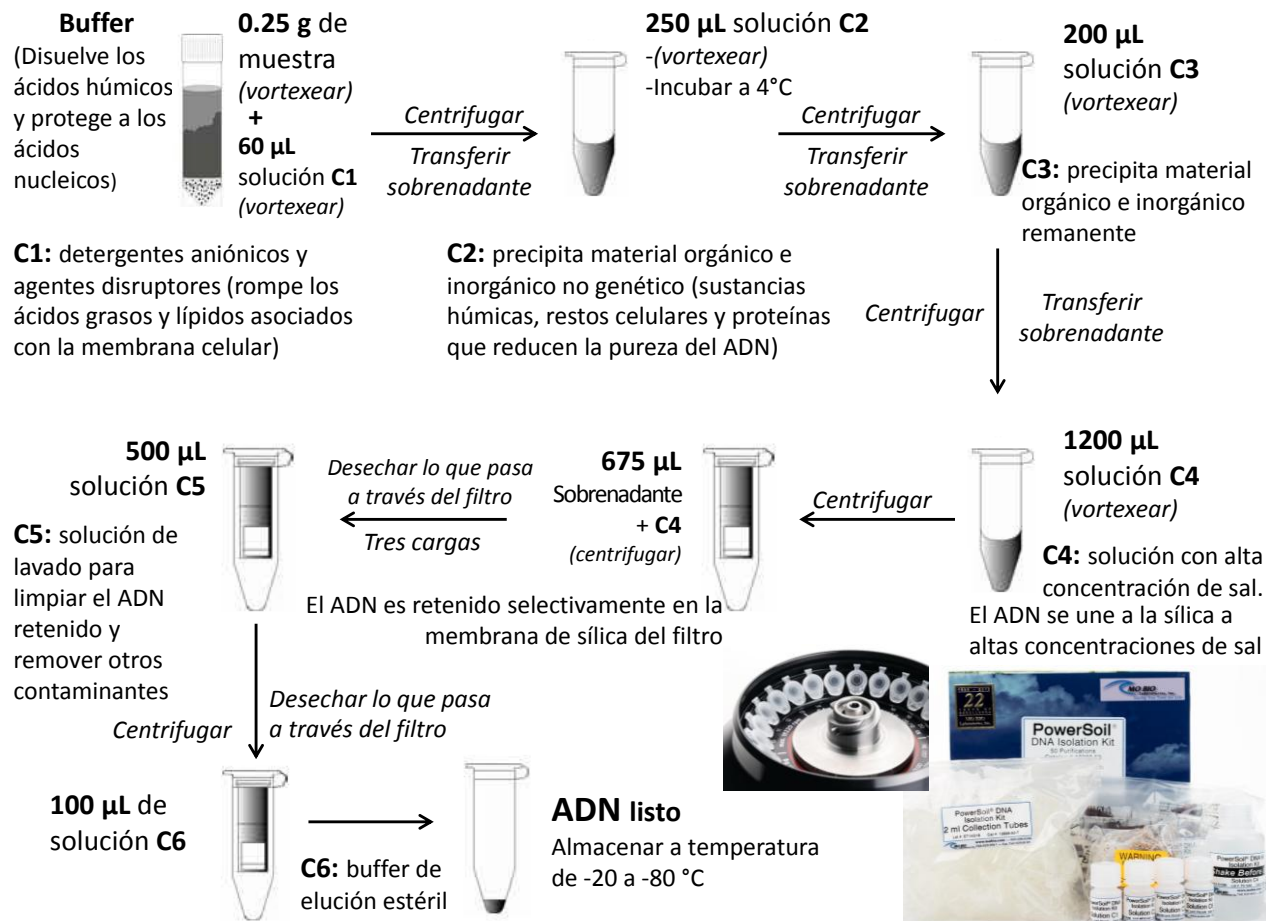
### 3.10 EXTRACCIÓN DE ADN

Las muestras de la biomasa inmovilizada para la extracción de ADN fueron tomadas de la parte central de los reactores al finalizar cada fase experimental. Las muestras fueron colocadas en tubos tipo Falcón estériles y almacenadas en un ultracongelador a una temperatura de  $-30^{\circ}\text{C}$ . El procesamiento de las muestras fue realizado con material estéril (tubos eppendorf y puntas desechables con filtro) bajo una campana de extracción (Figura 3.9). Para realizar la extracción de ADN se desprendió la biomasa inmovilizada utilizando agua grado HPLC, la biomasa fue colocada en tubos eppendorf y centrifugada para retirar el exceso de agua.



Figura 3.9. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó empleando el kit “PowerSoil DNA Isolation Kit” de laboratorios MO BIO, en la Figura 3.10 se presenta un resumen del procedimiento de extracción.



**Figura 3.10.** Procedimiento de extracción de ADN de las muestras de biomasa

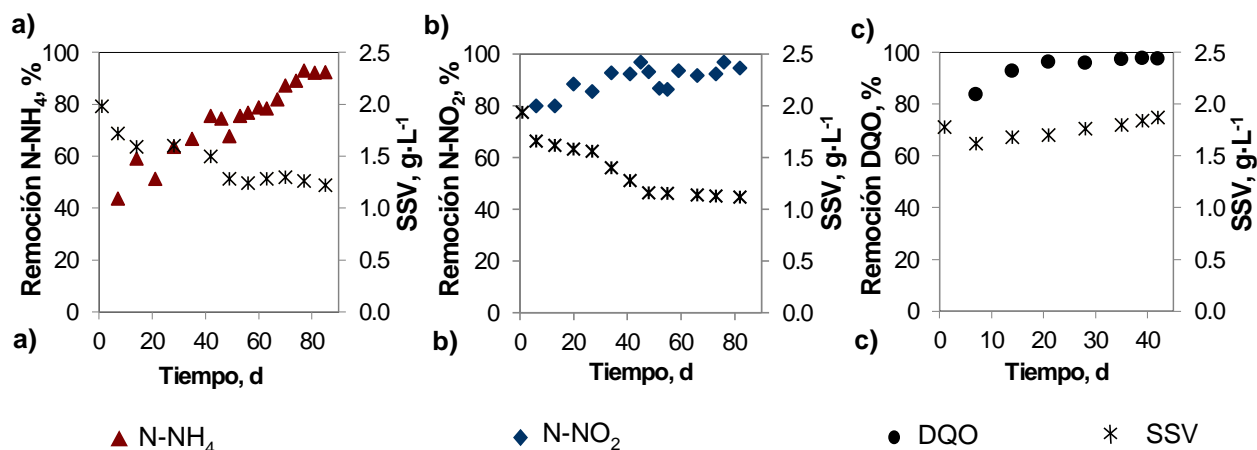
Una parte importante es conocer la concentración de ADN, para ello se utilizó un espectrofotómetro de luz ultravioleta EPOCH a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La pureza de la muestra está relacionada con el valor de máxima absorbancia de los ácidos nucleicos detectada a una longitud de onda de 260 nm. La relación de las absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  nos permite conocer la pureza del ADN y verificar que no esté contaminado por la presencia de compuestos aromáticos, ya que éstos absorben a una longitud de onda de 280 nm. Se considera que el ADN es de calidad óptima cuando la relación 260/280 es cercana a 1.8. Una relación  $A_{260}/A_{280} > 2.1$  es indicativa de una presencia considerable de ARN en la muestra, por el contrario, si esta relación es baja ( $A_{260}/A_{280} < 1.6$ ) la muestra está contaminada por proteínas o fenoles. Para realizar el análisis de identificación de microorganismos se necesitan al menos 20 µL de ADN extraído y una concentración de las muestras de al menos de 20 ng·µL<sup>-1</sup>. Se verificó que todas las muestras cumplieron las proporciones y concentraciones de ADN requeridas. El ADN extraído de las 16 muestras fue enviado a *Research and Testing Laboratory's* (RTL, Lubbock, TX, USA) para realizar la secuenciación mediante la plataforma Miseq de Illumina (Secuenciación de Nueva Generación). MiSeq de Illumina es una plataforma de secuenciación masiva optimizada para un proceso de lectura de secuencias de ADN, la tecnología de secuenciación Miseq ha sido empleada para identificar la diversidad microbiana en lodos activados y reactores con biopelícula (Ma *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD

#### 4.1.1 Enriquecimiento de los consorcios microbianos

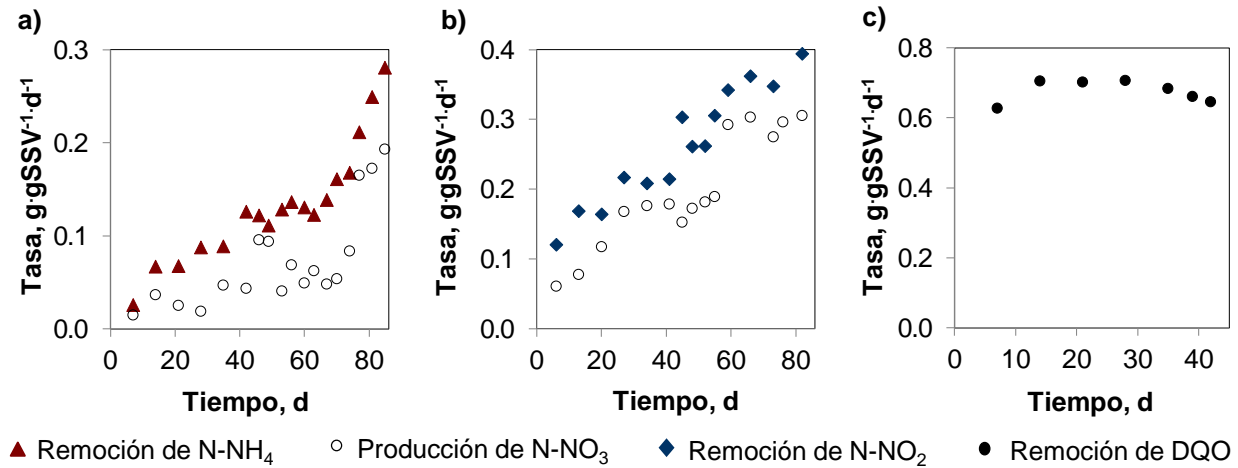
Los tres reactores utilizados para el enriquecimiento de los consorcios microbianos se llenaron con biomasa proveniente de un reactor nitrificante-desnitrificante ajustando la concentración inicial de SSV a  $2000 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las concentraciones de los SSV decrecieron como resultado de la estrategia de alimentación aplicada, durante los primeros 50 d de operación, la disminución fue de casi 37 y 40 % en los reactores amonio-nitrito oxidante y nitrito oxidante respectivamente, esto puede ser atribuido al decaimiento endógeno de la población de los microorganismos heterótrofos, debido a la falta de la fuente de carbono orgánica en la alimentación. La variación de los SSV en los reactores y el desempeño de la biomasa durante el enriquecimiento se muestran en la Figura 4.1 y el Anexo 3. El reactor amonio-nitrito oxidante fue operado durante 85 d, las remociones de  $\text{N-NH}_4$  incrementaron a través del tiempo, éstas fueron mayores de 90 % después del día 74 (Figura 4.1a). Durante los últimos 8 d de operación, la concentración de SSV fue de  $1240 \pm 28 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , la tasa de consumo de  $\text{N-NH}_4$  fue de  $0.25 \pm 0.03 \text{ gN-NH}_4\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  y la tasa de producción de nitratos fue de  $0.18 \pm 0.01 \text{ gN-NO}_3\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (Figura 4.2a), esto confirmó el proceso de nitrificación en este reactor. Las bacterias amonio oxidantes del género *Nitrosomonas* tienen un pH óptimo entre 7.0 y 8.0 (EPA, 2002), la nitrificación procede más lentamente a pH bajo, incluso a pH por debajo de 5.0 la nitrificación ya no es debida a bacterias nitrificantes, sino debida a bacterias organótrofas (Gerardi, 2002). Por consiguiente, el pH promedio del agua sintética de alimentación fue de  $7.54 \pm 0.42$ , como consecuencia del proceso de nitrificación, el pH disminuyó a  $6.11 \pm 0.96$ , la adición de bicarbonato de sodio en el influente evitó valores más bajos del pH en el reactor.



**Figura 4.1. Desempeño de la biomasa en los tres reactores.**  
a) Amonio-nitrito oxidante; b) Nitrito oxidante; c) Biomasa heterótrofa

El reactor nitrito oxidante fue operado durante 82 d, la remoción de  $\text{N-NO}_2$  fue de 80 % desde el comienzo de la operación y aumento en el transcurso del tiempo hasta que se alcanzaron remociones mayores de 90 % (Figura 4.1b). Durante los últimos 23 d, la tasa de consumo de nitritos fue de  $0.37 \pm 0.03 \text{ gN-NO}_2\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , la tasa de producción de nitratos fue de  $0.29 \pm 0.01 \text{ gN-NO}_3\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (Figura 4.2b) y la concentración de SSV fue de  $1110 \pm 43 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las bacterias nitrito oxidantes del género *Nitrobacter* tienen un pH óptimo entre 7.5 y 8.0, se ha reportado que a un pH arriba de 9 se reduce la tasa de la nitrificación (EPA, 2002). Así, el pH promedio del agua

sinéctica de alimentación al reactor fue de  $7.36 \pm 0.19$  y de  $8.21 \pm 0.18$  en el efluente. De esta manera, los resultados obtenidos confirmaron el enriquecimiento de los consorcios amonio y nitrito oxidantes con la estrategia de alimentación empleada.



**Figura 4.2. Tasas de remoción y producción en los tres reactores.**

a) Amonio-nitrito oxidante; b) Nitrito oxidante; c) Biomasa heterótrofa

El reactor con biomasa heterótrofa fue operado durante 42 d. La concentración de SSV disminuyó un 9% en los primeros 7 d, posteriormente se observó un incremento gradual (Figura 4.1c). Las remociones de materia orgánica expresadas como DQO fueron mayores a 92 % a partir de los 14 días de operación, las concentraciones de DQO y N-NH<sub>4</sub> en el agua sinéctica de alimentación fueron de  $1254 \pm 28 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $40 \pm 3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Durante los días 14-42, las remociones de DQO fueron  $96.2 \pm 1.8 \%$ , se obtuvo una tasa de remoción de  $0.68 \pm 0.03 \text{ gDQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (Figura 4.2c) y la concentración de SSV fue de  $1775 \pm 76 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las remociones de N-NH<sub>4</sub> fueron mayores de 90 %, sin embargo, para evitar la nitrificación en este reactor, la concentración de OD se mantuvo por debajo de  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , como resultado no se encontraron nitritos y nitratos en el efluente, lo que indicó que el N-NH<sub>4</sub> fue removido por bioasimilación. Se calculó la producción de biomasa, ésta fue de  $0.1 \text{ gSSV}\cdot\text{gDQO}_{\text{removida}}$ , más baja que los valores típicos para los biorreactores aerobios ( $0.4\text{-}0.6 \text{ gSSV}\cdot\text{gDQO}$ ) (Metcalf y Eddy, 2014), lo cual puede explicarse con una limitación del crecimiento causada por la baja concentración de N-NH<sub>4</sub> en el influente. Los promedios del pH del influente y efluente fueron de  $6.89 \pm 0.18$  y  $6.58 \pm 0.19$ , respectivamente. Los tres reactores mantuvieron temperaturas en el rango de 21-30 °C. La Figura 4.3 muestra la biomasa de los tres consorcios. Debido a que se alcanzó la estabilización del proceso en los tres reactores, indicado por porcentajes de remoción de N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub> y DQO constantes y mayores del 90 %, la biomasa fue usada para las pruebas de biodegradabilidad de los fármacos.



**Figura 4.3. Fotografías de las biomásas.**

a) Amonio-nitrito oxidante; b) Nitrito oxidante; c) Biomasa heterótrofa

#### 4.1.2 Biodegradabilidad y cinéticas

Los resultados de las pruebas de biodegradabilidad con los tres consorcios mostraron una disminución gradual de la cantidad de los fármacos a través del tiempo, las concentraciones iniciales de cada fármaco fueron de casi  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , la evolución de las concentraciones fue diferente para cada fármaco y para cada consorcio microbiano. Las concentraciones en las fases líquida y sólida en cada tiempo son presentadas en la Figura 4.4 donde se puede observar el seguimiento de los fármacos hasta el final de las pruebas en el día 24, donde la menor concentración de ácido mefenámico en la fase líquida ( $0.9433 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se midió en las pruebas con el consorcio amonio-nitrito oxidante, seguido de la biomasa heterótrofa ( $2.4991 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). En el caso de la fluoxetina, la más baja concentración se obtuvo con la biomasa heterótrofa ( $0.7104 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), seguido de la biomasa amonio-nitrito oxidante ( $0.7556 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). El consorcio amonio-nitrito oxidante también consiguió la menor concentración de metoprolol ( $2.9956 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), seguido de la biomasa heterótrofa ( $3.4408 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La cantidad específica de los fármacos en la biomasa (fase sólida) se midió en todos los tiempos, las variaciones de los valores medidos de cada fármaco a los diferentes tiempos fueron pequeñas. Al comparar los tres fármacos, las cantidades de fluoxetina en la biomasa amonio-nitrito oxidante fueron más altas, seguido del ácido mefenámico y el metoprolol ( $1.074 \pm 0.0521 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $0.4246 \pm 0.04314 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  y  $0.2574 \pm 0.0688 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente). Las cantidades promedio de fluoxetina y ácido mefenámico fueron similares en la biomasa nitrito oxidante ( $0.65 \pm 0.09$  y  $0.56 \pm 0.0878 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente) y en la biomasa heterótrofa ( $0.9204 \pm 0.1896$  y  $0.919 \pm 0.137 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente), pero fueron casi dos a tres veces mayores comparado a las cantidades específicas de metoprolol en ambas biomasas ( $0.2063 \pm 0.0103$  y  $0.3126 \pm 0.0908 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente). Los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, representadas por los valores reportados del coeficiente de partición octanol-agua  $\log K_{ow}$ , coeficiente de sorción  $\log K_d$  y coeficiente de partición liposoma-agua  $\log D_{lipw}$ . El ácido mefenámico, de acuerdo a su  $\log K_{ow}$  de 5.12-5.4,  $\log K_d$  de 2.46-2.73 y  $\log D_{lipw}$  de 4.16, se espera que tienda a sorberse al lodo, pero su valor de  $pK_a$  es bajo (3.89-4.48), generalmente por debajo del pH del agua residual, por lo que también se espera que se encuentre en su forma ionizada en el agua y no en el lodo (Jones *et al.*, 2002; Radjenović *et al.*, 2009; Escher *et al.*, 2011; Kovalova *et al.*, 2012). Se ha reportado que la fluoxetina posee alto  $\log K_{ow}$  (4.17), alto  $\log K_d$  (2.9-4.0) y  $\log D_{lipw}$  (3.28), por lo que también tenderá a sorberse en el lodo (Escher *et al.*, 2011; Hörsing *et al.*, 2011; Kovalova *et al.*, 2012; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2014). Para el metoprolol se han reportado  $\log K_{ow}$  de 1.76-1.88,  $\log K_d$  de 0.2-1.9 y  $\log D_{lipw}$  de 1.25, por lo que se espera que posea un bajo potencial de sorción al lodo (Wick *et al.*, 2009; Ramil *et al.*, 2010; Scheurer *et al.*, 2010; Escher *et al.*, 2011; Kovalova *et al.*, 2012; Grossberger *et al.*, 2014). Las pruebas se realizaron por duplicado y se calcularon los promedios de las mediciones, en el Anexo 4.1 y 4.2 se encuentran los valores de los duplicados para cada fármaco en cada tiempo.

Las remociones globales de los fármacos en las diferentes biomasas, así como las remociones de  $\text{N-NH}_4$ ,  $\text{N-NO}_2$  y DQO son presentadas en la Figura 4.5. Puede observarse que las remociones incrementaron a través del tiempo, al finalizar las pruebas, las mayores remociones de ácido mefenámico y metoprolol fueron obtenidas con el consorcio amonio-nitrito oxidante (90.2 y 68.2 % respectivamente), seguido de la biomasa heterótrofa (75.5 y 63.1 % respectivamente). Las remociones de fluoxetina alcanzadas con ambos consorcios fueron similares (92.3 % con el consorcio amonio-nitrito oxidante y 92.7 % con la biomasa heterótrofa). Las menores remociones de los tres fármacos fueron obtenidas con el consorcio nitrito oxidante.

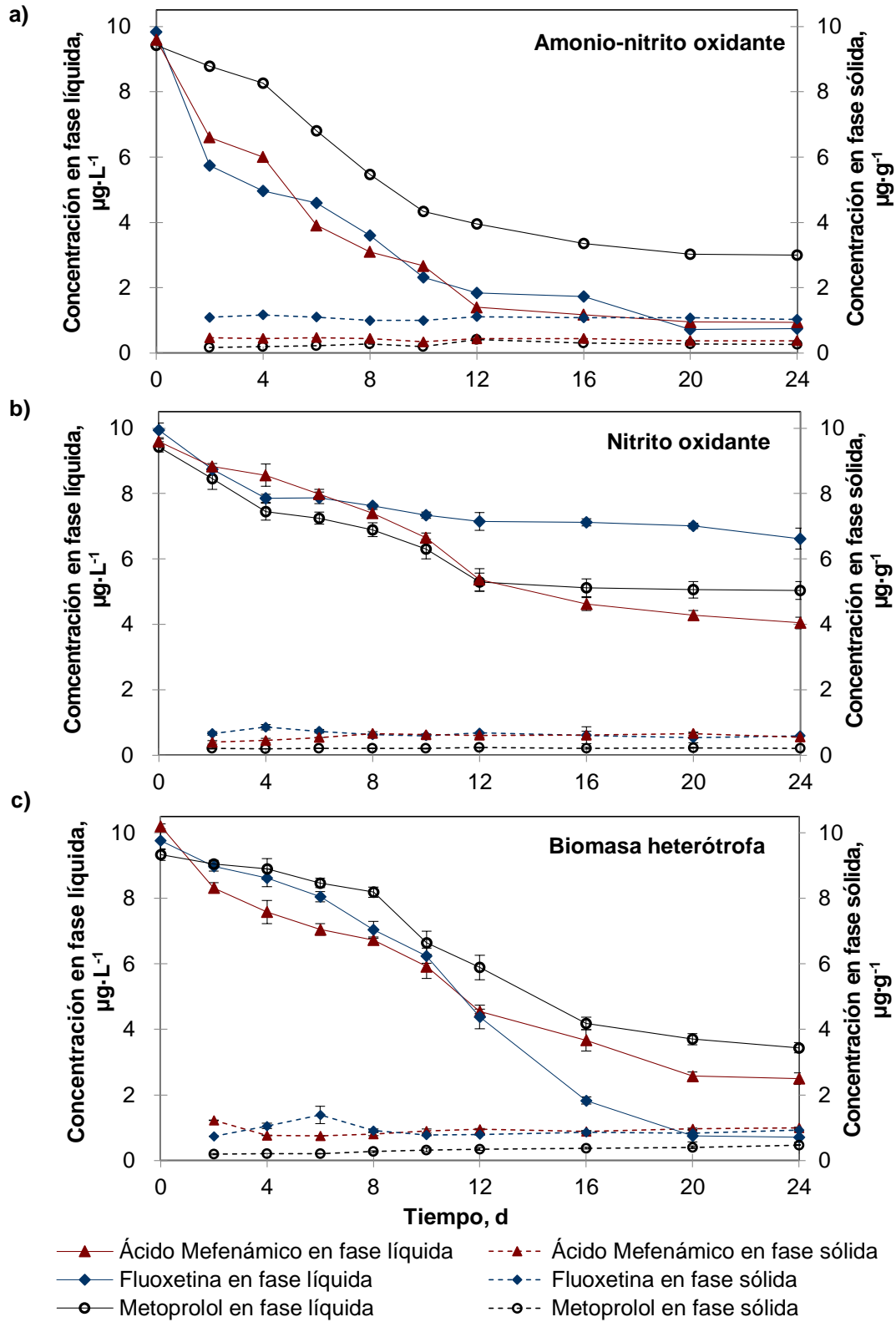
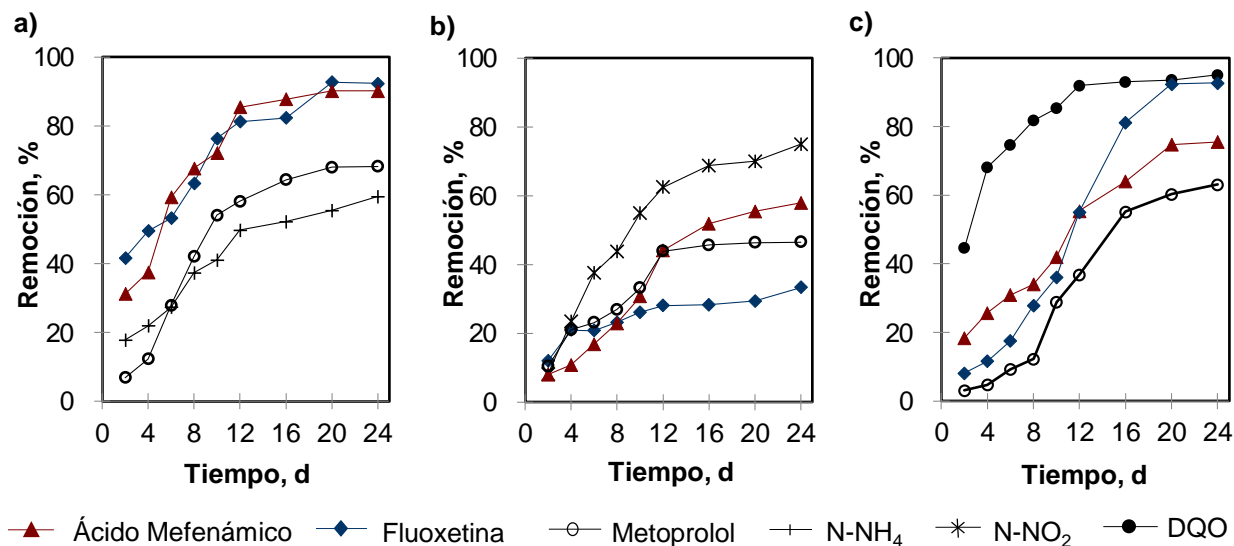


Figura 4.4. Concentraciones de los fármacos en la fase líquida y fase sólida durante las pruebas de biodegradabilidad. a) Amonio-nitrito oxidante; b) Nitrito oxidante; c) Biomasa heterótrofa

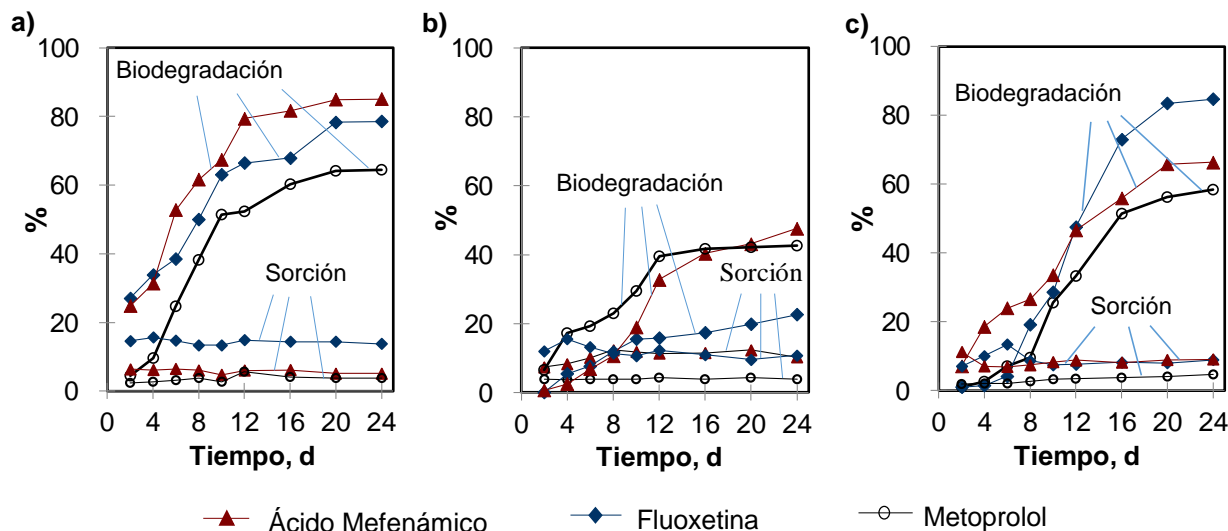




**Figura 4.5. Remociones de los fármacos usando los diferentes consorcios microbianos.**

a) Amonio-nitrito oxidante; b) Nitrito oxidante; c) Biomasa heterótrofa

Se realizó el balance de masa para determinar la contribución del proceso de biodegradación y sorción en la remoción global de los fármacos. Los porcentajes de biodegradación y sorción para cada consorcio son presentados en la Figura 4.6 y en el Anexo 4.3, 4.4. Después de los 24 d, el consorcio amonio-nitrito oxidante presentó la mayor biodegradación y la menor sorción en la biomasa de ácido mefenámico y metoprolol, se alcanzó una biodegradación de 85 % ( $18.36 \mu\text{g}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) y 64.5 % ( $13.68 \mu\text{g}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) respectivamente, mientras los porcentajes de sorción fueron relativamente bajos,  $5.8 \pm 0.6 \%$  y  $3.6 \pm 0.1 \%$ . La remoción de N-NH<sub>4</sub> fue de 59.5 % ( $0.22 \text{ g}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) y la producción de N-NO<sub>3</sub> fue de  $0.15 \text{ g}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ , lo cual indicó una buena actividad nitrificante de la biomasa. El consorcio amonio-nitrito oxidante también fue capaz de biodegradar 78.6 % de fluoxetina ( $17.38 \mu\text{g}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ), sin embargo, la sorción en la biomasa fue relativamente alta ( $14.3 \pm 0.7 \%$ ). Este consorcio exhibió remociones rápidas de los tres compuestos durante los primeros días, los porcentajes y las tasas de remoción de los fármacos disminuyeron cuando los porcentajes y las tasas de remoción de N-NH<sub>4</sub> disminuyeron, así las mayores tasas de remoción del ácido mefenámico se alcanzaron durante los primeros 12 d, las mayores tasas de remoción de la fluoxetina y el metoprolol se consiguieron en los primeros 10 d (Figura 4.5a y 4.7a). Estos resultados son consistentes con publicaciones previas, Tran *et al.* (2009) encontraron que la actividad nitrificante de la biomasa incrementa la biotransformación de fármacos persistentes. Fernández-Fontaina *et al.* (2012) reportaron que la buena actividad nitrificante incrementa la tasa de biodegradación de fármacos como la fluoxetina, la enzima amonio monooxigenasa se consideró como la principal responsable de la biodegradación cometabólica; sin embargo, no encontraron una correlación entre la constante cinética de biodegradación de fluoxetina y la tasa de nitrificación específica. En el caso del ácido mefenámico, Falàs *et al.* (2012) observaron una tendencia positiva entre la capacidad de nitrificación y las constantes de biodegradación en reactores con soportes; esta correlación fue restringida a la biomasa inmovilizada, las bajas constantes de velocidad en lodo activado nitrificante sugieren una degradación heterótrofa de ácido mefenámico. En cambio, el efecto positivo del incremento del tiempo de retención de sólidos y la nitrificación no ha llegado a ser claro para el metoprolol (Falàs *et al.*, 2016).



**Figura 4.6. Porcentajes de biodegradación y sorción usando los diferentes consorcios microbianos.**  
 a) Amonio-nitrito oxidante; b) Nitrito oxidante; c) Biomasa heterótrofa

En la Figura 4.6c puede verse que la biomasa heterótrofa también tuvo un buen desempeño, este consorcio exhibió la mayor capacidad de biodegradación de fluoxetina, se alcanzó hasta un 84.7 % de biodegradación ( $18.61 \mu\text{g}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ), mientras que el porcentaje de sorción fue de 8.9 %. Éste consorcio también fue capaz de biodegradar 66.4 y 58.4 % de ácido mefenámico y metoprolol respectivamente, los porcentajes de sorción fueron de 9.1 y 4.7 %, al mismo tiempo, la remoción de materia orgánica expresada como DQO fue de 95.1 %. Las tasas de remoción de los fármacos y la DQO son presentadas en la Figura 4.7c y el Anexo 4.5. En contraste a la correlación observada con la tasa de remoción de  $\text{N-NH}_4$  en el consorcio amonio-nitrito oxidante, las tasas de remoción de los fármacos incrementaron cuando las tasas de remoción de materia orgánica disminuyeron, las tasas de remoción de ácido mefenámico y metoprolol incrementaron a partir del día 10, mientras que las tasas de remoción de fluoxetina aumentaron a partir del día 8 (Figura 4.7c). Se ha reportado que los microorganismos heterótrofos pueden ser capaces de usar los compuestos farmacéuticos como única fuente de carbono o energía (Tran *et al.*, 2013).

El consorcio nitrito oxidante presentó la menor biodegradación de los tres fármacos (menos del 48 %), aunque la remoción de  $\text{N-NO}_2$  fue de 75 % ( $0.75 \text{ g}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) y la producción de  $\text{N-NO}_3$  fue de  $0.71 \text{ g}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ , lo cual indicó la buena actividad de la biomasa. Los porcentajes de biodegradación obtenidos para el ácido mefenámico y metoprolol fueron de 47.6 % ( $10.3 \mu\text{g}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) y 42.7 % ( $9.1 \mu\text{g}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) respectivamente, esto es 15-37 % más bajo que la biodegradación determinada en los otros dos consorcios, los porcentajes de sorción fueron 10.3 y 3.9 %, respectivamente. La biodegradación de fluoxetina también fue baja con el consorcio nitrito oxidante, solo se logró 22.6 % ( $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) de biodegradación y la sorción fue de 10.7 %. Las tasas de remoción presentadas en la Figura 4.7b indicaron que las mayores tasas de remoción de ácido mefenámico y metoprolol se presentaron durante los primeros 12 d, las mayores tasas de remoción de fluoxetina se lograron en los primeros 10 d, cuando hubo más altas tasas de oxidación de nitritos. Al comparar la biodegradación de los tres fármacos en los tres consorcios, se pudo ver que el ácido mefenámico y la fluoxetina fueron más biodegradables que el metoprolol, se alcanzó 85 % de biodegradación de ácido mefenámico y fluoxetina usando la biomasa amonio-nitrito oxidante y la biomasa heterótrofa respectivamente. El mayor porcentaje de biodegradación de metoprolol fue de 64.5 % y se obtuvo con el consorcio amonio-nitrito oxidante.

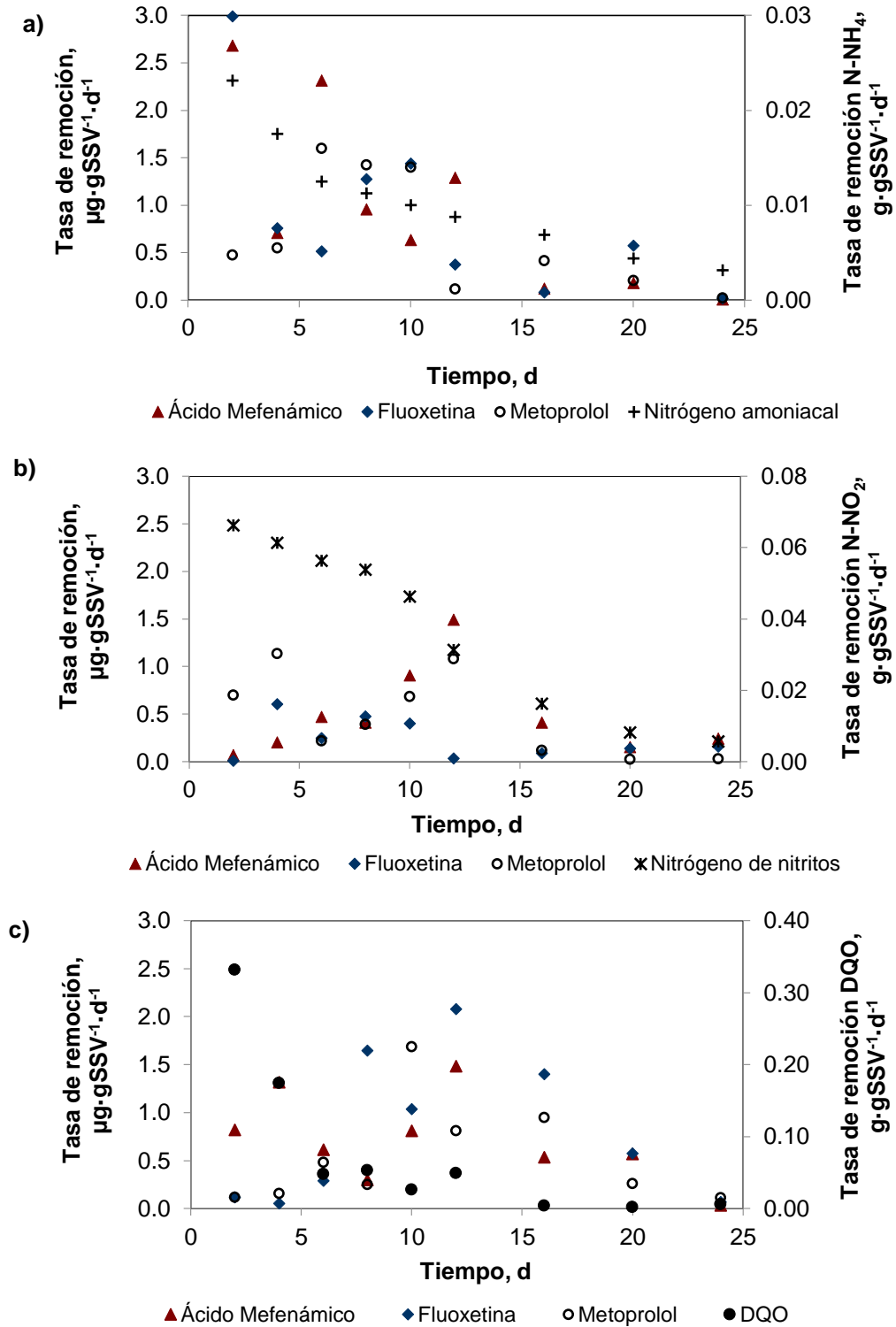
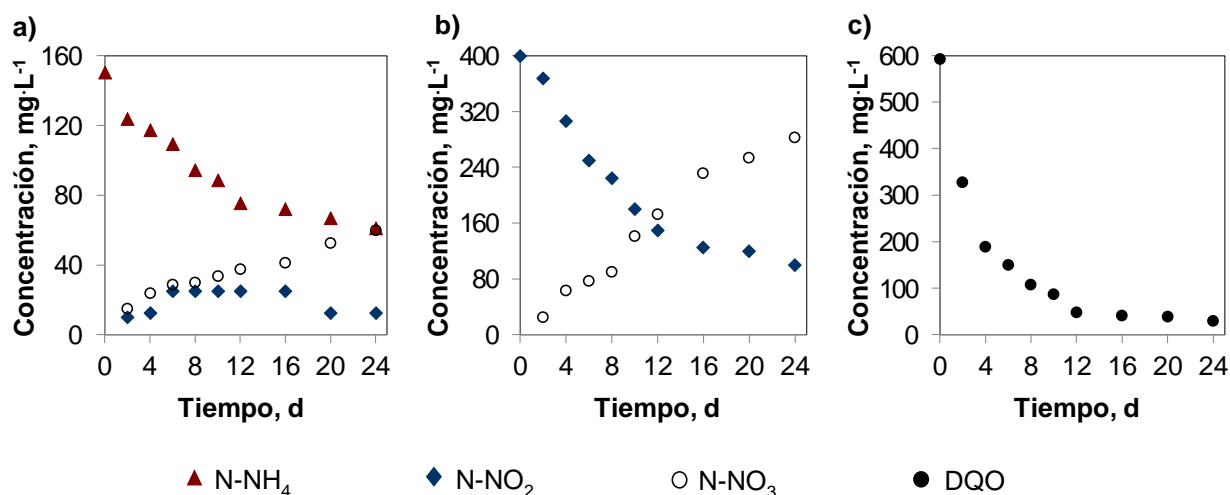


Figura 4.7. Tasas de remoción de los fármacos con los diferentes consorcios microbianos. a) Amonio-nitrito oxidante; b) Nitrito oxidante; c) Biomasa heterótrofa

Los menores porcentajes de sorción en los tres consorcios (2.0-5.7 %) fueron determinados para el metoprolol (Anexo 4.4), el cual tiene los valores más bajos de  $\log K_{ow}$  y  $\log D_{lipw}$ ; este fármaco también fue el menos biodegradable. Luo *et al.* (2014a) explicaron que los compuestos polares tales como el metoprolol se encuentran más probablemente en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, mientras que los compuestos que tienden a ser sorbidos en los sólidos se espera que sean mejor eliminados en los procesos de lodos activados. Los porcentajes de sorción del ácido mefenámico y la fluoxetina fueron de 5.1-15.6 %, la sorción fue más baja en el consorcio que obtuvo la mayor tasa de biodegradación, en el caso del ácido mefenámico, el porcentaje de sorción fue más bajo en el consorcio amonio-nitrito oxidante (5.1-6.5%), en el caso de la fluoxetina, la sorción fue menor en la biomasa heterótrofa (7.1-13.4 %). Luo *et al.*, (2014b) explicaron que la persistencia de los compuestos es un factor que afecta la sorción, debido a que al existir una menor capacidad de biodegradación, los compuestos permanecen en la biomasa. Los resultados del control 1 (agua residual sintética con los fármacos y sin biomasa) indicaron que las concentraciones de los tres fármacos permanecieron relativamente constantes sobre el periodo experimental de 24 d (la disminución fue menor del 4 %), esto confirmó que las remociones son debidas a la presencia de la biomasa. Los resultados del control 2 (agua residual sintética sin fármacos y con biomasa) mostraron que la actividad de la biomasa no fue inhibida por la presencia de los fármacos, ya que las remociones de N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub> y DQO fueron similares a las obtenidas en las pruebas con los fármacos. Finalmente, los controles de sorción que usaron biomasa inactiva mostraron que menos del 20 % de los tres fármacos fueron removidos por sorción.

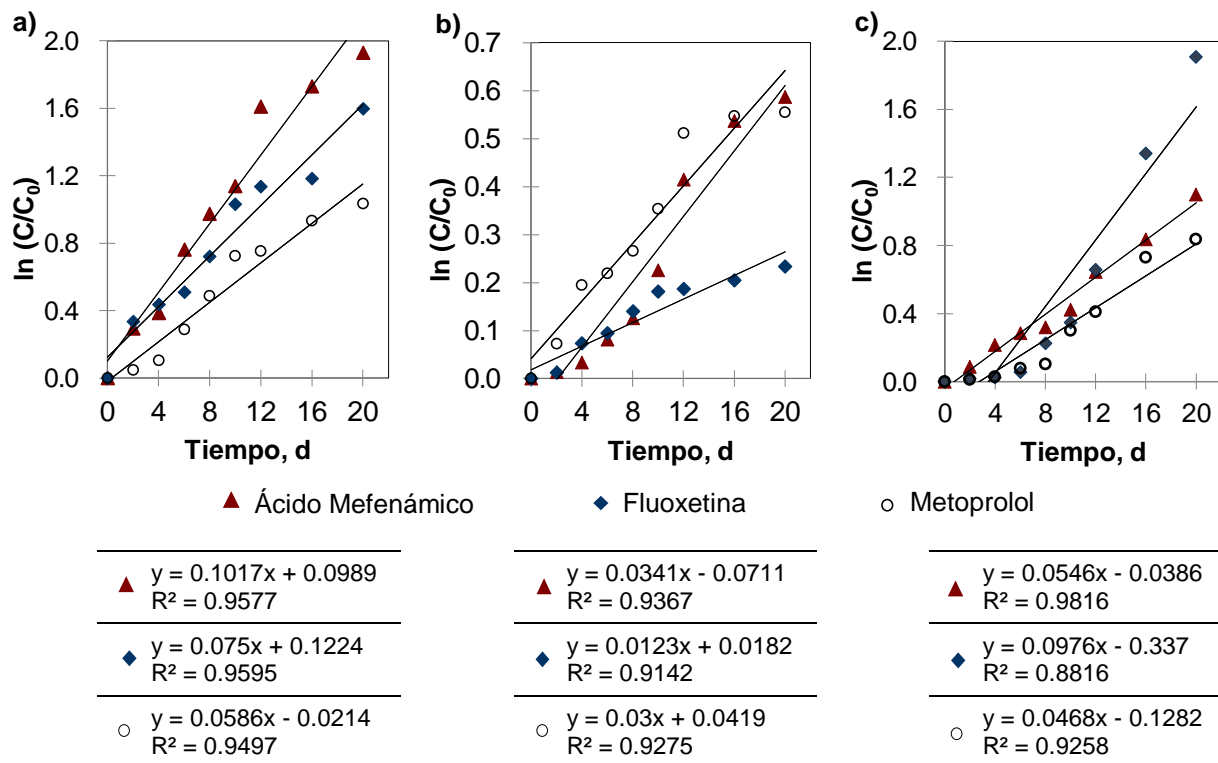
El seguimiento de las concentraciones de N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub> y DQO para verificar la actividad de la biomasa en cada uno de los consorcios se presenta en la Figura 4.8. Se observa un decremento gradual de la concentración de N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub> y DQO hasta los 12 días en el consorcio amonio-nitrito oxidante, nitrito oxidante y biomasa heterótrofa, respectivamente (Anexo 4.6 y 4.7). Cuando ya no existió remoción adicional significativa de N-NH<sub>4</sub> y N-NO<sub>2</sub>, la eliminación de los fármacos también dejó de ser significativa. En cambio en la biomasa heterótrofa, la remoción de los fármacos incrementó después de los 12 d, cuando la mayor parte de la materia orgánica había sido consumida.



**Figura 4.8. Desempeño de la biomasa en las pruebas de biodegradabilidad.**  
 a) Amonio-nitrito oxidante; b) Nitrito oxidante; c) Biomasa heterótrofa

Se aplicó una regresión lineal usando los datos de la biodegradación de los fármacos para ajustar a un modelo cinético de pseudo-primer orden. Los valores calculados de  $R^2$  estuvieron en el intervalo de 0.88-0.98 (Figura 4.9), las constantes cinéticas de biodegradación fueron obtenidas dividiendo la pendiente entre la concentración de biomasa ( $400 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Los valores de las constantes son presentados en la Tabla 4.1. Las mayores constantes de biodegradación ( $k_{\text{biol}}$ ) de fluoxetina fueron obtenidas usando la biomasa heterótrofa, seguido de la biomasa amonio-nitrito oxidante. Una relación inversa fue obtenida para el ácido mefenámico y metoprolol, los mayores  $k_{\text{biol}}$  fueron determinados con el consorcio amonio-nitrito oxidante, seguido de la biomasa heterótrofa, las menores constantes de biodegradación de los tres fármacos fueron obtenidas usando el consorcio nitrito oxidante.

Joss *et al.* (2006) propusieron tres grupos de biodegradabilidad de acuerdo a la constante de biodegradación de los compuestos con relación a los sólidos suspendidos:  $k_{\text{biol}} < 0.1 \text{ L}\cdot\text{gSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , no remoción sustancial debido a la degradación biológica ( $< 20 \%$ ), sin embargo, para compuestos con coeficiente de sorción  $K_d$  mayor a  $1 \text{ L}\cdot\text{gSS}^{-1}$ , la remoción puede ser mayor debida a la transferencia al lodo;  $0.1 < k_{\text{biol}} < 10 \text{ L}\cdot\text{gSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , remoción parcial (entre 20 y 90 %);  $k_{\text{biol}} > 10 \text{ L}\cdot\text{gSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , más del 90 % de remoción por degradación biológica, la eficiencia de degradación es fuertemente dependiente de la configuración del reactor. Fernandez-Fontaina *et al.* (2016) clasificaron a los compuestos farmacéuticos de acuerdo a su  $k_{\text{biol}}$  respecto a los sólidos suspendidos volátiles:  $k_{\text{biol}} > 1 \text{ L}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , altamente biodegradable;  $1 > k_{\text{biol}} > 0.5 \text{ L}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , moderadamente biodegradable;  $0.5 > k_{\text{biol}} > 0.1 \text{ L}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , lentamente biodegradable y  $k_{\text{biol}} < 0.1 \text{ L}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , recalcitrante. En este estudio, los valores de las constantes fueron determinados respecto a los sólidos suspendidos volátiles. Los valores de  $k_{\text{biol}}$  para el ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol determinados usando el consorcio amonio-nitrito oxidante y la biomasa heterótrofa corresponden a la categoría de una remoción parcial y lentamente biodegradable. Los valores de  $k_{\text{biol}}$  de los tres compuestos con el consorcio nitrito oxidante fueron bajos, corresponden a las categorías de no existir remoción sustancial debido a la degradación biológica (recalcitrante). El mayor valor de la constante de biodegradación  $k_{\text{biol}}$  fue determinado para el ácido mefenámico con el consorcio amonio-nitrito oxidante; el valor fue 46 % más bajo con la biomasa heterótrofa (Tabla 4.1). Para la fluoxetina el mayor valor de  $k_{\text{biol}}$  fue determinado usando la biomasa heterótrofa, el valor de la constante con el consorcio amonio-nitrito oxidante fue 23 % más bajo. En el caso del metoprolol, el mayor valor fue determinado con el consorcio amonio-nitrito oxidante, el valor de  $k_{\text{biol}}$  fue 20 % más bajo con la biomasa heterótrofa.



**Figura 4.9. Modelo cinético de pseudo primer orden.**  
a) Amonio-nitrito oxidante; b) Nitrito oxidante; c) Biomasa heterótrofa

**Tabla 4.1.** Constantes de biodegradación en los diferentes consorcios microbianos

Compuesto	$k_{biol}$ , $L \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$			$k_{biol}$ literatura ( $L \cdot gSS^{-1} \cdot d^{-1}$ )* ( $L \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$ )**
	Amonio-nitrito oxidante	Nitrito oxidante	Heterótrofa	
Ácido Mefenámico	0.254	0.085	0.137	* 0.08 - 0.48 <sup>c</sup> * 3.9 - 5.3 <sup>d</sup> * 0.9 - 1.1 <sup>d</sup>
Fluoxetina	0.188	0.03	0.244	** 0.6-1.3 <sup>e</sup> , 9.0 <sup>b</sup> ** 1.12-1.77 <sup>f</sup>
Metoprolol	0.147	0.075	0.117	* 0.25 - 0.76 <sup>a, b</sup> * 0.25 - 0.31 <sup>d</sup> * 0.69 - 0.76 <sup>d</sup>

**Referencias:** <sup>a</sup>Wick *et al.*, 2009; <sup>b</sup> Suarez *et al.*, 2010; <sup>c</sup>Falàs *et al.*, 2012; <sup>d</sup>Falàs *et al.*, 2013; <sup>e</sup>Fernandez-Fontaina *et al.*, 2014; <sup>f</sup>Fernandez-Fontaina *et al.*, 2016.

Los valores de  $k_{biol}$  determinados en este estudio para el ácido mefenámico, se encuentran dentro del intervalo de los valores reportados en la literatura, en cambio las constantes determinadas para la fluoxetina y metoprolol son más bajas que las reportadas previamente. Falàs *et al.* (2012) obtuvieron valores más bajos que en este estudio, ellos compararon las constantes de remoción de ácido mefenámico en lodo activado nitrificante y soportes con biopelícula, los soportes con biopelícula mostraron constantes de remoción considerablemente mayores de ácido mefenámico ( $0.06-0.17 L \cdot g \text{ biomasa}^{-1} \cdot d^{-1}$ ) comparado a  $0-0.04 L \cdot g \text{ biomasa}^{-1} \cdot d^{-1}$  para lodo activado, a pesar de

que la capacidad de nitrificación de la biopelícula fue más baja que la del lodo activado nitrificante. Los valores reportados por Falås *et al.* (2013) fueron más altos, ellos evaluaron tres reactores paralelos en lote (lodo anóxico, lodo aerobio y proceso híbrido biopelícula-lodo activado), ellos encontraron también que el ácido mefenámico fue degradado más rápidamente por la biomasa inmovilizada que por la biomasa aerobia suspendida, donde la capacidad de nitrificación por unidad de biomasa fue más alta para la biomasa inmovilizada, las constantes obtenidas para el ácido mefenámico fueron 3.9-5.3 L·g biomasa<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> con la biomasa inmovilizada y 0.9-1.1 L·g biomasa<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> para el lodo aerobio. En contraste, las constantes obtenidas para el metoprolol fueron 0.25-0.31 L·g biomasa<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> con la biomasa inmovilizada y 0.69-0.76 L·g biomasa<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> para el lodo aerobio. Los valores de  $k_{\text{biol}}$  de metoprolol determinados en lodo activado por Wick *et al.* (2009) fueron 0.35-0.4 L·gSS<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, por lo tanto, las constantes reportadas para el metoprolol fueron mayores que las determinadas en este estudio. Suarez *et al.*, (2010) obtuvieron  $k_{\text{biol}}$  de 9 L·gSS<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> para fluoxetina en un reactor nitrificante, Fernández-Fontaina *et al.*, (2014) obtuvieron  $k_{\text{biol}}$  de 0.6 y 1.3 L·gSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> en reactores enriquecidos con lodo activado nitrificante, posteriormente Fernández-Fontaina *et al.*, (2016) reportaron constantes de biodegradación de fluoxetina más altas (1.77 L·gSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) bajo condiciones de remoción de materia orgánica (microorganismos heterótrofos), seguido de condiciones de nitratación (1.17 L·gSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) y condiciones de nitrificación completa (1.12 L·gSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), todos estos valores fueron más altos que los obtenidos en este estudio, pero al mismo tiempo se observó un comportamiento similar, ya que las  $k_{\text{biol}}$  de la fluoxetina fueron más altas en la biomasa heterótrofa, seguido de la biomasa amonio-nitrito oxidante.

Los resultados indicaron que la biodegradación de fármacos no solo depende de sus características químicas, sino que también depende de los consorcios microbianos involucrados. Algunos estudios difieren de estas constantes de biodegradación, Joss *et al.* (2006) y Tran *et al.* (2009) sugieren que parte de las diferencias pueden ser explicadas por las diferentes concentraciones de fármacos, las características de la biomasa (fracción de biomasa activa, tamaño del flóculo y diversidad microbiana), la composición del agua residual y las condiciones experimentales. En este estudio se ha confirmado que la biodegradación de fármacos puede ser atribuida a las actividades de microorganismos autótrofos y heterótrofos. Algunos estudios han explicado que los microorganismos heterótrofos pueden degradar los fármacos vía metabolismo y/o cometabolismo, el metabolismo es posible a altas concentraciones de fármacos. Cuando los fármacos están presentes a niveles de concentración traza como en este estudio, la biodegradación puede ser atribuida a actividades cometabólicas. A diferencia de los heterótrofos, los microorganismos autótrofos solo pueden cometabolizar los compuestos farmacéuticos en la presencia de un sustrato de crecimiento. Las bacterias autótrofas amonio-oxidantes cometabolizan una gran variedad de fármacos vía enzimas no específicas, tales como la enzima amonio monooxigenasa (Tran *et al.*, 2013). Esto se relaciona con los resultados obtenidos en este estudio, donde las remociones de los fármacos disminuyeron cuando la remoción de N-NH<sub>4</sub> disminuyó, mientras las tasas de remoción de los fármacos incrementaron cuando la mayor parte de la materia orgánica había sido consumida por los microorganismos heterótrofos.

La biodegradación cometabólica por la enzima amonio monooxigenasa puede involucrar reacciones de hidroxilación y oxidación durante la nitrificación (Xu *et al.*, 2016). El ataque por el oxígeno reactivo de la enzima amonio monooxigenasa puede ocurrir contra enlaces N-H, C-H, o dobles enlaces, otras dos reacciones que han sido observadas son deshidrogenación/oxidación y deshalogenación (Forrez *et al.*, 2011). También es sabido que la degradación aerobia de compuestos con fragmento éter aromático-alifático como la fluoxetina y metoprolol puede proceder por ruptura del éter (O-desalquilación) (Tadkaew *et al.*, 2011). El ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol poseen una amina secundaria, dos principales reacciones oxidativas iniciales en el grupo funcional amino han sido observadas para los sistemas de lodos activados: 1) N-oxidación y 2)  $\alpha$ -C-hidroxilación seguido por N-desalquilación, oxidación a amida o

deshidratación (Gulde *et al.*, 2016). Por otro lado la mayoría de los compuestos que presentan reacciones de sustitución no tienen relación con la remoción de nitrógeno amoniacal (Helbling *et al.*, 2012).

#### 4.1.3 Equilibrio de sorción

Para la determinación de los coeficientes de sorción es necesario calcular el tiempo de equilibrio de sorción. El equilibrio de sorción es alcanzado cuando las tasas de sorción y desorción son iguales. Los resultados indicaron que el equilibrio entre las fases líquida y sólida para el ácido mefenámico, la fluoxetina y el metoprolol puede ser alcanzado después de 24 horas. Las Figura 4.10 y el Anexo 5.1 muestran las disminuciones de las concentraciones de los fármacos en la fase líquida hasta que se alcanzó el equilibrio de sorción.

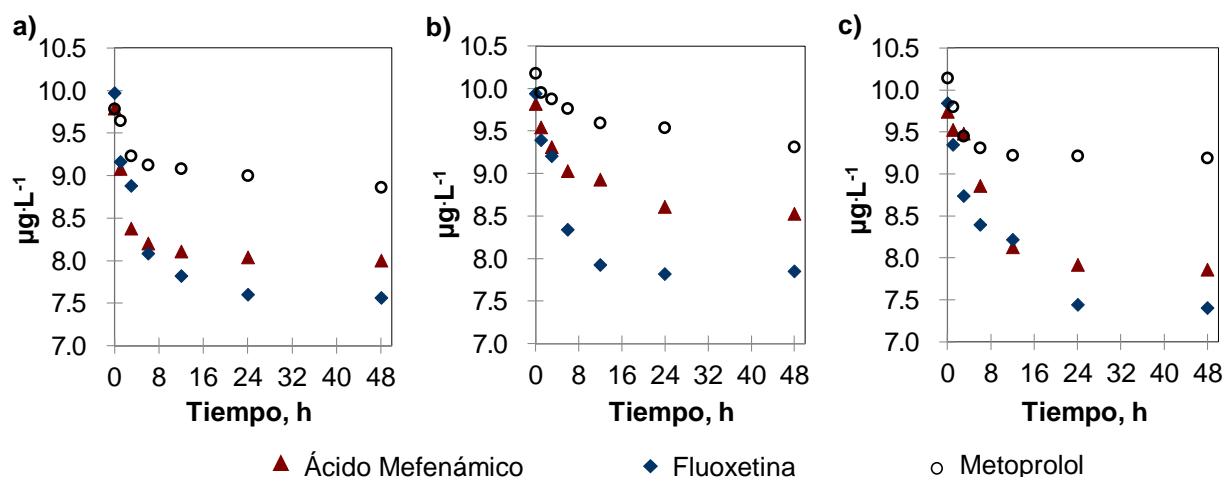


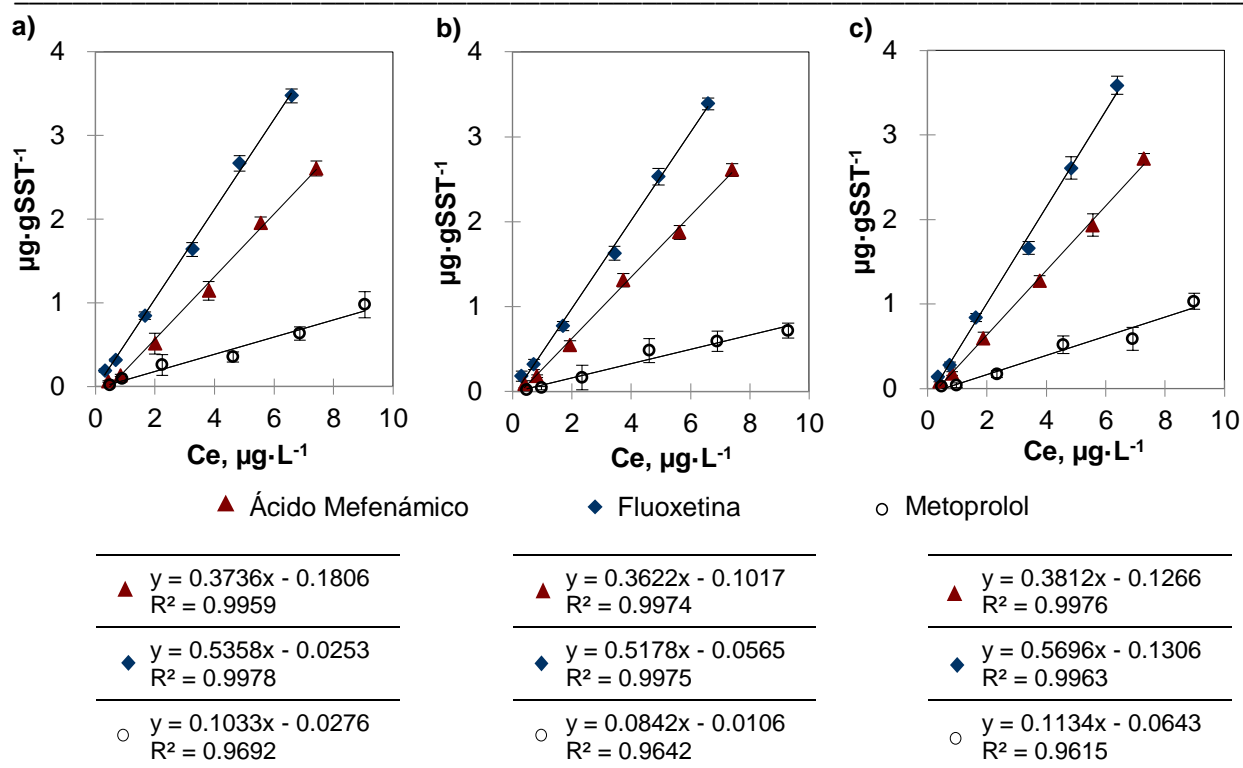
Figura 4.10. Evolución de los fármacos en función del tiempo en la fase líquida.

a) Amonio-nitrito oxidante; b) Nitrito oxidante; c) Biomasa heterótrofa

#### 4.1.4 Coeficientes de sorción $K_d$

Las isothermas de sorción mostraron un buen ajuste para el modelo lineal (Figura 4.11). Las concentraciones iniciales y finales de los fármacos en la fase líquida y sólida para la determinación de  $K_d$  se encuentran en el Anexo 5.2 y 5.3. La pendiente de las isothermas de sorción representa el coeficiente  $K_d$  en  $L \cdot kg^{-1}$ . Los coeficientes de sorción para cada clase de biomasa inactiva y los coeficientes de sorción reportados en otros estudios se encuentran resumidos en la Tabla 4.2. Los coeficientes de sorción para la biomasa inactiva heterótrofa fueron ligeramente mayores que los valores obtenidos para los otros dos consorcios, lo cual puede ser debido a las diferentes morfologías de las biomasas. Para la biomasa inactiva del consorcio nitrito oxidante se obtuvieron los menores valores de  $K_d$ . Los valores bajos del coeficiente de sorción ( $K_d < 500 L \cdot kg^{-1}$  o  $\log K_d < 2.7$ ) implican baja sorción al lodo, lo cual resulta principalmente en su presencia en la fase acuosa (Ternes *et al.*, 2004; Poseidon, 2004). Los coeficientes de sorción más bajos fueron determinados para el metoprolol con los tres consorcios ( $\log K_d$  de 1.93-2.05), el compuesto con los valores más bajos de  $\log K_{ow}$  y  $\log D_{lipw}$ , indicando su bajo potencial de sorción, lo cual está de acuerdo con la baja sorción presentada en las pruebas de biodegradabilidad. Los valores de  $\log K_d$  para el ácido mefenámico estuvieron entre 2.56 y 2.58, por lo tanto, este compuesto también mostró bajo potencial de sorción, en el caso de la fluoxetina, los valores de los coeficientes de sorción  $\log K_d$  fueron ligeramente mayores a 2.7 (2.71-2.76) indicando su tendencia a la sorción en la biomasa y las partículas, tal como se observó en las pruebas de biodegradabilidad, donde se tuvo mayor sorción de la fluoxetina en el consorcio amonio-nitrito oxidante y nitrito oxidante en comparación con los demás fármacos.





**Figura 4.11. Isothermas de sorción de los fármacos en las diferentes biomasas.**  
 a) Amonio-nitrito oxidante; b) Nitrito oxidante; c) Biomasa heterótrofa

**Tabla 4.2. Coeficientes de sorción en los diferentes consorcios microbianos**

Compuesto	log K <sub>d</sub>			log K <sub>d</sub> Literatura
	Amonio-nitrito oxidante	Nitrito oxidante	Heterótrofa	
Ácido mefenámico	2.57	2.56	2.58	2.64-2.73 <sup>a</sup>
Fluoxetina	2.73	2.71	2.76	3.76-3.78 <sup>d</sup> 2.88-3.02 <sup>e</sup>
Metoprolol	2.01	1.93	2.05	1.7-1.95 <sup>b, c</sup>

**Referencias:** <sup>a</sup> Radjenović *et al.*, 2009; <sup>b</sup> Ramil *et al.*, 2010; <sup>c</sup> Scheurer *et al.*, 2010; <sup>d</sup> Hörsing *et al.*, 2011; <sup>e</sup> Fernandez-Fontaina *et al.*, 2014

Hörsing *et al.* (2011) obtuvieron las isothermas de sorción de la fluoxetina para lodo secundario, los resultados mostraron valores de K<sub>d</sub> de 5700-6000 L·kg<sup>-1</sup> (log K<sub>d</sub> de 3.76-3.78), los coeficientes fueron más altos que los calculados en este estudio. Los valores de K<sub>d</sub> obtenidos para el ácido mefenámico en este estudio fueron ligeramente menores a los calculados por Radjenović *et al.* (2009), quienes reportaron valores de 434 a 537 L·kg<sup>-1</sup> (log K<sub>d</sub> de 2.64-2.73) en lodo activado de biorreactores con membranas, indicando que la sorción podría ser un mecanismo de remoción relevante. Ellos explicaron que las discrepancias en los datos de la literatura podrían ser debido a las diferencias en el tiempo de retención de sólidos y la composición de la biomasa. Finalmente, los coeficientes de sorción determinados para el metoprolol fueron cercanos a los reportados por Scheurer *et al.* (2010), ellos obtuvieron valores entre 50 y 90 L·kg<sup>-1</sup> (log K<sub>d</sub> de 1.7-1.95) en lodo activado. Ramil *et al.* (2010) reportaron log K<sub>d</sub> de 1.75 en sedimentos de río.

## 4.2 REACTORES CON BIOMASA INMOVILIZADA

### 4.2.1 Cantidad de biomasa y tiempos de retención de sólidos en los reactores

Los cuatro reactores con biomasa inmovilizada fueron operados durante 304 días. La cantidad de biomasa inmovilizada aumentó con el incremento de la carga orgánica, los reactores PE2 y PU2 (CO de 9 y 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>) acumularon mayores cantidades de biomasa comparado con los reactores PE1 y PU1 (CO de 3 y 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>). La Figura 4.12 presenta la evolución de la biomasa en ambos soportes. Al comparar bajo las mismas cargas orgánicas, se observa que los cubos de poliuretano permitieron una mayor acumulación de biomasa en los reactores durante todas las fases, las cantidades fueron de 5.8-10.5 gSV·m<sup>-2</sup> en estos reactores y 4.9-9.0 gSV·m<sup>-2</sup> en los reactores con cintas de polietileno (Tabla 4.3). La Figura 4.13a muestra una comparación de la cantidad promedio de biomasa en cada tipo de empaque durante las fases experimentales. En las cintas de polietileno la biomasa se encuentra en la superficie relativamente lisa de su estructura, mientras que en los cubos de poliuretano la biomasa es inmovilizada de dos formas, la primera es una biopelícula sobre la superficie externa, la otra es en el interior de los poros que proporcionan interespacios en los cuales los microorganismos pueden crecer y facilitan el transporte de compuestos en la biomasa inmovilizada (Guo *et al.*, 2010; Quan *et al.*, 2012).

El comienzo de la recirculación del efluente estuvo acompañado de la reducción de la cantidad de biomasa, debido a que la recirculación incrementa las velocidades de flujo a través del reactor, causando el desprendimiento del exceso de biopelícula, a la vez que se mejora la transferencia de masa (Rittman y McCarty, 2001). La disminución ocurrió durante los primeros días de las fases, posteriormente la cantidad de biomasa incrementó, ésta disminución fue más notoria en los reactores PE2 y PU2.

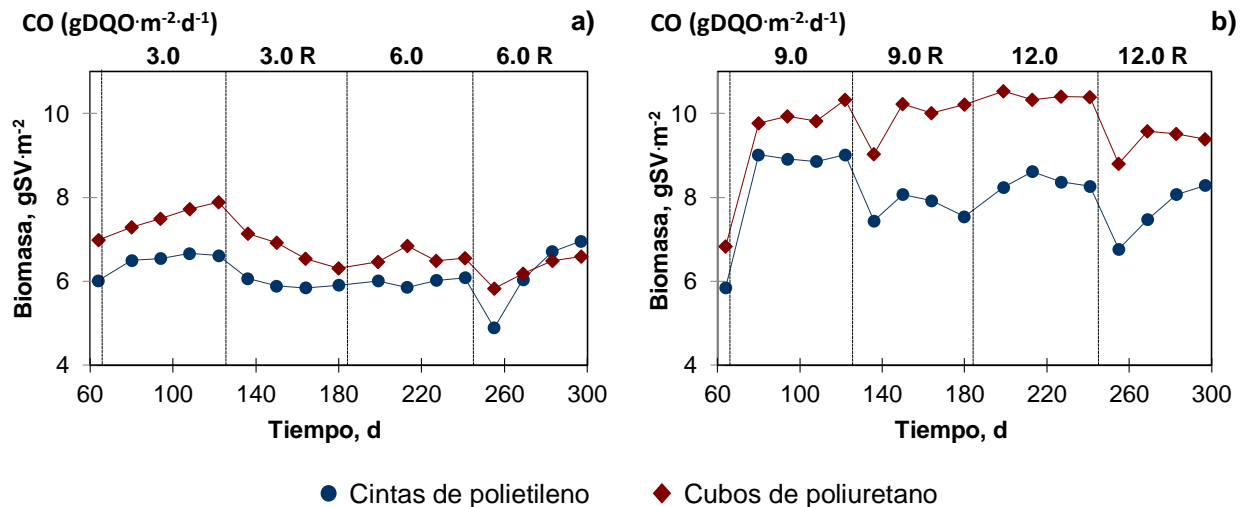


Figura 4.12. Evolución de la biomasa durante las fases experimentales.

a) Reactores PE1 y PU1; b) Reactores PE2 y PU2

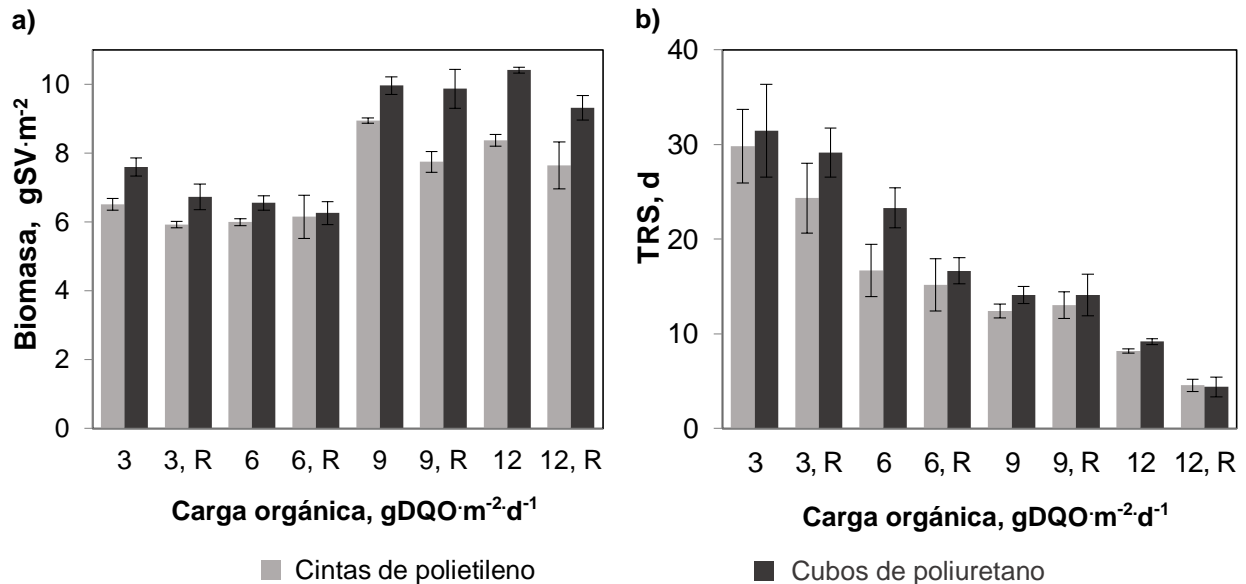
Los TRS disminuyeron con el aumento de la carga orgánica en los reactores, el aumento de la carga orgánica se realizó mediante el incremento del flujo en el influente de los reactores, esto causó mayor desprendimiento de biomasa y mayor extracción de sedimento de los reactores, por lo tanto, los TRS disminuyeron. Al comparar bajo las mismas cargas orgánicas y velocidades de flujo, los TRS fueron siempre más altos en los reactores con cubos de poliuretano (Figura 4.13b), lo cual puede ser atribuido a que la estructura porosa de este material permite retener mayor cantidad de biomasa, tanto en la parte externa como en la parte interna, aún con altas velocidades de flujo. Los TRS estuvieron entre 12-34 d en el reactor PE1 y 15-37 d en el reactor PU1, mientras que los TRS estuvieron entre 4-13 y 4-16 d en los reactores PE2 y PU2 respectivamente (Tabla 4.3). Los mayores TRS se encontraron durante la fase 2 de los reactores PE1 y PU1 (CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>).

**Tabla 4.3.** Cantidad de biomasa y tiempos de retención de sólidos

Carga orgánica, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Recirculación, %	Cintas de polietileno		Cubos de poliuretano	
		Biomasa, gSV·m <sup>-2</sup>	TRS, d	Biomasa, gSV·m <sup>-2</sup>	TRS, d
3.0 (arranque)	0	6.2 PE1	28 PE1	7.0 PU1	36 PU1
		5.9 PE2	31 PE2	6.8 PU2	33 PU2
3.0*	0	6.3-6.6	26-34	7.3-7.9	27-37
3.0*	50	5.9-6.0	19-28	6.3-7.1	26-32
6.0*	0	6.0-6.1	14-20	6.5-6.8	20-25
6.0*	50	4.9-7.0	12-18	5.8-6.6	15-18
9.0**	0	8.9-9.0	11-13	9.8-10.3	13-14
9.0**	50	7.4-8.1	10-13	9.0-10.2	11-16
12.0**	0	8.2-8.6	8-9	10.3-10.5	9-10
12.0**	50	6.8-8.3	4-6	8.8-9.6	4-6

\* Reactores PE1 y PU1

\*\* Reactores PE2 y PU2



**Figura 4.13.** Biomasa y TRS promedio en los reactores.

a) Cantidad de biomasa; b) TRS

Se realizaron los análisis estadísticos con el programa *Statgraphics*, se evaluaron las diferencias entre las cantidades de biomasa con los dos materiales de soporte a la misma carga orgánica, también se evaluaron las diferencias entre los TRS. Los valores obtenidos de la *razón-F* y *valor-P* del análisis estadístico son mostrados en la Tabla 4.4. Si el *valor P* de la *prueba F* es menor de 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre las cantidades promedio de un material de soporte a otro, con un 95 % de nivel de confianza. Por lo tanto, al trabajar con la misma carga orgánica, existe una diferencia estadísticamente significativa en las cantidades de biomasa entre un material de soporte y otro, excepto cuando los reactores fueron operados con CO de 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> con recirculación. En cuanto al TRS, existe una diferencia estadísticamente significativa en los TRS entre un material de soporte y otro cuando se trabajó la condición sin recirculación del efluente, excepto cuando los reactores fueron operados con CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>.

**Diseño Base**

Número de factores experimentales: 1      Número de corridas: 8  
 Número de bloques: 1                      Grados de libertad para el error: 6  
 Número de respuestas: 1                   Aleatorizar: Sí

<i>Factores</i>	<i>Niveles</i>	<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>
Materiales de soporte	2	Cantidad	gSV·m <sup>-2</sup> ; d

**Tabla 4.4.** Análisis estadístico de las diferencias entre las cantidades de biomasa y TRS obtenidas con los diferentes materiales de soporte a la misma carga orgánica

CO, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Recirculación, %	BIOMASA		TRS	
		<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
3.0	0	55.45	0.0003	0.27	0.6201
3.0	50	17.46	0.0058	6.27	0.0463
6.0	0	37.55	0.0009	14.33	0.0091
6.0	50	0.06	0.8161	0.91	0.3772
9.0	0	59.80	0.0002	6.24	0.0467
9.0	50	44.36	0.0006	4.5	0.0780
12.0	0	465.20	0.0000	8.00	0.0300
12.0	50	18.92	0.0048	0.13	0.7304

**4.2.2 Desempeño de los reactores en la remoción de la materia orgánica**

Las concentraciones de materia orgánica en el influente expresadas como DQO estuvieron entre 200 y 380 mg·L<sup>-1</sup>. La Fase 1 (desarrollo de la biomasa y estabilización del proceso) tuvo una duración de 64 días, las remociones de materia orgánica en los cuatro reactores aumentaron gradualmente hasta llegar al 80 %, esto ocurrió a partir del día 52 en los reactores PE y desde el día 48 en los reactores PU. En la Figura 4.14 se presenta el seguimiento de la DQO en los reactores. En los últimos 10 días de la fase 1, las remociones fueron mayores al 88 %, los sistemas se mantuvieron estables y tuvieron tasas de remoción arriba de 2.4 g·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>.

Una vez alcanzada la estabilización del proceso, se inició la Fase 2 que incluyó la adición de los fármacos al agua residual. Los reactores PE1 y PU1 continuaron trabajando con carga orgánica de  $3 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  (TRH de 2.8-4.1 h), en esta fase los dos reactores se mantuvieron estables en cuanto a la remoción de DQO, esto representó tasas de remoción promedio de  $2.6 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  en ambos reactores y valores hasta de  $33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en los efluentes. Al incrementar la CO a  $6 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ , disminuyó el TRH (1.3-1.7 h) y la remoción de DQO, a los dos reactores les llevó alrededor de 30 d alcanzar nuevamente remociones mayores al 80 %. Durante la Fase 2 de los reactores PE2 y PU2 se incrementó la carga orgánica a  $9 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ , como consecuencia hubo aumento del caudal y disminución del TRH (0.9-1.4 h), al comienzo de la fase también se observó una disminución en la remoción de DQO en ambos soportes, después de 30 d alcanzaron nuevamente remociones mayores al 80 %. Cuando se incrementó la CO a  $12 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  (Fase 4) no se logró llegar al 80 % de remoción de DQO en ningún reactor, aun así el reactor PU2 obtuvo mejores resultados,  $79.3 \pm 2.5 \%$  de remoción en los últimos 14 días de la fase en comparación a  $74.7 \pm 2.3 \%$  en el reactor PE2 (Tabla 4.5). Al estudiar el efecto del 50 % de recirculación del efluente en los cuatro reactores, no se observó disminución relevante de la DQO en los efluentes, las remociones permanecieron constantes. En la Figura 4.15 se presentan las remociones promedio de la DQO en los reactores con diferentes empaques operados con diferentes cargas orgánicas, sin y con recirculación. Se observa que el incremento de la carga orgánica resultó en un decremento de las remociones de DQO en los reactores, las mayores remociones (mayores a 89 %) fueron alcanzadas cuando se trabajó con CO de  $3 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ , las menores remociones fueron obtenidas con CO de  $12 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  (menores a 80 %). La recirculación del efluente no aumentó la remoción de DQO. Las mayores remociones fueron obtenidas en los reactores con cubos de poliuretano.

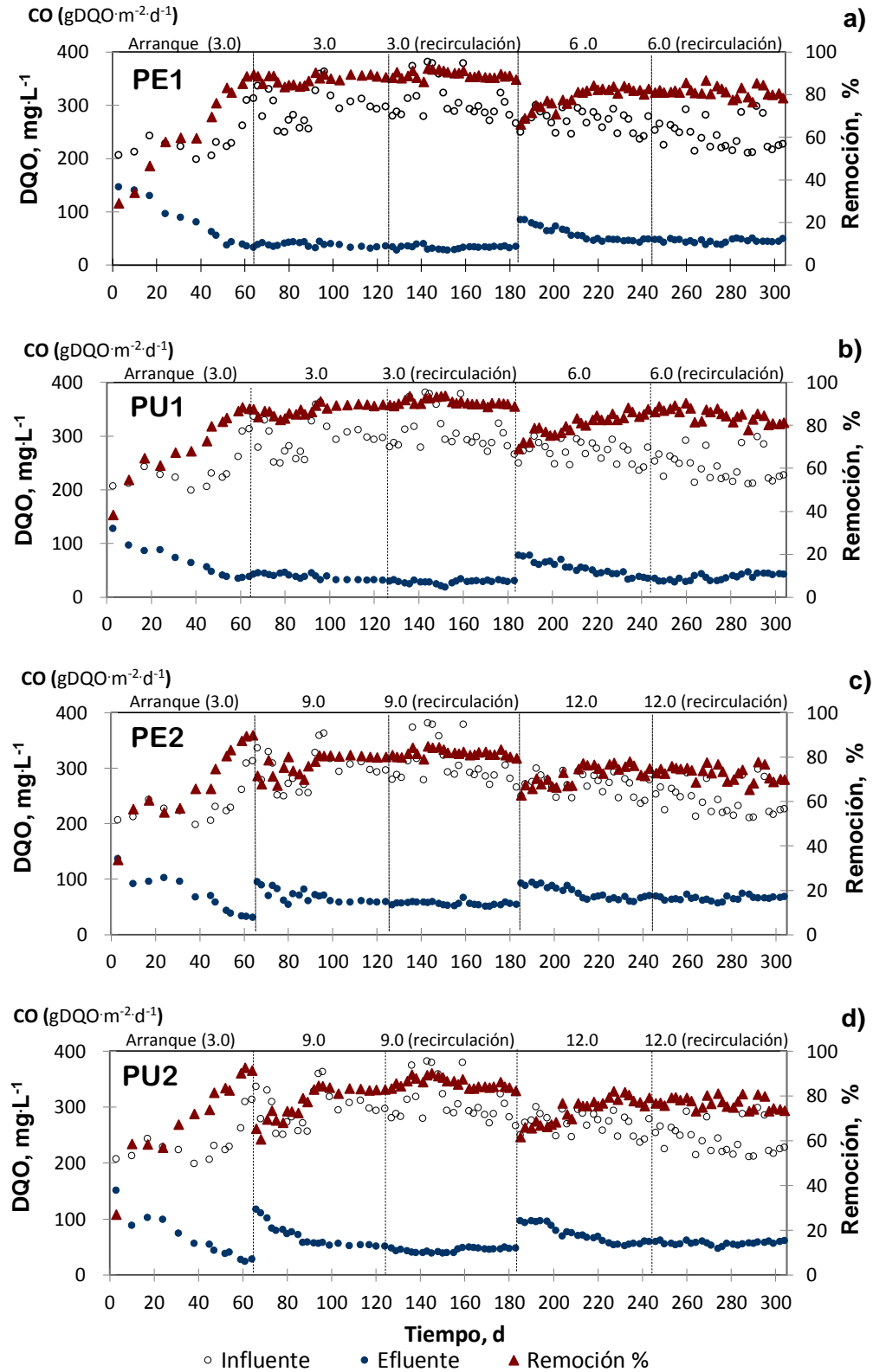


Figura 4.14. Seguimiento de la DQO durante la experimentación.

a) Reactor 1.Cintas de polietileno; b) Reactor 1.Cubos de poliuretano; c) Reactor 2.Cintas de polietileno; d) Reactor 2.Cubos de poliuretano

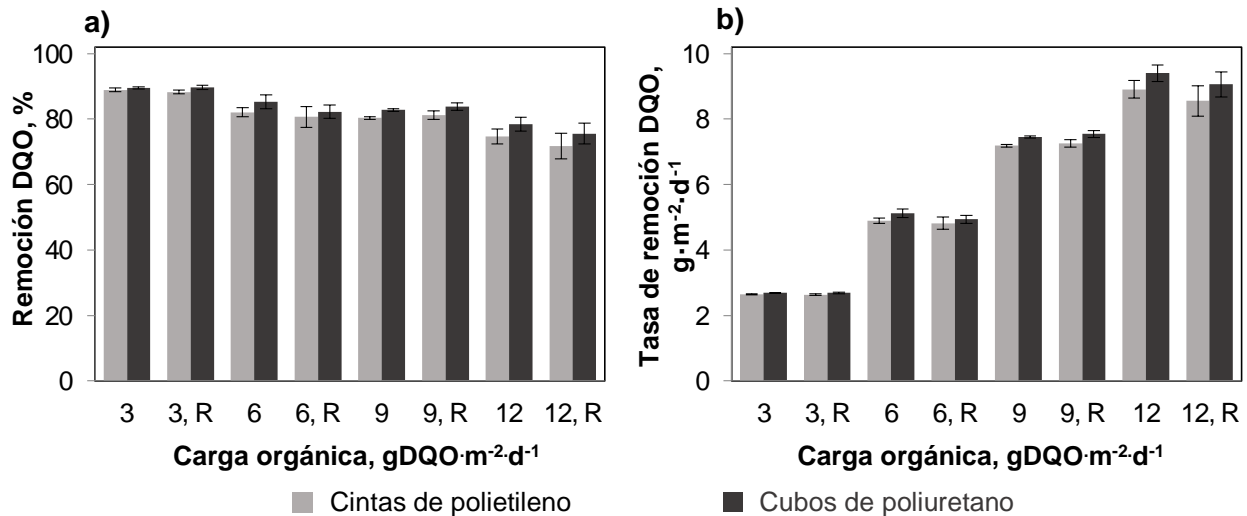
**Tabla 4.5.** Remoción de materia orgánica medida como DQO en las diferentes fases experimentales

Carga orgánica, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Influyente, mgL <sup>-1</sup>	DQO					
		Cintas de polietileno			Cubos de poliuretano		
		Efluente, mgL <sup>-1</sup>	Remoción, %	Tasa de remoción, g·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Efluente, mgL <sup>-1</sup>	Remoción, %	Tasa de remoción, g·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>
3.0 (arranque)	236±37	69±33* PE1	69.2±16.8* PE1	2.1±0.5* PE1	63±29* PU1	71.9±14.9* PU1	2.2±0.4* PU1
		39±6** PE1	84.2±0.2** PE1	2.5±0.5** PE1	39±4** PU1	84.6±3.6** PU1	2.5±0.1** PU1
		76±41* PE2	66.1±20.4* PE2	2.0±0.6* PE2	63±38* PU2	71.8±18.5* PU2	2.2±0.6* PU2
		41±8** PE2	83.9±5** PE2	2.5±0.1** PE2	33±8** PU2	86.7±4.9** PU2	2.6±0.1** PU2
3.0	298±33	38±4*	87.2±2.2*	2.6±0.1*	38±5*	87.1±2.5*	2.6±0.1*
		33±2**	88.9±0.6**	2.7±0.02**	32±0.7**	89.5±0.3**	2.7±0.01**
3.0 R	309±36	33±3*	89.3±1.7*	2.7±0.05*	28±3*	90.8±1.6*	2.7±0.05*
		34±1**	88.3±0.6**	2.6±0.02**	30±1**	89.7±0.7**	2.7±0.02**
6.0	270±19	58±14*	79±5.1*	4.7±0.3*	53±14*	80.4±5*	4.9±0.3*
		46±23**	82.1±1.4**	4.9±0.1**	38±5**	85.2±2.1**	5.2±0.1**
6.0 R	243±28	45±4*	81.3±2.5*	4.9±0.16*	37±6*	84.6±3.2*	5.1±0.2*
		46±3**	80.7±3.2**	4.8±0.1**	42±3**	82.2±2**	5±0.1**
9.0	298±33	69±12*	77±4.7*	6.9±0.4*	69±20*	76.6±7.3*	6.9±0.7*
		59±1**	80±0.4**	7.2±0.04**	52±1**	82.8±0.4**	7.4±0.03**
9.0 R	309±36	56±3*	81.8±1.6*	7.3±0.1*	44±4*	85.6±2.2*	7.7±0.2*
		54±3**	81.2±1.3**	7.3±0.1**	46±2**	83.8±1.1**	7.5±0.1**
12.0	270±19	75±12*	72.1±4.4*	8.6±0.5*	71±16*	73.6±6*	8.8±0.7*
		65±4**	74.7±2.3**	8.9±0.3**	55±3**	78.4±2.1**	9.4±0.3**
12.0 R	243±28	66±4*	72.8±3.2*	8.7±0.4*	56±3.5*	76.7±2.6*	9.2±0.3*
		67±1**	71.8±3.9**	8.6±0.5**	58±2**	75.5±3.2**	9±0.4**

\*Valores promedio de la fase

\*\*Valores promedio para los últimos 14 días de la fase

R- 50 % de recirculación del efluente



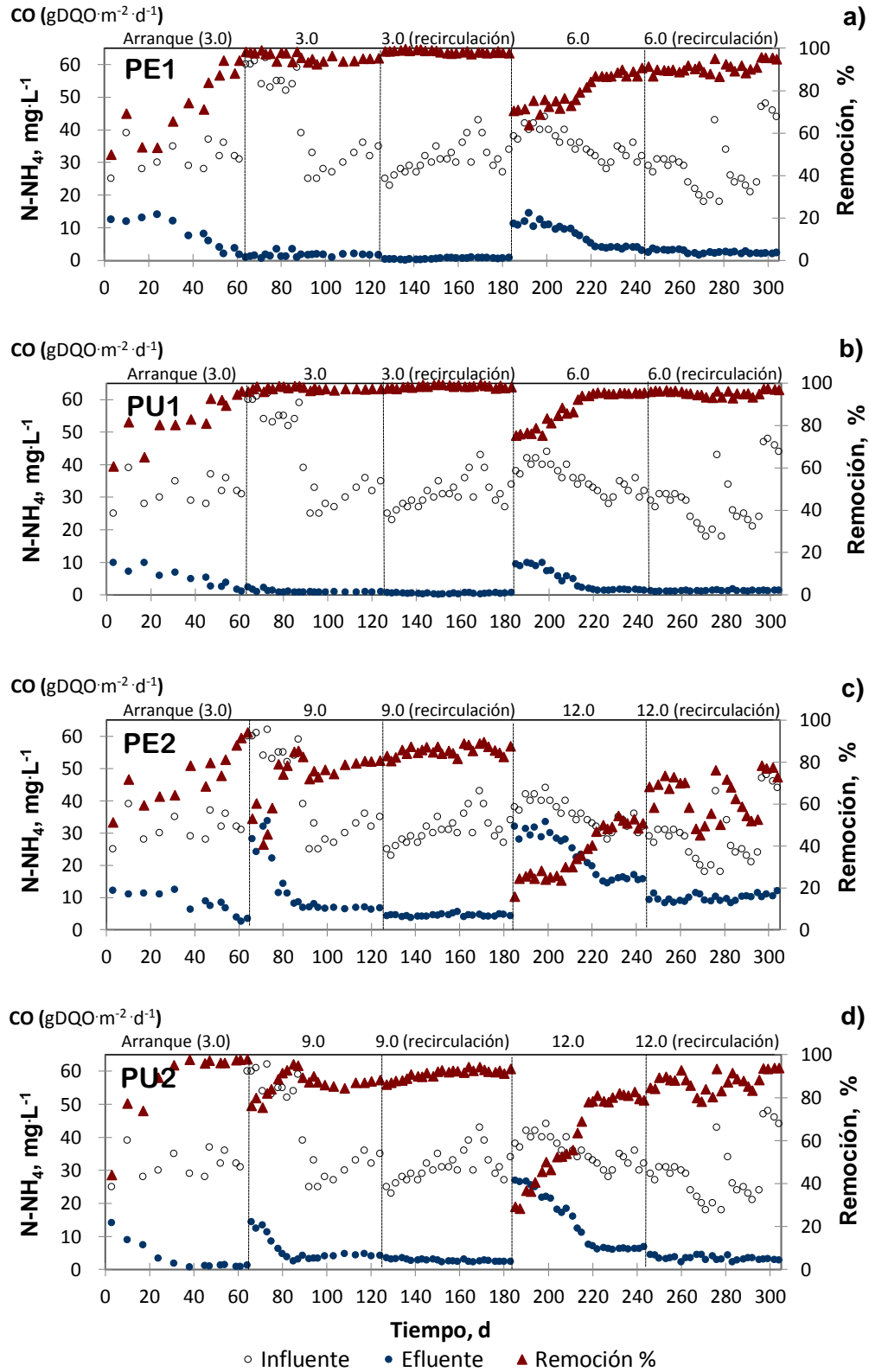
**Figura 4.15.** Remociones promedio de DQO en las diferentes fases experimentales

### 4.2.3 Remoción de nitrógeno amoniacal en los reactores

Las concentraciones de N-NH<sub>4</sub> en el influente estuvieron entre 20 y 60 mg·L<sup>-1</sup>. En el transcurso de la Fase 1 las remociones de N-NH<sub>4</sub> tuvieron un incremento progresivo, de tal manera que a partir del día 24 se consiguió el 80 % de remoción en los reactores PU1 y PU2, esto ocurrió hasta el día 48 en el reactor PE1 y en el día 55 en el reactor PE2, después los reactores se mantuvieron estables y tuvieron remociones constantes mayores al 80 % con tasas de remoción de  $0.4 \pm 0.1 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$  (Figura 4.16). Durante la fase 2, las remociones de N-NH<sub>4</sub> en los reactores PE1 y PU1 aumentaron al continuar trabajando con carga orgánica de  $3 \text{ gDQO} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ . Los porcentajes de remoción del reactor PE1 llegaron hasta  $95.6 \pm 2 \%$  con valores promedio en el efluente de  $1.7 \pm 0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de N-NH<sub>4</sub> y tasas de remoción de  $0.4 \pm 0.2 \text{ gN-NH}_4 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ , los resultados del reactor PU1 fueron mejores, se lograron remociones de  $97.5 \pm 0.7 \%$  y concentraciones en el efluente de  $1.0 \pm 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , este reactor también tuvo mayores TRS (27-37 d). En las gráficas puede verse que no se observó un cambio significativo en los efluentes de los reactores PE1 y PU1 cuando las concentraciones de N-NH<sub>4</sub> en los influentes fueron más altas (día 64-87). Tras el aumento de la carga orgánica a  $9 \text{ gDQO} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$  en los reactores PE2 y PU2, los TRS y los porcentajes de remoción de N-NH<sub>4</sub> disminuyeron, posteriormente las remociones aumentaron de forma progresiva hasta que después de 18 días (día 82) se llegó nuevamente al 80 % de remoción. El reactor PU2 alcanzó mayores remociones de N-NH<sub>4</sub> en comparación con el reactor PE2, después de tan solo 7 días del cambio de fase se lograron conseguir nuevamente remociones por arriba del 80 %, con valores en los efluentes de  $4.4 \pm 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  en los últimos 14 días de la fase. El posterior incremento en la carga orgánica de los reactores PE1 y PU1 a  $6 \text{ gDQO} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$  provocó una disminución del TRS y de las remociones de N-NH<sub>4</sub>, en el reactor PE1 las remociones fueron menores al 90 % durante toda la fase, mientras que el reactor PU1 logró remociones por arriba del 90 %. De igual forma, tras el aumento de la carga orgánica a  $12 \text{ gDQO} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$  en los reactores PE2 y PU2 los porcentajes de remoción de N-NH<sub>4</sub> disminuyeron, las remociones en el reactor PE2 al final de la fase fueron de tan solo  $51.2 \pm 2.1 \%$ , el reactor PU2 obtuvo mejores resultados y sus remociones al final de la fase llegaron al  $80.7 \pm 1.4 \%$ .

En la Tabla 4.6 se presentan los promedios de las concentraciones de N-NH<sub>4</sub> en los influentes durante las diferentes fases experimentales, así como las concentraciones del N-NH<sub>4</sub> en los efluentes, los porcentajes y las tasas de remoción calculados como promedio de todo el período de evaluación de cada fase y como promedio de los valores obtenidos durante los últimos 14 d de cada fase cuando las concentraciones en los efluentes se mantenían constantes. Los resultados de las remociones promedio de N-NH<sub>4</sub> en los reactores con diferentes empaques, operados con diferentes cargas orgánicas, sin y con recirculación, se ilustran en la Figura 4.18 donde se observa que las bajas cargas orgánicas favorecieron las remociones de N-NH<sub>4</sub>, además hay un claro incremento de la remoción de N-NH<sub>4</sub> cuando los reactores fueron operados con recirculación del efluente. Este efecto puede ser atribuido a la reducción de la concentración de la materia orgánica en los reactores, lo cual hace a las bacterias nitrificantes más competitivas, esto incrementa la eficiencia de la nitrificación y la concentración de oxígeno disuelto (EPA, 2000), además al aplicar la recirculación se alcanza una distribución más homogénea del sustrato y oxígeno, mejorando la transferencia de masa (Rittman y McCarty, 2001). Así, las mayores remociones de N-NH<sub>4</sub> (98 %) fueron alcanzadas con CO de  $3 \text{ gDQO} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación del efluente en los reactores con ambos materiales de soporte. Las remociones con CO de  $12 \text{ gDQO} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación del efluente fueron menores de 66 y 90 % en el reactor PE2 y PU2 respectivamente, por lo tanto, las diferencias en las remociones y tasas de nitrificación entre un material de soporte y otro fueron mayores con carga orgánica alta (Figura 4.18a). Los reactores con cubos de poliuretano alcanzaron mayores remociones de N-NH<sub>4</sub> comparado a las obtenidas con las cintas de polietileno.





**Figura 4.16. Seguimiento del N-NH<sub>4</sub> durante la experimentación.**

a) Reactor 1.Cintas de polietileno; b) Reactor 1.Cubos de poliuretano; c) Reactor 2.Cintas de polietileno; d) Reactor 2.Cubos de poliuretano

**Tabla 4.6.** Remoción de N-NH<sub>4</sub> en las diferentes fases experimentales

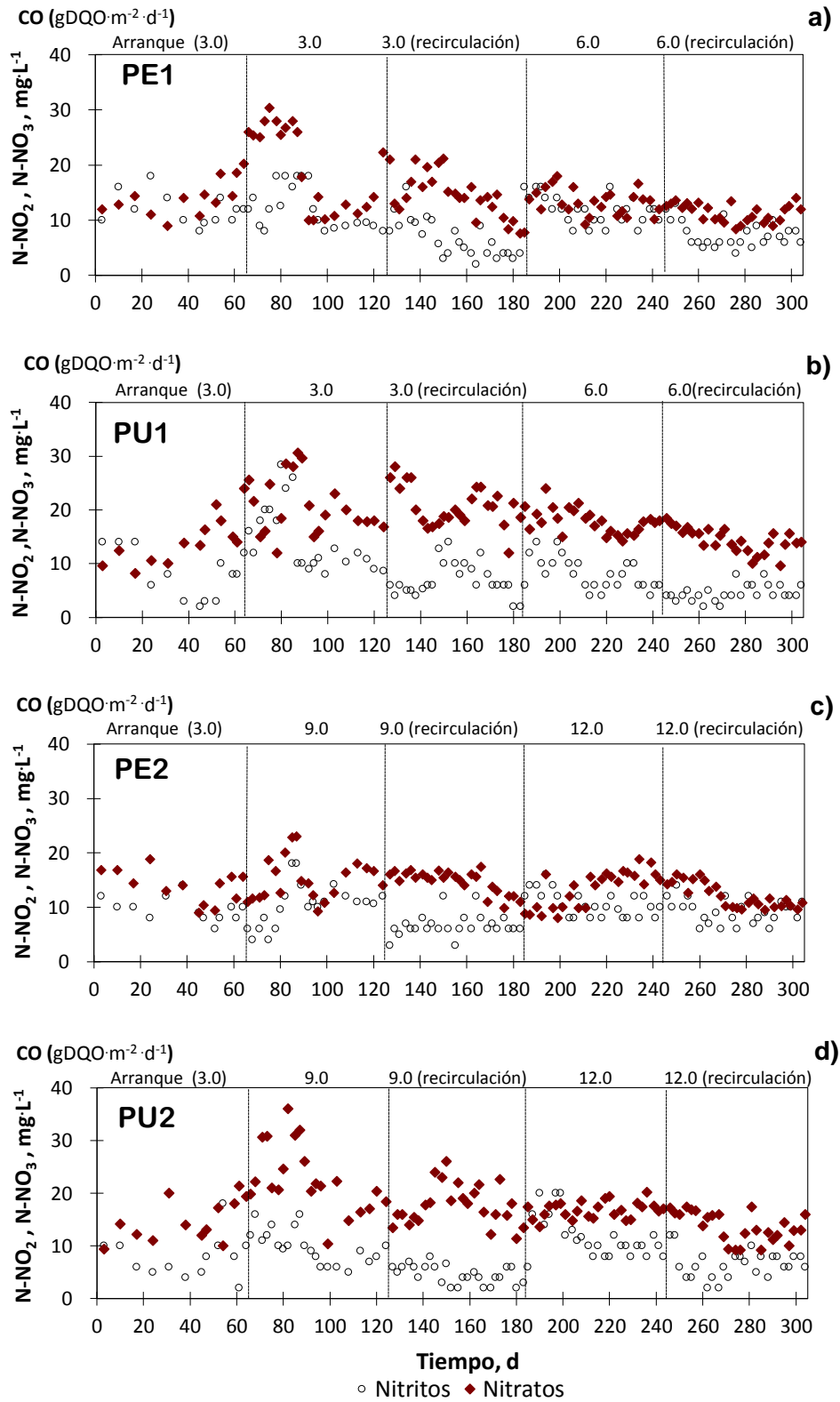
Carga orgánica, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Influente, mgL <sup>-1</sup>	N-NH <sub>4</sub>					
		Cintas de polietileno			Cubos de poliuretano		
		Efluente, mgL <sup>-1</sup>	Remoción, %	Tasa de remoción, gm <sup>2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Efluente, mgL <sup>-1</sup>	Remoción, %	Tasa de remoción, gm <sup>2</sup> ·d <sup>-1</sup>
<b>3.0</b> (arranque)	34±8.8	7.6±4.8* <sup>PE1</sup>	75.5±16.8* <sup>PE1</sup>	0.3±0.1* <sup>PE1</sup>	4.9±2.9* <sup>PU1</sup>	84.1±11.7* <sup>PU1</sup>	0.4±0.1* <sup>PU1</sup>
		3.1±1.8** <sup>PE1</sup>	90.9±5.4** <sup>PE1</sup>	0.4±0.1** <sup>PE1</sup>	2.4±0.9** <sup>PU1</sup>	93.6±2.6** <sup>PU1</sup>	0.4±0.1** <sup>PU1</sup>
		8.1±3.4* <sup>PE2</sup>	74.2±12.9* <sup>PE2</sup>	0.3±0.1* <sup>PE2</sup>	3.3±4.1* <sup>PU2</sup>	88.9±15.7* <sup>PU2</sup>	0.4±0.1* <sup>PU2</sup>
		5.4±2.4** <sup>PE2</sup>	84.7±7.9** <sup>PE2</sup>	0.4±0.1** <sup>PE2</sup>	1.1±0.3** <sup>PU2</sup>	97.1±0.8** <sup>PU2</sup>	0.4±0.1** <sup>PU2</sup>
<b>3.0</b>	43.2±13.6	1.7±0.7*	95.6±2*	0.4±0.2*	1±0.4*	97.5±0.7*	0.4±0.2*
		1.8±0.2**	94.6±0.7**	0.3±0.03**	0.9±0.1**	97.4±0.1**	0.3±0.03**
<b>3.0 R</b>	31±4.8	0.5±0.2*	98.3±0.7*	0.3±0.1*	0.4±0.2*	98.6±0.6*	0.3±0.1*
		0.7±0.1**	97.9±0.3**	0.3±0.1**	0.5±0.2**	98.6±0.6**	0.4±0.1**
<b>6.0</b>	35.7±7.7	7.6±3.5*	79.3±7.9*	0.6±0.1*	4.4±3.3*	88.3±8*	0.7±0.1*
		3.8±0.4**	88.3±1.6**	0.7±0.1**	1.5±0.1**	95.3±0.2**	0.74±0.1**
<b>6.0 R</b>	28.8±9.1	2.5±0.5*	90.8±2.6*	0.7±0.3*	1.2±0.2*	95.4±1.3*	0.7±0.3*
		2.2±0.2**	92.9±3.1**	0.9±0.4**	1.3±0.1**	96±1.6**	0.9±0.4**
<b>9.0</b>	43.2±13.6	12.8±9.2*	72.1±12.8*	0.9±0.4*	5.9±3.7*	86.6±5.3*	1.2±0.4*
		6.7±0.3**	79.9±0.9**	0.8±0.1**	4.4±0.3**	86.8±1.5**	0.9±0.1**
<b>9.0 R</b>	31±4.8	4.4±0.4*	85.4±2.4*	0.8±0.2*	2.7±0.4*	91.1±2.2*	0.8±0.2*
		4.4±0.3**	86.5±2.5**	0.9±0.2**	2.5±0.2**	92.5±1**	1±0.2**
<b>12.0</b>	35.7±7.7	23±6.6*	36.7±12.1	0.6±0.2*	14±8.2*	62.2±18.8*	1±0.3*
		15.9±0.6**	51.2±2.1**	0.8±0.1**	6.3±0.3**	80.7±1.4**	1.2±0.1**
<b>12.0 R</b>	28.8±9.1	9.9±1*	63.8±10.4*	1±0.5*	3.4±0.7*	87.2±4.6*	1.3±0.5*
		10.8±0.7**	66.3±12.7**	1.3±0.7**	3.1±0.3**	90.2±4.5**	1.7±0.8**

\*Valores promedio de la fase

\*\*Valores promedio para los últimos 14 días de la fase

R- 50 % de recirculación del efluente

En la Figura 4.17 se presenta el seguimiento del N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> en los efluentes durante todo el periodo experimental. Se observa que durante todas las fases hubo menores concentraciones de N-NO<sub>2</sub> en los efluentes en comparación al N-NO<sub>3</sub>. Las mayores concentraciones de N-NO<sub>3</sub> se observaron en los días 64-87, cuando se encontraron altas concentraciones de N-NH<sub>4</sub> en el influente. Los resultados de las concentraciones de N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> mostraron el proceso de nitrificación (Tabla 4.7). Las tasas de nitrificación calculadas como promedio son presentadas en la Figura 4.18b. Los reactores con cubos de poliuretano mostraron mayor actividad de nitrificación que las obtenidas con las cintas de polietileno durante todas las fases experimentales. La recirculación mejoró la tasa de nitrificación en los reactores con ambos materiales de soporte.



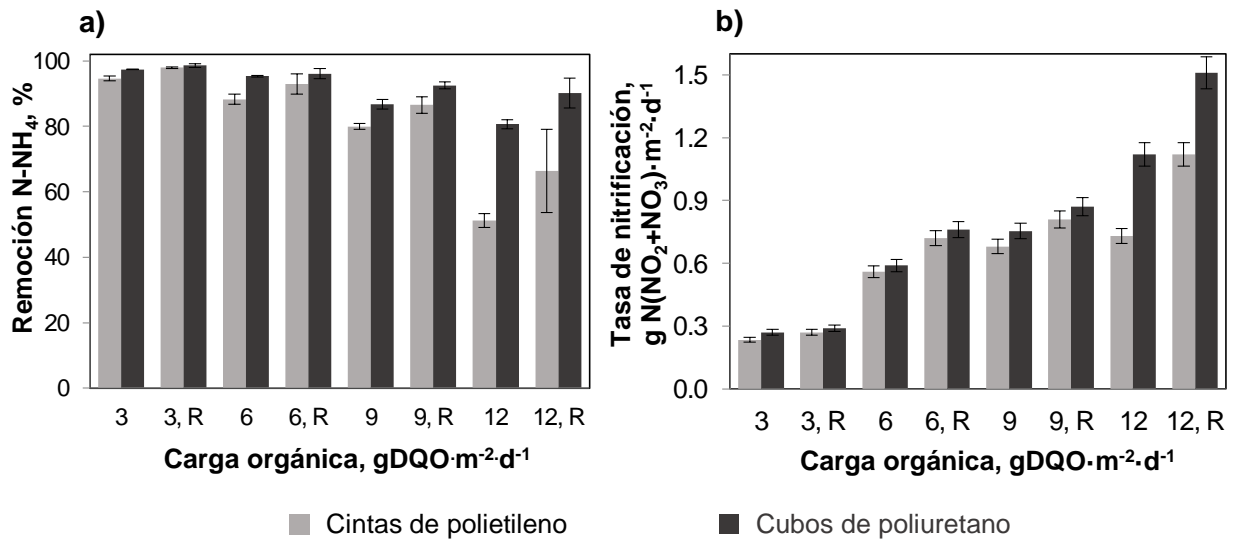
**Figura 4.17. Seguimiento del N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> presente en el efluente durante la experimentación.**  
 a) Reactor 1. Cintas de polietileno; b) Reactor 1. Cubos de poliuretano; c) Reactor 2. Cintas de polietileno; d) Reactor 2. Cubos de poliuretano

**Tabla 4.7.** N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> en los efluentes de los reactores en las diferentes fases experimentales

Carga orgánica, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	N-NH <sub>4</sub> Influyente, mg·L <sup>-1</sup>	Carga N-NH <sub>4</sub> g·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Cintas de polietileno		Cubos de poliuretano	
			N-NO <sub>2</sub>	N-NO <sub>3</sub>	N-NO <sub>2</sub>	N-NO <sub>3</sub>
			Efluente, mg·L <sup>-1</sup>		Efluente, mg·L <sup>-1</sup>	
3.0 (arranque)	34±8.8	0.4±0.1	11.9±3.0* PE1	14.1±2.9* PE1	8.1±4.5* PE1	14.3±4.6* PE1
			11.3±1.9** PE1	16.6±2.5** PE1	7.3±3.7** PE1	18.1±3.8** PE1
			9.6±2.1* PE2	13.8±3.0* PE2	7.9±4.0* PE2	14.8±4.0* PE2
			8.3±1.5** PE2	12.8±2.7** PE2	9.3±5.2** PE2	16.5±4.2** PE2
3.0	43.2±13.6	0.5±0.2	12.3±3.9*	19.8±7.6*	14.5±6.2*	20.7±5.3*
			9±0.6**	14.6±4.4**	10.1±1.4**	18.1±1.2**
3.0 R	31±4.8	0.3±0.1	6.7±3.5*	14.7±3.9*	7.0±3.1*	20.7±3.6*
			4.0±2.1**	11.1±2.7**	5.2±2.3**	19.0±3.6**
6.0	35.7±7.7	0.8±0.1	11.9±2.6*	13.1±2.5*	8.1±2.9*	17.9±2.3*
			11.1±2**	13±2.3**	6.9±2.3**	17.0±1.2**
6.0 R	28.8±9.1	0.7±0.3	7.5±2.4*	11.3±1.7*	4.4±1.5*	14.4±2.3*
			7.7±1.4**	11.3±1.9**	4.7±1**	13.7±2.2**
9.0	43.2±13.6	1.4±0.5	10.4±3.9*	15.1±3.9*	9.9±3.2*	22.8±6.4*
			11.3±0.6**	16.4±1.5**	7.8±1.9**	17.4±2.1**
9.0 R	31±4.8	0.9±0.2	6.4±0.8*	14.7±2.1*	4.5±1.8*	17.7±3.8*
			6.6±1**	11.8±1.3**	3.9±1.8**	15.6±3.7**
12.0	35.7±7.7	1.6±0.2	10.6±2.3*	13.4±3.3*	11.6±3.9*	16.8±1.6*
			9.7±1.8**	16.3±1.6**	9.4±1.5**	17.4±1.6**
12.0 R	28.8±9.1	1.5±0.5	9.2±2.2*	12.1±2.3*	6.6±2.6*	13.6±2.8*
			8.8±1.8**	10.5±0.8**	7.3±1**	12.3±1.5**

\*Valores promedio de la fase

\*\*Valores promedio para los últimos 14 días de la fase R- 50 % de recirculación del efluente



**Figura 4.18.** Evolución de la nitrificación en las diferentes fases experimentales

Se realizaron los análisis estadísticos de las remociones de DQO y N-NH<sub>4</sub> con el programa *Statgraphics*, se evaluaron las diferencias entre las remociones obtenidas con los diferentes materiales de soporte a la misma carga orgánica, también se evaluaron las diferencias entre las remociones obtenidas con y sin recirculación a la misma carga orgánica para cada uno de los materiales de soporte. Los valores obtenidos de la *razón-F* y *valor-P* del análisis estadístico son mostrados en las Tablas 4.7 y 4.8.

Si el *valor P* de la *prueba F* es menor de 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre las remociones promedio de un material de soporte a otro, con un 95 % de nivel de confianza. Por lo tanto, al trabajar con la misma carga orgánica, existe una diferencia estadísticamente significativa en las remociones promedio de DQO entre un material de soporte y otro, con un nivel del 95 % de confianza, excepto cuando los reactores fueron operados con CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> sin recirculación, así como con CO de 6 y 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> con recirculación. En cuanto al N-NH<sub>4</sub>, existe una diferencia estadísticamente significativa en las remociones promedio de N-NH<sub>4</sub> entre un material de soporte y otro, con un nivel del 95 % de confianza (Tabla 4.8).

Los análisis estadísticos de las diferencias entre las remociones obtenidas con y sin recirculación a la misma carga orgánica, desarrolladas para cada tipo de material de soporte, indicaron que no hubo diferencia estadísticamente significativa en las remociones promedio de DQO entre la condición con y sin recirculación del efluente, con excepción del caso donde el reactor PU1 fue operado con CO de 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>. En cambio, existe una diferencia estadísticamente significativa en las remociones promedio de N-NH<sub>4</sub> entre la condición con y sin recirculación, excepto el caso cuando el reactor PU1 fue operado con CO de 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> (Tabla 4.9).

**Diseño Base**

Número de factores experimentales: 1      Número de corridas: 14  
 Número de bloques: 1                      Grados de libertad para el error: 12  
 Número de respuestas: 1                    Aleatorizar: Sí

Factores	Niveles	Respuestas	Unidades
Materiales de soporte	2	Remoción	%

**Tabla 4.8.** Análisis estadístico de las diferencias entre las remociones de DQO y N-NH<sub>4</sub> obtenidas con los diferentes materiales de soporte a la misma carga orgánica

CO, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Recirculación, %	DQO		N-NH <sub>4</sub>	
		Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
3.0	0	4.72	0.0615	70.30	0.0000
3.0	50	12.59	0.0040	6.10	0.0295
6.0	0	10.79	0.0065	133.50	0.0000
6.0	50	1.20	0.2941	5.66	0.0348
9.0	0	92.60	0.0000	77.98	0.0000
9.0	50	16.40	0.0016	33.61	0.0001
12.0	0	9.82	0.0086	610.10	0.0000
12.0	50	3.83	0.0741	21.90	0.0005

**Diseño Base**

Número de factores experimentales: 1      Número de corridas: 14  
 Número de bloques: 1                      Grados de libertad para el error: 12  
 Número de respuestas: 1                    Aleatorizar: Sí

Factores	Niveles	Respuestas	Unidades
Recirculación	2	Remoción	%

**Tabla 4.9.** Análisis estadístico de las diferencias entre las remociones de DQO y N-NH<sub>4</sub> obtenidas con y sin recirculación a la misma carga orgánica para cada uno de los materiales de soporte

Material de soporte	CO, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	DQO		N-NH <sub>4</sub>	
		Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
PE	3.0	1.28	0.2905	83.68	0.0000
	6.0	1.09	0.3163	12.28	0.0043
	9.0	1.08	0.3288	28.77	0.0007
	12.0	2.95	0.1114	9.49	0.0095
PU	3.0	1.10	0.3247	19.06	0.0024
	6.0	7.29	0.0193	1.37	0.2640
	9.0	3.21	0.1107	49.53	0.0001
	12.0	4.01	0.0682	27.81	0.0002

**4.2.4 Remoción de los fármacos en los reactores con biomasa inmovilizada**

La adición y determinación de los fármacos inició a partir del día 65, una vez alcanzada la estabilización de los reactores. Las concentraciones en los influentes estuvieron en el rango de 4.9268-6.8650 µg·L<sup>-1</sup> para el ácido mefenámico, de 1.9014-2.3719 µg·L<sup>-1</sup> para la fluoxetina y de 4.7829-6.1318 µg·L<sup>-1</sup> para el metoprolol. En las Figuras 4.19 y 4.20 se muestra el seguimiento de los fármacos en los reactores. Al inicio de la fase 2, se observó una etapa de adaptación a la remoción de los tres fármacos, las remociones aumentaron gradualmente en los cuatro reactores, hasta que las concentraciones de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol en los efluentes llegaron a ser casi constantes durante los últimos 14 d de la fase. Al trabajar la CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>, TRH de 2.8-4.1 h y TRS de 26-37 d, las remociones promedio de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol fueron de 41.4 ± 3.9, 77.5 ± 1.2 y 59.2 ± 2.9 %, respectivamente en el reactor empacado con cintas de polietileno (PE1), mientras que en el reactor con cubos de poliuretano (PU1), las remociones promedio fueron más altas, 60.4 ± 2.7, 83.4 ± 1.0 y 60.6 ± 4.1 % respectivamente. Los valores promedio de las concentraciones de los fármacos, porcentajes y tasas de remoción durante las fases experimentales son presentados en las Tablas 4.10 y 4.11.

Se observó un incremento de la remoción de los fármacos cuando los reactores fueron operados con recirculación del efluente, a pesar del decremento del TRS a 19-32 d causado por el desprendimiento de exceso de biomasa inmovilizada, lo cual reduce la resistencia a la transferencia de masa, además de incrementar la eficiencia de nitrificación y la concentración de oxígeno disuelto (EPA, 2000; Rittman y McCarty, 2001). Por lo tanto, las mayores remociones de los tres fármacos fueron alcanzadas aplicando CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación en los reactores con ambos materiales de soporte. Las concentraciones de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol en los efluentes fueron de 1.43 ± 0.14, 0.14 ± 0.01 y 1.76 ± 0.24 µg·L<sup>-1</sup>

respectivamente para el reactor con cintas de polietileno, obteniendo remociones de  $77.6 \pm 2.7$ ,  $94 \pm 0.3$  y  $67.5 \pm 4.3$  % respectivamente durante los últimos 14 días de la fase. Las mayores remociones de los fármacos fueron obtenidas en el reactor con cubos de poliuretano, las concentraciones en los efluentes fueron de  $1.17 \pm 0.22$ ,  $0.11 \pm 0.01$  y  $1.47 \pm 0.03$   $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente, obteniendo remociones de  $81.7 \pm 3.5$ ,  $94.9 \pm 0.8$  y  $72.7 \pm 5.1$  %, respectivamente. El mayor incremento en la remoción al aplicar la recirculación se observó en el caso del ácido mefenámico en los reactores con ambos soportes.

El incremento de la CO a  $6$   $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  (sin recirculación) causó un incremento de la concentración de fármacos en los efluentes de los reactores PE1 y PU1. Este efecto es atribuido al cambio de las condiciones de operación, ya que el incremento del flujo del influente causó decremento del TRH a 1.3-1.7 h y el TRS se redujo a 14-25 d. Se necesitaron de 30-40 d para alcanzar nuevamente la estabilización del proceso y concentraciones de los fármacos relativamente constantes en los efluentes, pero mayores a las obtenidas en la etapa anterior y por lo tanto menores remociones. Nuevamente se obtuvieron mejores remociones de los tres fármacos en el reactor con cubos de poliuretano (PU1), el cual tuvo mayor cantidad de biomasa y mayores remociones de  $\text{N-NH}_4$  comparado con el reactor con cintas de polietileno (PE1). Durante la siguiente fase experimental (fase 5), la CO fue mantenida en  $6$   $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  pero se aplicó el 50 % de recirculación del efluente. Estas condiciones operacionales causaron un decremento del TRS a 12-18 d, sin embargo se incrementaron las remociones de los fármacos en los reactores con ambos soportes. Las remociones de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol fueron  $59.4 \pm 2.4$ ,  $90.2 \pm 0.7$  y  $66.5 \pm 2.3$  % respectivamente en el reactor con cubos PU, mayores que las determinadas en los reactores con cintas PE ( $50.5 \pm 4.1$ ,  $87.1 \pm 1$  y  $58.6 \pm 1.9$  % respectivamente), esto es atribuido nuevamente a la mayor cantidad de biomasa y a las mayores remociones de  $\text{N-NH}_4$  obtenidos en el reactor PU. Los porcentajes de remoción de los fármacos en esta fase experimental fueron similares o mayores a los obtenidos en los últimos días de la fase 2 (CO de  $3$   $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  sin recirculación), por lo tanto, la recirculación permite trabajar con mayores cargas orgánicas, obteniendo resultados semejantes o mejores a cargas orgánicas bajas sin recirculación (Tabla 4.10).

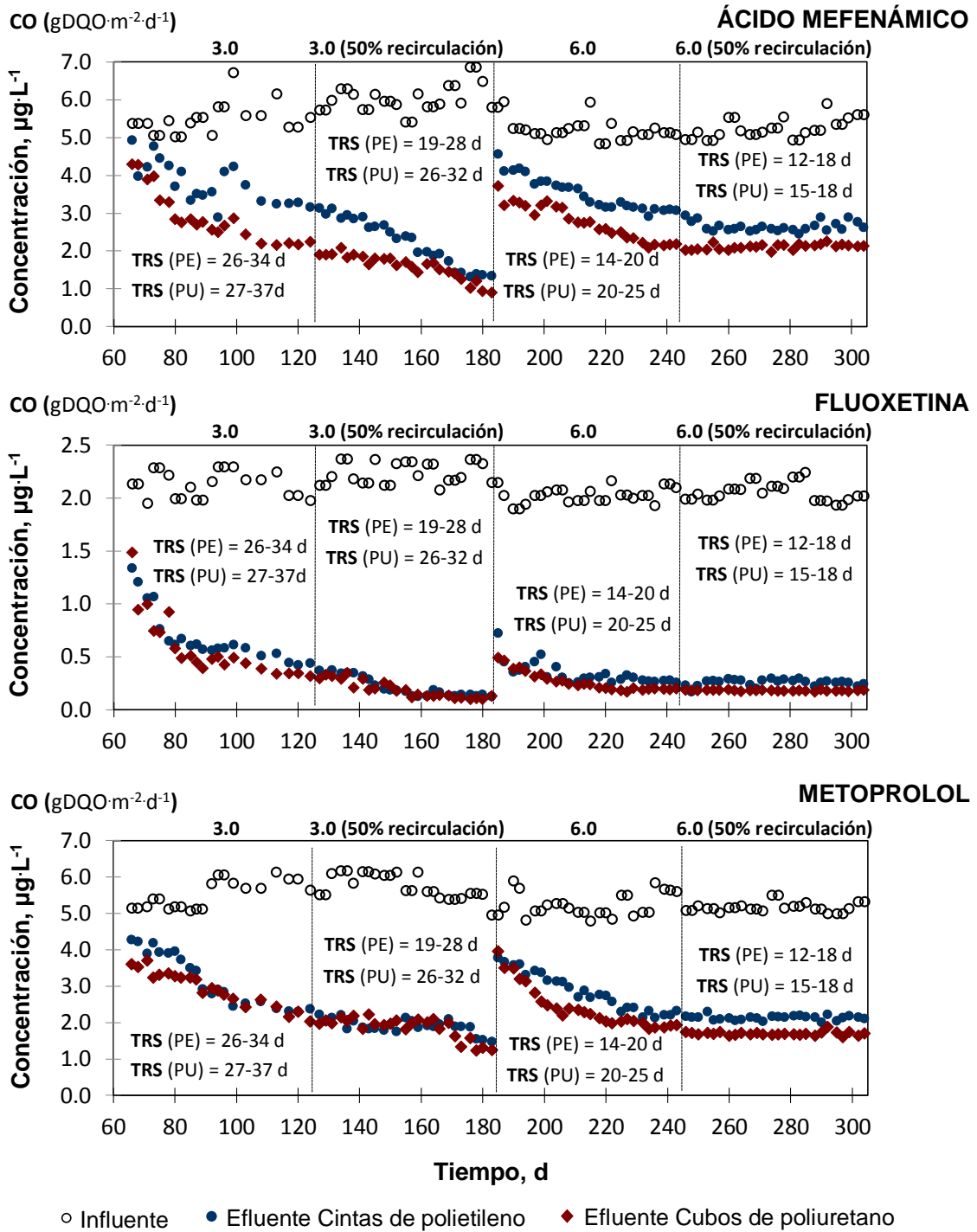


Figura 4.19. Seguimiento de los fármacos durante la experimentación. Reactores PE1 y PU1



**Tabla 4.10.** Remoción de los fármacos en los reactores PE1 y PU1

Carga orgánica, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Influyente, µg·L <sup>-1</sup>	ÁCIDO MEFENÁMICO					
		Cintas de polietileno			Cubos de poliuretano		
		Efluente, µg·L <sup>-1</sup>	Remoción, %	Tasa de remoción, µg·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Efluente, µg·L <sup>-1</sup>	Remoción, %	Tasa de remoción, µg·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>
3.0	5.48±0.41	3.79±0.56*	30.4±12.3*	16.9±7.2*	2.9±0.69*	46.5±14.2*	26±8.6*
		3.25±0.06**	41.4±3.9**	22.9±3.2**	2.2±0.03**	60.4±2.7**	33.6±2.9**
3.0 R	6.03±0.37	2.24±0.63*	62.4±11.5	37.1±10*	1.6 ±0.32*	73.4 ±6*	43.6±7.6*
		1.43±0.14**	77.6±2.7**	51.2±3**	1.17±0.22**	81.7±3.5**	54.3±3.3**
6.0	5.2±0.29	3.5±0.44*	32.4±7.6*	37.6±10.3*	2.75±0.47*	47.3±8.4*	55.1±12*
		3.08±0.08**	40±1.4**	47.8±4.1**	2.19±0.08**	57.3±1**	68.9±6**
6.0 R	5.24±0.26	2.65±0.13*	49.3±3.5*	64.3±9.1*	2.11±0.07*	59.6±2*	78.1±10*
		2.72±0.14*	50.5±4.1**	69.8±8.1**	2.16±0.05**	60.6±1.5**	84.5±10.1**
<b>FLUOXETINA</b>							
3.0	2.13±0.13	0.69±0.26*	67.7±12.1*	14.6±3*	0.59±0.29*	72.4±13.8*	15.7±3.2*
		0.47±0.05**	77.5±1.2**	16±0.4**	0.35±0.02**	83.4±1**	17.3±0.6**
3.0 R	2.24±0.1	0.22±0.09*	90.3±4.3*	19.7±2.5*	0.19±0.08*	91.4±3.7*	20.1±2.5*
		0.14±0.01**	94±0.3**	21.9±0.9**	0.11±0.01**	94.9±0.8**	22.2±0.9**
6.0	2.03±0.07	0.34±0.11*	83.1±5*	37.4±4.3*	0.27±0.09*	86.9±4.6*	39.3±4.5*
		0.28±0.01**	86.5±0.9**	41.3±3.7**	0.2±0.01**	90.4±0.5**	43.4±3.9**
6.0 R	2.06±0.09	0.26±0.03*	87.5±1.5*	44.6±5.1*	0.18±0.01*	91.1±0.5*	46.8±5.4*
		0.25±0.02**	87.1±1**	43.5±6.2**	0.18±0.01**	90.8±0.3**	45.6±6.2**
<b>METOPROLOL</b>							
3.0	5.51±0.38	3.21±0.72*	40.9±16.5*	22.9±9.6*	2.94±0.48*	46.1±11.7*	25.9±7.3*
		2.39±0.11**	59.2±2.9**	34.4±2.9**	2.31±0.23**	60.6±4.1**	35.4±3.2**
3.0 R	5.74±0.34	1.9±0.19*	66.8±3.6*	37.2±3.4*	1.86±0.3*	67.8±4.4*	38±4.2*
		1.76±0.24**	67.5±4.3**	37.7±3**	1.47±0.3**	72.7±5.1**	40.8±3.3**
6.0	5.23±0.33	2.84 ±0.53*	45.3±10.9*	53.1±16.6*	2.41±0.59*	53.7±11.7*	63.1±17.3*
		2.25±0.11**	58±4.3**	73.3±13.5**	1.92±0.08**	64.2±3.5**	81.5±13.5**
6.0 R	5.16±0.13	2.13 ±0.06*	58.7±1.5*	75.3±9.6*	1.69±0.05*	67.2±1.5*	86.8±11.2*
		2.12±0.07**	58.6±1.9**	74.7±11.8**	1.71±0.09**	66.5±2.3**	86.9±14.7**

\*Valores promedio de la fase

\*\*Valores promedio para los últimos 14 días de la fase

R- 50 % de recirculación del efluente

En los reactores PE2 y PU2, el incremento de la CO de 3 a 9 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>, produjo inestabilidad al comienzo de la fase 2; hubo disminución del TRH de 2.3-3.5 h a 0.9-1.4 h y los TRS fueron de 11-14 d, después de 30-40 d se obtuvieron concentraciones de fármacos relativamente constantes en los efluentes (Figura 4.20). Los cubos PU mostraron mayores remociones de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol (51.4 ± 2.8, 80.4 ± 1.6 y 49 ± 2.8 %) en comparación con las cintas PE (28.8 ± 5, 67.1 ± 1.3 y 40.4 ± 2.7 %). Cuando se aplicó la recirculación del efluente mientras se mantuvo la CO de 9 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> (fase 3), las remociones de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol incrementaron en los reactores con ambos materiales de soporte, también se obtuvieron mayores remociones en el reactor con cubos de poliuretano. Los valores promedio de las concentraciones y remociones de los fármacos son presentados en las Tabla 4.11.

El incremento de la carga orgánica a 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> llevado a cabo en el día 184 en los reactores PE2 y PU2 (fase 4) causó nuevamente la desestabilización del proceso, debido al cambio de las condiciones de operación, tales como disminución del TRH a 0.7-0.8 h y del TRS de 8-10 d. Las concentraciones de los fármacos en los efluentes disminuyeron con el tiempo y se necesitaron casi 50 d para alcanzar la estabilidad. El reactor con cubos de poliuretano obtuvo mejores remociones de los fármacos en comparación con las cintas de polietileno. Las remociones incrementaron cuando se aplicó la recirculación del efluente, las diferencias en el desempeño de los reactores fueron notables, sin embargo, los porcentajes de remoción de fluoxetina fueron menores al 82 %, mientras las remociones de ácido mefenámico y metoprolol fueron menores o iguales al 50 %. Se observó nuevamente mejor desempeño en el reactor con cubos de poliuretano, lo cual puede ser asociado con la mayor cantidad de biomasa y la mayor remoción de N-NH<sub>4</sub>, ya que el TRS fue el mismo en ambos reactores. Adicionalmente pudo observarse que las remociones obtenidas con CO de 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación del efluente fueron similares o mayores a las determinadas con CO de 9 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> sin recirculación en los reactores con ambos soportes, lo cual indica que la recirculación permite trabajar con mayor carga orgánica y obtener resultados similares que cuando se trabaja con menor carga orgánica sin recirculación.

Como pudo observarse en la Figura 4.18b, conforme se incrementó la carga orgánica, la tasa de nitrificación también aumentó y esta fue aún más alta cuando se aplicó el 50 % de recirculación del efluente, por lo tanto, las mayores tasas de nitrificación se presentaron al trabajar con CO de 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación. Las mayores tasas de remoción de fármacos también se presentaron bajo estas condiciones (Figura 4.21), sin embargo, los menores porcentajes de remoción de los tres fármacos, así como las más altas concentraciones en los efluentes se tuvieron al trabajar con carga orgánica alta. Se debe tener presente que la actividad nitrificante incrementa la biotransformación de ciertos fármacos, aunque los microorganismos heterótrofos también son capaces de degradarlos (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2016). Falàs *et al.* (2012) demostraron que los reactores con biopelícula con soportes Kaldnes K1 y Biofilm Chip alcanzaron mayores remociones de ácido mefenámico comparado al proceso de lodos activados nitrificantes, a pesar de las mayores tasas de nitrificación del lodo activado nitrificante. En este estudio, las tasas de remoción de materia orgánica expresada como DQO y la nitrificación fueron más altas con CO de 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>. Las bajas remociones de los fármacos bajo estas condiciones de operación se deben a que de acuerdo a otros estudios, una alternativa para incrementar la remoción de fármacos es mantener tiempos de retención de sólidos mayores a 10 d y tiempos de residencia hidráulica lo suficientemente largos (≥ 8 h) para que las enzimas reaccionen con los compuestos (Sui *et al.*, 2010; Forrez *et al.*, 2011). Se ha sugerido que los tiempos de residencia hidráulica cortos en reactores con biomasa inmovilizada son compensados por la alta concentración de biomasa (Falàs *et al.*, 2012).

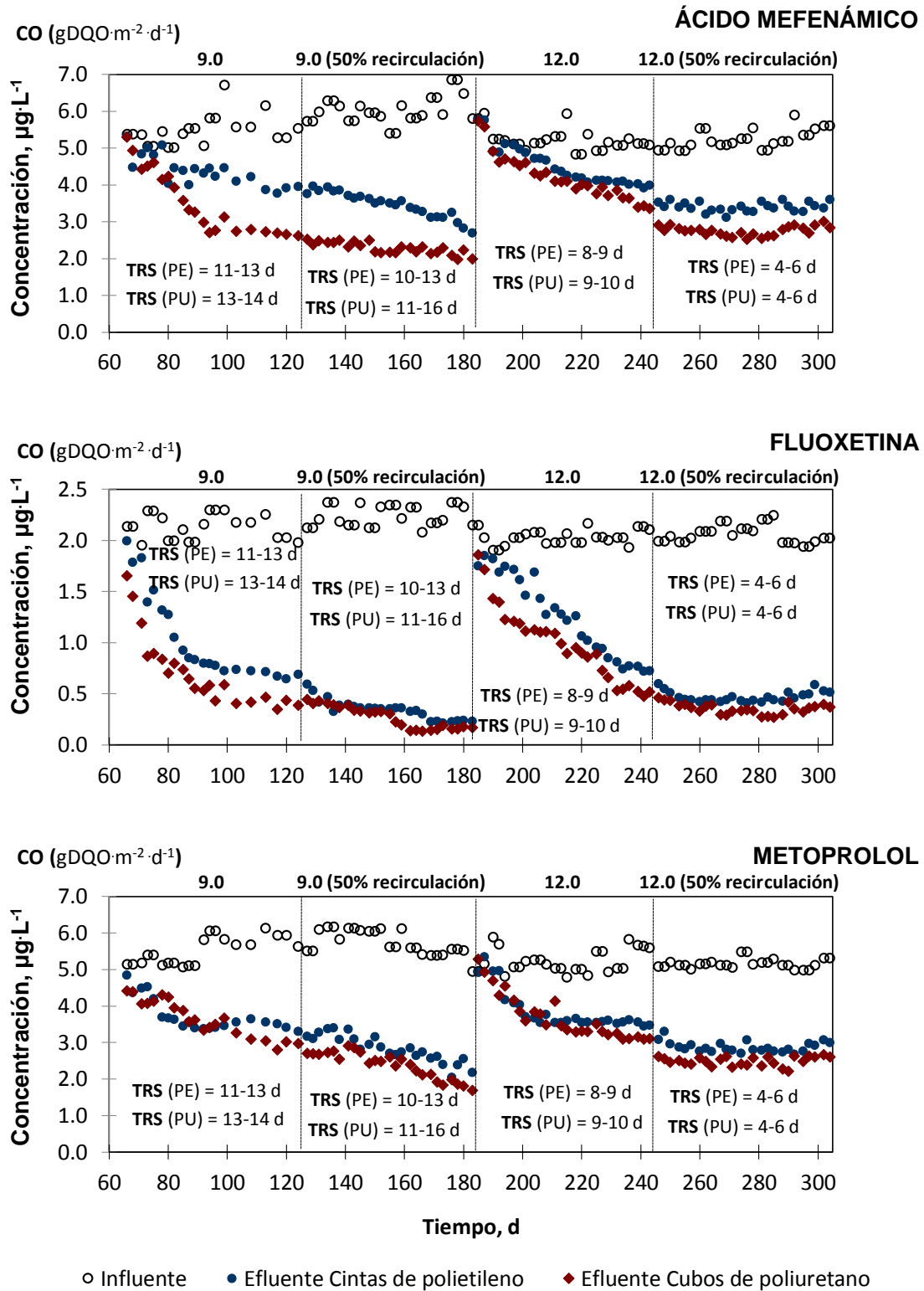


Figura 4.20. Seguimiento de los fármacos durante la experimentación.  
Reactores PE2 y PU2

**Tabla 4.11.** Remoción de los fármacos en los reactores PE2 y PU2

Carga orgánica, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Influyente, µg·L <sup>-1</sup>	ÁCIDO MEFENÁMICO					
		Cintas de polietileno			Cubos de poliuretano		
		Efluente, µg·L <sup>-1</sup>	Remoción, %	Tasa de remoción, µg·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Efluente, µg·L <sup>-1</sup>	Remoción, %	Tasa de remoción, µg·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>
9.0	5.48±0.41	4.39±0.42*	19.3±10.5*	32.5±18.4*	3.53 ±0.87*	34.8±18.5*	58.3±31.4*
		3.95±0.17**	28.8±5**	47.9±10.4**	2.7±0.07**	51.4±2.8**	85.5±8.4**
9.0 R	6.03±0.37	3.46 ±0.31*	42.3±7.4*	75.3±20.2*	2.29 ±0.16*	62±3.8*	110.2±17.4*
		3.02 ±0.2**	52.7±3.3**	104.4±9.7**	2.13±0.12**	66.6±3.2**	132.7±9.7**
12.0	5.2±0.29	4.52±0.53*	13.3±8.6*	31±21.5*	4.2±0.6*	19.5±9.6*	45.6±24.3*
		4.03±0.07**	21.4±1.7**	51.2±7.4**	3.58±0.19**	30.2±3.7**	72.8±12.5**
12.0 R	5.24±0.26	3.4±0.13*	34.9±4.3*	90.9±16.6*	2.75±0.13*	47.4±2.9*	124.3±17.9*
		3.42±0.12**	37.8±3.7**	103.9±10.8**	2.87±0.1**	47.9±2.1**	133.2±15**
<b>FLUOXETINA</b>							
9.0	2.13±0.13	1.05±0.43*	50.6±20.6*	32.6±12.7*	0.71±0.35*	66.6±16.8*	43.3±11.1*
		0.69±0.03**	67.1±1.3**	41.6±2**	0.41±0.04**	80.4±1.6**	50.2±1.5**
9.0 R	2.24±0.1	0.34±0.1*	84.7±4.6*	55.5±7.3*	0.27±0.11*	88±5*	58±7.9*
		0.23±0.01**	89.9±0.46**	62.8±2.4**	0.16±0.02**	92.8±0.8**	65.2±2.6**
12.0	2.03±0.07	1.25±0.4*	38.2±20.2*	35±19.8*	0.98±0.4*	51.3±18.3*	46.9±18.9*
		0.77±0.05**	62.5±3.3**	59.6±7**	0.55±0.06**	73.3±3.6**	70.4±8.2**
12.0 R	2.06±0.09	0.47±0.05*	77.1±3.2*	78.7±10.2*	0.35±0.05*	83.2±3.4*	86.2±11*
		0.51±0.04**	74.2±1.9**	73.9±9.2**	0.37±0.03**	81.3±1.4**	81.5±10.3**
<b>METOPROLOL</b>							
9.0	5.51±0.38	3.74±0.45*	31.7±11.3*	53.3±19.4*	3.66 ±0.51*	32.9±13.1*	55.5±23.1*
		3.49±0.13**	40.4±2.7**	70.5±6.7**	2.99±0.11**	49±2.8**	86±7.5**
9.0 R	5.74±0.34	2.83±0.37*	50.8±4.9*	84.7±8.7*	2.38±0.37*	58.6±4.9*	98.6±11.3*
		2.39±0.22**	55.6±4**	92.9±2.9**	1.85±0.1**	65.7±2.3**	109.4±6.7**
12.0	5.23±0.33	3.87±0.55*	25.8±10.8*	60.6±28.2*	3.7±0.62*	28.9±13.1*	68.7±34.9*
		3.54±0.07**	33.9±4.8**	86.1±20.6**	3.15±0.06**	41.3±4.6**	103.2±22.8**
12.0 R	5.16±0.13	2.88±0.14*	44.2±2.8*	113±14*	2.49±0.12*	51.6±2.9*	133.5±20.4*
		2.89±0.14**	43.5±2.2**	112.1±14.8**	2.55±0.16**	50.2±3.2**	130.9±24**

\*Valores promedio de la fase

\*\*Valores promedio para los últimos 14 días de la fase

R- 50 % de recirculación del efluente

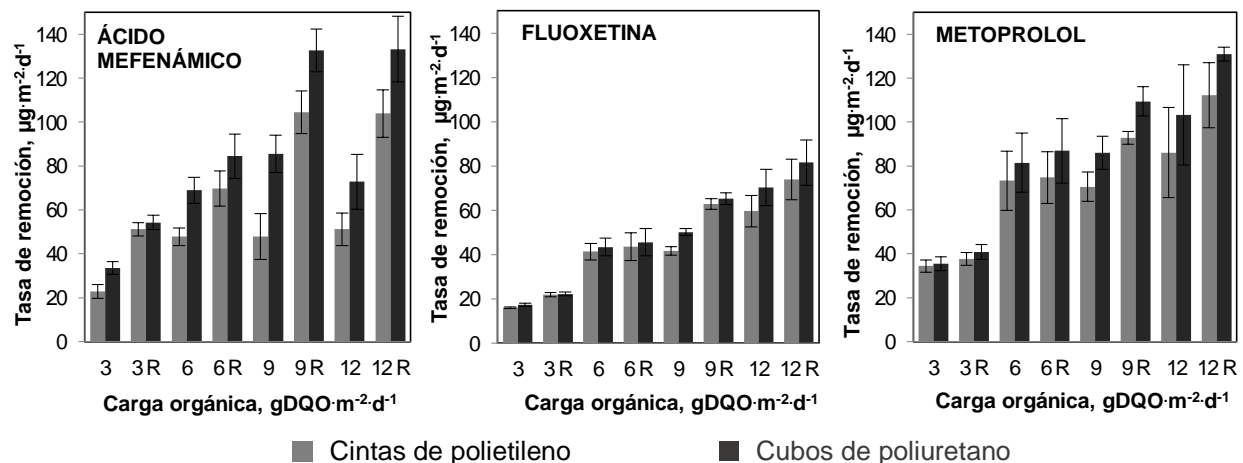


Figura 4.21. Tasas de remoción promedio de los fármacos durante las fases experimentales

Considerando los estudios de toxicidad de los tres fármacos a concentraciones medioambientalmente relevantes, se han reportado efectos negativos a bajas concentraciones. Collard *et al.* (2013) detectaron ocasionalmente características del sexo masculino en peces zebra hembras (*Danio rerio*) expuestos a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido mefenámico, las concentraciones sin efecto observable en el crecimiento fueron de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En este estudio, las concentraciones en el influente de ácido mefenámico en los reactores PE y PU fueron menores de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pero las concentraciones en los efluentes fueron mayores a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  durante todas las fases experimentales. Ji *et al.* (2013) han sugerido un potencial estrogénico del ácido mefenámico en peces zebra hembras y machos (*Danio rerio*), después de la exposición a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido mefenámico, se encontró un incremento de las concentraciones de  $17\beta$ -estradiol en el plasma sanguíneo, también se observó un incremento en los niveles de testosterona en peces zebra hembra, mientras que los niveles de testosterona entre los peces machos disminuyeron.

Nentwig (2007) reportó que los efectos significativos en la reproducción de los caracoles *Potamopyrgus antipodarum* ocurren a  $2.25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fluoxetina, presentando una máxima concentración sin efecto observable de  $0.47 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Mennigen *et al.* (2010) descubrieron que los peces expuestos durante 28 d a  $0.54 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fluoxetina muestran efectos en el metabolismo de la glucosa y una disminución en la ingesta de alimentos. En este estudio, las concentraciones de fluoxetina en los efluentes de los reactores con los dos tipos de soporte fueron más bajas que  $0.47 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , esto ocurrió cuando se trabajaron las CO de 3 y 6  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  independientemente de la recirculación, 9  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación en las cintas de polietileno, 9  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  con y sin recirculación en los cubos de poliuretano, además de 12  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación. Por lo tanto, se ha determinado que los reactores con biomasa inmobilizada de lecho sumergido empacados con cintas de polietileno y cubos de poliuretano son una buena opción de tratamiento de aguas residuales municipales para la remoción de fluoxetina, ya que pueden alcanzar concentraciones lo suficientemente bajas para evitar los efectos negativos en el ambiente.

La exposición de *Daphnia magna* a  $2.67 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $10^{-8}$  M) de metoprolol dio como resultado actividad simpaticomimética en el corazón, indujo un efecto cronotrópico positivo y un área reducida en diástole (Villegas-Navarro *et al.*, 2003). Los reactores PE y PU obtuvieron concentraciones más bajas que este valor cuando fueron operados con CO de 3 y 6  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  independientemente de la recirculación del efluente y CO de 9  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  con recirculación. Esta relación también fue obtenida para el reactor PU operado a CO de 12  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  con recirculación.

Triebkorn *et al.* (2007) encontraron efectos en el hígado de las truchas arcoíris expuestas a concentraciones de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de metoprolol, los síntomas incluyeron la reducción de las reservas de glucógeno, la presencia de material de membrana celular dentro de las células, vesiculación, dilatación y orientación irregular del retículo endoplasmático. Contardo-Jara *et al.* (2010) examinaron los cambios en la expresión genética en mejillones de agua dulce expuestos a metoprolol, las concentraciones de  $2 \times 10^{-8} \text{ M}$  ( $5.34 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) causaron cambios en la regulación de la expresión de los genes HSP70 mRNA, no se encontraron efectos a concentraciones de  $2 \times 10^{-9} \text{ M}$  ( $0.534 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), pero se mostró que el metoprolol puede ser acumulado en los mejillones a esta concentración. Gröner *et al.* (2015) estudiaron los cambios en los niveles transcripcionales de enzimas en hepatocitos primarios en tilapias del nilo machos, se encontraron efectos a concentraciones de  $4 \times 10^{-9} \text{ M}$  ( $1.069 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Las concentraciones de metoprolol en los efluentes de los reactores PE y PU estuvieron por arriba de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , en el intervalo de  $1.5\text{-}3.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  bajo las condiciones de operación de este estudio.

En la Figura 4.22 se presenta una comparación de las remociones promedio de los fármacos en los dos materiales de soporte. Se observa que las mayores remociones de los tres fármacos fueron obtenidas al trabajar con CO de  $3 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación (TRH de 3.1-4.3 h y TRS de 19-32 d). Los reactores alcanzaron mayores porcentajes de remoción de fluoxetina, en comparación con el ácido mefenámico y el metoprolol. Es importante mencionar que este compuesto fue adicionado al influente a concentraciones de tan solo  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que el ácido mefenámico y metoprolol se adicionaron para obtener casi  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Bajo las condiciones mencionadas, las remociones promedio de fluoxetina fueron similares con ambos soportes,  $94 \pm 0.3$  y  $94.9 \pm 0.8$  % en el reactor PE1 y PU1 respectivamente, al trabajar las demás cargas orgánicas, las remociones fueron diferentes para cada soporte y mayores en los reactores con cubos de poliuretano. Después de la fluoxetina, los reactores lograron mayores remociones de metoprolol en comparación con el ácido mefenámico, esto ocurrió cuando se trabajaron las CO de 3, 6, 9 y  $12 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  sin recirculación, además de 6 y  $12 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  con recirculación. Al trabajar con CO de  $9 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación, las remociones de ácido mefenámico y metoprolol fueron similares cuando se compararon en un mismo reactor. Al trabajar la CO de  $3 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación, se observó un comportamiento diferente, las remociones de ácido mefenámico fueron mayores que las del metoprolol,  $77.6 \pm 2.7$  % y  $67.5 \pm 4.3$  % de remoción de ácido mefenámico y metoprolol, respectivamente en el reactor con cintas de polietileno, mientras que las remociones en el reactor con cubos de poliuretano fueron  $81.7 \pm 3.5$  % y  $72.7 \pm 5.1$  % de ácido mefenámico y metoprolol, respectivamente.

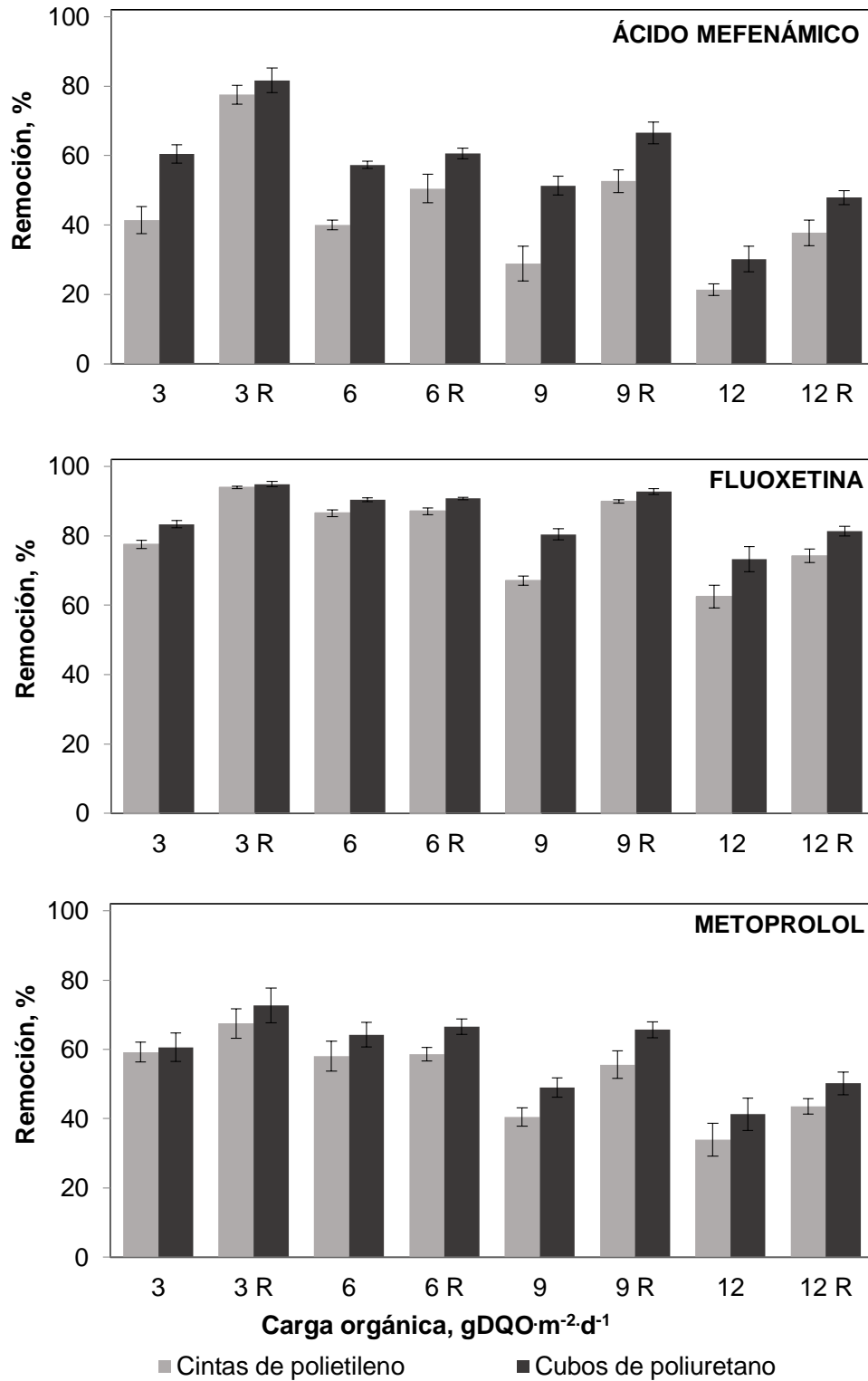


Figura 4.22. Remociones promedio de los fármacos durante las fases experimentales

Los análisis estadísticos de las diferencias entre las remociones de los fármacos obtenidas con cada material de soporte, indicaron que existe una diferencia estadísticamente significativa en las remociones promedio de los fármacos entre un material de soporte y otro, con un nivel del 95 % de confianza (*valor P* de la *prueba F* menor de 0.05), para los tres fármacos (ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol), con la excepción de las remociones de metoprolol con CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> sin y con recirculación (Tabla 4.12).

**Diseño Base**

Número de factores experimentales: 1      Número de corridas: 14  
 Número de bloques: 1                      Grados de libertad para el error: 12  
 Número de respuestas: 1                    Aleatorizar: Sí

<i>Factores</i>	<i>Niveles</i>	<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>
Materiales de soporte	2	Remoción	%

**Tabla 4.12.** Análisis estadístico de las diferencias entre las remociones de los fármacos obtenidas con los diferentes materiales de soporte a la misma carga orgánica

CO, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Recirculación, %	ÁCIDO MEFENÁMICO		FLUOXETINE		METOPROLOL	
		<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
3.0	0	83.06	0.0000	71.58	0.0000	0.38	0.5558
3.0	50	5.99	0.0307	8.11	0.0147	4.34	0.0592
6.0	0	505.43	0.0000	92.12	0.0000	8.69	0.0122
6.0	50	38.34	0.0000	84.41	0.0000	49.02	0.0000
9.0	0	78.38	0.0000	208.00	0.0000	25.05	0.0010
9.0	50	64.67	0.0000	64.99	0.0000	28.87	0.0002
12.0	0	33.15	0.0001	34.83	0.0001	7.82	0.0162
12.0	50	39.77	0.0000	61.89	0.0000	22.08	0.0005

De este modo, el tipo de material de soporte influyó en el desempeño de los reactores tanto en la remoción de materia orgánica y nitrógeno amoniacal, así como en la remoción de los tres fármacos, por un lado los cubos de poliuretano permitieron una mayor acumulación de biomasa en los reactores durante todas las fases, los TRS fueron más altos en los reactores con cubos de poliuretano, éstos alcanzaron mayores remociones de materia orgánica, N-NH<sub>4</sub>, ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol en comparación con las cintas de polietileno. Se ha reportado que la biopelícula desarrollada en los reactores con cintas de polietileno es delgada, ésta favorece la difusividad y transferencia de masa en la biopelícula (Mijaylova *et al.* 2010). En el caso de los cubos de poliuretano, se ha reportado que se forma una biopelícula gruesa sobre la superficie externa, también se puede encontrar biomasa atrapada en el interior de los poros (Guo *et al.*, 2010). El poliuretano existe en diferentes tamaños de poro, desde 10 PPI (10 poros por pulgada) hasta 90 PPI, los cubos de poliuretano empleados en este estudio poseen un tamaño de poro de 10 PPI, esto significa que los poros son más grandes, lo cual hace posible el desarrollo de la biomasa inmovilizada y la transferencia de masa hacia el interior del cubo, de manera que existirán variaciones en la comunidad bacteriana entre un material de soporte y otro, éstas serán presentadas posteriormente.



En la Tabla 4.13 se presentan los análisis estadísticos de las diferencias en las remociones promedio entre la condición con y sin recirculación a la misma carga orgánica, el análisis fue desarrollado para cada tipo de material de soporte, los resultados indicaron que existe una diferencia estadísticamente significativa en las remociones promedio de los tres compuestos al aplicar la recirculación, con la excepción de las remociones de metoprolol con la CO de 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> en el reactor con cintas de polietileno (PE) y en el reactor con cubos de poliuretano (PU).

**Diseño Base**

Número de factores experimentales: 1      Número de corridas: 14  
 Número de bloques: 1                      Grados de libertad para el error: 12  
 Número de respuestas: 1                  Aleatorizar: Sí

<i>Factores</i>	<i>Niveles</i>	<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>
Recirculación	2	Remoción	%

**Tabla 4.13.** Análisis estadístico de las diferencias entre las remociones de los fármacos obtenidas con y sin recirculación a la misma carga orgánica para cada material de soporte

Material de soporte	CO, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	ÁCIDO MEFENÁMICO		FLUOXETINE		METOPROLOL	
		Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
PE	3.0	361.76	0.0000	914.58	0.0000	25.11	0.0010
	6.0	41.64	0.0000	1.45	0.2520	0.11	0.7504
	9.0	76.61	0.0000	1355.77	0.0000	69.13	0.0000
	12.0	111.97	0.0000	67.14	0.0000	24.33	0.0003
PU	3.0	175.09	0.0000	413.15	0.0000	47.52	0.0001
	6.0	16.93	0.0014	2.34	0.1519	2.10	0.1725
	9.0	52.21	0.0001	216.30	0.0000	165.34	0.0000
	12.0	123.32	0.0000	29.68	0.0001	15.78	0.0018

Debido a que las remociones de los fármacos son dependientes de las condiciones de operación en los procesos de tratamiento, es importante comparar las remociones de los tres compuestos bajo las mismas condiciones de operación. Radjenović *et al.* (2009) estudiaron las remociones del ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol en dos biorreactores con membranas, uno equipado con membranas de ultrafiltración de fibra hueca (TRH de 7.2 h) y otro con membranas de microfiltración de placa plana (TRH de 15 h). Al igual que en este estudio, ellos reportaron que se alcanzaron las mayores remociones de fluoxetina (98 ± 1.9 %), seguido del metoprolol (44.2 ± 29.6 %) y por último el ácido mefenámico (40.5 ± 23.7 %) en el biorreactor con membranas de microfiltración, mientras que en el reactor con membranas de ultrafiltración fue distinto, la fluoxetina (98 ± 1.6 %) seguido del ácido mefenámico (35.5 ± 28.3 %) y por último el metoprolol (29.5 ± 47.9 %). En ambos reactores, la remoción del ácido mefenámico se vio favorecida respecto al metoprolol bajo las condiciones de mayor remoción de N-NH<sub>4</sub>. Esto también se observó en este estudio, ya que la remoción de ácido mefenámico fue mayor que la del metoprolol cuando se trabajó la CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación, donde hubo la mayor remoción de N-NH<sub>4</sub>. En la Figura 4.22 puede observarse claramente que el aumento de la carga orgánica disminuyó los porcentajes de remoción, por el contrario, la recirculación mejoró las remociones, además las mayores remociones

de los tres fármacos se lograron empleando los cubos de poliuretano, lo cual puede ser atribuido a las mayores cantidades de biomasa y a las mayores remociones de  $\text{N-NH}_4$ .

La Tabla 4.14 presenta una comparación de los resultados en este estudio con los obtenidos en lodos activados y biorreactores con membranas. Cuando se trabajó con CO de  $3 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación, las remociones de ácido mefenámico en ambos materiales de soporte superaron las remociones reportadas en los lodos activados, e incluso en dos de los estudios de biorreactores con membranas, aun cuando en este estudio se trabajaron menores TRH. Radjenović *et al.* (2009) encontraron remociones de ácido mefenámico de 40 y 35 % en dos biorreactores con membranas (TRH > 7 h; influente con  $0.8\text{-}1.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Los reactores con cintas PE y cubos PU alcanzaron mayores remociones aplicando CO de 3 y  $6 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ , usando o no recirculación del efluente (TRH de 1.2-4.3 h), además con CO de  $9 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación (TRH de 1.0-1.4 h), los cubos PU también alcanzaron mayores remociones aplicando CO de  $9 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  sin recirculación. Kovalova *et al.* (2012) reportaron remociones de 92 % de ácido mefenámico en un biorreactor con membranas operado con TRS de 30-50 d, TRH de 98 h y concentraciones de  $6.140 \pm 1.779 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , estas remociones no fueron alcanzadas bajo ninguna de las condiciones estudiadas en ningún tipo de soporte, esto puede deberse a los menores TRS y TRH.

Se obtuvieron altas remociones de fluoxetina en los reactores con ambos materiales de soporte, cuando se trabajó la CO de  $3 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación se consiguieron remociones mayores que las reportadas por Suarez *et al.* (2010), quienes reportaron remociones de  $92 \pm 3$  % en lodo activado nitrificante (TRS > 50 d y TRH de 24 h), sus concentraciones iniciales fueron de  $13.4 \pm 3.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que todas las demás fases experimentales lograron superar los resultados obtenidos en los otros procesos de lodos activados, esto a pesar de los menores TRH. Radjenović *et al.* (2009) obtuvieron 33 % de remoción de fluoxetina en un sistema de tratamiento de aguas residuales de lodos activados, el TRS fue de 10 d, el TRH de 11.5 h y sus concentraciones iniciales estuvieron en el rango de  $0.12\text{-}2.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , en este estudio se superaron estas remociones bajo todas las condiciones experimentales en ambos soportes, sin embargo, cuando evaluaron dos biorreactores con membranas a escala piloto lograron mayores remociones hasta de 98 %, las cuales fueron obtenidas con TRH de 7.2 y 15 h, mayores que los TRH en este estudio, por tal razón, estas remociones no fueron alcanzadas bajo ninguna de las condiciones probadas en ninguno de los dos tipos de soporte.

En el caso del metoprolol, durante todas las fases experimentales se superaron los resultados obtenidos en lodos activados con ambos tipos de soporte, aun cuando se trabajaron menores TRH. Radjenović *et al.* (2009) obtuvieron remociones de metoprolol de 24 % en lodo activado y remociones de 44 y 29 % en dos biorreactores con membranas. Después, Kovalova *et al.* (2012) reportaron remociones de metoprolol de  $55 \pm 13$  % en un biorreactor con membranas. Los reactores con cintas PE y cubos PU alcanzaron remociones mayores al 55 % con CO de 3 y  $6 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ , independientemente de la recirculación del efluente y con CO de  $9 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  con recirculación, los cubos PU también obtuvieron remociones mayores con CO de  $9 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  sin recirculación. Es importante notar que estas remociones se lograron aun trabajando con TRH considerablemente menores a los reportados en los otros estudios.

**Tabla 4.14.** Comparación de resultados de la remoción de los fármacos con lodos activados y biorreactores con membranas

Este estudio								Otros estudios							
CO, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	TRS, d		Remoción, %				Remoción, %								
	PE	PU	ÁCIDO MEFENÁMICO		FLUOXETINE		METOPROLOL		ÁCIDO MEFENÁMICO		FLUOXETINA		METOPROLOL		
	PE	PU	PE	PU	PE	PU	PE	PU	LA	BRM	LA	BRM	LA	BRM	
<b>3.0</b> <i>TRH= 2.8-4.1 h</i>	26-34	27-37	<b>41.4±3.9</b>	<b>60.4±2.7</b>	<b>77.5±1.2</b>	<b>83.4±1</b>	<b>59.2±2.9</b>	<b>60.6±4.1</b>			<b>33.1±28.9<sup>b</sup></b> <i>TRH=11.5 h</i>	<b>98±1.9<sup>b</sup></b> <i>TRH=15 h</i>		<b>44.2±29.6<sup>b</sup></b> <i>TRH 15 h</i>	
<b>3.0 R</b> <i>TRH=3.1-4.3 h</i>	19-28	26-32	<b>77.6±2.7</b>	<b>81.7±3.5</b>	<b>94±0.3</b>	<b>94.9±0.8</b>	<b>67.5±4.3</b>	<b>72.7±5.1</b>	<b>2-50<sup>a</sup></b> <i>TRH= 7.0-15.9 h</i>	<b>40.5±23.7<sup>b</sup></b> <i>TRH=15 h</i> Influyente: 0.8-1.2 µg·L <sup>-1</sup>	<b>24.7±44.9<sup>b</sup></b> <i>TRH=11.5 h</i> Influyente: 0.12-2.3 µg·L <sup>-1</sup>	<b>98±1.9<sup>b</sup></b> <i>TRH=15 h</i> Influyente: 0.12-2.3 µg·L <sup>-1</sup>	<b>24.7±44.9<sup>b</sup></b> <i>TRH=11.5 h</i> Influyente: 0.026-0.063 µg·L <sup>-1</sup>	<b>44.2±29.6<sup>b</sup></b> <i>TRH 15 h</i> Influyente: 0.026-0.063 µg·L <sup>-1</sup>	
<b>6.0</b> <i>TRH=1.3-1.7 h</i>	14-20	20-25	<b>40±1.4</b>	<b>57.3±1</b>	<b>86.5±0.9</b>	<b>90.4±0.5</b>	<b>58±4.3</b>	<b>64.2±3.5</b>							
<b>6.0 R</b> <i>TRH=1.2-1.7 h</i>	12-18	15-18	<b>50.5±4.1</b>	<b>60.6±1.5</b>	<b>87.1±1</b>	<b>90.8±0.3</b>	<b>58.6±1.9</b>	<b>66.5±2.3</b>	<b>65<sup>e</sup></b> <i>TRH=20 h</i> <i>TRS=6 d</i>	<b>35.5±28.3<sup>b</sup></b> <i>TRH=7.2 h</i> Influyente: 0.8-1.2 µg·L <sup>-1</sup>	<b>92 ±3<sup>d</sup></b> <b>Lodo nitrificante</b> <i>TRH=24 h</i> <i>TRS=&gt;50 d</i> Influyente: 13.4±8.6	<b>98±1.6<sup>b</sup></b> <i>TRH=7.2 h</i> Influyente: 0.12-2.3 µg·L <sup>-1</sup>	<b>29.5±47.9<sup>b</sup></b> <i>TRH=7.2 h</i> Influyente: 0.026-0.063 µg·L <sup>-1</sup>	<b>29.5±47.9<sup>b</sup></b> <i>TRH=7.2 h</i> Influyente: 0.026-0.063 µg·L <sup>-1</sup>	
<b>9.0</b> <i>TRH= 0.9-1.4 h</i>	11-13	13-14	<b>28.8±5</b>	<b>51.4±2.8</b>	<b>67.1±1.3</b>	<b>80.4±1.6</b>	<b>40.4±2.7</b>	<b>49±2.8</b>					<b>6.5<sup>c</sup></b>		
<b>9.0 R</b> <i>TRH= 1.0-1.4 h</i>	10-13	11-16	<b>52.7±3.3</b>	<b>66.6±3.2</b>	<b>89.9±0.46</b>	<b>92.8±0.8</b>	<b>55.6±4</b>	<b>65.7±2.3</b>		<b>92±0<sup>f</sup></b> <i>TRS=30-50 d</i> <i>TRH=98 h</i> Influyente: 6.140±1.779 µg·L <sup>-1</sup>	<b>40<sup>f</sup></b> <i>TRH=11.9 h</i> <i>TRS=8.1 d</i>	<b>76.8<sup>c</sup></b>	<b>55±13<sup>f</sup></b> <i>TRH=98 h</i> <i>TRS=30-50 d</i> Influyente: 1.325±0.330 µg·L <sup>-1</sup>	<b>55±13<sup>f</sup></b> <i>TRH=98 h</i> <i>TRS=30-50 d</i> Influyente: 1.325±0.330 µg·L <sup>-1</sup>	
<b>12.0</b> <i>TRH=0.7-0.8 h</i>	8-9	9-10	<b>21.4±1.7</b>	<b>30.2±3.7</b>	<b>62.5±3.3</b>	<b>73.3±3.6</b>	<b>33.9±4.8</b>	<b>41.3±4.6</b>	<b>55-58<sup>e</sup></b> <i>TRH=40 h</i> <i>TRS=16 d</i>				<b>35<sup>e</sup></b> <i>TRH=20 h</i> <i>TRS=6 d</i>	<b>35<sup>e</sup></b> <i>TRH=20 h</i> <i>TRS=6 d</i> Influyente: 1.325±0.330 µg·L <sup>-1</sup>	
<b>12.0 R</b> <i>TRH=0.6-0.9 h</i>	4-6	4-6	<b>37.8±3.7</b>	<b>47.9±2.1</b>	<b>74.2±1.9</b>	<b>81.3±1.4</b>	<b>43.5±2.2</b>	<b>50.2±3.2</b>			<b>33.0<sup>h</sup></b>	<b>80<sup>h</sup></b>	<b>26<sup>g</sup></b> <i>TRS=35 d</i>	<b>26<sup>g</sup></b> <i>TRS=35 d</i>	

**Referencias:** <sup>a</sup> Tauxe-Wuersch *et al.* 2005; <sup>b</sup> Radjenović *et al.*, 2009; <sup>c</sup> Rosal *et al.*, 2010; <sup>d</sup> Suarez *et al.*, 2010; <sup>e</sup> Jelic *et al.*, 2011; <sup>f</sup> Kovalova *et al.*, 2012;

<sup>g</sup> Nielsen *et al.*, 2013; <sup>h</sup> Al Aukudy *et al.*, 2014

**PE** – Reactor con cintas de polietileno

**PU** – Reactor con cubos de poliuretano

**LA** – Lodos activados

**BRM** – Biorreactores con membranas

**Nota:** Valores promedio para los últimos 14 días de la fase

La estructura química de los compuestos juega un papel importante en determinar su resistencia a la biodegradación, por ello, cada fármaco presentó distintas remociones. Un factor clave que favorece la biotransformación de fármacos en lodo activado nitrificante es la disponibilidad de cadenas lineales con grupos alquilo, así como los carbonos secundarios y terciarios que pueden ser hidroxilados fácilmente por la acción de la enzima amonio monooxigenasa (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2016). A diferencia del ácido mefenámico, la fluoxetina y el metoprolol poseen en su estructura cadenas lineales con carbonos secundarios, lo cual puede facilitar la hidroxilación. El ataque por el oxígeno reactivo de la enzima amonio monooxigenasa también puede ocurrir contra enlaces N-H, C-H, o dobles enlaces, otras dos reacciones que han sido observadas son deshidrogenación/oxidación y deshalogenación (Forrez *et al.*, 2011). El grupo amino es donador de electrones, esto hace a las moléculas más propensas al ataque por las bacterias aerobias (Tadkaew *et al.*, 2011). Los tres compuestos contienen un enlace N-H (amina secundaria), sin embargo, la fluoxetina, seguido del metoprolol presentan menos impedimento estérico para un ataque en comparación con el ácido mefenámico. Los fármacos que muestran una asociación positiva con la remoción de nitrógeno amoniacal generalmente presentan reacciones de oxidación como *N*-desalquilación (Helbling *et al.*, 2012). La *N*-desalquilación puede ocurrir más fácilmente en la fluoxetina y el metoprolol, debido a que poseen el grupo metilo y el grupo isopropilo unido a *N* respectivamente. Además las reacciones de *N*-oxidación involucran la introducción directa de un átomo de oxígeno en el nitrógeno del grupo funcional amino, resultando en productos de hidroxilamina para las aminas secundarias (Gulde *et al.*, 2016). Los grupos funcionales aceptores de electrones como el grupo carboxilo en el ácido mefenámico, hace a los compuestos menos susceptibles al catabolismo oxidativo (Tadkaew *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2014a), esto y el impedimento estérico para un ataque en el grupo amino puede explicar en parte las bajas remociones del ácido mefenámico.

Por otro lado, el ácido mefenámico y la fluoxetina contienen más enlaces C-H que el metoprolol, una razón es que el ácido mefenámico y la fluoxetina poseen dos anillos aromáticos, la reacción más común de los compuestos aromáticos es la sustitución electrofílica aromática, esto es, un electrófilo reacciona con un anillo aromático y sustituye a uno de los hidrógenos; pueden introducirse varios tipos de sustituyentes, entre ellos el grupo hidroxilo (-OH), dando como resultado una hidroxilación del anillo aromático (McMurry, 2008). Los intermediarios hidroxilados pueden servir como sustrato para los microorganismos heterótrofos (Yi y Harper, 2007). También se puede dar la oxidación de un producto hidroxilado a un producto carbonilo o ácido carboxílico (Gulde *et al.*, 2016). La fluoxetina es el único de los tres fármacos que contiene halógenos en su molécula para una deshalogenación, en este caso, corresponde a una defluoración del grupo trifluorometil, lo cual puede dar como resultado una oxidación a ácido carboxílico (Petrovic y Barceló, 2010). Además la enzima amonio monooxigenasa es capaz de oxidar éteres aromáticos a través de *O*-desalquilación o hidroxilación (Suarez *et al.*, 2010; Alvarino *et al.*, 2014). La fluoxetina y el metoprolol contienen un éter aromático. Por lo tanto, la estructura de la molécula de fluoxetina hace posible las diversas transformaciones, todo lo anterior puede explicar en parte las más altas remociones de fluoxetina en comparación con el metoprolol y el ácido mefenámico.

La biodegradación y la sorción son los dos mecanismos principales de remoción de fármacos mediante tratamientos biológicos (Ternes y Joss 2006; Majewsky *et al.*, 2011). Generalmente los fármacos son removidos en mayor grado en procesos aerobios en comparación a las condiciones anaerobias (Alvarino *et al.*, 2014). Por consiguiente, además de la estructura química, es necesario considerar las diferencias en las comunidades bacterianas desarrolladas en las cintas de polietileno y los cubos de poliuretano, así como el comportamiento de sorción de los fármacos en la biomasa inmovilizada en cada tipo de soporte.

### 4.2.5 Sorción de los fármacos en la biomasa inmovilizada

Para determinar la concentración de los fármacos en la biomasa inmovilizada se tomaron muestras cada dos semanas, los resultados se presentan en la Figura 4.23. El fármaco que estuvo presente en mayores concentraciones fue el ácido mefenámico, seguido del metoprolol y la fluoxetina. Las concentraciones de ácido mefenámico estuvieron en el rango de 1.024-1.69  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  en las cintas de polietileno y 0.812-1.426  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  en los cubos de poliuretano, el metoprolol se encontró en el rango de 0.635-0.921  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  y 0.409-0.842  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  respectivamente, mientras que los rangos de la fluoxetina fueron de 0.46-0.9  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  en las cintas y 0.326-0.663  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  en los cubos. Puede notarse que se encontraron mayores concentraciones de los fármacos en la biomasa de las cintas de polietileno en comparación con los cubos de poliuretano. Se realizaron los análisis estadísticos para evaluar las diferencias entre las concentraciones de los fármacos en la biomasa inmovilizada con los dos diferentes materiales de soporte a la misma carga orgánica (Tabla 4.15), los resultados mostraron que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de fluoxetina en la biomasa inmovilizada en cada material de soporte, con excepción de la CO de 9  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  sin recirculación, también hubo una diferencia significativa en las concentraciones de metoprolol, con excepción de la CO de 9  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  sin recirculación y CO de 12  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ , en el caso del ácido mefenámico solo existió diferencia significativa cuando se trabajaron las CO de 3  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ , 9  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 12  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  con recirculación.

#### Diseño Base

Número de factores experimentales: 1	Número de corridas: 8
Número de bloques: 1	Grados de libertad para el error: 6
Número de respuestas: 1	Aleatorizar: Sí
<i>Factores</i>	<i>Niveles</i>
Materiales de soporte	2
<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>
Cantidad	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

**Tabla 4.15.** Análisis estadístico de las diferencias entre las concentraciones de los fármacos en la biomasa inmovilizada con los diferentes materiales de soporte a la misma carga orgánica

CO, $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$	Recirculación, %	ÁCIDO MEFENÁMICO		FLUOXETINE		METOPROLOL	
		Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
3.0	0	8.39	0.0274	23.19	0.0030	13.55	0.0103
3.0	50	12.13	0.0131	7.92	0.0306	10.73	0.0169
6.0	0	3.51	0.1102	28.65	0.0017	6.07	0.0488
6.0	50	0.62	0.4626	24.65	0.0025	74.03	0.0001
9.0	0	3.76	0.1007	2.16	0.1917	0.98	0.3602
9.0	50	56.34	0.0003	12.15	0.0131	8.36	0.0276
12.0	0	4.27	0.0842	21.07	0.0037	0.03	0.8796
12.0	50	15.28	0.0079	6.47	0.0439	0.59	0.4733

Se observó que el compuesto con las más bajas remociones (ácido mefenámico) estuvo presente en mayores concentraciones en la biomasa inmovilizada, mientras el compuesto con las más altas remociones (fluoxetina) estuvo presente a menores concentraciones en la biomasa, por un lado esto puede explicarse debido a la mayor capacidad de los microorganismos de llevar a cabo la remoción de fluoxetina, por otro lado, es importante considerar que la fluoxetina fue adicionada en una menor concentración al agua residual, casi 2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fluoxetina, en comparación con los casi 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido mefenámico y metoprolol, lo cual también pudo influir en su menor concentración en la biomasa. Luo *et al.* (2014b) explicaron que los compuestos con más bajas eficiencias de remoción generalmente se acumulan en los biosólidos, tanto en la biomasa suspendida como en la biomasa inmovilizada en

cubos de poliuretano. Tadkaew *et al.* (2011) explicaron que la sorción de contaminantes orgánicos a concentraciones traza en los biosólidos, da como resultado un mayor tiempo de residencia en el reactor, lo cual puede promover la remoción vía biodegradación.

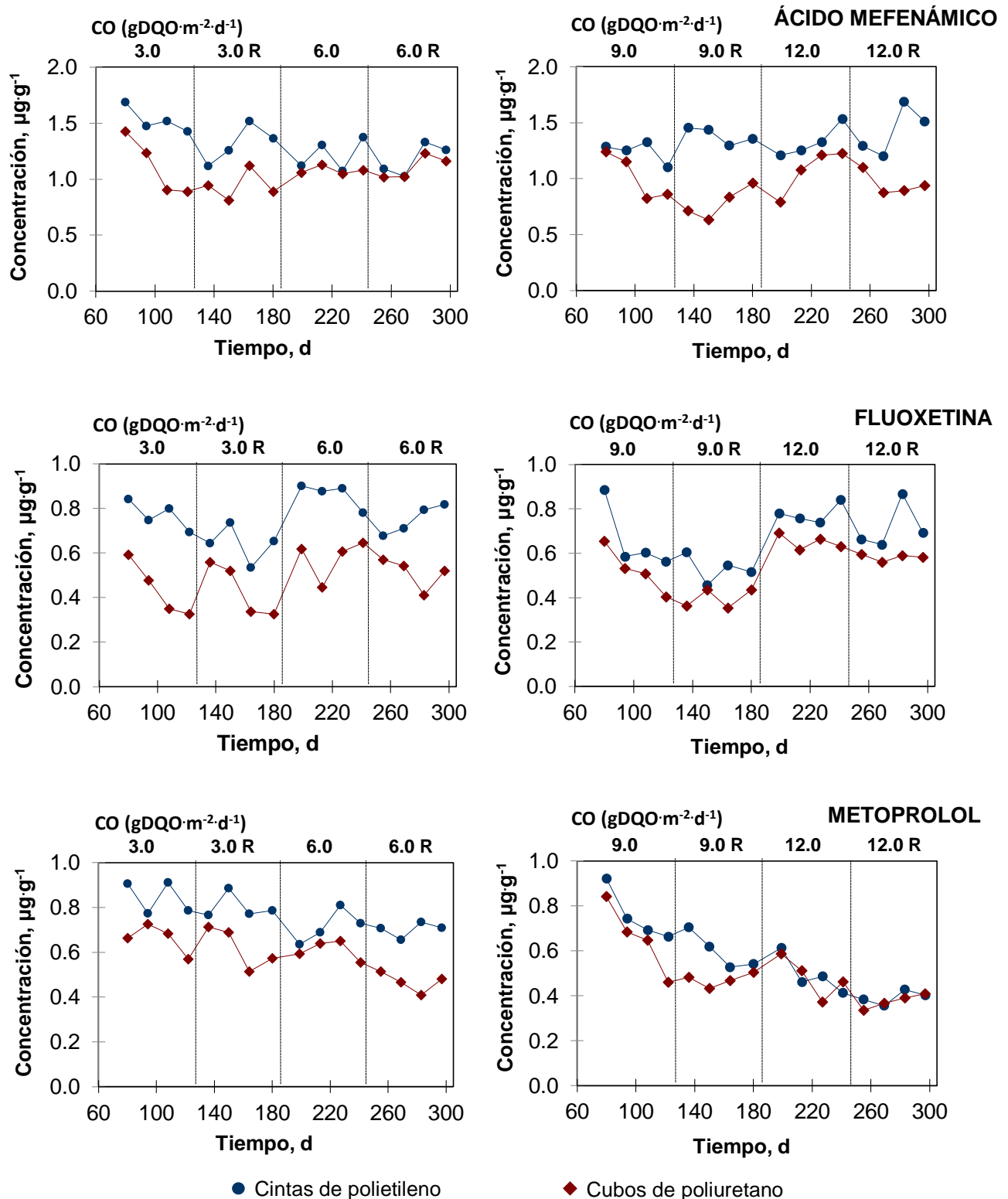


Figura 4.23. Concentraciones de los fármacos en la biomasa inmovilizada durante la experimentación

No se encontró una relación entre las concentraciones de los fármacos en la biomasa y las diferentes cargas orgánicas, tampoco se encontró una relación entre las concentraciones de los fármacos y el tiempo de operación de los reactores. Según otros estudios que han realizado la cuantificación de hormonas y fármacos en la biomasa de biorreactores con membranas, se han encontrado altas concentraciones de las hormonas E1, E2, EE2 durante los primeros 120 d de operación, también altas concentraciones de los fármacos ácido clofíbrico y gemfibrozil durante los primeros 209 d de operación, después las concentraciones decrecieron hasta por debajo de los límites de cuantificación ( $0.002-0.006 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), lo cual fue explicado por un ajuste de los consorcios en la biomasa y el metabolismo para llevar a cabo la biodegradación (Estrada-Arriaga y Mijaylova, 2011; Gutierrez-Macias y Mijaylova, 2015). En este estudio no se observó este comportamiento, las concentraciones en la biomasa inmovilizada de los dos tipos de soporte estuvieron por arriba de los límites de cuantificación ( $0.1426-0.1815 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), aún en las condiciones bajo las cuáles se presentaron las mayores remociones de los fármacos (CO de  $3 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación), además se observaron incrementos y decrementos en las concentraciones durante todas las fases experimentales, manteniéndose en cierto rango.

Estos resultados fueron utilizados para realizar los balances de masa, los cuales se basan en las concentraciones medidas de los fármacos en la fase líquida y en la biomasa inmovilizada, así se determinó la contribución de los procesos de biodegradación y sorción en la remoción global de los fármacos. La biodegradación fue el mecanismo de remoción principal de los tres fármacos en los reactores con ambos materiales de soporte, la sorción tuvo una contribución menor al 2 % de la remoción. Las concentraciones de los fármacos en la biomasa inmovilizada en los cubos fueron menores en comparación con las cintas, esto puede atribuirse a su mayor capacidad de remoción de los fármacos, además a las diferentes características de la biomasa inmovilizada en cada tipo de soporte, tal como su menor potencial de sorción.

### 4.3 COEFICIENTES DE SORCIÓN EN LA BIOMASA INMOVILIZADA

#### 4.3.1 Tiempo de equilibrio

Los resultados indicaron que el equilibrio para el ácido mefenámico, la fluoxetina y el metoprolol en la biomasa inmovilizada en las cintas de polietileno puede ser alcanzado después de 12 h, el equilibrio en los cubos de poliuretano fue alcanzado después de 18 h. La Figura 4.24 muestra las disminuciones de los fármacos en la fase líquida para la determinación del tiempo de equilibrio. En el Anexo 6.1 se encuentran los resultados de los duplicados de cada experimento.

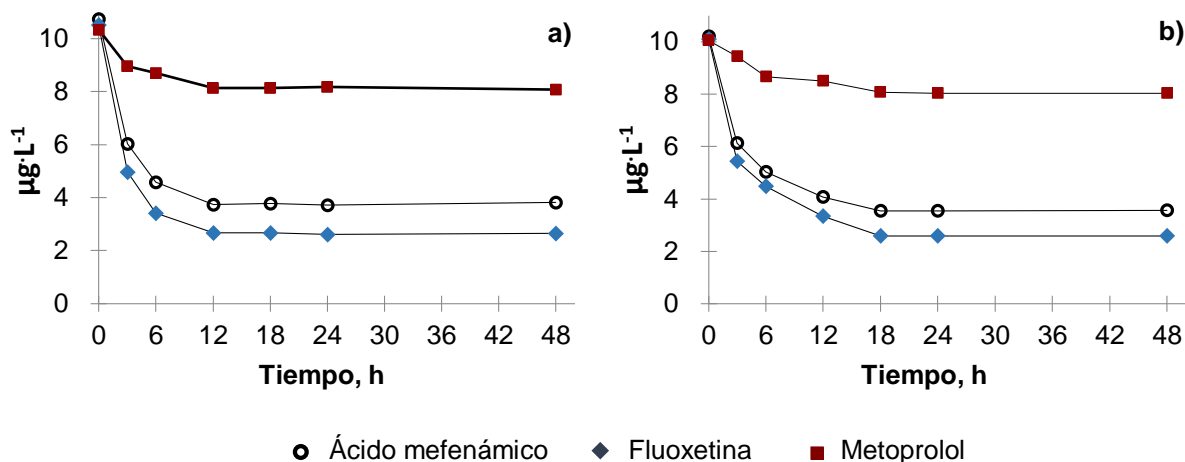


Figura 4.24. Evolución de los fármacos en función del tiempo en la fase líquida para la determinación del tiempo de equilibrio. a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

### 4.3.2 Coeficientes de sorción $K_d$

En la Figura 4.25 se muestran las isotermas de sorción obtenidas, se encontró buen ajuste del modelo con los datos, los valores de  $R^2$  estuvieron entre 0.9105 y 0.987 en los dos soportes. La pendiente representa el coeficiente  $K_d$  en  $L \cdot g^{-1}$ , este valor fue convertido a  $L \cdot kg^{-1}$  para obtener los coeficientes de sorción mostrados en la Tabla 4.16. El Anexo 6.2 muestra las concentraciones de los duplicados de los fármacos en la fase líquida para la determinación de los coeficientes de sorción. El Anexo 6.3 contiene las concentraciones de los sólidos en los duplicados para la determinación de los coeficientes. El Anexo 6.4 muestra las concentraciones de los fármacos en los sólidos.

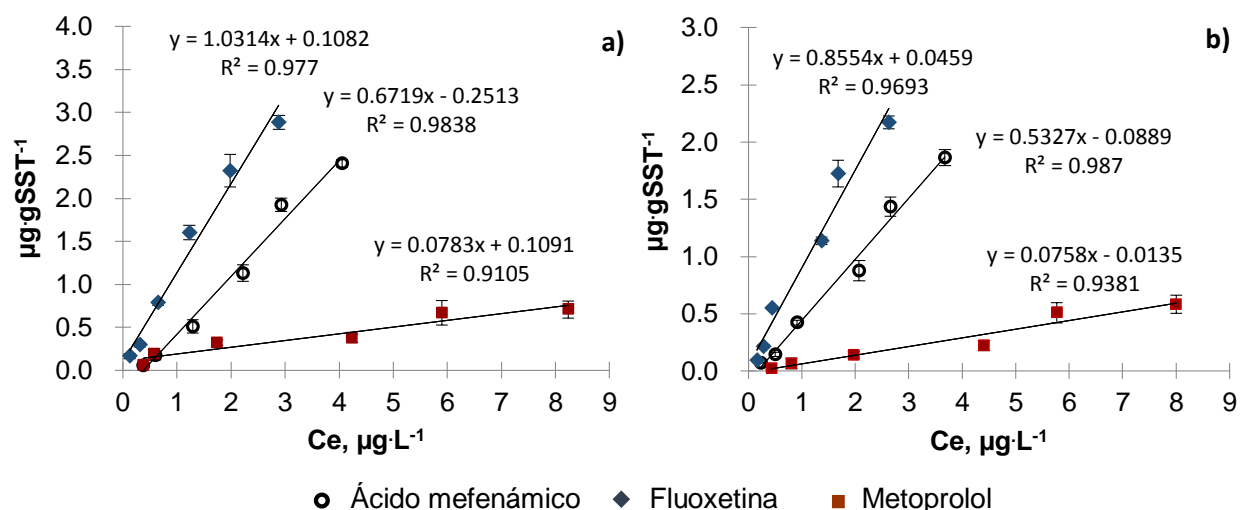


Figura 4.25. Isotermas de sorción de los fármacos en los dos tipos de soporte.  
a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

Tabla 4.16. Coeficientes de sorción en la biomasa inactiva en los dos tipos de soporte

Compuesto	log $K_d$		log $K_d$ Biomasa suspendida	log $K_d$ Literatura
	PE	PU		
Ácido mefenámico	2.827	2.726	2.56-2.58	2.64-2.73 <sup>a</sup>
Fluoxetina	3.013	2.932	2.71-2.76	3.76-3.78 <sup>d</sup> 2.88-3.02 <sup>e</sup>
Metoprolol	1.894	1.879	1.93-2.05	1.7-1.95 <sup>b, c</sup>

Referencias: <sup>a</sup> Radjenović *et al.*, 2009; <sup>b</sup> Ramil *et al.* 2010; <sup>c</sup> Scheurer *et al.*, 2010; <sup>d</sup> Hörsing *et al.*, 2011; <sup>e</sup> Fernandez-Fontaina *et al.*, 2014

La Tabla 4.16 contiene los valores de los coeficientes de sorción obtenidos para cada biomasa inactiva y los coeficientes reportados en la literatura. Los valores de  $K_d < 500 L \cdot kg^{-1}$  ( $\log K_d < 2.7$ ) indican baja sorción al lodo, lo cual resulta en su presencia principalmente en la fase acuosa (Ternes *et al.*, 2004; Poseidon 2004). Los menores coeficientes de sorción fueron determinados para el metoprolol ( $\log K_d < 2.7$ ), esto indicó su bajo potencial de sorción, lo cual está de acuerdo a los valores reportados previamente en la literatura y a los obtenidos en este estudio en las pruebas de sorción con biomasa suspendida. Los valores del metoprolol en los dos empaques



fueron menores a los obtenidos anteriormente con la biomasa suspendida. Los valores para el ácido mefenámico fueron  $\log K_d > 2.7$ , mayores a los obtenidos en la biomasa suspendida y ligeramente mayores o similares a los determinados por Radjenović *et al.* (2009), ellos reportaron valores de  $\log K_d$  de 2.64-2.73 ( $434\text{-}537 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) en lodo activado y en biorreactores con membranas, esto indicó que la sorción de ácido mefenámico en la biomasa inmovilizada puede ser un mecanismo de remoción relevante. Los valores de  $\log K_d$  para la fluoxetina fueron los más altos, aunque menores a los determinados por Hørsing *et al.* (2011), ellos reportaron  $\log K_d$  de 3.76-3.78 ( $5700\text{-}6000 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) en lodo secundario, los valores de  $\log K_d$  en este estudio fueron similares a los reportados por Fernández-Fontaina *et al.*, (2014), ellos realizaron el estudio en reactores enriquecidos con lodo activado nitrificante. Se observó que los valores del ácido mefenámico y la fluoxetina en los dos empaques fueron mayores a los obtenidos con la biomasa suspendida al inicio de esta investigación. Los tres fármacos mostraron mayores coeficientes de sorción en la biomasa inmovilizada sobre la superficie lisa de las cintas de polietileno, en comparación con la biomasa inmovilizada sobre la superficie de los cubos y en el interior de sus poros. En parte, esto puede deberse a que en las cintas de polietileno se encontró una mayor abundancia relativa de bacterias filamentosas *Thiothrix*, las bacterias filamentosas pueden proporcionar una mayor área superficial disponible para la sorción (Martins *et al.*, 2003).

#### **4.4 BALANCES DE MASA EN LOS REACTORES CON BIOMASA INMOVILIZADA**

Se emplearon dos métodos para realizar los balances de masa en los reactores con biomasa inmovilizada. El método 1 involucra las concentraciones medidas de los fármacos en la fase líquida, en la biomasa inmovilizada y en el lodo extraído. El método 2 incluye las concentraciones medidas de los fármacos en fase líquida, así como los coeficientes de sorción  $K_d$  determinados para cada compuesto en la biomasa inmovilizada en cada tipo de soporte. En ambos métodos se consideró la sorción a partir de los sólidos producidos en los reactores, su determinación requirió el uso del coeficiente de producción de biomasa ( $Y$ ) y el coeficiente de decaimiento endógeno ( $k_d$ ). La determinación y los valores de los coeficientes cinéticos para cada tipo de soporte se presentan en el Anexo 2.

Las Figuras 4.26 y 4.27 muestran una comparación de los resultados de los balances de masa respecto a los porcentajes de biodegradación y sorción con ambos métodos. En el Anexo 7.1-7.4 se encuentran los valores del balance de masa utilizando los métodos 1 y 2. La principal diferencia entre un método y otro radica en la determinación de la sorción, por lo tanto, las diferencias en la biodegradación equivalen a las diferencias en la sorción.

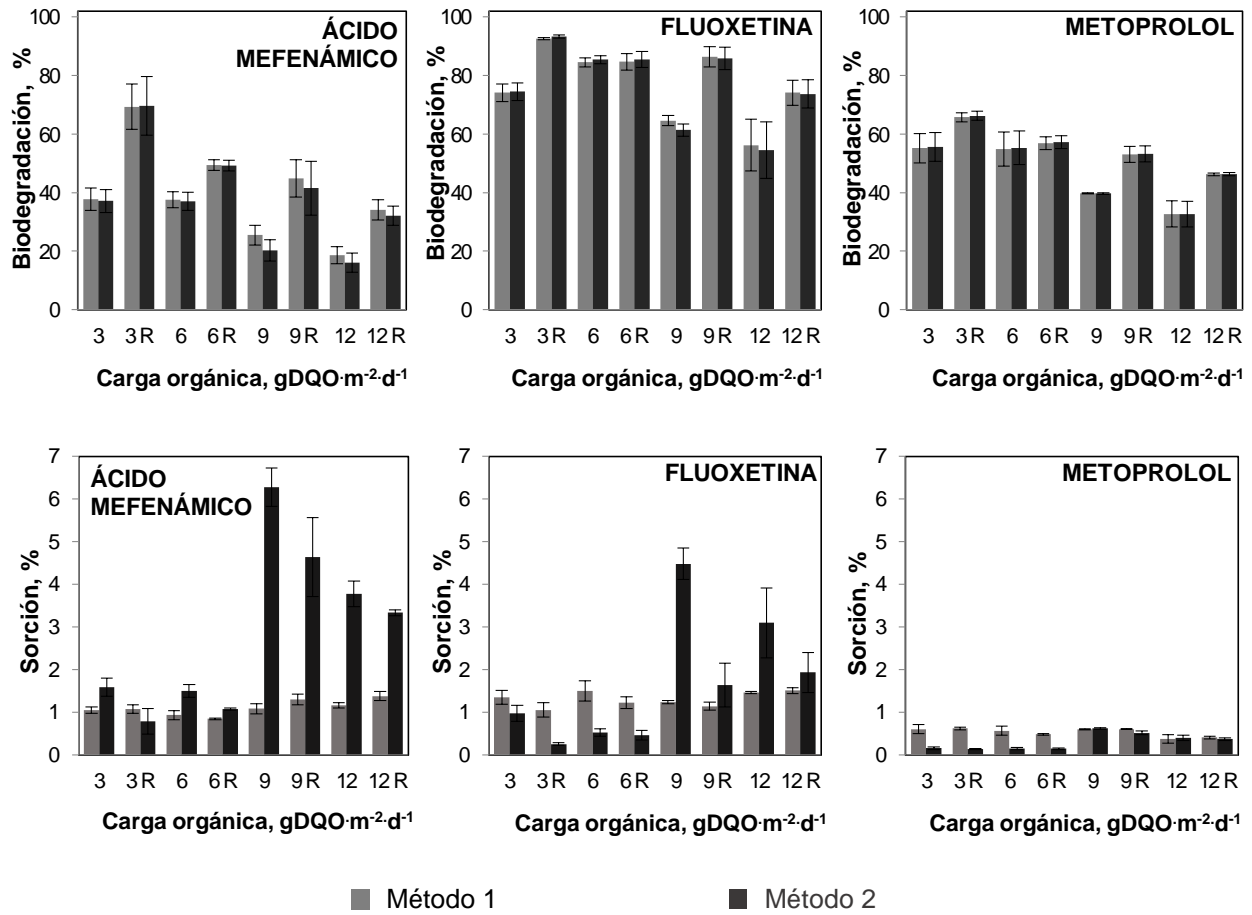


Figura 4.26. Porcentajes de biodegradación y sorción en los reactores con cintas de polietileno

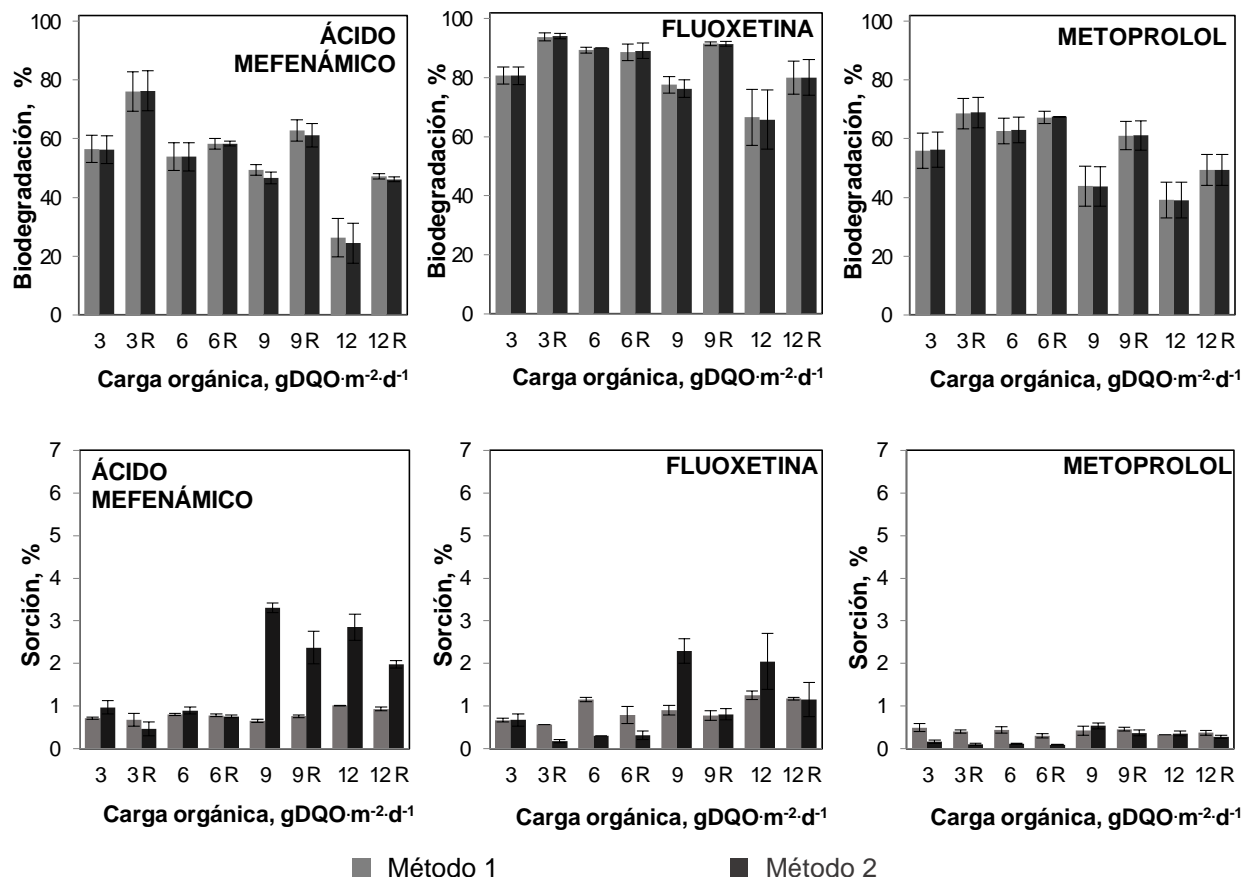


Figura 4.27. Porcentajes de biodegradación y sorción en los reactores con cubos de poliuretano

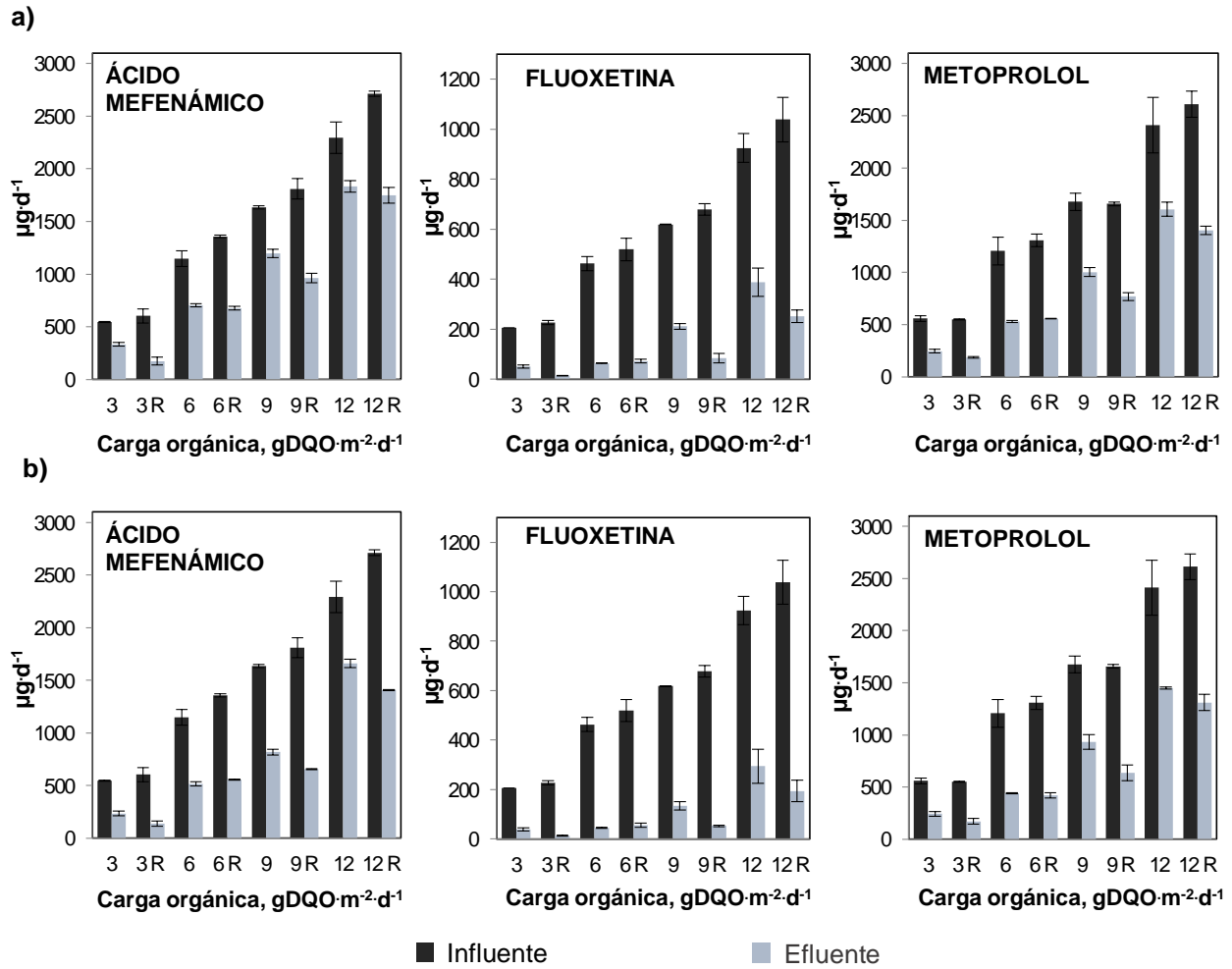
La biodegradación fue el mecanismo de remoción principal de los tres fármacos en todas las fases. Los reactores presentaron mayores porcentajes de biodegradación de fluoxetina en comparación con los demás fármacos, pero este compuesto fue adicionado en una menor concentración al agua residual, casi  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fluoxetina, casi  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido mefenámico y metoprolol, esto pudo influir en los altos porcentajes de biodegradación de la fluoxetina. En el caso del ácido mefenámico, las diferencias entre las remociones atribuidas a la sorción obtenidas mediante un método y otro fueron pequeñas al trabajar las cargas orgánicas bajas (0.2-0.6 % en las cintas de polietileno y 0.1-0.2 % en los cubos de poliuretano), estas diferencias aumentaron al trabajar las cargas orgánicas altas (2.0-5.2 % y 1.0-2.6 %, respectivamente), el método 2 presentó mayores porcentajes de sorción, principalmente en los casos de las CO de 9 y 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>, ya que la producción de sólidos (Anexo 7.5), la cantidad de sólidos extraídos y las concentraciones de los fármacos en el efluente son más altas al trabajar con cargas orgánicas altas, el método 2 se basa en el uso de los coeficientes de sorción que fueron calculados con la biomasa inmovilizada inactiva, por lo tanto, este método no toma en cuenta la actividad de la biomasa. La excepción ocurrió con la CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación, donde el porcentaje de sorción calculado con el método 1 fue superior, debido a que en esa condición se lograron las mayores remociones de ácido mefenámico y por ello se obtuvieron las menores concentraciones en los efluentes, incluso en las demás fases experimentales las concentraciones de ácido mefenámico en los efluentes fueron mayores a los otros fármacos.

En el caso de la fluoxetina las diferencias entre las remociones atribuidas a sorción obtenidos mediante los dos métodos fueron de 0.4-3.2 % en las cintas de polietileno y de 0.1-1.4 % en los cubos de poliuretano, se puede observar que en los dos tipos de soporte, la mayor diferencia se presentó con CO de 9 y 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> sin recirculación (reactores PE2 y PU2), donde la remoción por sorción fue mayor con el método 2, esto debido a que bajo estas condiciones se tuvieron las mayores concentraciones de fluoxetina en los efluentes.

En el caso del metoprolol las diferencias entre las remociones atribuidas a sorción obtenidos mediante ambos métodos fueron bajas, hasta 0.5 % en las cintas de polietileno y 0.3 % en los cubos de poliuretano, la menor diferencia pudo ser a causa de las menores cantidades de metoprolol medidas en la biomasa inmovilizada y los menores coeficientes de sorción. Se puede notar que en el caso de la fluoxetina y el metoprolol, la sorción fue mayor con el método 1 cuando se trabajaron las CO de 3 y 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>, ya que en el método 2 la sorción considera las concentraciones de los fármacos en el efluente, dichas concentraciones fueron más bajas con estas cargas orgánicas, como consecuencia, los porcentajes de sorción calculados también fueron menores.

Los balances de masa realizados con el uso del coeficiente de sorción (método 2) son una herramienta útil para la determinación de los mecanismos de remoción de los compuestos, con lo cual se pueden omitir los análisis en la fase sólida, pero se debe considerar que los coeficientes de sorción se determinan con biomasa inactiva, por lo tanto la medición directa de las concentraciones de los fármacos en la fase líquida y sólida (método 1) se puede considerar una mejor alternativa para los balances de masa. No obstante, las diferencias entre ambos métodos en los dos tipos de soporte fueron <5.3 % para el ácido mefenámico, <3.3 % en la fluoxetina y <0.6 % en el metoprolol.

Se trabajó con un agua residual real con variaciones en la concentración de materia orgánica, por ello fue necesario ajustar continuamente el caudal del influente para mantener la carga orgánica en estudio, mientras la adición de los fármacos se realizó para obtener casi 2 ug·L<sup>-1</sup> de fluoxetina, 5 ug·L<sup>-1</sup> de ácido mefenámico y metoprolol sin importar la concentración de materia orgánica, por esta razón se observaron diferencias en los flujos máxicos de los fármacos en los influentes, aun cuando se trabajó la misma carga orgánica en la condición con recirculación. La Figura 4.28 y el Anexo 7 presentan los flujos máxicos promedio de los fármacos en los influentes y efluentes de los reactores con los dos tipos de soporte. Los flujos promedio de ácido mefenámico en los influentes fueron desde 545.5 ± 4.6 hasta 2712.6 ± 26.4 µg·d<sup>-1</sup>, 206.2 ± 0.4 a 1037.8 ± 89.5 µg·d<sup>-1</sup> de fluoxetina y desde 559 ± 0.4 hasta 2611.8 ± 89.5 µg·d<sup>-1</sup> de metoprolol. Los flujos máxicos de los influentes y efluentes incrementaron conforme aumentó la carga orgánica, debido al menor tiempo de residencia hidráulica en los reactores. Cuando se trabajó la condición con recirculación disminuyó el flujo máxico de los tres fármacos en los efluentes de los cuatro reactores, así los menores flujos máxicos en los efluentes y por consiguiente los mayores porcentajes de remoción se presentaron en la Fase 3 de los reactores PE1 y PU1 (CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación), los flujos de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol en los efluentes fueron de 175 ± 38.7, 14.5 ± 0.7 y 186.1 ± 7.1 µg·d<sup>-1</sup>, respectivamente en el reactor PE1. En el reactor PU1 fueron de 138.3 ± 25, 12.9 ± 1.5 y 171.3 ± 27.2 µg·d<sup>-1</sup>, respectivamente. Al trabajar la CO de 3.0 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> también hubo los más bajos flujos máxicos de fármacos en los influentes, por esta razón, las menores tasas de remoción se tuvieron bajo esta condición, donde también se observaron menores tasas de sorción.



**Figura 4.28. Flujos máxicos de los fármacos en el influente y efluente de los reactores con biomasa inmovilizada. a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano**

Durante la operación de los reactores, la biomasa se encuentra activa, por lo que el método 1 se puede considerar una mejor alternativa para los balances de masa, por consiguiente en la Figura 4.29 se presentan las tasas de remoción, biodegradación y sorción de los fármacos usando el método 1.

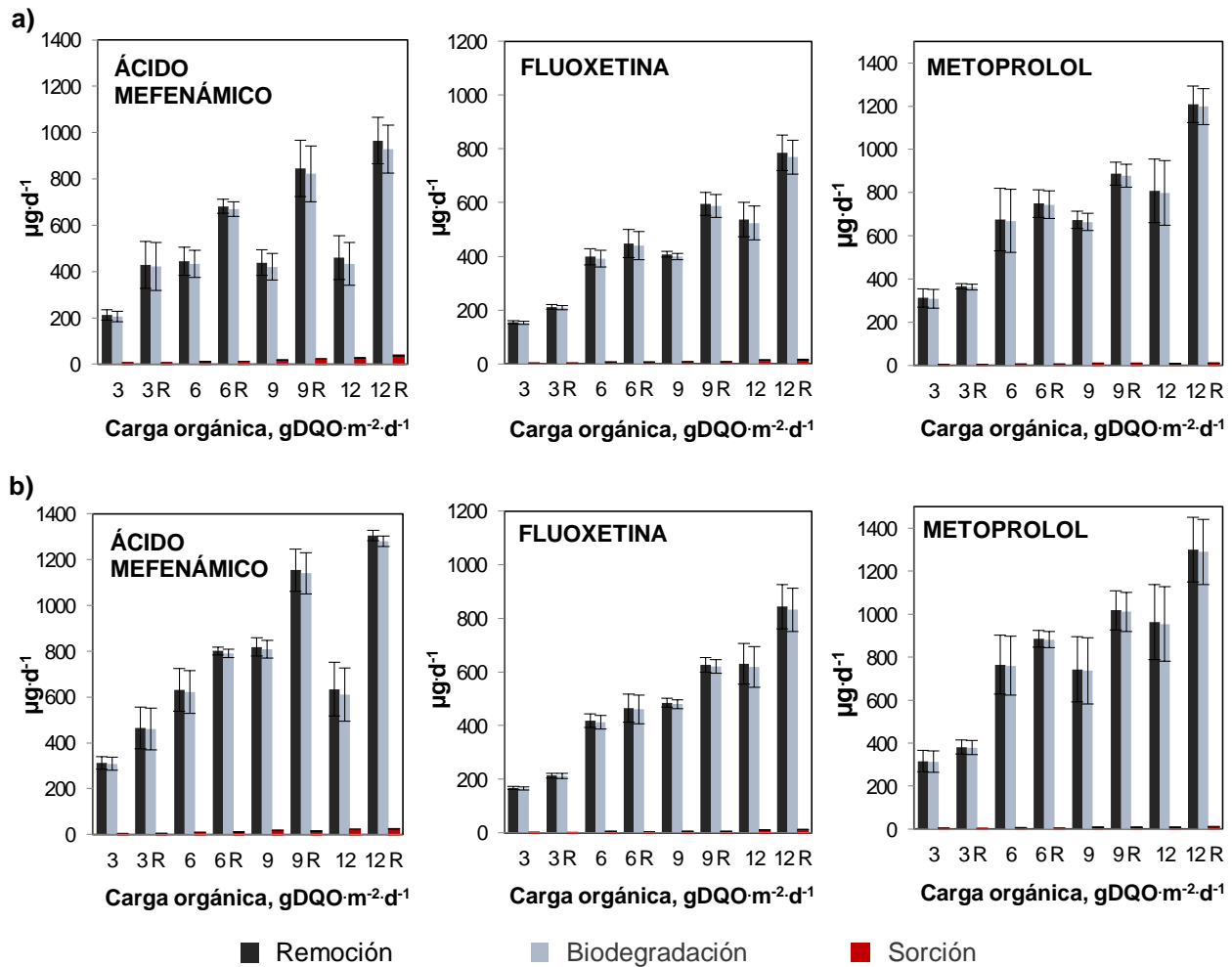


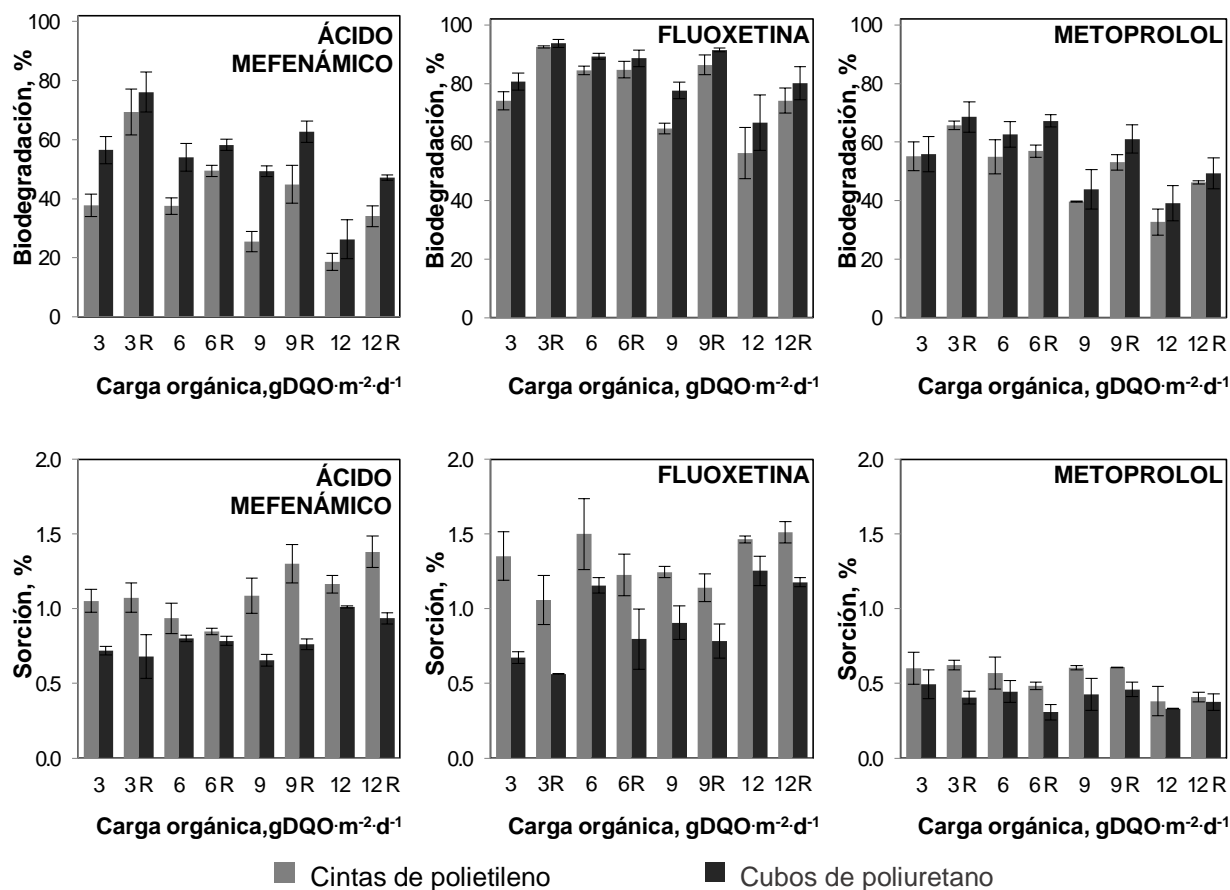
Figura 4.29. Tasas de remoción, biodegradación y sorción en los reactores con biomasa inmóvilizada. a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

Las tasas de remoción, biodegradación y sorción incrementaron conforme aumentó la carga orgánica en los dos tipos de soporte. Al aplicar la recirculación, las tasas de remoción de los tres fármacos aumentaron, de tal manera que las mayores tasas de remoción, biodegradación y sorción se presentaron con CO de 12  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación. Las tasas de sorción del ácido mefenámico fueron más altas en comparación a los demás fármacos, estas incrementaron al aplicar la recirculación en las cintas de polietileno. Por un lado, la recirculación puede mejorar la transferencia de masa, además de acuerdo a los coeficientes de sorción y a la cantidad de ácido mefenámico cuantificada en la biomasa, la sorción de ácido mefenámico podría ser un mecanismo de remoción relevante. Por otro lado, la capacidad de biodegradación de ácido mefenámico en la biomasa inmóvilizada en las cintas de polietileno fue menor al 70 %. Cuando se aplicó la recirculación en los cubos de poliuretano, las tasas de sorción de ácido mefenámico fueron menores al trabajar las CO de 3 y 9  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ , bajo esas condiciones, las tasas de biodegradación de ácido mefenámico fueron más altas, incluso mayores que las del metoprolol, las tasas de sorción podrían ser más bajas debido a que cuanto mayor es la biodegradación, la cantidad de compuesto en la biomasa podría ser menor debido a la actividad de los microorganismos. En las cintas de polietileno solo se logró obtener mayor remoción de ácido mefenámico en comparación con el metoprolol cuando se trabajó la CO de 3  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación.

Este comportamiento no fue observado para la fluoxetina y el metoprolol, las tasas de sorción disminuyeron al aplicar la recirculación en los dos tipos de soporte cuando se trabajaron las CO de 3 y 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>, ya que durante la condición de recirculación del efluente se consiguieron mayores porcentajes de biodegradación, mientras que al aplicar la recirculación con la CO de 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> las tasas de sorción aumentaron, en esta condición la producción de sólidos y los sólidos extraídos fueron mayores. En las cintas de polietileno también se observó que cuando se trabajó la CO de 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación se superaron las tasas de remoción de los tres fármacos obtenidas con CO de 9 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> sin recirculación, lo mismo ocurrió con la CO de 9 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación en comparación con la CO de 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> sin recirculación, por lo tanto, al aplicar la recirculación se pueden trabajar cargas orgánicas más altas y obtener resultados similares o mejores que con cargas orgánicas más bajas sin recirculación. En los cubos de poliuretano, las tasas de remoción obtenidas con CO de 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación superaron a las obtenidas con CO de 9 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> sin recirculación, esto se observó únicamente en el metoprolol, mientras que la mayor tasa de remoción con CO de 9 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación, en comparación con la CO de 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> sin recirculación se observó con el ácido mefenámico y el metoprolol.

Al trabajar la CO de 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> se tuvieron los mayores flujos máxicos en los influentes, esto contribuyó a las mayores tasas de remoción de los fármacos en la fase 5 de los reactores PE2 y PU2 (CO de 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación), sin embargo, los flujos máxicos en los efluentes bajo esta condición fueron altos (Figura 4.28). En cambio, los menores flujos máxicos en los efluentes se consiguieron con CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación, pero al mismo tiempo, los flujos máxicos en los influentes fueron menores. Al comparar las dos alternativas de tratamiento (CO de 3 y 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> con 50 % de recirculación) para tratar el mismo flujo máxico de la CO de 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación, en los dos tipos de soporte se observó lo siguiente: el flujo máxico del ácido mefenámico en el efluente (CO de 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> con 50 % de recirculación) es casi 2.2-2.3 veces mayor que si se realiza el tratamiento del agua residual con una CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación, en el caso de la fluoxetina, el flujo máxico es de 3.3-3.8 veces mayor, mientras que el flujo máxico del metoprolol es casi 1.6 veces mayor que si se trabaja con la CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación. La principal diferencia entre los tratamientos es el tiempo de residencia hidráulica, por lo tanto, para evitar la contaminación por ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol, compuestos tóxicos para el ambiente acuático, la mejor alternativa de operación de los reactores con cintas de polietileno y cubos de poliuretano es la CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación, a pesar de que esto signifique mayores tiempos de residencia hidráulica.

Se alcanzaron mayores porcentajes de biodegradación en los reactores con cubos de poliuretano. La Figura 4.30 muestra una comparación de los porcentajes de biodegradación y sorción calculados en los dos soportes mediante el método 1. En las cintas de polietileno (reactor PE1; CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación) se obtuvo hasta 69.3 ± 7.7 % de biodegradación de ácido mefenámico, 92.5 ± 0.3 % de fluoxetina y 65.7 ± 1.5 % de biodegradación de metoprolol (Anexo 7.1). En los cubos de poliuretano (reactor PU1; CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación) se consiguió hasta 76.1 ± 6.8 % de biodegradación de ácido mefenámico, 93.8 ± 0.9 % de fluoxetina y 68.6 ± 5.2 % de biodegradación de metoprolol (Anexo 7.2). Así, los porcentajes de biodegradación de fluoxetina fueron superiores a los obtenidos con los demás fármacos. Los reactores con cintas de polietileno y cubos de poliuretano mostraron mayor biodegradación de metoprolol en comparación con el ácido mefenámico, con la excepción de la CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación en el reactor PE1 y PU1, además de la CO de 9 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> en el reactor PU2, donde la biodegradación de ácido mefenámico fue mayor.



**Figura 4.30.** Porcentajes de biodegradación y sorción en los reactores con biomasa inmovilizada (Método 1)

Los porcentajes de sorción fueron bajos en comparación con los porcentajes de biodegradación. El metoprolol fue el compuesto con el menor porcentaje de sorción en los dos tipos de soporte. Se tuvieron más altos porcentajes de sorción en las cintas de polietileno, hasta 1.4 % de sorción de ácido mefenámico, 1.5 % de fluoxetina y 0.6 % de sorción de metoprolol. En los cubos de poliuretano la sorción fue hasta 1 % de ácido mefenámico, 1.2 % de fluoxetina y 0.5 % de metoprolol.

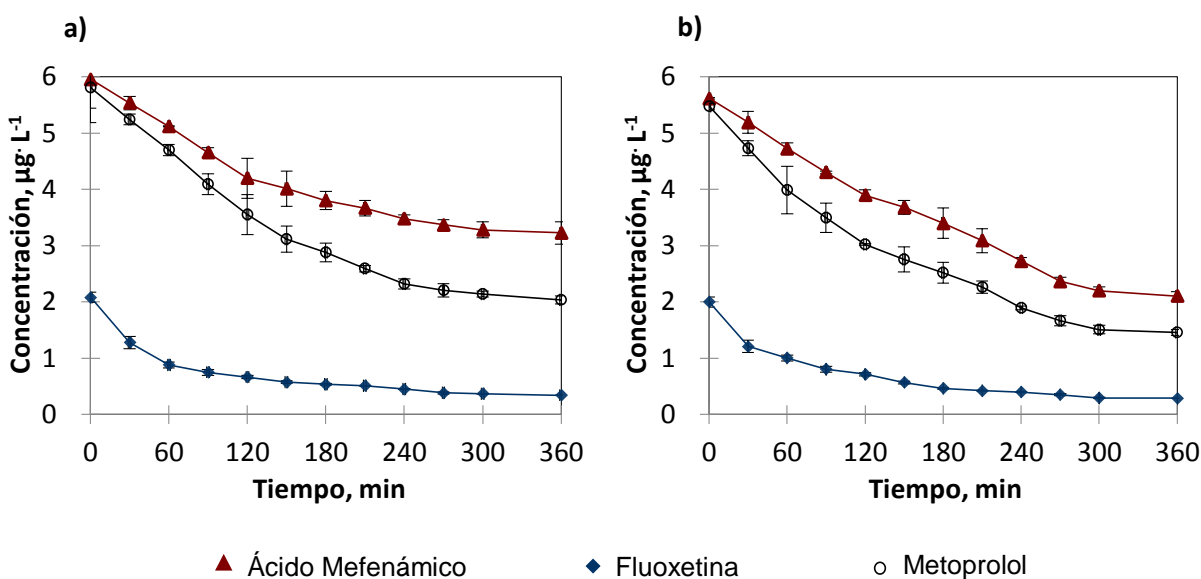
#### 4.5 CINÉTICAS DE REMOCIÓN DE LOS FÁRMACOS CON BIOMASA INMOVILIZADA EN EMPAQUES DE CINTA DE POLIETILENO Y CUBOS DE POLIURETANO

##### 4.5.1 Constantes de remoción

Las cinéticas de remoción con la biomasa inmovilizada se realizaron en reactores en lote con un volumen de trabajo de 14 L. Se utilizó la biomasa inmovilizada proveniente de los reactores PE1 (cintas de polietileno) y PU1 (cubos de poliuretano), los cuáles se encontraban trabajando con una carga orgánica de 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50% de recirculación del efluente. Los empaques fueron retirados en donde se estudiaron las diferentes fases experimentales y se colocaron en los nuevos reactores para el estudio de la cinética. Antes de empezar el experimento se tomaron muestras para la determinación de los SV, la cantidad de solidos volátiles en el reactor PE fue de 6.83 gSV·m<sup>-2</sup> (4.86 g·L<sup>-1</sup>) y en el reactor PU fue de 6.99 gSV·m<sup>-2</sup> (4.94 g·L<sup>-1</sup>). Los reactores se



llenaron con agua residual a la cual se le adicionaron los compuestos farmacéuticos en las mismas concentraciones a las cuales se realizó el estudio del desempeño de los cuatro reactores empacados operados en continuo, casi  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fluoxetina, casi  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido mefenámico y metoprolol. Para el seguimiento de la remoción se tomaron muestras cada 30 min durante 360 min. Las concentraciones de los fármacos, como promedio de las concentraciones en las dos muestras tomadas en cada tiempo, son presentadas en la Figura 4.31, donde se observa una disminución progresiva de las concentraciones de los fármacos en la fase líquida. La evolución de las concentraciones fue diferente para cada fármaco y para cada tipo de soporte. En el reactor PE se observó una disminución gradual del ácido mefenámico y metoprolol durante los primeros 240 min, a partir de los 270 min las concentraciones fueron casi constantes. En el reactor PU se observó una disminución gradual de ácido mefenámico y metoprolol hasta los 300 min. La fluoxetina presentó un decremento de su concentración durante los primeros 180 min en ambos tipos de soporte. Los porcentajes de remoción de los compuestos a través del tiempo, obtenidos en los reactores con los dos empaques, son presentados en la Figura 4.32. El compuesto que obtuvo los mayores porcentajes de remoción fue la fluoxetina, seguido del metoprolol y por último el ácido mefenámico. El reactor PU logró la mayor remoción de ácido mefenámico y metoprolol. El reactor PE obtuvo mayores porcentajes de remoción de fluoxetina durante los primeros 150 min, posteriormente hubo un cambio, de tal manera que al finalizar los 360 min, el reactor PU alcanzó la mayor remoción, sin embargo, la diferencia entre ambos soportes fue de tan solo 2 %, mientras que la diferencia en la remoción del ácido mefenámico y metoprolol fue de 16.7 y 8.4 % respectivamente. El Anexo 8.1 y 8.2 contiene los valores de las concentraciones en los duplicados y los porcentajes de remoción promedio en cada tiempo. Al finalizar los 360 min, la remoción del ácido mefenámico fue de 45.8 % en PE y 62.5 % en PU, la remoción de metoprolol fue de 65 y 73.4% respectivamente. Las remociones de fluoxetina fueron de casi 80 % en los dos reactores.



**Figura 4.31. Evolución de los fármacos en función del tiempo para la fase líquida en los dos soportes. a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano**

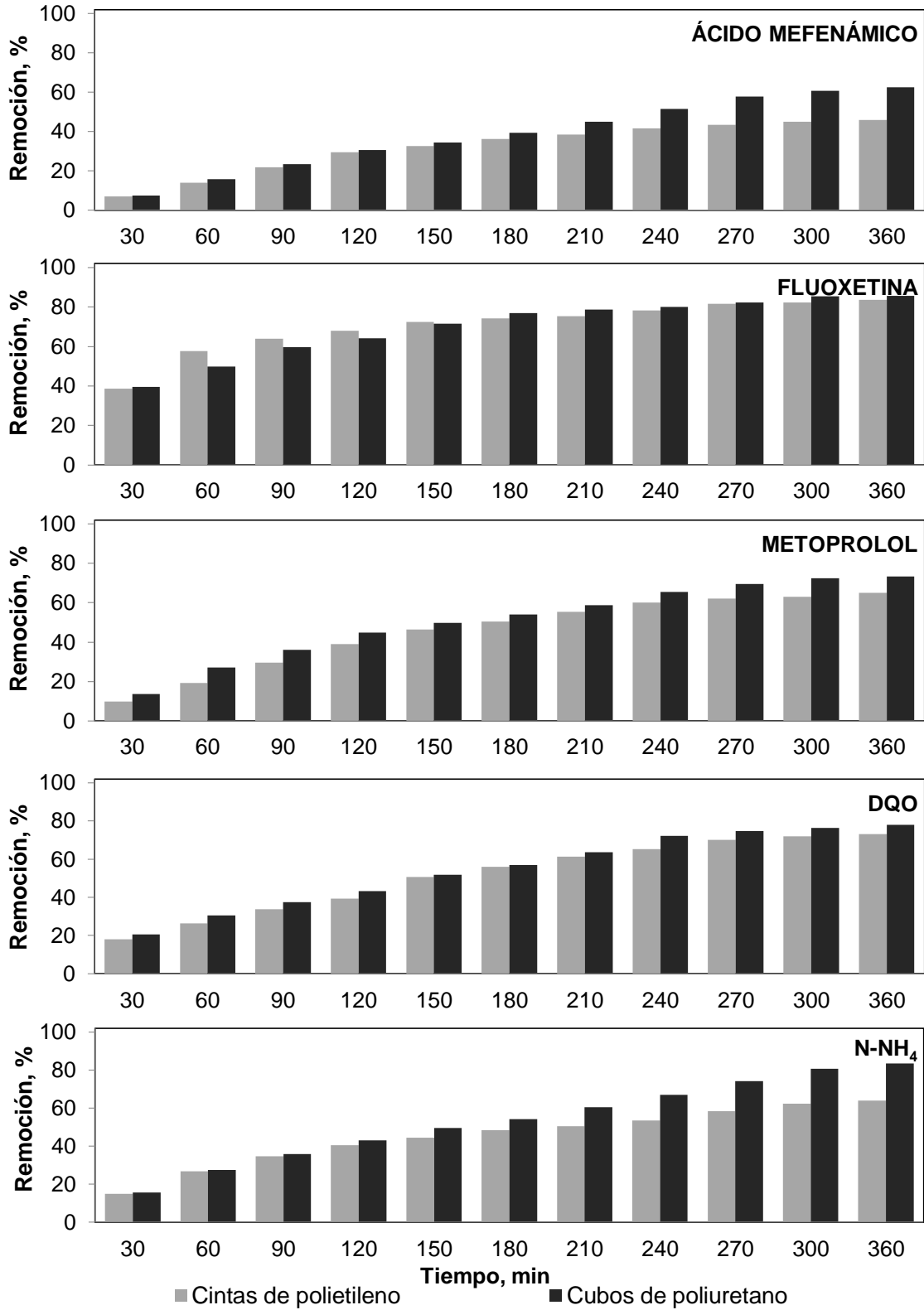


Figura 4.32. Remociones de los fármacos, DQO y N-NH<sub>4</sub> durante las cinéticas en los reactores con biomasa inmovilizada

Además del seguimiento a las concentraciones de los fármacos, se midieron las concentraciones de materia orgánica expresada como DQO y las concentraciones de N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> para verificar la actividad de la biomasa en los reactores. En el Anexo 8.3 también se encuentran los valores del seguimiento de la materia orgánica y nitrógeno a través del tiempo. El reactor PU obtuvo mayores remociones de DQO y N-NH<sub>4</sub> (Anexo 8.4), al finalizar la prueba la diferencia en la remoción de DQO entre los dos empaques fue del 5 %, mientras que la diferencia en la remoción de N-NH<sub>4</sub> fue de 19.5 % (Figura 4.32). Las remociones de materia orgánica a los 360 min fueron de 73.1 y 78.1 % en los reactores PE y PU respectivamente, las remociones de N-NH<sub>4</sub> fueron de 64 y 83.5 % respectivamente. La Figura 4.33 muestra las concentraciones de N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub>, ahí se observan las mayores concentraciones de N-NO<sub>3</sub> en el reactor PU, lo que confirma su mayor actividad nitrificante. La Figura 4.34 presenta las tasas de remoción de los fármacos y N-NH<sub>4</sub>. En los primeros 30 min, el compuesto que tuvo las mayores tasas de remoción fue la fluoxetina, seguido del metoprolol y por último el ácido mefenámico, después de ese tiempo el comportamiento fue diferente, debido a la menor cantidad de fluoxetina en los influentes, en los primeros 30 min se removió casi el 40 %, como consecuencia, sus tasas de remoción disminuyeron después de ese tiempo. Las más altas tasas de remoción del ácido mefenámico y metoprolol se tuvieron durante los primeros 120 min, cuando también se tuvieron las más altas tasas de remoción de N-NH<sub>4</sub> (Anexo 8.5).

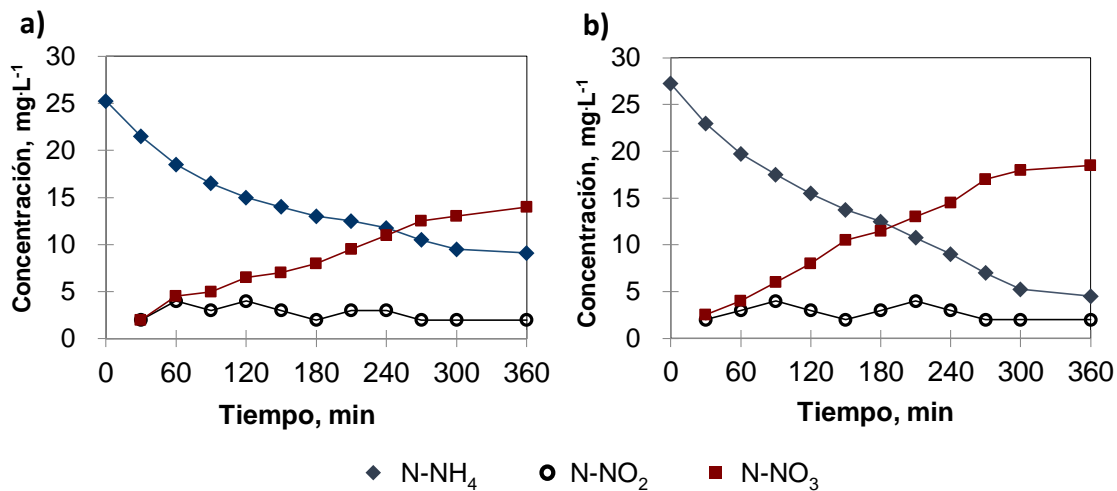
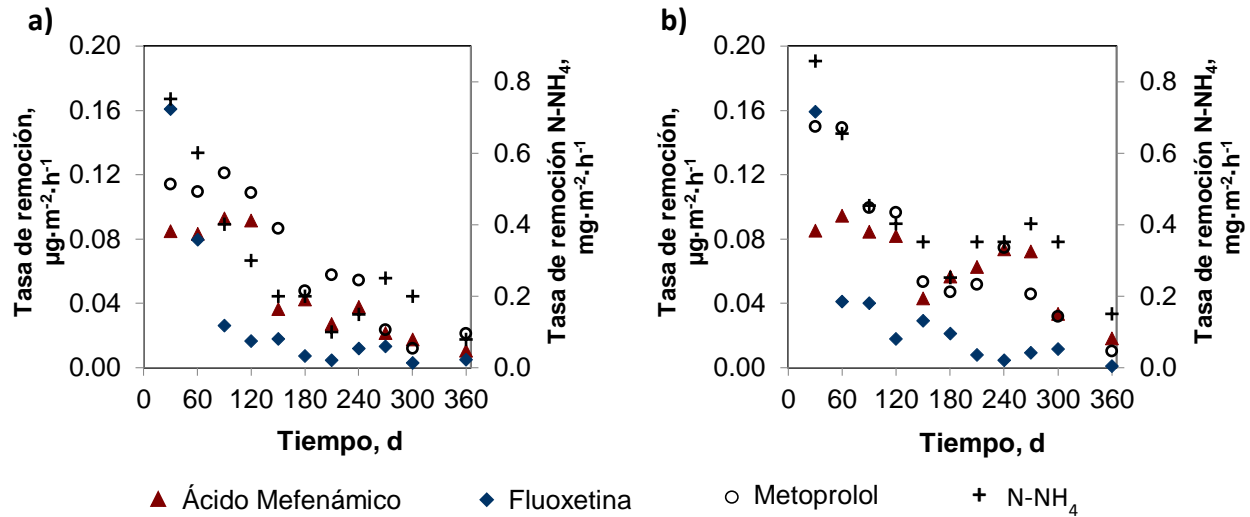
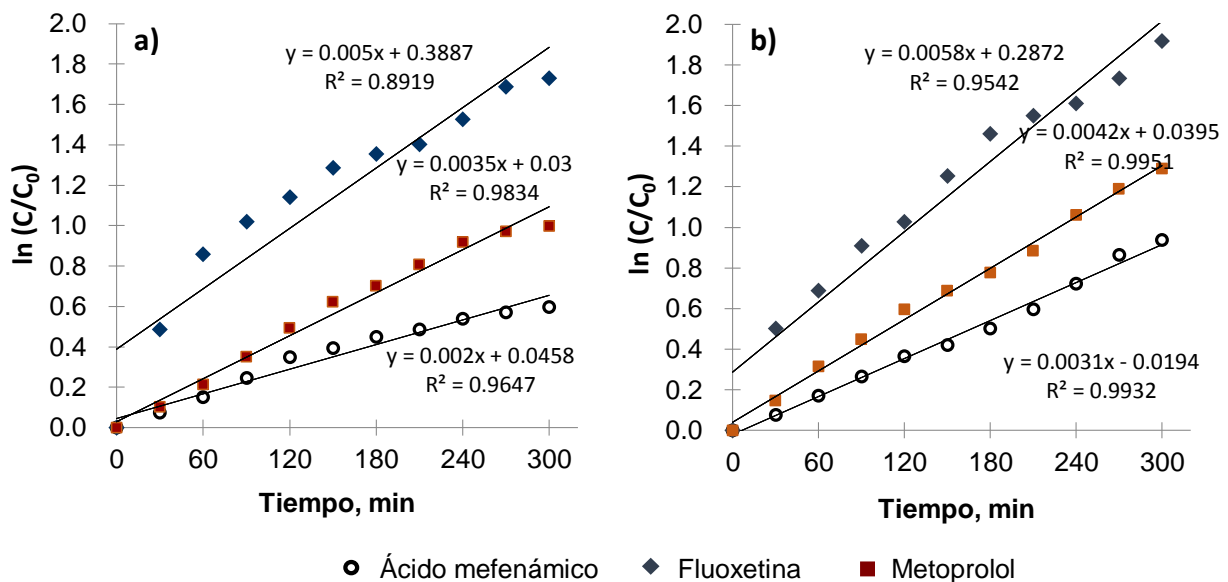


Figura 4.33. Seguimiento de nitrógeno en función del tiempo para la fase líquida en los dos soportes.  
 a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano



**Figura 4.34. Tasas de remoción de los fármacos con los diferentes tipos de soporte.**  
a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

Se hizo una regresión lineal para ajustar las cinéticas al modelo de pseudo primer orden (Figura 4.35). Se obtuvo un buen ajuste del modelo, los valores de  $R^2$  estuvieron en el intervalo de 0.89 y 0.99 en los dos soportes. Las constantes de remoción fueron obtenidas dividiendo la pendiente entre la concentración de SV, el resultado de la determinación de los sólidos volátiles fue de 4.857 gL<sup>-1</sup> en PE (6.827 gSV·m<sup>-2</sup>) y 4.943 gL<sup>-1</sup> en PU (6.99 gSV·m<sup>-2</sup>). Los resultados de las constantes de remoción para cada soporte son presentados en la Tabla 4.17. Las más altas constantes de remoción fueron obtenidas en el reactor con cubos de poliuretano. Las mayores constantes de remoción fueron determinadas para la fluoxetina, seguido del metoprolol y por último el ácido mefenámico.



**Figura 4.35. Modelo cinético de pseudo primer orden en los reactores con biomasa inmobilizada.** a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

**Tabla 4.17.** Constantes de remoción en los dos tipos de soporte

Compuesto	$k_{\text{biol}}$ (L·gSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )		$k_{\text{biol}}$ literatura (L·gSS <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )* (L·gSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )**
	PE	PU	
Ácido mefenámico	0.593	0.903	* 0.08 - 0.48 <sup>c</sup> * 3.9 - 5.3 <sup>d</sup> * 0.9 - 1.1 <sup>d</sup>
Fluoxetina	1.482	1.69	** 0.6-1.3 <sup>e</sup> , 9.0 <sup>b</sup> ** 1.12-1.77 <sup>f</sup>
Metoprolol	1.038	1.224	* 0.25 - 0.76 <sup>a, b</sup> * 0.25 - 0.31 <sup>d</sup> * 0.69 - 0.76 <sup>d</sup>

**Referencias:** <sup>a</sup> Wick *et al.*, 2009; <sup>b</sup> Suarez *et al.*, 2010; <sup>c</sup> Falås *et al.*, 2012; <sup>d</sup> Falås *et al.*, 2013; <sup>e</sup> Fernandez-Fontaina *et al.*, 2014; <sup>f</sup> Fernandez-Fontaina *et al.*, 2016.

Considerando la clasificación propuesta por Joss *et al.* (2006), los valores de  $k_{\text{biol}}$  obtenidos en los dos soportes para el ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol se encuentran en el intervalo de  $0.1 < k_{\text{biol}} < 10$  L·gSS<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, por lo que puede esperarse una remoción parcial por biodegradación (entre 20 y 90%), el grado de remoción será fuertemente dependiente de la configuración del reactor. Esto concuerda con las remociones en el intervalo de 45-85% obtenidas de los tres compuestos a los 360 min de la prueba, también corresponden al intervalo de remociones obtenidas durante toda la experimentación.

De acuerdo a la clasificación propuesta por Fernandez-Fontaina *et al.* (2016) la fluoxetina y el metoprolol pueden clasificarse como altamente degradables ( $k_{\text{biol}} > 1$  L·gSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), mientras que el ácido mefenámico puede considerarse moderadamente degradable ( $1 > k_{\text{biol}} > 0.5$  L·gSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). Es importante considerar que de acuerdo a Joss *et al.* (2005) y Luo *et al.* (2014) la sorción de fármacos debe ser cuantificada con base en la producción de nuevos biosólidos, los cuales son responsables de la remoción por sorción. Por otro lado, Joss *et al.* (2006) explicaron que la concentración de sólidos suspendidos puede asumirse constante para las pruebas en lote realizadas en corto tiempo, por lo tanto, en el cálculo de las constantes de remoción no se consideró la sorción debida a la generación de nuevos sólidos. Los valores de las constantes de remoción obtenidas para el ácido mefenámico y la fluoxetina se encuentran dentro del rango de los valores  $k_{\text{biol}}$  reportados en la literatura, mientras que los valores obtenidos para el metoprolol son más altos a los reportados previamente.

Falås *et al.* (2012) encontraron mayores constantes de remoción de ácido mefenámico en la biomasa inmovilizada en soportes tipo Kaldnes K1 y Biofilm Chip (0.08-0.48 L·g biomasa<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), en comparación con lodo activado nitrificante (0.01-0.06 L·g biomasa<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), a pesar de que la capacidad de nitrificación fue más baja para la biomasa inmovilizada, dichos valores son menores que los determinados en este estudio. Posteriormente Falås *et al.* (2013) reportaron mayores constantes de remoción de ácido mefenámico en biomasa inmovilizada en soportes Biofilm Chip (3.9-5.3 L·g biomasa<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), esto es 6-9 veces más alta que en el reactor PE y 4-6 veces mayor que en el reactor PU, la capacidad de nitrificación por unidad de biomasa en ese estudio fue más alta para la biomasa inmovilizada en comparación con la biomasa aerobia suspendida, donde las constantes fueron de 0.9-1.1 L·g biomasa<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, similares a las determinadas en los cubos de poliuretano, pero mayores a las determinadas en las cintas de polietileno. En contraste, en el mismo estudio se obtuvieron constantes de remoción de metoprolol mayores en la biomasa suspendida (0.69-0.76 L·g biomasa<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), en comparación con las constantes reportadas en la biomasa inmovilizada (0.25-0.31 L·g biomasa<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), estos valores son menores a los determinados

en este estudio en los dos soportes, igualmente los valores de las constantes del metoprolol reportados por Wick *et al.* (2009) fueron de 0.35-0.4 L·gSS<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, menores a los valores de este estudio. Suarez *et al.* (2010) obtuvieron  $k_{biol}$  de 9 L·gSS<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> para la fluoxetina en un reactor nitrificante, este valor es mucho mayor al determinado en ambos tipos de soporte, mientras que Fernandez-Fontaina *et al.* (2014) reportaron  $k_{biol}$  de 0.6 y 1.3 L·gSS<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> en reactores nitrificantes, después Fernandez-Fontaina *et al.* (2016) reportaron valores de  $k_{biol}$  para fluoxetina de 1.12-1.17 L·gSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> en condiciones nitrificantes, estos valores son más bajos que los obtenidos en este estudio, pero el valor de la constante de biodegradación en condiciones de remoción de materia orgánica (heterótrofas) fue mayor (1.77 L·gSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>).

## 4.6 DIVERSIDAD BACTERIANA EN LOS REACTORES CON BIOMASA INMOVILIZADA

### 4.6.1 Filos y clases

El filo es la subdivisión básica de las bacterias, los filos se dividen en clases, las clases se dividen en órdenes, los órdenes en familias, las familias en géneros y los géneros en especies (Tortora *et al.*, 2007). Los resultados de la secuenciación (Miseq de Illumina) proporcionados por *Research and Testing Laboratory's* fueron presentados mediante la herramienta de visualización Krona, ésta permite una exploración de las abundancias relativas dentro de las jerarquías taxonómicas, en el cuál se da click en cada subdivisión para mostrar desde el filo hasta el género de bacterias con sus porcentajes correspondientes. La Figura 4.36 presenta la visualización principal de la muestra del reactor PE1 cuando trabajó la CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> (PE 3).

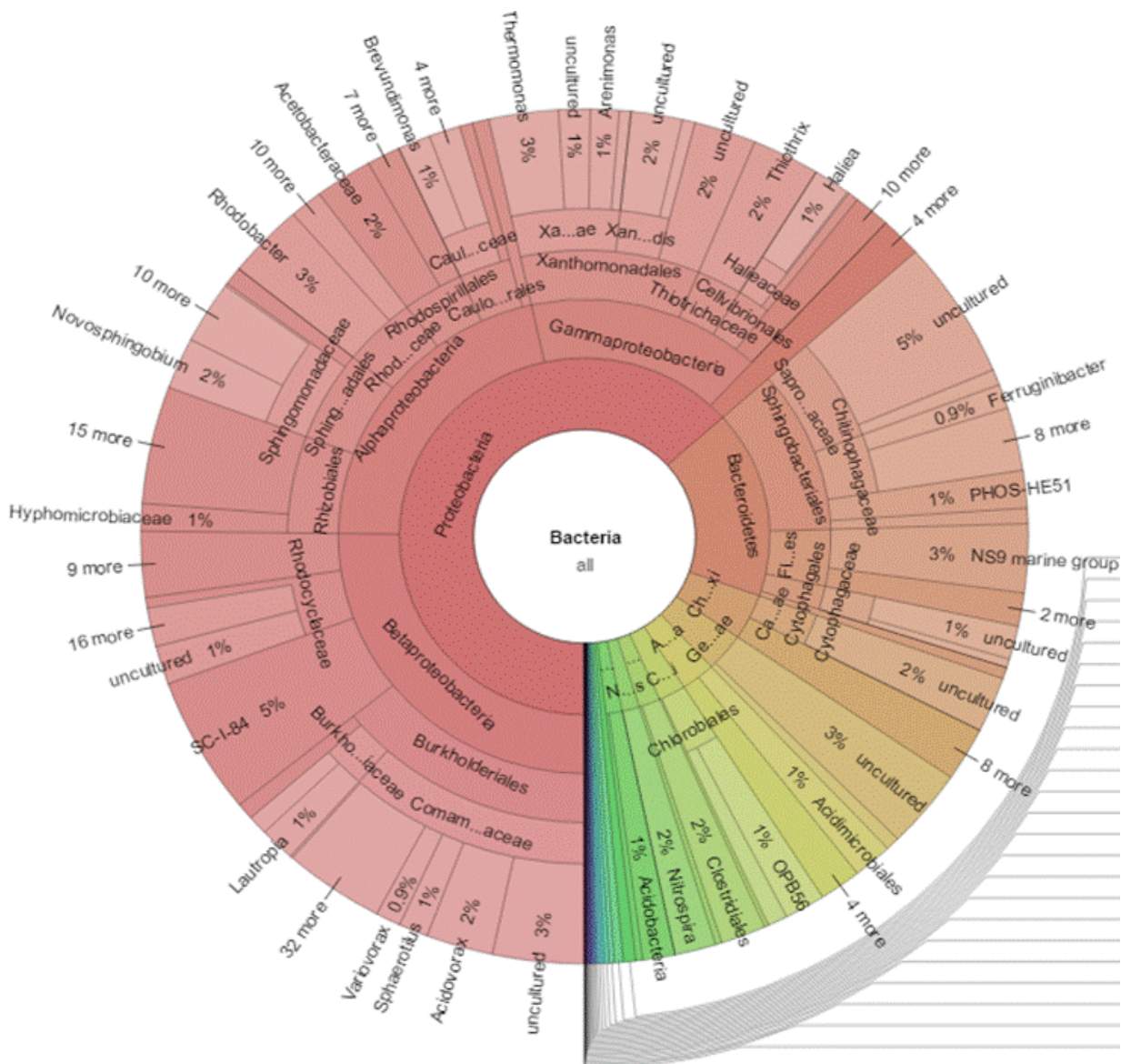
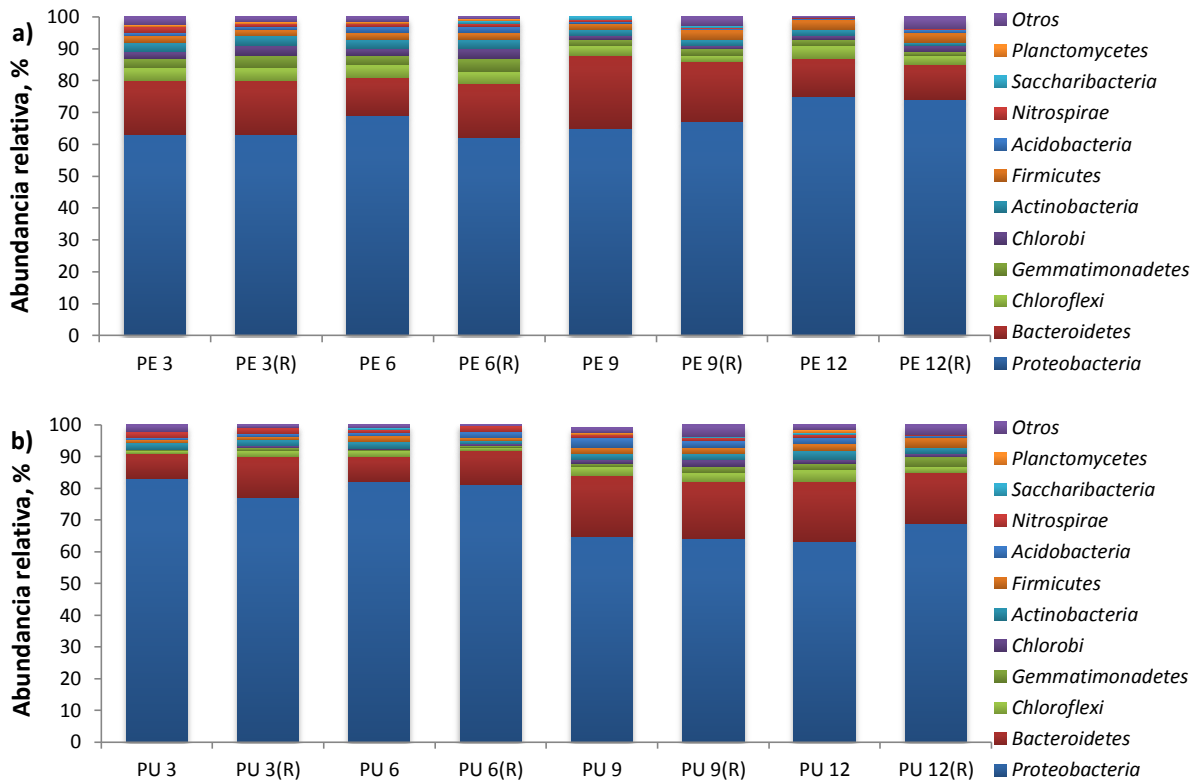


Figura 4.36. Visualización Krona. Reactor PE1 (CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>).

De acuerdo con los resultados de la secuenciación, once diferentes filos comprendieron más del 96 % de las bacterias en los cuatro reactores (*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Chlorobi*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Nitrospirae*, *Saccharibacteria*, *Planctomycetes*). La Figura 4.37 muestra los porcentajes de abundancia relativa de los filos. El filo con la mayor abundancia relativa fue *Proteobacteria*, abarcó el 62-75 % en la biomasa de las cintas de polietileno (su abundancia fue mayor con el aumento de la carga orgánica) y 63-83 % en la biomasa de los cubos de poliuretano (su abundancia fue menor con el aumento de la carga orgánica). El siguiente filo fue *Bacteroidetes*, su abundancia fue de 12-23 %

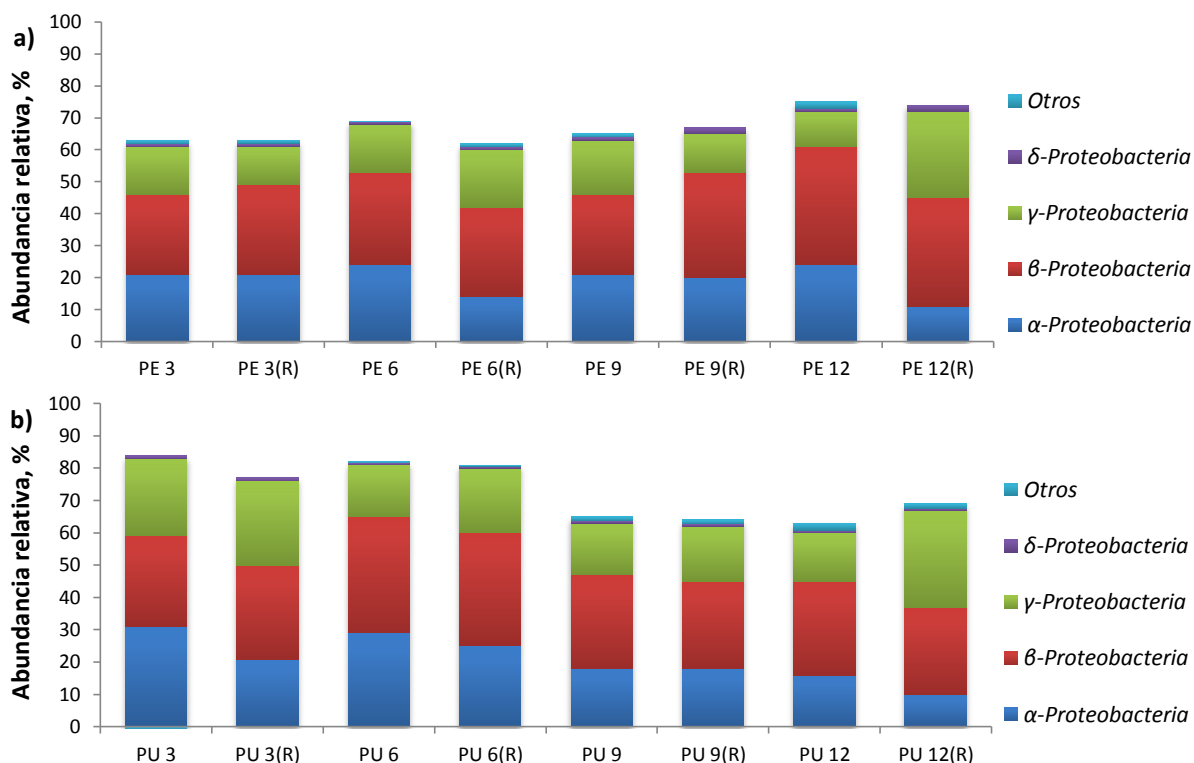
en las cintas (PE) y 8-19 % en los cubos (PU). *Proteobacteria* seguido de *Bacteroidetes* también han sido reportados previamente como los filos dominantes en plantas de tratamiento de aguas residuales (Ma *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). *Proteobacteria* es el filo de bacterias más diverso, con la mayor variabilidad morfológica y metabólica, incluye desde bacterias fotolitoautótrofas, quimioheterótrofas y quimiolitoautótrofas, pueden ser aerobias o anaerobias (Kratz, 2005). El filo *Bacteroidetes* incluye bacterias heterótrofas aerobias y anaerobias (Thomas *et al.*, 2011). Los subgrupos filogenéticos usan las letras griegas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ , la clase de *Proteobacteria* más abundante fue  $\beta$ -*Proteobacteria* (25-37 % en PE y 27-36 % en PU), los porcentajes de  $\alpha$ -*Proteobacteria* y  $\gamma$ -*Proteobacteria* estuvieron entre el 11-27 % en PE y 10-30 % en PU (Figura 4.38).



**Figura 4.37. Distribución de los filos de bacterias.**

a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano



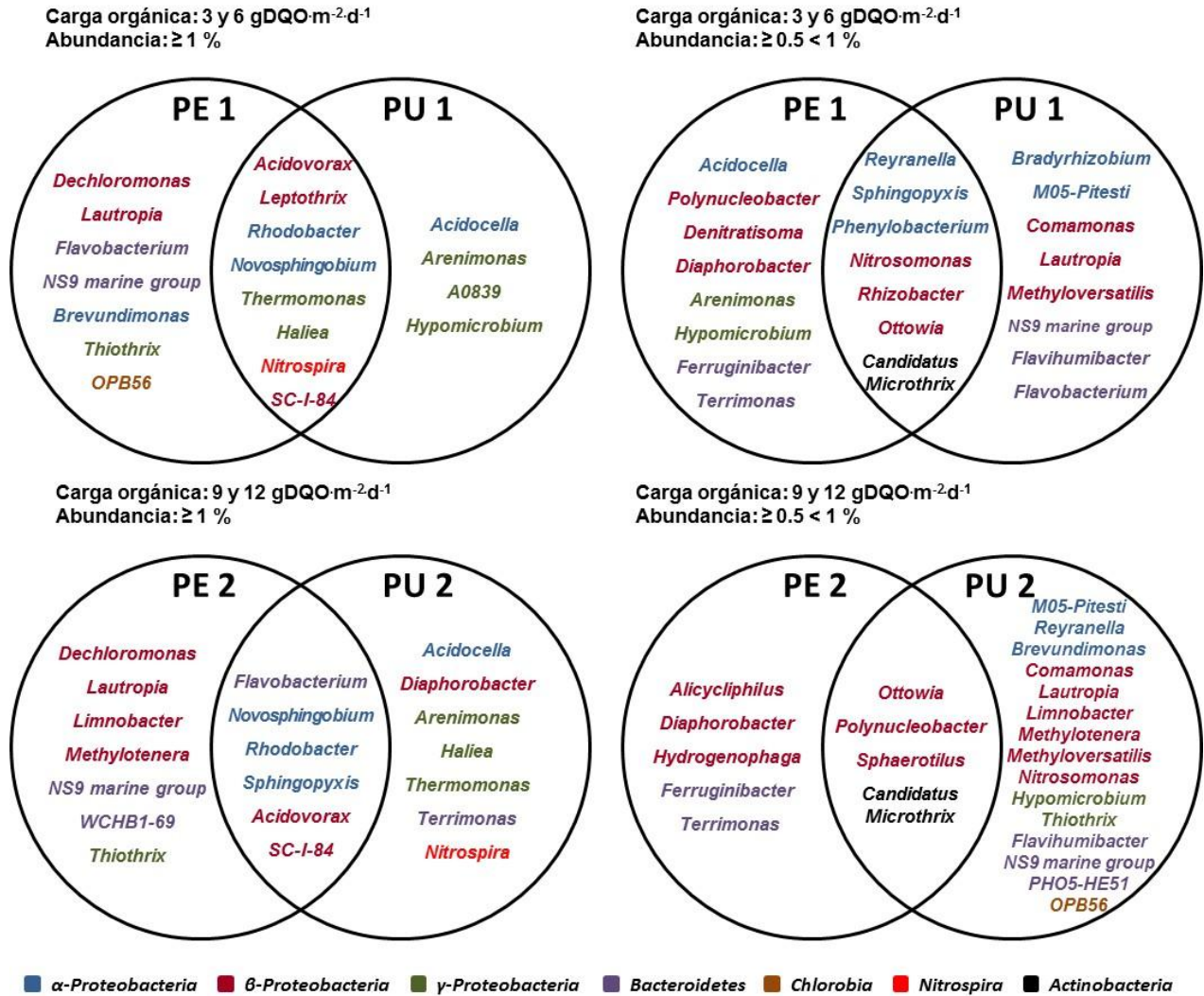


**Figura 4.38. Distribución de las clases de bacterias.**  
a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

#### 4.6.2 Géneros de las bacterias más abundantes

Las bacterias crecen en presencia o ausencia de oxígeno molecular, pueden clasificarse en aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias. Las aerobias requieren oxígeno para la degradación del sustrato, por el contrario, las bacterias anaerobias no usan oxígeno molecular para la degradación de sustratos, entre las aerobias y anaerobias están las anaerobias facultativas o desnitrificantes, éstas tienen la habilidad de usar oxígeno libre molecular u otra molécula como nitrato o nitrito para degradar sustratos, sin embargo, prefieren oxígeno a otras moléculas como nitratos. Las enzimas necesarias para el uso de nitrato o nitrito son formadas rápidamente bajo condiciones anóxicas o de baja concentración de oxígeno disuelto. En el caso de las bacterias anaerobias, existen las tolerantes de oxígeno (aerotolerantes), éstas pueden sobrevivir en presencia de oxígeno molecular libre, en cambio las intolerantes de oxígeno (anaerobias obligadas) mueren en presencia de oxígeno molecular libre, debido al superóxido y peróxido de hidrógeno formados cuando el oxígeno entra a la célula bacteriana (Gerardi, 2006).

Los resultados demostraron que las comunidades bacterianas en las cintas de polietileno y en los cubos de poliuretano tuvieron diferencias. Todos los géneros que se presentan en este estudio fueron encontrados en ambos tipos de soporte, sin embargo, los porcentajes de abundancia relativa fueron distintos para cada soporte y condición de operación de los reactores. En la Figura 4.39 se muestran diagramas de Venn con los géneros más abundantes ( $\geq 0.5\%$ ) en los dos soportes, se aprecian los géneros de bacterias en común y los cambios en las abundancias relativas a las distintas cargas orgánicas. Los géneros con una abundancia  $\geq 1\%$  fueron considerados como dominantes.



**Figura 4.39. Diagramas de Venn de los diferentes géneros de bacterias más abundantes (≥0.5 %).**  
 PE1. Reactor 1 cintas de polietileno; PE2. Reactor 2 cintas de polietileno  
 PU1. Reactor 1 cubos de poliuretano; PU2. Reactor 2 cubos de poliuretano

En los dos tipos de soporte se encontraron varios géneros dominantes de bacterias que pueden desarrollarse bajo condiciones aerobias, anóxicas y anaerobias. Esto indicó que a pesar de la concentración de OD mayor a 3 mg·L<sup>-1</sup> en el líquido y la superficie relativamente lisa de las cintas de polietileno, su distribución propició la existencia de zonas anóxicas y anaerobias. En el caso de los cubos de poliuretano es sabido que la biomasa es inmovilizada tanto en la superficie externa, como en el interior de los poros que proporcionan interespacios en los cuales los microorganismos pueden crecer, un gradiente distintivo de oxígeno disuelto ocurre hacia el interior de los cubos, resultando en condiciones anóxicas y anaerobias en la parte profunda del cubo, posibilitando la nitrificación y desnitrificación simultánea (Guo *et al.*, 2010; Quan *et al.*, 2012). A continuación se describen las principales características de los géneros de bacterias más abundantes.

### 4.6.3 Características de los principales géneros

#### ***α-Proteobacteria***

Las bacterias del género ***Acidocella*** son heterótrofas acidófilas que crecen en medios aerobios, también catalizan la reducción de hierro férrico bajo condiciones micro-aerobias o anaerobias (Jones *et al.*, 2013). Este género fue más abundante en PU ( $\geq 1$  %) en comparación con PE (0.2-0.7 %), no se observó relación con el aumento de la carga orgánica y la recirculación. La Figura 4.40 presenta la abundancia de los géneros pertenecientes a la clase *α-Proteobacteria* en todas las condiciones de operación de cada soporte.

***Bradyrhizobium*** es un género que incluye bacterias aerobias o fijadoras de nitrógeno en condiciones de baja concentración de oxígeno (Surpin y Maier, 1998; Tsukuda *et al.*, 2015). No se encontró relación de su abundancia relativa con los diferentes soportes y cargas orgánicas.

***Brevundimonas*** contiene bacterias aerobias que poseen sitios potenciales de sorción (Resmi *et al.*, 2010a; Singh y Gadi, 2012), estas bacterias pueden actuar como un biosorbente para la remoción de plomo del agua residual (Resmi *et al.*, 2010b). Estuvo presente en mayor abundancia relativa ( $\geq 1$  %) en las cintas de polietileno al trabajar con CO de  $3 \text{ gDQO} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ .

***Halomonas*** comprende bacterias heterótrofas que pueden ser aerobias o anaerobias facultativas como desnitrificantes, su desempeño se incrementa con la alta salinidad (Ventosa *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2016). Su abundancia relativa estuvo entre 0.2-1 % en PE y 0.2-0.5 % en PU.

***Mesorhizobium*** es un género de bacterias aerobias Gram-negativas, pueden llevar a cabo la desnitrificación bajo condiciones aerobias (Okada *et al.*, 2005; Nandasena *et al.*, 2013). No hubo relación de su abundancia con el tipo de soporte.

***Nitratireductor*** posee la habilidad de convertir nitrato a nitrito pero no es capaz de reducir nitrito a nitrógeno (Singh *et al.*, 2012). Su abundancia fue baja en los dos tipos de soportes ( $\leq 0.1\%$ ).

Las bacterias del género ***Novosphingobium*** son aerobias heterótrofas, son conocidas por incluir especies que pueden realizar la biodegradación de compuestos aromáticos como el  $17\beta$ -estradiol (Fujii *et al.*, 2002). Fueron encontradas en ambos soportes durante las cuatro cargas orgánicas en porcentajes  $\geq 1$  %, su abundancia relativa fue mayor en las cintas de polietileno (2-9 %).

***Phenylobacterium*** abarca bacterias heterótrofas Gram-negativas, aerobias o facultativas, degradadoras de compuestos xenobióticos (Chu *et al.*, 2015; Sinha *et al.*, 2017). Su abundancia fue mayor al trabajar con cargas orgánicas bajas en los dos soportes (0.1-3 %).

***Reyranella*** son Gram-negativas y microaerófilas, crecen aerobicamente a temperaturas en el intervalo de 15-35 °C y pH de 4.0-9.0 (Lee y Whang, 2014). Se encontraron en ambos soportes, principalmente cuando se trabajó con carga orgánica baja (0.2-1 %).

***Rhodobacter*** comprende bacterias desnitrificantes y fotótrofas anoxigénicas (Hiraishi *et al.*, 1995). Estuvieron presentes en los dos soportes en porcentajes de abundancia  $\geq 1$  % durante las cuatro cargas orgánicas, su abundancia fue mayor en las cintas de polietileno.

***Sphingomonas*** incluye bacterias quimioheterótrofas y estrictamente aerobias (Takeuchi *et al.*, 2001). Estuvieron presentes con mayor abundancia relativa en las cintas de polietileno (0.2-0.8 %).

***Sphingopyxis*** contiene bacterias estrictamente aerobias y quimiorganotróficas (Takeuchi *et al.*, 2001). Fueron encontradas en ambos tipos de empaque en abundancias de  $0.5 \leq 1$  %.

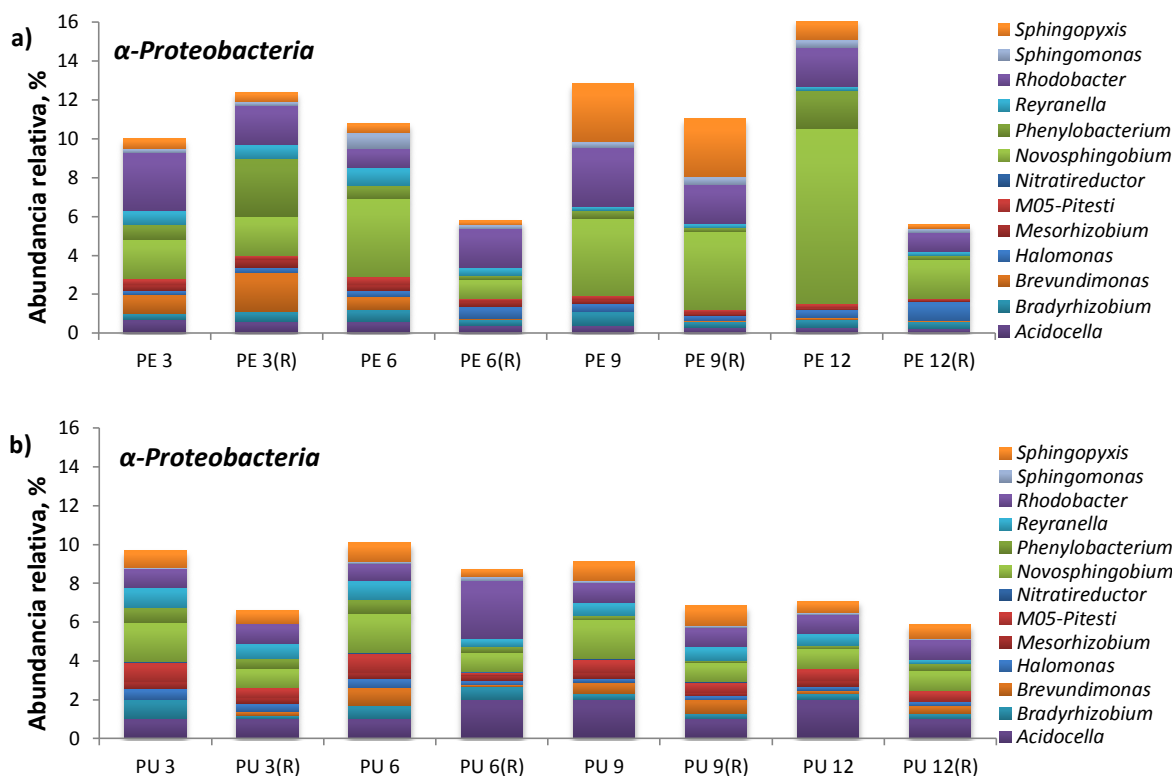


Figura 4.40. Porcentajes de los géneros más abundantes de  $\alpha$ -Proteobacteria.

a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

### $\beta$ -Proteobacterias

**Acidovorax** es un género de bacterias anaerobias facultativas, pueden realizar la oxidación de hierro y la reducción de nitratos, nitritos y óxido nitroso (Byrne-Bailey *et al.*, 2010; Hedrich *et al.*, 2011), este género contiene especies capaces de degradar esteroides (Haig *et al.*, 2016). Fueron encontradas en altos porcentajes  $\geq 1$  % en ambos soportes durante la evaluación de las cuatro cargas orgánicas estudiadas, aun así su abundancia relativa fue mayor en la biomasa de las cintas de polietileno al trabajar con cargas orgánicas altas (9 y 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>), presentando abundancias de 4-6 %. Las abundancias de los géneros de la clase  $\beta$ -Proteobacteria en todas las condiciones de operación de cada soporte se encuentran en la Figura 4.41.

**Alicyciphilus** contiene bacterias que usan oxígeno, cloratos y nitratos como aceptores de electrones para crecimiento bajo condiciones aerobias y anaerobias desnitrificantes. Estas bacterias han sido observadas en reactores de biopelícula de lecho fijo (Guan *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2016). Se encontraron en ambos materiales de soporte con abundancias relativas de 0.007-2 %.

El género **Comamonas** puede proliferar tanto en condiciones aerobias como anóxicas, son heterótrofas capaces de usar oxígeno y nitratos simultáneamente como aceptores de electrones, producen nitrógeno molecular sin acumular nitritos, es decir, son desnitrificantes así como nitrificantes bajo diversas condiciones de aeración, además son degradadoras de compuestos aromáticos, su existencia puede estar relacionada con altas concentraciones de nitrógeno amoniacal (Ma *et al.*, 2015). Se encontraron en un mayor porcentaje en los cubos de poliuretano (0.2-2 %), en comparación a 0.1-0.5 % en las cintas de polietileno.

**Dechloromonas** incluye bacterias oxidantes de hierro dependientes de nitratos, usan oxígeno, cloratos y nitratos como aceptores de electrones para crecimiento bajo condiciones aerobias y

condiciones anaerobias desnitrificantes. Estas bacterias han sido encontradas en reactores de biopelícula de lecho fijo (Hedrich *et al.*, 2011; Guan *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2016). Se presentaron en mayor abundancia relativa (>0.5 %) en las cintas de polietileno.

Las bacterias del género **Denitratisoma** reducen nitratos, *Denitratisoma oestradiolicum* también es capaz de utilizar estradiol (Fahrbach *et al.*, 2006), estas fueron encontradas en mayor abundancia en los cubos de poliuretano.

**Diaphorobacter** contiene bacterias aerobias y quimiorganótrofas, usan oxígeno como aceptor terminal de electrones, también es posible el crecimiento bajo condiciones anaerobias y anóxicas con nitrato como aceptor de electrones (Khan y Hiraishi, 2002). No se encontró relación de su abundancia relativa con el tipo de soporte y las cargas orgánicas.

**Hydrogenophaga** son bacterias aerobias facultativas (Chung *et al.*, 2007). Su abundancia relativa fue >0.5 % en las cintas de polietileno cuando se trabajó con carga orgánica alta.

**Lautropia** es un género de bacterias anaerobias, capaces de reducir nitratos y nitritos (Smidt *et al.*, 1994). Los porcentajes fueron mayores en las cintas de polietileno ( $\geq 1$  %) bajo las cuatro cargas orgánicas, en comparación a los cubos de poliuretano (<0.7 %).

**Leptothrix** incluye bacterias aerobias heterótrofas y filamentosas que pueden acumular hierro férrico en su estructura (Hedrich *et al.*, 2011). Se encontraron en mayor abundancia relativa en los reactores PU ( $\geq 1$  %) y con CO baja (3 y 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>), sus porcentajes en las cintas bajo estas condiciones fueron de 0.3-2 %.

**Limnobacter** son bacterias heterótrofas aerobias oxidantes de tiosulfato (Sutton *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2016). Los porcentajes de abundancia fueron mayores al trabajar con cargas orgánicas altas (9 y 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>), 1 % en las cintas de polietileno y 0.2-0.7 % en los cubos de poliuretano.

**Methylothera** contiene bacterias desnitrificantes y por lo tanto pueden encontrarse a bajas concentraciones de oxígeno (Hernandez *et al.*, 2014). Estuvieron presentes en las cintas de polietileno en porcentajes de abundancia relativa de 3 % al trabajar la mayor CO (12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>), en esta condición el porcentaje en los cubos de poliuretano fue de 0.6 %. Su abundancia fue menor con cargas orgánicas bajas.

**Methyloversatilis** reduce nitrato a nitrito en condiciones anóxicas (Mustakhimov *et al.*, 2013). No se observó relación de su abundancia con el tipo de soporte y la carga orgánica.

**Ottowia** son bacterias de crecimiento facultativo, anaerobio o anóxico en presencia de nitratos, han sido encontradas en lodos activados (Spring *et al.*, 2004). Su abundancia fue similar en ambos empaques en las cuatro cargas orgánicas (0.5≤1 %).

**Polynucleobacter** comprende bacterias heterótrofas, aerobias y Gram-negativas, pueden ser de vida libre o endosimbióticas, se encuentran en agua dulce (Meincke *et al.*, 2012). Estuvieron presentes en ambos soportes, no se encontró relación con la carga orgánica.

**Rhizobacter** es un género de bacterias aerobias Gram- negativas (Wei *et al.*, 2015), encontradas en mayor porcentaje en las cintas de polietileno (0.4-0.9 %) al trabajar cargas orgánicas bajas (3 y 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>).

**Rubrivivax** abarca bacterias facultativas y fototróficas, pueden crecer bajo condiciones aerobias en la oscuridad (Steunou *et al.*, 2004). Su abundancia fue ≤0.1% en ambos soportes.

**SC-I-84** fue el género más abundante en los dos tipos de soporte, son bacterias que han sido encontradas en condiciones aerobias y anóxicas (Guadie *et al.*, 2014; Phan *et al.*, 2016). Los mayores porcentajes de abundancia relativa fueron encontrados en los cubos de poliuretano (2-11 %), su abundancia disminuyó al aplicar la recirculación. En las cintas de polietileno sus porcentajes estuvieron entre el 1-6 %.

**Sphaerotilus** contiene bacterias heterótrofas, filamentosas y anaerobias facultativas, acoplan la oxidación de hierro y la reducción de nitratos en ambientes anaerobios (Hedrich *et al.*, 2011). Su abundancia en ambos tipos de empaque estuvo entre 0.2-1 %.

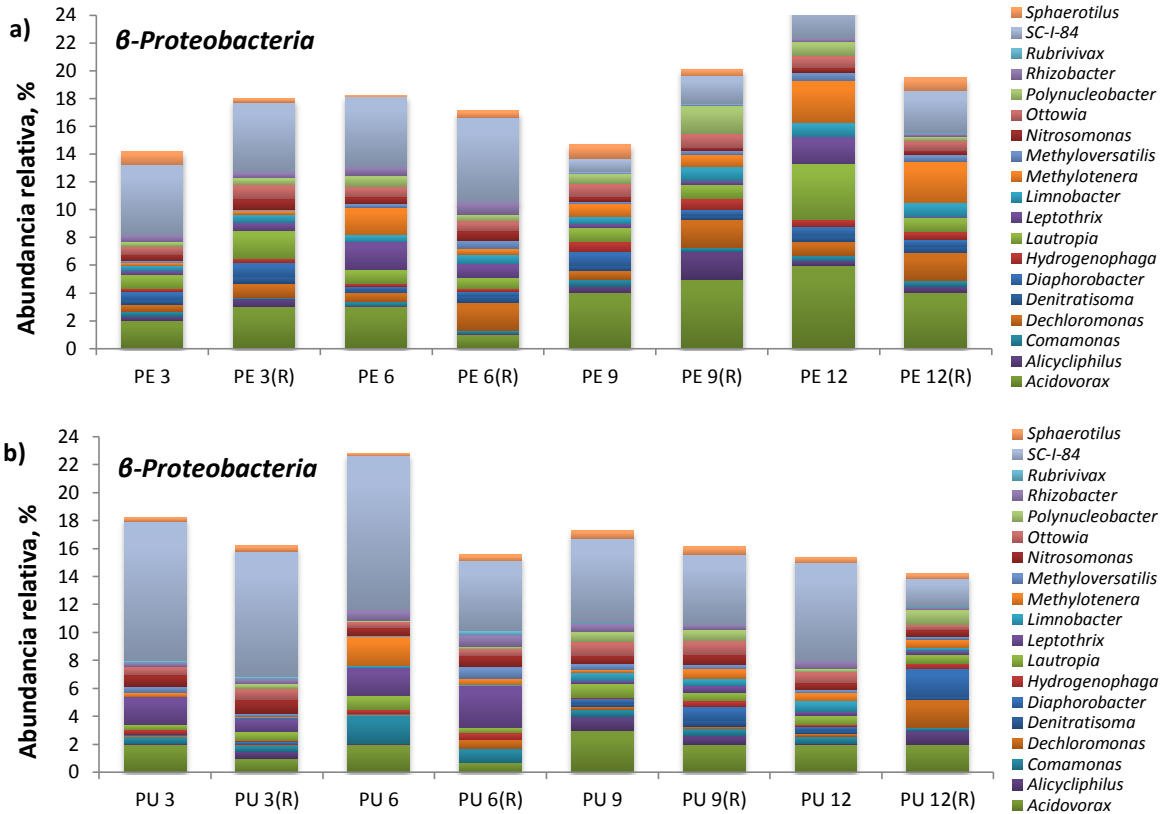


Figura 4.41. Porcentajes de los géneros más abundantes de  $\beta$ -Proteobacteria.  
a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

### $\gamma$ -Proteobacterias

**Acidibacter** incluye bacterias heterótrofas que crecen bajo condiciones microaerobias, anoxicas o anaerobias (Falagán y Johnson, 2014). No se encontró relación de su abundancia con el tipo de empaque y carga orgánica. En la Figura 4.42 se muestra la abundancia de los géneros de la clase  $\gamma$ -Proteobacteria en todas las condiciones de operación de cada soporte.

**Acinetobacter** comprende bacterias Gram-negativas, pueden ser aerobias, también contienen especies desnitrificantes, anaerobias facultativas, usan nitrato o nitrito bajo condiciones anóxicas o baja concentración de OD (Gerardi, 2006). Su abundancia fue mayor en las cintas de polietileno (0.1-0.3 %).

**Aquimonas** contiene bacterias Gram-negativas, estrictamente aerobias (Saha *et al.*, 2005). Se encontraron en ambos empaques en el intervalo de 0.01-0.8 %.

**Arenimonas** son bacterias heterótrofas que muestran un metabolismo aerobio, degradan carbono orgánico (WEF, 2010). Se presentaron en porcentajes  $\geq 1$  % en los cubos de poliuretano con todas las cargas orgánicas. En las cintas 0.03-1 % con cargas orgánicas bajas (3 y 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>).

Las bacterias del género **Haliea** son aerobias heterótrofas y requieren NaCl para crecimiento, degradan varios polímeros y muestran preferencia por ácidos orgánicos y aminoácidos sobre carbohidratos como fuente de carbono y energía (Liem, 2014). Sus abundancias fueron  $\geq 1$  % en

los reactores PU bajo todas las cargas orgánicas, en los reactores PE las abundancias fueron  $\geq 1\%$  con cargas orgánicas de 3 y 6  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ .

*Hypomicrobium* contiene bacterias heterótrofas desnitrificantes, su presencia se favorece por las condiciones anóxicas (Lemmer *et al.*, 1997; Gerardi, 2006). Estuvieron presentes en mayor porcentaje ( $\geq 1\%$ ) en el reactor PU1 (CO de 3 y 6  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ), con altas cargas orgánicas su porcentaje disminuyó, en los reactores PE se encontraron también en mayores porcentajes (0.6-1 %) al trabajar con cargas orgánicas bajas.

Las *Pseudomonas* son quimioheterótrofas y pueden usar  $\text{H}_2$  como donador de electrones para la desnitrificación (Hao *et al.*, 2016), pueden ser aerobias, anaerobias facultativas, algunas especies son capaces de usar nitrato y nitrito bajo condiciones anóxicas o baja concentración de OD (Gerardi, 2006). Su abundancia fue baja en ambos tipos de soportes ( $\leq 0.3\%$ ).

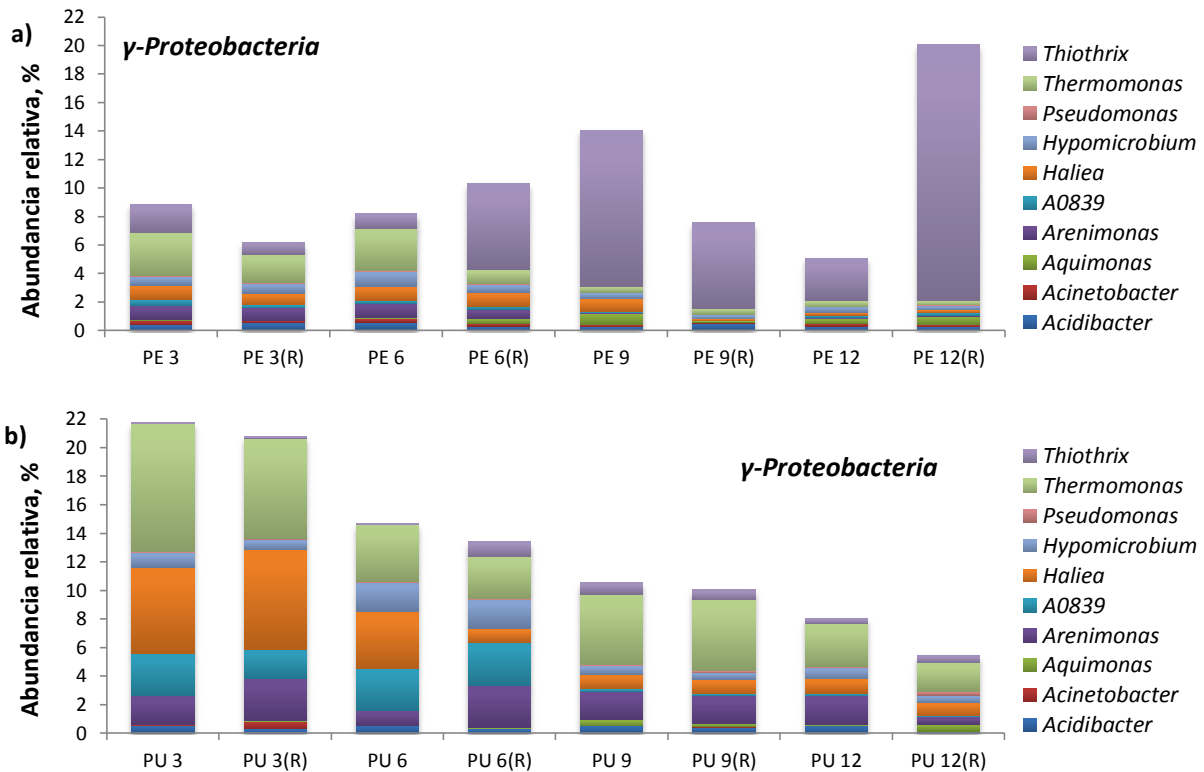


Figura 4.42. Porcentajes de los géneros más abundantes de  $\gamma$ -Proteobacteria.

a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

Las bacterias del género *Thermomonas* se encuentra con frecuencia cercanas a las bacterias nitrificantes, aunque también pueden crecer lejos ellas, son bacterias anaerobias y oxidantes de hierro. Las *Thermomonas* no son organismos específicos que actúan en simbiosis con las bacterias nitrificantes, sino que son heterótrofos que ocasionalmente toman productos orgánicos solubles excretados por las bacterias nitrificantes, o sustratos liberados por el decaimiento de la biomasa nitrificante, o sustancias poliméricas extracelulares que rodean las microcolonias de las bacterias nitrificantes (Yu *et al.*, 2007; Hedrich *et al.*, 2011; Dolinšek *et al.*, 2013). Las *Thermomonas* se encontraron en mayor porcentaje en los cubos de poliuretano, donde hubo una mayor actividad de remoción de nitrógeno amoniacal. La mayor abundancia en PU se encontró al trabajar con CO de 3  $\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  (9 y 7 % sin y con recirculación, respectivamente), mientras que en PE hubo 3 y 2 % sin y con recirculación, respectivamente. De acuerdo a lo anterior, su

menor porcentaje en las cintas de polietileno puede deberse a la menor abundancia de *Nitrosomonas* en la biomasa de este empaque.

**Thiothrix** es un género de bacterias que se caracteriza por un crecimiento filamentoso, algunas especies han sido reportadas como aerobias, no fermentativas y capaces de crecer heterotróficamente, otras especies son mixotróficas o pueden crecer autotróficamente, usan compuestos de azufre reducido como fuente de energía, pueden estar presentes en agua residual séptica y proliferar cuando hay productos de la fermentación (Rossetti *et al.*, 2003; Gerardi, 2006; Metcalf y Eddy, 2014). Estuvieron presentes en las cintas de polietileno con abundancias relativas de 3-18 % cuando se trabajaron cargas orgánicas altas, mientras que en los cubos de poliuretano fueron de tan solo 0.4-0.8 %.

### **Bacteroidetes**

**Ferruginibacter** comprende bacterias estrictamente aerobias, no filamentosas (Lim *et al.*, 2009). Su abundancia fue mayor en los cubos de poliuretano (1-4 %) al trabajar con cargas orgánicas altas, a diferencia del 0.5-0.7 % en las cintas de polietileno. La Figura 4.43 presenta los porcentajes de los géneros más abundantes de diversas clases.

**Flaviumibacter** contiene bacterias aerobias (Oh *et al.*, 2016), estuvieron presentes en mayor abundancia en los cubos de poliuretano (0.5-4 %), los porcentajes en las cintas de polietileno fueron de 0.003-0.6 %.

**Flavobacterium** incluye especies con potencial desnitrificante, son bacterias anaerobias facultativas (Gerardi, 2002). Su abundancia fue mayor en las cintas PE cuando se trabajó con CO baja, por el contrario, su abundancia fue mayor en los cubos PU cuando se trabajó con CO alta.

**NS9 marine group** es un género de bacterias aerobias (Baatar *et al.*, 2016). Su abundancia fue mayor en las cintas de polietileno.

**Terrimonas** incluye bacterias estrictamente aerobias, no filamentosas (Zhang *et al.*, 2012). No se encontró relación entre su abundancia con el tipo de soporte y la carga orgánica.

Las **WCHB-1** son bacterias reductoras de hierro (Livermore *et al.*, 2013) con mayor presencia en las cintas de polietileno al trabajar cargas orgánicas altas (1-2 %).

### **Chlorobi**

Las bacterias verdes del azufre o **Chlorobia** constituyen un pequeño grupo de bacterias que realizan la fotosíntesis anoxigénica. Son fotolitoautótrofas obligadas que usan sulfuro de hidrógeno o azufre como donantes de electrones (Hiras *et al.*, 2016). Dentro de esta clase, **OPB56** son bacterias del azufre no clasificadas (Mulheron, 2014).

### **Actinobacteria**

**Candidatus Microthrix** contiene bacterias aerobias filamentosas, quimiorganótrofas capaces de reducir nitrato a nitrito, comúnmente son causantes de problemas en la separación de lodos en las plantas de tratamiento de lodos activados (Goldman y Green, 2009; McIlroy *et al.*, 2013). Estuvieron presentes en la biomasa de ambos empaques y en todas las cargas orgánicas en porcentajes de 0.1-1 %.



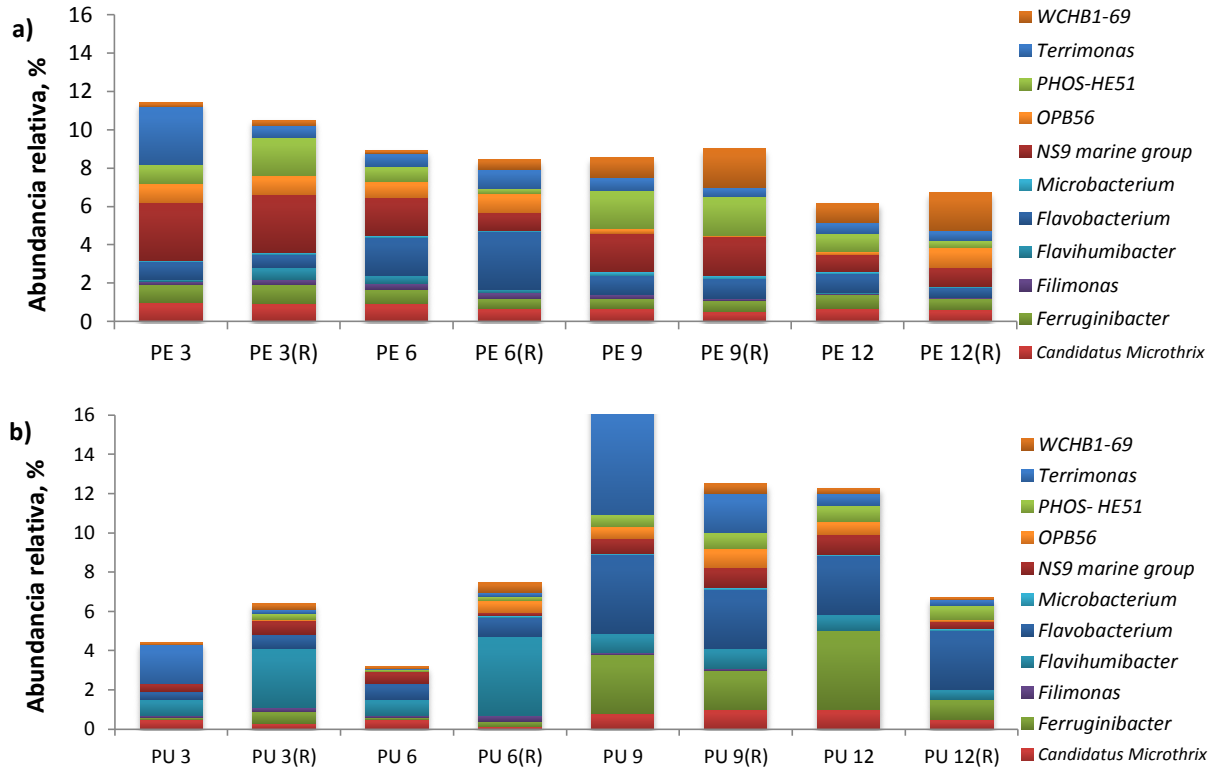


Figura 4.43. Porcentajes de los géneros más abundantes de diversas clases.

a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

#### 4.6.4 Relación entre la comunidad bacteriana y las condiciones de operación

Los géneros con la mayor abundancia relativa en las cintas de polietileno fueron *Thiothrix*, *SC-I-84*, *Novosphingobium* y *Acidovorax*. Los géneros más abundantes en los cubos de poliuretano fueron la *SC-I-84*, *Hailea* y *Thermomonas*. Los valores de los porcentajes de abundancia relativa se encuentran en las Tablas 4.18 y 4.19, la intensidad del color indica la abundancia en las diferentes condiciones de operación, los resultados pueden resumirse de la siguiente manera:

**Géneros con mayor abundancia al trabajar con CO baja (3 y 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>) en comparación con CO alta:**

**Cintas de polietileno (reactor PE1):** *Acidocella*, *Brevundimonas*, *Mesorhizobium*, *Reyranella*, *SC-I-84*, *Nitrosomonas*, *Rhizobacter*, *Arenimonas*, *Haliea*, *Hypomicrobium*, *Thermomonas*, *Ferruginibacter*, *Flaviumibacter*, *Terrimonas*, *Candidatus Microthrix*, *OPB56*, *Nitrospira*.

**Cubos de poliuretano (reactor PU1):** *Bradyrhizobium*, *Phenylobacterium*, *Halomonas*, *Reyranella*, *SC-I-84*, *Leptothrix*, *Nitrosomonas*, *Rubrivivax*, *A0839*, *Haliea*, *Hypomicrobium*, *Thermomonas*, *Nitrospira*.

Se ha reportado que los procesos de biopelícula de baja carga orgánica tienden a favorecer el desarrollo de bacterias autótrofas de lento crecimiento, tales como las nitrificantes (Falàs *et al.*, 2012). Esto también se pudo observar en los dos tipos de soporte, ya que cuando se trabajó con cargas orgánicas bajas, entre los géneros de bacterias con mayor abundancia relativa estuvieron las amonio oxidantes *Nitrosomonas* y las nitrito oxidantes *Nitrospira*. Generalmente la biopelícula formada con bajas cargas orgánicas es delgada y porosa, esto facilita la difusión de sustratos, nutrientes y oxígeno disuelto (Quan *et al.*, 2012), por lo tanto, bajo condiciones de baja carga

orgánica estuvieron presentes principalmente bacterias aerobias, aun así también se encontraron bacterias que se desarrollan bajo condiciones anóxicas y anaerobias, tal es el caso de las *Thermomonas* que se encuentran con frecuencia cercanas a las bacterias nitrificantes (Yu *et al.*, 2007; Hedrich *et al.*, 2011; Dolinšek *et al.*, 2013), de manera que su porcentaje de abundancia fue mayor con baja carga, donde hubo mayor abundancia relativa de bacterias nitrificantes.

**Géneros con mayor abundancia al trabajar con CO alta (9 y 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>) en comparación con CO baja:**

**Cintas de polietileno (reactor PE2):** *Novosphingobium*, *Sphingopyxis*, *Acidovorax*, *Hydrogenophaga*, *Limnobacter*, *Methylotenera*, *Rubrivivax*, *WCHB1-69*.

**Cubos de poliuretano (reactor PU2):** *Sphingomonas*, *Dechloromonas*, *Denitratisoma*, *Diaphorobacter*, *Limnobacter*, *Polynucleobacter*, *Aquimonas*, *Thiothrix*, *Flavobacterium*, *NS9 marine group*, *PHOS-HE51*, *Ferruginibacter*, *Terrimonas*, *Candidatus Microthrix*.

La condición de alta carga orgánica proporciona más sustrato para el crecimiento de microorganismos heterótrofos, los cuáles crecen más rápido que los autótrofos, como resultado, la actividad de las bacterias nitrificantes disminuye, generalmente la biopelícula formada con alta carga orgánica es compacta y gruesa, esto dificulta la transferencia de oxígeno disuelto (Wuertz *et al.*, 2008; Quan *et al.*, 2012). Los resultados mostraron que al trabajar con cargas orgánicas altas, la abundancia relativa de las bacterias nitrificantes y *Thermomonas* fue menor en los dos soportes. Además, entre los principales géneros con mayor abundancia relativa se encontraron tanto bacterias aerobias, así como bacterias que se desarrollan bajo condiciones anóxicas y anaerobias.

**Géneros que disminuyen su abundancia relativa al aplicar la recirculación:**

**Cintas de polietileno:** *Acidocella*, *M05-Pitesti*, *Rhodobacter* *Comamonas*, *Arenimonas*, *Hypomicrobium*, *Nitrosococcus*, *Thermomonas*, *Terrimonas*, *Candidatus Microthrix*.

**Cubos de poliuretano:** *Phenylobacterium*, *Mesorhizobium*, *M05-Pitesti*, *Novosphingobium*, *Reyranella*, *Acidovorax*, *Comamonas*, *SC-I-84*, *Lautropia*, *Limnobacter*, *Acidibacter*, *A039*, *Hypomicrobium*, *Thermomonas*.

**Géneros que aumentan su abundancia relativa al aplicar la recirculación:**

**Cintas de polietileno:** *SC-I-84*, *Dechloromonas*, *Limnobacter*, *WCHB1-69*.

**Cubos de poliuretano:** *Dechloromonas*, *Nitrosomonas*, *Polynucleobacter*.

El creciente flujo de entrada que resulta de la recirculación ocasiona velocidades más altas del fluido a través del reactor, puede provocar el desprendimiento de exceso de biopelícula, a la vez que se alcanza una distribución más homogénea del sustrato y oxígeno disuelto, mejorando así la transferencia de masa, además hay una dilución en el influente, como consecuencia se reduce la concentración de materia orgánica, lo que hace a las bacterias nitrificantes más competitivas (Rittman y McCarty, 2001; EPA, 2000). De esta manera, al aplicar la recirculación en los dos tipos de soporte, disminuyó la abundancia relativa tanto de bacterias aerobias que podrían encontrarse en la parte externa, así como de bacterias que se desarrollan bajo condiciones anóxicas y anaerobias, ya que el medio para su desarrollo es menos favorable como consecuencia de la mejor transferencia de oxígeno disuelto. En cambio, debido a que la recirculación puede mejorar la transferencia de oxígeno disuelto, se incrementó principalmente la abundancia de bacterias aerobias.

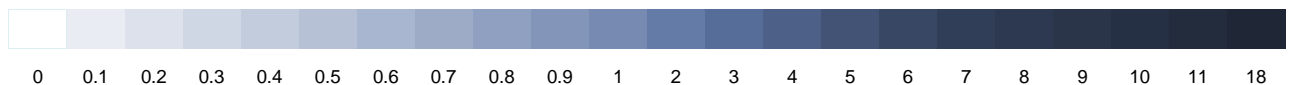
Tabla 4.18. Abundancias relativas de los géneros de bacterias en las cintas de polietileno

Filo	Clase	Género	% Abundancia relativa							
			PE 3	PE 3(R)	PE 6	PE 6(R)	PE 9	PE 9(R)	PE 12	PE12(R)
<b>Proteobacteria</b>	<b><math>\alpha</math>-Proteobacteria</b>	<i>Acidocella</i>	0.7	0.6	0.6	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2
		<i>Bradyrhizobium</i>	0.3	0.5	0.6	0.3	0.7	0.3	0.4	0.4
		<i>Brevundimonas</i>	1	2	0.7	0.07	0.03	0.03	0.1	0.03
		<i>Halomonas</i>	0.2	0.3	0.3	0.6	0.4	0.3	0.4	1
		<i>Mesorhizobium</i>	0.3	0.4	0.3	0.3	0.2	0.1	0.1	0.08
		<i>M05-Pitesti</i>	0.3	0.2	0.4	0.1	0.2	0.2	0.2	0.08
		<i>Nitratireductor</i>	0.002	-	0.001	0.003	0.004	0.003	0.002	0.002
		<i>Novosphingobium</i>	2	2	4	1	4	4	9	2
		<i>Phenylobacterium</i>	0.8	3	0.7	0.2	0.4	0.2	2	2
		<i>Reyranella</i>	0.7	0.7	0.9	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2
		<i>Rhodobacter</i>	3	2	1	2	3	2	2	1
		<i>Sphingomonas</i>	0.2	0.2	0.8	0.2	0.3	0.4	0.4	0.2
		<i>Sphingopyxis</i>	0.5	0.5	0.5	0.2	3	3	1	0.2
	<b><math>\beta</math>-Proteobacteria</b>	<i>Acidovorax</i>	2	3	3	1	4	5	6	4
		<i>Alicyclophilus</i>	0.3	0.6	0.1	0.1	0.5	2	0.3	0.5
		<i>Comamonas</i>	0.4	0.1	0.3	0.2	0.5	0.3	0.4	0.4
		<i>Dechloromonas</i>	0.5	1	0.6	2	0.6	2	1	2
		<i>Denitratisoma</i>	0.3	0.5	0.2	0.5	0.4	0.3	0.4	0.5
		<i>Diaphorobacter</i>	0.6	1	0.3	0.3	1	0.4	0.7	0.5
		<i>Hydrogenophaga</i>	0.2	0.3	0.2	0.2	0.7	0.8	0.5	0.5
		<i>Lautropia</i>	1	2	1	0.8	1	1	4	1
		<i>Leptothrix</i>	0.3	0.6	2	1	0.3	0.3	2	0.09
		<i>Limnobacter</i>	0.4	0.6	0.5	0.7	0.5	1	1	1
		<i>Methylotenera</i>	0.2	0.2	2	0.4	0.9	0.9	3	3
		<i>Methyloversatilis</i>	0.1	0.1	0.2	0.6	0.2	0.3	0.6	0.5
		<i>Nitrosomonas</i>	0.5	0.8	0.5	0.7	0.3	0.2	0.3	0.3
		<i>Ottowia</i>	0.6	1	0.8	0.7	1	1	0.9	0.7
		<i>Polynucleobacter</i>	0.3	0.5	0.8	0.5	0.7	2	1	0.3
		<i>Rhizobacter</i>	0.5	0.4	0.6	0.9	0.03	0.04	0.2	0.2
		<i>Rubrivivax</i>	0.02	0.03	0.03	0.02	0.07	0.1	0.06	0.07
	<i>SC-I-84</i>	5	5	5	6	1	2	3	3	
	<i>Sphaerotilus</i>	1	0.3	0.08	0.5	1	0.5	0.4	1	
	<b><math>\gamma</math>-Proteobacteria</b>	<i>Acidibacter</i>	0.4	0.6	0.6	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3
		<i>Acinetobacter</i>	0.3	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1
		<i>Aquimonas</i>	0.06	-	0.1	0.3	0.8	0.08	0.3	0.6
<i>Arenimonas</i>		1	0.9	1	0.7	0.03	0.03	0.07	0.05	
<i>A0839</i>		0.4	0.2	0.2	0.2	0.1	0.01	0.2	0.2	
<i>Haliae</i>		1	0.8	1	1	0.9	0.1	0.2	0.2	
<i>Hypomicrobium</i>		0.6	0.7	1	0.5	0.4	0.3	0.4	0.3	
<i>Nitrosococcus</i>		0.03	0.02	0.05	0.03	0.01	0.03	0.04	0.02	
<i>Pseudomonas</i>		0.09	0.06	0.08	0.08	0.05	0.03	0.02	0.02	
<i>Thermomonas</i>		3	2	3	1	0.4	0.4	0.4	0.3	
<i>Thiothrix</i>	2	0.8	1	6	11	6	3	18		
<b>Bacteroidetes</b>	<b>Flavobacteria</b>	<i>Flavobacterium</i>	0.9	0.7	2	3	1	1	1	0.5
		<i>NS9 marine group</i>	3	3	2	0.9	2	2	0.9	1
		<i>PHOS-HE51</i>	1	2	0.8	0.3	2	2	0.9	0.4
	<b>Sphingobacteria</b>	<i>Ferruginibacter</i>	0.9	1	0.8	0.5	0.5	0.6	0.7	0.6
		<i>Filimonas</i>	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1	0.08	0.05
		<i>Flaviumibacter</i>	0.1	0.6	0.4	0.2	0.02	0.01	0.003	0.02
<i>WCHB1-69</i>	0.2	0.3	0.1	0.5	1	2	1	2		
<i>Terrimonas</i>	3	0.6	0.7	1	0.7	0.5	0.6	0.5		
<b>Actinobacteria</b>	<b>Actinobacteria</b>	<i>Candidatus Microthrix</i>	1	0.9	0.9	0.7	0.7	0.5	0.7	0.6
		<i>Microbacterium</i>	0.1	0.1	0.08	0.06	0.2	0.2	0.09	0.05
<b>Chlorobi</b>	<b>Chlorobia</b>	<i>OPB56</i>	1	1	0.8	1	0.2	0.1	0.2	1
<b>Nitrospirae</b>	<b>Nitrospira</b>	<i>Nitrospira</i>	2	0.9	1	1	0.5	0.3	0.3	0.4



Tabla 4.19. Abundancias relativas de los géneros de bacterias en los cubos de poliuretano

Filo	Clase	Género	% Abundancia relativa									
			PU3	PU3(R)	PU6	PU6(R)	PU9	PU9(R)	PU12	PU12(R)		
<b>Proteobacteria</b>	<b><math>\alpha</math>-Proteobacteria</b>	<i>Acidocella</i>	1	1	1	2	2	1	2	1		
		<i>Bradyrhizobium</i>	1	0.2	0.7	0.7	0.3	0.3	0.3	0.3		
		<i>Brevundimonas</i>	0.04	0.2	0.9	0.07	0.6	0.7	0.2	0.4		
		<i>Halomonas</i>	0.5	0.4	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		
		<i>Mesorhizobium</i>	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.07		
		<i>M05-Pitesti</i>	1	0.5	1	0.1	0.7	0.5	0.6	0.5		
		<i>Nitratireductor</i>	0.03	0.01	0.05	0.07	0.02	0.03	0.004	0.005		
		<i>Novosphingobium</i>	2	1	2	1	2	1	1	1		
		<i>Phenyllobacterium</i>	0.8	0.5	0.7	0.3	0.2	0.1	0.2	0.4		
		<i>Reyranella</i>	1	0.8	1	0.4	0.7	0.7	0.6	0.2		
		<i>Rhodobacter</i>	1	1	0.9	5	1	1	1	2		
		<i>Sphingomonas</i>	0.03	0.02	0.07	0.2	0.1	0.1	0.09	0.1		
		<i>Sphingopyxis</i>	0.9	0.7	1	0.4	1	1	0.6	0.7		
	<b><math>\beta</math>-Proteobacteria</b>	<i>Acidovorax</i>	2	1	2	0.7	3	2	2	2		
		<i>Alicyclophilus</i>	0.05	0.5	0.04	0.007	1	0.6	0.08	1		
		<i>Comamonas</i>	0.5	0.4	2	1	0.5	0.5	0.5	0.2		
		<i>Dechloromonas</i>	0.07	0.1	0.07	0.6	0.2	0.2	0.2	2		
		<i>Denitratisoma</i>	0.004		0.004		0.2	0.4	0.2	0.2		
		<i>Diaphorobacter</i>	0.1	0.2	0.05	0.01	0.4	1	0.3	2		
		<i>Hydrogenophaga</i>	0.3	0.08	0.3	0.5	0.05	0.4	0.1	0.4		
		<i>Lautropia</i>	0.4	0.6	1	0.4	1	0.6	0.7	0.6		
		<i>Leptothrix</i>	2	1	2	3	0.2	0.5	0.3	0.3		
		<i>Limnobacter</i>	0.03	0.02	0.2	0.02	0.6	0.5	0.7	0.2		
		<i>Methylotenera</i>	0.2	0.1	2	0.5	0.2	0.7	0.6	0.6		
		<i>Methyloversatilis</i>	0.5	0.2	0.1	0.8	0.4	0.3	0.2	0.2		
		<i>Nitrosomonas</i>	0.8	1	0.6	0.8	0.6	0.7	0.5	0.5		
		<i>Ottowia</i>	0.6	0.8	0.4	0.5	1	1	0.8	0.4		
		<i>Polynucleobacter</i>	-	0.3	0.04	0.2	0.7	0.8	0.2	1		
		<i>Rhizobacter</i>	0.3	0.4	0.8	0.8	0.6	0.4	0.6	0.2		
		<i>Rubrividax</i>	0.1	1	0.03	0.3	0.07	0.005	0.01	0.03		
	<i>SC-I-84</i>	10	9	11	5	6	5	7	2			
	<i>Sphaerotilus</i>	0.3	0.4	0.2	0.4	0.6	0.5	0.4	0.4			
	<b><math>\gamma</math>-Proteobacteria</b>	<i>Acidibacter</i>	0.5	0.3	0.5	0.3	0.5	0.4	0.5	0.1		
		<i>Acinetobacter</i>	0.09	0.5	0.05	-	0.02	0.06	0.01	0.04		
		<i>Aquimonas</i>	0.02	0.05	0.01	0.07	0.4	0.2	0.09	0.5		
		<i>Arenimonas</i>	2	3	1	3	2	2	2	0.5		
		<i>A0839</i>	3	2	3	3	0.2	0.1	0.2	0.1		
		<i>Haliae</i>	6	7	4	1	1	1	1	0.9		
		<i>Hypomicrobium</i>	1	0.7	2	2	0.6	0.5	0.8	0.5		
		<i>Nitrosococcus</i>	-	0.008	0.04	0.007	0.05	0.07	0.05	0.02		
		<i>Pseudomonas</i>	0.08	0.1	0.05	0.02	0.04	0.09	0.05	0.3		
		<i>Thermomonas</i>	9	7	4	3	5	5	3	2		
		<i>Thiothrix</i>	0.05	0.1	0.05	1	0.8	0.7	0.4	0.5		
		<b>Bacteroidetes</b>	<b>Flavobacteria</b>	<i>Flavobacterium</i>	0.4	0.7	0.8	1	4	3	3	3
				<i>NS9 marine group</i>	0.4	0.7	0.6	0.2	0.8	1	1	0.4
<i>PHOS-HE51</i>				-	0.3	0.1	0.2	0.6	0.8	0.8	0.7	
<b>Sphingobacteria</b>			<i>Ferruginibacter</i>	0.1	0.6	0.1	0.3	3	2	4	1	
	<i>Filimonas</i>		0.1	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1	0.04	0.03		
	<i>Flaviumibacter</i>		0.8	3	0.8	4	1	1	0.8	0.5		
	<i>WCHB1-69</i>		0.1	0.3	0.1	0.5	0.4	0.5	0.3	0.1		
	<i>Terrimonas</i>		2	0.2	0.03	0.2	6	2	0.6	0.3		
<b>Actinobacteria</b>	<b>Actinobacteria</b>	<i>Candidatus Microthrix</i>	0.5	0.3	0.5	0.1	0.8	1	1	0.5		
		<i>Microbacterium</i>	-	0.02	0.009	0.06	0.04	0.1	0.05	0.07		
<b>Chlorobi</b>	<b>Chlorobia</b>	<i>OPB56</i>	-	0.07	0.04	0.6	0.6	1	0.7	0.1		
<b>Nitrospirae</b>	<b>Nitrospira</b>	<i>Nitrospira</i>	2	2	1	2	1	1	1	0.8		



#### 4.6.5 Abundancia relativa de las bacterias amonio y nitrito oxidantes

Las bacterias amonio y nitrito oxidantes son aerobias quimioautótrofas, *Nitrosomonas* y *Nitrosospira* son los géneros de bacterias amonio oxidantes más importantes. *Nitrospira* y *Nitrobacter* son los géneros de bacterias nitrito oxidantes encontradas frecuentemente en lodos activados y biomasa inmovilizada, su existencia y proporciones son inconsistentes en diferentes estudios (WEF, 2010; Quan *et al.*, 2012; Metcalf y Eddy, 2014). Las bacterias amonio oxidantes *Nitrosomonas* son resistentes a los cambios en el ambiente, tienen relativamente alta tasa de crecimiento comparado a *Nitrosospira*, por lo que *Nitrosomonas* es frecuentemente reportado como género dominante en las plantas de tratamiento de aguas residuales, los demás géneros como *Nitrosococcus* han sido encontrados en muy bajos porcentajes, en el caso de las bacterias nitrito oxidantes, *Nitrospira* se ha reportado como uno de los géneros dominantes en reactores nitrificantes (Ye *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2015).

En este estudio se obtuvieron resultados similares, *Nitrosomonas* fue el género de bacterias amonio oxidantes con mayor abundancia relativa, los porcentajes fueron de 0.2-0.8 % en las cintas de polietileno y 0.5-1 % en los cubos de poliuretano, donde su abundancia relativa incrementó como resultado de la recirculación del efluente, con excepción de la CO de 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>. En las cintas de polietileno la recirculación incrementó la abundancia relativa de *Nitrosomonas* solo a bajas cargas orgánicas (3 y 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>), esto puede explicarse debido a que por un lado, los microorganismos con la más alta tasa de crecimiento generalmente se encuentran en el exterior de la biopelícula, mientras que los microorganismos de lento crecimiento como las bacterias nitrificantes se encuentran en el interior, donde aún puede penetrar el oxígeno disuelto, como resultado se encuentran protegidos ante posibles condiciones adversas del medio por los microorganismos con alta tasa de crecimiento (Wuertz *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2012), en las biopelículas gruesas, el oxígeno solo puede penetrar aproximadamente hasta 300 µm (Flemming *et al.*, 2000). Por otro lado, el aumento de la carga orgánica se realizó mediante el incremento del caudal del influente, además el creciente flujo de entrada que resulta de la recirculación ocasiona velocidades aún más altas del fluido a través del reactor, provocando el desprendimiento de exceso de biopelícula (Rittman y McCarty, 2001), este desprendimiento pudo ocasionar la disminución de la abundancia de *Nitrosomonas* en las cintas de polietileno al trabajar con CO de 9 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>. Por el contrario, en los cubos de poliuretano hubo incremento de la abundancia de *Nitrosomonas* al aplicar la recirculación bajo esta condición, se ha reportado previamente que las bacterias nitrificantes *Nitrosomonas* son encontradas en los espacios interiores de la esponja de poliuretano más que dentro de la biopelícula adherida a la superficie (Chu y Wang, 2011), esto pudo haber evitado pérdidas de las bacterias *Nitrosomonas*, ya que el creciente flujo puede afectar principalmente la parte externa. El género *Nitrosococcus* estuvo presente en porcentajes menores al 0.05 % en ambos empaques. *Nitrospira* también fue el género de bacterias nitrito oxidantes más abundante, los porcentajes fueron 0.3-2 % en las cintas de polietileno y 0.8-2 % en los cubos de poliuretano, mientras que *Nitrobacter* estuvo presente en porcentajes menores al 0.05 %. Es evidente la mayor abundancia de las bacterias nitrito oxidantes en los cubos de poliuretano que presentaron mayores remociones de nitrógeno amoniacal. Los bajos porcentajes de bacterias nitrificantes parecen no estar de acuerdo con la eficiente nitrificación, esto se debe a las altas concentraciones de materia orgánica en comparación al nitrógeno amoniacal, lo que proporciona exceso de sustratos de crecimiento para las bacterias heterótrofas, contribuyendo a su mayor abundancia (Ma *et al.*, 2015).

#### 4.6.6 Relación entre la remoción de fármacos, las condiciones de operación y la comunidad bacteriana

Las condiciones aerobias son favorables para la remoción de fármacos en comparación a las condiciones anaerobias (Alvarino *et al.*, 2014). Se han reportado cinéticas de degradación más rápidas en reactores nitrificantes en comparación con sistemas desnitrificantes (Suarez *et al.*, 2010), por esta razón es importante prestar atención a los géneros de bacterias nitrificantes presentes en los reactores. Los estudios indican que la transformación de los fármacos puede iniciarse gracias a la biodegradación cometabólica de la enzima amonio monooxigenasa, secretada por las bacterias autótrofas amonio oxidantes, por lo tanto, la buena actividad nitrificante puede incrementar la biodegradación de algunos fármacos (Forrez *et al.*, 2011; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012), aunque también la biodegradación puede ser debida al cometabolismo o metabolismo de algunos microorganismos heterótrofos (Tran *et al.*, 2013; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2016).

De acuerdo a los resultados de las pruebas de biodegradabilidad con biomasa suspendida, la biomasa amonio-nitrito oxidante tuvo mayor capacidad de biodegradación de ácido mefenámico (85 %) y metoprolol (64.5 %), por lo que su remoción podría beneficiarse principalmente de la buena actividad nitrificante, sin embargo, la biomasa heterótrofa también tuvo la capacidad de biodegradación de ácido mefenámico y metoprolol (66.4 y 58.4 % respectivamente), su capacidad incrementó una vez que la mayor parte de la materia orgánica había sido consumida. La biodegradación de fluoxetina pudo llevarse a cabo tanto con la biomasa heterótrofa (84.7 %) como con el consorcio amonio-nitrito oxidante (78.6 %), por lo tanto, su remoción en la biomasa inmovilizada podría beneficiarse con la mayor actividad de remoción de materia orgánica y N-NH<sub>4</sub>.

Las mayores remociones de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol en los reactores con biomasa inmovilizada se lograron en la Fase 3 de los reactores PE1 y PU1 (CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> y 50 % de recirculación del efluente), donde también hubo mayores porcentajes de remoción de DQO y N-NH<sub>4</sub>. Los cubos de poliuretano mostraron mejores resultados en comparación con las cintas de polietileno durante todas las fases. Los reactores empacados con cubos de poliuretano alcanzaron mayores remociones de materia orgánica, de manera que hubo una diferencia estadísticamente significativa en las remociones promedio de DQO entre un material de soporte y otro (excepto cuando los reactores fueron operados con CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> sin recirculación, así como con CO de 6 y 12 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> con recirculación). En cuanto al N-NH<sub>4</sub>, los reactores con cubos de poliuretano también lograron mayores remociones, igualmente existió una diferencia estadísticamente significativa en las remociones promedio de N-NH<sub>4</sub> entre un material de soporte y otro, esto ocurrió en todas las condiciones de operación. La estructura de los cubos de poliuretano permitió el establecimiento de una mayor cantidad de biomasa, al mismo tiempo, se encontró mayor abundancia relativa de bacterias nitrificantes *Nitrosomonas* y *Nitrospira*, estas pueden encontrarse en la biomasa inmovilizada en la superficie, así como en los espacios interiores de los cubos (Chu y Wang, 2011), ya que su tamaño de poro (10 PPI) puede hacer posible la transferencia de masa y oxígeno hacia el interior. La mayor actividad nitrificante en los cubos de poliuretano puede asociarse con la mayor abundancia relativa de las bacterias anaerobias del género *Thermomonas*, uno de los tres géneros más abundantes en este material de soporte, estas bacterias se encuentran con frecuencia cercanas a las bacterias nitrificantes, aunque también pueden crecer lejos ellas, son bacterias heterótrofas que ocasionalmente toman productos orgánicos solubles excretados por las bacterias nitrificantes, los sustratos liberados por el decaimiento de la biomasa nitrificante y las sustancias poliméricas extracelulares que rodean las microcolonias de las nitrificantes (Yu *et al.*, 2007; Hedrich *et al.*, 2011; Dolinšek *et al.*, 2013).

En los reactores con ambos tipos de empaque la mayor abundancia relativa del género *Thermomonas* en la biomasa se encontró al trabajar con CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>, cuando hubo mayor abundancia relativa de bacterias nitrificantes y mayor remoción de N-NH<sub>4</sub>.

Las remociones de los tres fármacos incrementaron al aplicar la recirculación del efluente. Respecto a la materia orgánica, no hubo diferencia estadísticamente significativa en las remociones promedio de DQO entre la condición con y sin recirculación del efluente, con excepción del caso donde el reactor PU1 fue operado con CO de 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>. En cambio, existió una diferencia estadísticamente significativa en las remociones promedio de N-NH<sub>4</sub> entre la condición con y sin recirculación, excepto el caso cuando el reactor PU1 fue operado con CO de 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>. En las cintas de polietileno, la recirculación incrementó la abundancia relativa del género de bacterias *Nitrosomonas* solo a bajas cargas orgánicas (3 y 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>), podría esperarse que la remoción de los fármacos fuera favorecida por la mayor presencia de estas bacterias. En los cubos de poliuretano, la recirculación incrementó la abundancia relativa de *Nitrosomonas* al trabajar las CO de 3, 6 y 9 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>. Los resultados de la remoción de los fármacos indicaron que existió una diferencia estadísticamente significativa en las remociones promedio de los tres compuestos al aplicar la recirculación, con la excepción de las remociones de metoprolol con la CO de 6 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>.

En cuanto a la fase sólida, se midieron mayores concentraciones de los tres fármacos en la biomasa inmovilizada en las cintas de polietileno. Por un lado, las menores concentraciones de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol en la biomasa inmovilizada en los cubos de poliuretano pueden atribuirse a su mayor capacidad de biodegradación de los tres fármacos, además a la existencia de una mayor abundancia relativa de las bacterias amonio oxidantes *Nitrosomonas*. Por otro lado, en ambos soportes se encontraron varios géneros de bacterias filamentosas (*Thiothrix*, *Leptothrix*, *Sphaerotilus* y *Candidatus Microthrix*), estas bacterias pueden proporcionar una mayor área superficial para la sorción debido a su alta relación superficie-masa (Martins *et al.*, 2003). La abundancia relativa de las bacterias filamentosas del género *Thiothrix* fue mayor en las cintas de polietileno (3-18 %) en comparación con los cubos de poliuretano (0.4-0.8 %), e incluso *Thiothrix* fue uno de los géneros de bacterias con la mayor abundancia relativa en las cintas de polietileno, lo que pudo proporcionar una mayor área superficial para la sorción. Las bacterias del género *Leptothrix* se encontraron en mayor abundancia relativa en los reactores PU (0.2-3 %), en comparación con los reactores PE (0.09-2 %), pero sus abundancias fueron mucho menores a las del género *Thiothrix* en las cintas de polietileno. Las bacterias del género *Sphaerotilus* y *Candidatus Microthrix* se encontraron en ambos tipos de empaque, su abundancia relativa estuvo entre 0.1-1 %. Otro género de bacterias que posee sitios potenciales de sorción es *Brevundimonas*, incluso pueden actuar como un biosorbente para la remoción de plomo del agua residual (Resmi *et al.*, 2010a; Resmi *et al.*, 2010b; Singh y Gadi, 2012), estas bacterias también estuvieron presentes en mayor abundancia relativa (≥1 %) en las cintas de polietileno cuando se trabajó con CO de 3 gDQO·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>.

No se han encontrado estudios que relacionen directamente los diferentes géneros de bacterias con las remociones de ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol, sin embargo, algunos autores han reportado que cultivos de *Sphingomonas* son capaces de degradar ibuprofeno como única fuente de carbono, las bacterias del género *Novosphingobium* son capaces de degradar 17β-estradiol como única fuente de carbono, pero no son capaces de degradar estriol y 17α-etinilestradiol, la biodegradabilidad de 17α-etinilestradiol se ha observado usando siete cultivos de bacterias heterótrofas (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous* y *Rhodococcus zopfii*) (Tran *et al.*, 2013). Las bacterias del género *Denitratisoma* también son capaces de utilizar 17β-estradiol (Fahrbach *et al.*, 2006), igualmente el género *Acidovorax* contiene especies capaces de degradar esteroides (Haig *et al.*, 2016). En este estudio, los géneros *Sphingomonas*,

---

*Novosphingobium*, *Denitratisoma* y *Acidovorax* fueron encontrados con mayor abundancia relativa en las cintas de polietileno, incluso *Novosphingobium* y *Acidovorax* son dos de los géneros más abundantes en las cintas de polietileno, por lo que no se pudo plantear una relación positiva entre la mayor presencia de estos géneros y la remoción de los fármacos. Las *Pseudomonas* estuvieron presentes en bajos porcentajes en ambos tipos de soporte ( $\leq 0.3\%$ ), por lo que tampoco pudo observarse una relación entre su abundancia y la remoción de los fármacos.



## 5. CONCLUSIONES

El consorcio amonio-nitrito oxidante y la biomasa heterótrofa fueron capaces de remover el ácido mefenámico, la fluoxetina y el metoprolol. La biodegradación fue el mecanismo de remoción principal de los tres compuestos. Las tasas de biodegradación fueron proporcionales a la actividad nitrificante en el consorcio amonio-nitrito oxidante, lo cual sugiere una biodegradación cometabólica. Las tasas de biodegradación incrementaron después del consumo de la materia orgánica en la biomasa heterótrofa. El consorcio nitrito oxidante presentó las más bajas tasas de biodegradación de los tres fármacos.

Los fármacos ácido mefenámico y fluoxetina fueron más biodegradables que el metoprolol en los experimentos con los tres consorcios. La biomasa amonio-nitrito oxidante tuvo mayor capacidad de biodegradación de ácido mefenámico (85 %) y metoprolol (64.5 %) después de 24 d de incubación, seguido por la biomasa heterótrofa (66.4 y 58.4 % respectivamente). La biomasa heterótrofa tuvo mayor capacidad de biodegradación de fluoxetina (84.7 %), seguido por el consorcio amonio-nitrito oxidante (78.6 %). La biodegradación de los fármacos fue menor de 50 % en el consorcio nitrito oxidante.

Las cinéticas de biodegradación de los tres fármacos en los tres consorcios se ajustaron a un modelo de pseudo-primer orden. Los mayores valores de las constantes de biodegradación  $k_{\text{biol}}$  de ácido mefenámico y metoprolol fueron determinados con el consorcio amonio-nitrito oxidante (0.254 y 0.147  $\text{LgSSV}^{-1}\text{d}^{-1}$ , respectivamente). La mayor constante de biodegradación de fluoxetina se obtuvo usando la biomasa heterótrofa (0.244  $\text{LgSSV}^{-1}\text{d}^{-1}$ ). Las constantes de biodegradación determinadas usando el consorcio amonio-nitrito oxidante y la biomasa heterótrofa indicaron que con ambos consorcios se obtiene una biodegradación parcial y relativamente lenta de los tres compuestos, mientras que no puede esperarse una biodegradación sustancial con el consorcio nitrito oxidante.

La sorción en la biomasa de los tres consorcios tuvo una contribución del 5-14 % en la remoción de fluoxetina y ácido mefenámico después de 24 d de incubación. La sorción de metoprolol en la biomasa fue baja, su contribución en la remoción global fue de 3-5 %. Los valores de los coeficientes de sorción determinados para la fluoxetina fueron  $\log K_d$  2.71-2.76, indicando su tendencia a la sorción en la biomasa de los tres consorcios. Los valores de  $\log K_d$  del ácido mefenámico fueron de 2.56-2.58, los más bajos valores fueron determinados para el metoprolol ( $\log K_d$  1.93-2.05), indicando que la sorción en la biomasa es baja y por lo tanto, su contribución en la remoción global es poco significativa en los tres consorcios.

Los reactores con biomasa inmovilizada fueron capaces de remover del agua residual municipal hasta 82 % de ácido mefenámico, 95 % de fluoxetina y 73 % de metoprolol. El desempeño de los reactores fue diferente con cada material de soporte. Los reactores con cubos de poliuretano mostraron mayores remociones de los tres fármacos en comparación con las cintas de polietileno durante todas las fases experimentales. Las diferencias entre un material de soporte y otro fueron estadísticamente significativas, estas pueden deberse a la mayor cantidad de biomasa, las más altas tasas de nitrificación, así como la mayor abundancia relativa de las bacterias *Nitrosomonas* en los reactores con cubos de poliuretano.

Los cubos de poliuretano acumularon mayor cantidad de biomasa durante todas las fases experimentales ( $5.8-10.5 \text{ gSV}\cdot\text{m}^{-2}$ ) en comparación con las cintas de polietileno ( $4.9-9.0 \text{ gSV}\cdot\text{m}^{-2}$ ), las diferencias fueron estadísticamente significativas. La estructura porosa de los cubos de poliuretano permitió el desarrollo de la biomasa inmovilizada tanto en la superficie externa como en el interior de los poros. En las cintas de polietileno la biomasa inmovilizada se desarrolló en la superficie relativamente lisa de su estructura. Las diferencias en las remociones de DQO y  $\text{N-NH}_4$  fueron estadísticamente significativas entre un material de soporte y otro, los reactores con cubos de poliuretano alcanzaron las mayores remociones.

Las concentraciones de los fármacos en la fase sólida fueron más altas en la biomasa inmovilizada en las cintas de polietileno durante las diferentes fases experimentales. El ácido mefenámico estuvo presente en mayores concentraciones en la biomasa inmovilizada en los dos materiales de soporte, seguido del metoprolol y la fluoxetina. Las cantidades del ácido mefenámico estuvieron en el intervalo de  $1.024-1.69 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  en la biomasa inmovilizada en las cintas de polietileno y de  $0.812-1.426 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  en los cubos de poliuretano. El metoprolol se encontró en el intervalo de  $0.635-0.921 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  y  $0.409-0.842 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  respectivamente, mientras que las concentraciones de fluoxetina fueron de  $0.46-0.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  y  $0.326-0.663 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  respectivamente. No se encontró una relación entre las concentraciones de los fármacos en la biomasa y las diferentes cargas orgánicas.

El tipo de soporte influyó en la composición de la comunidad bacteriana. Los géneros con la mayor abundancia relativa en las cintas de polietileno fueron *Thiothrix*, *SC-I-84*, *Novosphingobium* y *Acidovorax*. Los géneros más abundantes en los cubos de poliuretano fueron *SC-I-84*, *Hailea* y *Thermomonas*. Las bacterias amonio y nitrito oxidantes dominantes fueron *Nitrosomonas* y *Nitrospira* en los dos tipos de soporte, su abundancia relativa fue mayor en los cubos de poliuretano y al trabajar con cargas orgánicas bajas. Los porcentajes de abundancia relativa de *Nitrosomonas* y *Nitrospira* fueron de 0.2-0.8 y 0.3-2 %, respectivamente en las cintas de polietileno, en los cubos de poliuretano fueron de 0.5-1 y 0.8-2 %, respectivamente.

Los porcentajes de remoción de los fármacos disminuyeron con el aumento de la carga orgánica. Los altos TRS y el 50 % de recirculación del efluente favorecieron la remoción de los tres fármacos. Las mayores remociones se lograron al trabajar con la CO de  $3 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  y 50 % de recirculación del efluente (TRH de 3.1 a 4.3 h; TRS de 19-32 d). En el reactor con cubos de poliuretano se alcanzaron remociones de  $81.7 \pm 3.5$  % de ácido mefenámico,  $94.9 \pm 0.8$  % de fluoxetina y  $72.7 \pm 5.1$  % de metoprolol. Las remociones en el reactor con cintas de polietileno fueron de  $77.6 \pm 2.7$  % de ácido mefenámico,  $94 \pm 0.3$  % de fluoxetina y  $67.5 \pm 4.3$  % de metoprolol.

Las remociones de los fármacos incrementaron cuando aumentaron las remociones de  $\text{N-NH}_4$  en los reactores con los dos tipos de soporte. Las remociones de los fármacos y  $\text{N-NH}_4$ , así como las tasas de nitrificación aumentaron al aplicar el 50 % de recirculación del efluente, las diferencias en las remociones promedio de los tres fármacos y el  $\text{N-NH}_4$  fueron estadísticamente significativas entre la condición con y sin recirculación del efluente. La abundancia relativa de *Nitrosomonas* incrementó como resultado de la recirculación del efluente al trabajar la CO de 3 y  $6 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  en las cintas de polietileno, en los cubos de poliuretano la recirculación incrementó la abundancia relativa de *Nitrosomonas* cuando se trabajaron las CO de 3, 6 y  $9 \text{ gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ . En cambio no hubo diferencia estadísticamente significativa en las remociones promedio de DQO al aplicar la recirculación.

Las cinéticas de remoción de los fármacos en la biomasa inmovilizada se ajustaron a un modelo de pseudo primer orden. Las mayores constantes de remoción  $k_{\text{biol}}$  fueron determinadas para la fluoxetina ( $1.482-1.69 \text{ L}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), seguido del metoprolol ( $1.038-1.224 \text{ L}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) y por último el ácido mefenámico ( $0.593-0.903 \text{ L}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ). Los valores de  $k_{\text{biol}}$  obtenidos en los dos soportes indicaron que la fluoxetina y el metoprolol pueden clasificarse como altamente degradables, mientras que el ácido mefenámico puede considerarse moderadamente degradable. Las más altas constantes de remoción fueron obtenidas en el reactor con cubos de poliuretano.

Los mayores coeficientes de sorción en la biomasa inmovilizada fueron determinados para la fluoxetina ( $\log K_d$  de 2.932-3.013), seguido del ácido mefenámico ( $\log K_d$  de 2.726-2.827), estos valores indicaron su tendencia a la sorción en la biomasa inmovilizada en los dos tipos de soporte, mientras que los más bajos valores fueron determinados para el metoprolol ( $\log K_d$  de 1.879-1.894), indicando su bajo potencial de sorción en la biomasa. Los tres fármacos mostraron mayores coeficientes de sorción en la biomasa inmovilizada sobre la superficie de las cintas de polietileno, en comparación con la biomasa inmovilizada sobre la superficie de los cubos y en el interior de sus poros. En las cintas de polietileno hubo mayor abundancia relativa de bacterias filamentosas *Thiothrix* (3-18 %) en comparación a 0.4-0.8 % en los cubos de poliuretano, éstas pueden proporcionar una mayor área superficial para la sorción.

La biodegradación fue el mecanismo de remoción principal de los fármacos en los reactores con biomasa inmovilizada. Se alcanzaron mayores porcentajes de biodegradación en los reactores con cubos de poliuretano, se consiguió hasta  $76.1 \pm 6.8$  % de biodegradación de ácido mefenámico,  $93.8 \pm 0.9$  % de fluoxetina y  $68.6 \pm 5.2$  % de biodegradación de metoprolol. En las cintas de polietileno se obtuvo hasta  $69.3 \pm 7.7$  % de biodegradación de ácido mefenámico,  $92.5 \pm 0.3$  % de fluoxetina y  $65.7 \pm 1.5$  % de biodegradación de metoprolol. Los porcentajes de sorción fueron bajos durante todas las fases experimentales, hasta 1.4 % de sorción de ácido mefenámico, 1.5 % de fluoxetina y 0.6 % de sorción de metoprolol en la biomasa inmovilizada en las cintas de polietileno. En los cubos de poliuretano la sorción fue menor, hasta 1 % de ácido mefenámico, 1.2 % de fluoxetina y 0.5 % de metoprolol.

## 6. REFERENCIAS

- Al Aukudy M., Verlicchi P., Voulvoulos N. (2014). A framework for the assessment of the environmental risk posed by pharmaceuticals originating from hospital effluents. *Science of the Total Environment*. 493, pp. 54-64.
- Alvarino T., Suarez S., Lema J.M., Omil F. (2014). Understanding the removal mechanisms of PPCPs and the influence of main technological parameters in anaerobic UASB and aerobic CAS reactor. *Journal of Hazardous Materials*. 278, pp. 506-513.
- Azzous A., Souhail B., Ballesteros E. (2010). Continuous solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry determination of pharmaceuticals and hormones in water samples. *Journal of Chromatography A*. 1217, pp. 2956-2963.
- Baatar B., Chiang P., Rogozin D.Y., Wu Y., Tseng C., Yang C., Chiu H., Oyuntsetseg B., Degermendzhy G., Tang S. (2016). Bacterial Communities of Three Saline Meromictic Lakes in Central Asia. *PLOS ONE* | DOI:101371.
- Bailey K., Weber K.A., Chair A.H., Bose S., Knox T. (2010). Completed Genome Sequence of the Anaerobic Iron-Oxidizing Bacterium *Acidovorax ebreus* Strain TPSY. *Journal of Bacteriology*. 192, pp. 1475-1476.
- Baillon-Dhumez A. (2010). Evaluation of a biofilm process for the removal of pharmaceuticals in wastewater. Master's thesis. Lund Universit Sweden.
- Balest L., Lopez A., Mascolo G., Di laconi C. (2008). Removal of endocrine disrupter compounds from municipal wastewater using an aerobic granular biomass reactor. *Biochemical Engineering Journal*. 41, pp. 288-294.
- Barnes K.K., Kolpin D.W., Furlong E.T., Zaugg S.D., Meyer M.T., Barber L.B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - I) Groundwater. *Science of the Total Environment*. 402, pp. 192-200.
- Bassin J.P., Kleerebezem R., Rosado A.S., van Loosdrecht M.C., Dezotti M. (2011). Effect of Different Operational Conditions on Biofilm Development, Nitrification, and Nitrifying Microbial Population in Moving-Bed Biofilm Reactors. *Environmental Science and Technology*. 46, pp. 1546-1555.
- Batt A.L., Kim S., Aga D.S. (2006). Enhanced Biodegradation of Iopromide and Trimethoprim in Nitrifying Activated Sludge. *Environmental Science and Technology*. 40, pp. 7367-7373.
- Bejarano DI., Thalasso F., Cuervo F. (2013). Inhibitory effect of sulfide on the nitrifying respiratory process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 88, pp. 1344-1349.
- Birkholz DA., Stilson SM., Elliot HS. (2014). Analysis of Emerging Contaminants in Drinking Water-A Review. *Comprehensive Water Quality and Purification*. 2, pp. 212-229.
- Bisceglia K.J., Yu J.T., Coelhan M., Bouwer E.J., Roberts L. (2010). Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1217, pp. 558-564.
- Bound J.P y Voulvoulis N. (2006). Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. *Water Research*. 40, pp. 2885-2892.
- Brooks BW. And Huggett DB. (2012). Human Pharmaceuticals in the Environment. Current and Future Perspectives. Springer. New York.
- Brunton L.L., Lazo JS., Parker K. (2012). Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª Edición. Mc Graw Hill. Colombia.
- Caban M., Migowska N., Stepnowski P., Kwiatkowski M., Kumirska J. (2012). Matrix effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of  $\beta$ -blockers and  $\beta$ -agonists in environmental samples. *Journal of Chromatography A*. 1258, pp. 117-127.
- Casas ME., Chhetri RK., Ooi G., Hansen KMS., Litty K., Christensson M., Kragelund C., Andersen HR., Bester K. (2015). Biodegradation of pharmaceuticals in hospital wastewater by staged Moving Bed Biofilm Reactors (MBBR). *Water Research*. 83, pp. 293-302.
- Chu C., Yuan C., Liu X., Yao L., Zhu J., He J., Kwon S., Huang X. (2015). Phenyllobacterium kunshanense sp. nov., isolated from the sludge of a pesticide manufacturing factory. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65, pp. 325-330.

- Chu L. and Wang J. (2011). Comparison of polyurethane foam and biodegradable polymer as carriers in moving bed biofilm reactor for treating wastewater with a low C/N ratio. *Chemosphere*. 83, pp.63-68.
- Chung B.S., Ryu S.H., Park M., Jeon Y., Chung Y.R., Jeon C.O. (2007). Hydrogenophaga caeni sp. nov., isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, pp. 1126-1130.
- Clara M., Kreuzinger N., Strenn B., Gans O., Kroiss H. (2005). The solids retention time - a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research*. 39, pp. 97-106.
- Cleuvers M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*. 142, pp. 185-194.
- Collard H.J., Ji K., Lee S., Liu X., Kang S., Kho Y., Ahn B., Ryu J., Lee J., Choi K. (2013). Toxicity and endocrine disruption in zebrafish (Danio rerio) and two freshwater invertebrates (Daphnia magna and Moina macrocopa) after chronic exposure to mefenamic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 94, pp. 80-86.
- Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., Wiegand, C., 2010. The  $\beta$ -receptor blocker metoprolol alters detoxification processes in the non-target organism Dreissena polymorpha. *Environmental Pollution*. 158, pp. 2059-2066.
- Daughton CG., Ternes TA. (1999). Pharmaceutical and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environmental Health Perspectives*. 107 (Supplement 6): 907-938.
- Dawas A., Gur-Reznik S., Lerman S., Sabbah I., Desoretz C. (2014). Co-metabolic oxidation of pharmaceutical compounds by a nitrifying bacterial enrichment. *Bioresource Technology*. 167, pp. 336-342.
- Deblonde T., Cossu-Leguille C., Hartemann P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 214, pp. 442-448. EPA 712-C-98-076. (1998). Ready Biodegradability.
- Dolinšek J., Lagkouvardos I., Wanek W., Wagner M, Daims H (2013). Interactions of Nitrifying Bacteria and Heterotrophs: Identification of a *Micavibrio*-Like Putative Predator of *Nitrospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 79, pp. 2027-2037.
- Duque JP. (2010). Biotecnología. Panorámica de un sector. Netbiblo. España.
- EPA 712-C-98-076. (1998). Fate, Transport, and Transformation Test Guidelines. Ready Biodegradability. Washington, D.C.
- EPA (2002) Nitrification. Office of Water (4601 M), Washington DC.
- EPA 832-F-00-015. (2000). *Wastewater Technology Fact Sheet. Trickling Filter Nitrification*. Office of Water Washington, D.C.
- Escher B.I., Baumgartner R., Koller M., Treyer K., Lienert J., McArdell C.S. (2011). Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. 45, pp. 75-92.
- Estrada-Arriaga E.B., Mijaylova P. (2011). Calculation methods to perform mass balance of endocrine disrupting compounds in a submerged membrane bioreactor: fate and distribution of estrogens during the biological treatment. *Water Science & Technology*. 64.11, pp. 2158-2168.
- Fahrbach M., Kuever J., Meinke R., Kämpfer P., Hollender J. (2006). Denitratisoma oestradiolicum gen. nov., sp. nov., a 17 $\beta$ -oestradiol- degrading, denitrifying betaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56.
- Fakruddin MD., Chowdhury A., Nur Hossain MD., Mannan KSB., Mazumdar RM. (2012). Pyrosequencing - principles and applications. *International Journal of Life science & Pharma Research*. 2, pp. 65-76.
- Falagán C y Johnson DB. (2014). Acidibacter ferrireducens gen. nov., sp. nov.: an acidophilic ferric iron-reducing gammaproteobacterium. *Extremophiles*. 18(6), pp.1067-73.
- Falás P., Baillon-Dhumez A., Andersen H.R., Ledin A., la Cour Jansen J. (2012). Suspended biofilm carrier and activated sludge removal of acidic pharmaceuticals. *Water Research*. 46, pp. 1167-1175.
- Falás P., Longrée P., Cour Jansen J., Siegrist H., Hollender J. (2013). Micropollutant removal by attached and suspended growth in a hybrid biofilm-activated sludge process. *Water Research*. 47, pp. 4498-4506.
- Falás P., Wick A., Castronovo S., Habermacher J., Ternes TA., Joss A. (2016). Tracing the limits of organic micropollutant removal in biological wastewater treatment. *Water Research*. 95, pp. 240-249.
- Fent K., Westob A. A., Caminada D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. 76, pp. 122-159.

- Fernandez-Fontaina E., Carballa M., Omil F., Lema JM. (2014). Modelling cometabolic biotransformation of organic micropollutants in nitrifying reactors. *Water Research*. 65, pp. 371-383.
- Fernandez-Fontaina E., Gomes IB., Aga DS., Omil f., Lema JM., Carballa M. (2016). Biotransformation of pharmaceuticals under nitrification, nitrataion and heterotrophic conditions. *Science of the Total Environment*. 541, pp. 1439-1447.
- Fernandez-Fontaina E., Omil F., Lema J.M., Carballa M. (2012). Influence of nitrifying conditions on the biodegradation and sorption of emerging micropollutants. *Water Research*. 46, pp. 5434-5444.
- Ferrando-Climent L., Collado N., Buttiglieri G., Gros M, Rodriguez-Roda I., Rodriguez-Mozaz S., Barceló D. (2012). Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Science of the Total Environment*. 438, pp. 404-413.
- Flemming HC., Szewzyk U., Griebe T. (2000). *Biofilms: Investigative Methods and Applications*. Technomic Publishing. USA.
- Forrez I., Boon N., Verstraete., Carballa M. (2011). Biodegradation of Micropollutants and Prospects for Water and Wastewater Biotreatment. *Comprehensive Biotechnology*. 6, pp. 485-494.
- Forrez I., Carballa M., Boom N., Verstraete W. (2009). Biological removal of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) in an aerated nitrifying fixed bed reactor during ammonium starvation. *J Chem Technol Biotechnol*. 84, pp. 119-125.
- Fujii K., Kikuchi S., Satomi M., Ushio N., Morita N. (2002). Degradation of 17 $\beta$ -Estradiol by a Gram-Negative Bacterium Isolated from Activated Sludge in a Sewage Treatment Plant in Tokyo, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, pp. 2057-2060.
- Gabet-Giraud V., Miege C., Choubert J.M., Martin Ruel S., Coquery M. (2010). Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*. 408, pp. 4257-4269.
- Gerardi M. H. (2002). *Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process*. Environmental Protection. Willey Interscience. Nueva York.
- Gerardi M. H. (2006). *Wastewater bacteria*. Wastewater Microbiology Series. John Wiley and Sons. New Jersey.
- Goldman E; Green L.H. (2009). *Practical Handbook of Microbiology*, Second Edition. Taylor & Francis Group. United States of America.
- González M.M. (2006). Estudio del comportamiento de biopelículas aerobias en membranas permeables. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
- González S., López R., Cortina J.L. (2012). Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: A review. *Environmental Pollution*. 161, pp. 83-92.
- González S., Maldonado L.E., González O. (2002). Tratamiento de aguas residuales utilizando biopelículas sobre un material poroso. *XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (AIDIS)*. Cancún, México. Octubre 2002.
- González-Brambila M. y López-Isunza F. (2008). Comportamiento de un reactor de biopelícula para tratamiento de agua residual a diferentes velocidades de flujo. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 7, pp. 183-193.
- Grandclément C., Seyssiecq I., Piram A., Wong-Wah-Chung P., Vanot G., Tiliacos N., Roche N., Doumenq P. (2017). From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. *Water Research*. 111, pp.297-317.
- Gros M., Petrović M., Ginebreda A., Barceló D. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International*. 36, pp. 15–26.
- Grossberger A., Hadar Y., Borch T., Chefetz B. (2014). Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environmental Pollution*. 185, pp. 168-177.
- Guadie A., Xia S., Zhang Z., Zeleke J., Guo W., Ngo H.H., Hermanowicz S.W. (2014). Effect of intermittent aeration cycle on nutrient removal and microbial community in a fluidized bed reactor-membrane bioreactor combo system. *Bioresource Technology*, 156, pp.195–205.
- Guan X., Xie Y., Wang J., Wang J., Liu F. (2014). Electron donors and co-contaminants affect microbial community composition and activity in perchlorate degradation. *Environmental Science and Pollution Research*. 22, pp.6057-6067.

- Gulde R., Meier U., Schymanki EL., Kohler HE., Helbling DE., Derrer S., Rentsch D., Fenner K. (2016). Systematic Exploration of Biotransformation Reactions of Amine-Containing Micropollutants in Activated Sludge. *Environmental Science and Technology*. 50, pp. 2908-2920.
- Guo W., Ngo H., Dharmawan F., Palmer C. (2010). Roles of polyurethane foam in aerobic moving and fixed bed bioreactors. *Bioresource Technology*. 101, pp.1435-1439.
- Gutierrez-Macias T., Nacheva P.M. (2015). Clofibrac acid and gemfibrozil removal in membrane bioreactors. *Water Science & Technology*. 8, pp. 1143-1150.
- Haig S., Gauchotte C., Collins G., Quince C. (2016). Bioaugmentation Mitigates the Impact of Estrogen on Coliform-Grazing Protozoa in Slow Sand Filters. *Environmental Science and Technology*. 50, pp. 3101-3110.
- Hao R., Meng C., Li J. (2016). An integrated process of three-dimensional biofilm-electrode with sulfur autotrophic denitrification (3DBER-SAD) for wastewater reclamation. *Appl Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s00253-016-7534-4.
- Hata T., Kawai S., Okamura H., Nishida T. (2010). Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation. *Biodegradation*. 21, pp. 681-689.
- Hedrich S., Schlömann M., Johnson B. (2011). The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology*. 157, pp. 1551-1564.
- Helbling D., Johnson D.R. Honti M., Fenner K. (2012). Micropollutant Biotransformation Kinetics Associate with WWTP Process Parameters and Microbial Community Characteristics. *Environmental Science & Technology*. 46, pp. 10579-10588.
- Hernandez M.E. Beck D.A.C., Lindstrom M. E., Chistoserdova L. (2015). Oxygen availability is a major factor in determining the composition of microbial communities involved in methane oxidation. *PeerJ*, DOI 10.7717/peerj.801.
- Hibiya K., Nagai J., Tsuneda S., Hirata A. (2004). Simple prediction of oxygen penetration depth in biofilms for wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal*. 19, pp. 61-68.
- Hiraishi A., Muramatsu K., Urata K. (1995). Characterization of New Denitrifying Rhodobacter Strains Isolated from Photosynthetic Sludge for Wastewater Treatment. *Journal of Fermentation and bioengineering*. 79, pp. 39-44.
- Hiras J. Wu Y., Eichorst S., Simmons B. A., Singer S. W. (2016). Refining the phylum Chlorobi by resolving the phylogeny and metabolic potential of the representative of a deeply branching, uncultivated lineage. *The ISME Journal*. 10, pp. 833-845.
- Hörsing S., Lema J.M., Omil F. (2010). Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Research*. 44, pp. 3214-3224.
- Huetos O. (2004). Estudio comparativo y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos de corticosteroides en muestras biológicas. *Memoria para optar al grado de doctor*. Madrid.
- Huetos O. (2004). Estudio comparativo y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos de corticosteroides en muestras biológicas. *Memoria para optar al grado de doctor*. Madrid.
- Ibrahim H. T., Qiang H., Al-Rekabi W.S., Qiqi Y. (2012). Improvements in Biofilm Processes for Wastewater Treatment. *Pakistan Journal of Nutrition*. 11, pp. 610-636.
- Jelic A., Gros M., Ginebreda A., Céspedes-Sánchez R., Ventura F., Petrovic M., Barcelo D. (2011). Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research*. 45, pp. 1165-1176.
- Ji K., Liu X., Lee S., Kang S., Kho Y., Giesy J.P., Choi K. (2013). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. *Journal of Hazardous Materials*. 254-255, pp. 242-251.
- Johansson T., Weildof L., Jurva U. (2007). Mimicry of phase I drug metabolism – novel methods for metabolite characterization and synthesis. *Rapid communications in mass spectrometry*. 21, pp. 2323-2331.
- Jones O. A. H., Voulvoulis N., Lester J. N. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*. 36, pp. 5013-5022.
- Jones O.A.H., Voulvoulis N., Lester J.N. (2003). Analytical Method Development for the Simultaneous Determination of Five Human Pharmaceuticals in Water and Wastewater Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chromatographia*. 58, pp. 471-477.

- Jones R.M., Hedrich S., Johnson B. (2013). *Acidocella aromatica* sp. nov.: an acidophilic heterotrophic alphaproteobacterium with unusual phenotypic traits. *Extremophiles*. 17, pp. 841-850.
- Joss A., Keller E., Alder A. C. Göbel A., McArdell C. S. Ternes T., Siegrist H. (2005). Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research*. 39, pp. 3139-3152.
- Joss A., Zabczynski S., Göbel A., Hoffmann B., Löffler D., McArdell C. S., Ternes T. A. Thomsen A., Siegrist H. (2006). Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Research*. 40, pp. 1686-1696.
- Khan S.T., Hiraishi A. (2002). *Diaphorobacter nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Journal of General and Applied Microbiology*. 48, pp. 299-308.
- Kibbey TCG., Paruchuri R., Sabatini DA., Chen L. (2007). Adsorption of beta blockers to environmental surfaces. *Environmental Science and Technology*. 41, pp.5349-5356.
- Kim J., Song I., Lee S., Kim P., Oh H., Park J., Choung Y. (2010). Decomposition of pharmaceuticals (sulfamethazine and sulfathiazole) using oxygen-based membrane biofilm reactor. *Desalination*. 250, pp. 751-756.
- Kovalova L., Siegrist H., Singer H., Wittmer A., McArdell C.S. (2012). Hospital Wastewater Treatment by Membrane Bioreactor: Performance and Efficiency for Organic Micropollutant Elimination. *Environmental Science & Technology*. 46, pp. 1536-1545.
- Kraigher B. and Mandic-Mulec I. (2011). Nitrification activity and community structure of nitrite-oxidizing bacteria in the bioreactors operated with addition of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*. 188, pp. 78-84.
- Kraigher B., Kosjek T., Heath E., Kompore B., Mandic-Mulec I. (2008). Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. *Water Research*. 42, pp. 4578-4588.
- Kratz R. (2005). *Microbiology the Easy Way*. Barron's Educational Series. Nueva York.
- Kujawa-Roeleveld K. and Schuman E. (2008). Biodegradability and fate of pharmaceutical impact compounds in different treatment processes. *Environmental Technology*.
- Lahti M. (2012). The fate aspects of pharmaceuticals in the environment. *University Library of Jyväskylä*.
- Lamas J. P., Salgado C., García C., Llompert M., Cela R., Gómez M. (2004). Solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry for the analysis of selective serotonin reuptake inhibitors in environmental water. *Journal of Chromatography A*. 1046, pp. 241-247.
- Lapworth D.J., Baran N., Stuart M.E., Ward R. S. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*. 163, pp.287-303.
- Lee J., Whang K. (2014). *Reyranella graminifolia* sp. nov., isolated from bamboo (*Phyllostachys bambusoides*) litter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64, pp. 2503-2507.
- Lemmer H., Zaglauer A., Neef A., Meier H., Amann R. (1997). Denitrification in a methanol-fed fixed-bed reactor. Part 2: composition and ecology of the bacterial community in the biofilms. *Water Research*. 31, pp. 1903-1908.
- Li J. and Bishop P. L. (2004). Time course observations of nitrifying biofilm development using microelectrodes. *Journal of Environmental Engineering and Science*. 2, pp. 523-528.
- Li Y., Zhou J., Gong B., Wang Y., He Q. (2016). Cometabolic degradation of lincomycin in a Sequencing Batch Biofilm Reactor (SBBR) and its microbial community. *Bioresource Technology*. 214, pp.589-595.
- Liem R.T. (2014). Study on Microbial Community fo two estuaries in Midorikawa river and Shirakawa river in Ariake sea. *Graduate School of Science and Technology*. Kumamoto University, Japan.
- Lim J. H., Baek S., Lee S. (2009). *Ferruginibacter alkalilentus* gen. nov., sp. nov. and *Ferruginibacter lapsinans* sp. nov., novel members of the family 'Chitinophagaceae' in the phylum Bacteroidetes, isolated from freshwater sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, pp. 2394-2399.
- Lim J., Seng C., Lim O., Ng S., Sujari. (2011). Nitrogen removal in moving bed sequencing batch reactor using polyurethane foam cubes of various sizes as carrier materials. *Bioresource Technology*. 102, pp.9876-9883.
- Lister A., Regan C., Van Zwol J., Van der Kraak G. (2009). Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation. *Aquatic Toxicology*. 95, pp. 320-329.
- Liu C., Zhao D., Ma W., Guo Y., Wang A., Wang Q., Lee D. (2016). Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters in the presence of *Halomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100, pp. 1421-1426.



- Livermore J.A., Jin Y., Arnseth W., LePuil M., Matters T. E. (2013). Microbial Community Dynamics during Acetate Biostimulation of RDX-Contaminated Groundwater. *Environmental Science & Technology*. 47, pp. 7672-7678.
- Lundström E., Adolffson M., Alsberg T., Björleinius B., Eklund B., Lavén M., Breitholtz M. (2010). Characterization of additional sewage treatment technologies: Ecotoxicological effects and levels of selected pharmaceuticals, hormones and endocrine disruptors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73, pp. 1612-1619.
- Luo Y., Guo W., Hao H., Duc Nghiem L., Ibney F., Kang J., Xia S., Zhang Z., Evan W.. (2014b). Removal and fate of micropollutants in a sponge-based moving bed Bioreactor. *Bioresource Technology*. 159, pp. 311–319.
- Luo Y., Guo W., Hao H., Duc Nghiem L., Ibney F., Zhang J., Liang S., Wang X. (2014a). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*. 473-474, pp. 619–641.
- Luo Y., Jiang Q., Ngo HH., Nghiem LD., Hai FI., Guo WW. (2015). Evaluation of micropollutant removal and fouling reduction in a hybrid moving bed biofilm reactor–membrane bioreactor system. *Bioresource Technology*. 191, pp.355-359.
- Ma Q., Qu T., Shen W., Zhang Z., Wang J., Liu Z., Li D., Li H., Zhou J. (2015). Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Bioresource Technology*. 179, pp. 436-443.
- Maeng S. K., Choi B.B., Lee K.T., Song K.G. (2013). Influences of solid retention time, nitrification and microbial activity on the attenuation of pharmaceuticals and estrogens in membrane bioreactors. *Water Research*. 47, pp. 3151-3162.
- Majewsky M., Gallé T., Yargeau V., Fischer K. (2011). Active heterotrophic biomass and sludge retention time (SRT) as determining factors for biodegradation kinetics of pharmaceuticals in activated sludge. *Bioresource Technology*. 102, pp. 7415-7421.
- Mansour F., Al-Hindi M., Saad W., Salam D. (2016). Environmental risk analysis and prioritization of pharmaceuticals in a developing world context. *Science of the Total Environment*. 557–558, pp. 31-43.
- Martínez Bueno M.J., Gomez M.J., Herrera S., Hernando M.D., Agüera A., Fernández A.R. (2012). Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: Two years pilot survey monitoring. *Environmental Pollution*. 164, pp. 267-273.
- Martins A.M.P., Pagilla K., Heijnen J.J., van Loosdrecht A.C.M. (2003). Filamentous bulking sludge-a critical review. *Water Research*. pp. 794-817.
- McIlroy S. J., Awata T., Nierychlo M., Albertsen M., Kindaichi T., Nielsen P.H. (2015). Characterization of the In Situ Ecophysiology of Novel Phylotypes in Nutrient Removal Activated Sludge Treatment Plants. *PLoS One*. 10, pp. 1-13.
- McMurry J. (2008). *Química Orgánica*. 7ª. Edición. Cengage Learning. México.
- Meincke L., Copeland A., Lapidus A., Lucas S., Berry K.W., Glavina T., Hammon N., Dalin E., Tice H., Pitluck S., Richardson P., Bruce D. (2012). Complete genome sequence of *Polynucleobacter necessarius* subsp. *asymbioticus* type strain (QLW-P1DMWA-1T). *Standards in Genomic Sciences*. 6, pp. 74-83.
- Mendez F., Otsu T., Oyama T., Gimenes J., Esplugas S., Hidaka H., Serpone N. (2011). Photooxidation of the antidepressant drug Fluoxetine (Prozac®) in aqueous media by hybrid catalytic/ozonation processes. *Water Research*. 45, pp. 2782-2794.
- Mendoza N. (2008). *Farmacología Médica*. Editorial Médica Panamericana. México.
- Mennigen J.A., Sassine J., Trudeau V.L., Moon T.W. (2010). Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology*. 100, pp. 354-364.
- Mesquita S. R., Guilhermino L., Guimarães. (2011). Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Chemosphere*. 85, pp. 967-976.
- Metcalf y Eddy. (2014). *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery*. Fifth Edition. Mc Graw Hill. New York.
- Miège C., Choubert J.M., Ribeiro L., Eusèbe M., Coquery M. (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. *Environmental Pollution*. 157, pp. 1721-1726.
- Mijaylova P., Moeller G. (2010). Wastewater treatment using a novel bioreactor with submerged packing bed of polyethylene tape. *Water Science & Technology*. 62.1, pp. 481-489.

- Mijaylova P., Moeller G., Bustos C., Garzón M. A., Hornelas Y. (2008). Comparison of bioreactors with different kinds of submerged packed beds for domestic wastewater treatment. *Water Science & Technology*. 58.1, pp. 29-36.
- Moir JWB. (2011). *Nitrogen Cycling in Bacteria: Molecular Analysis*. Caister Academic Press. Norfolk UK.
- Monteiro SC., Boxall ABA. (2010). Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. 202, pp. 53-154
- Mulheron R. (2014). Microbial Community Assembly found with Sponge Orange Band Disease in *Xestospongia muta* (Giant Barrel Sponge). *Nova Southeastern University NSUWorks*.
- Mustakhimov I., Kalyuzhnaya M.G., Lidstrom M.E. Chistoserdova L.(2013). Insights into Denitrification in *Methylothermobacter mobilis* from Denitrification Pathway and Methanol Metabolism Mutants. *Journal of Bacteriology*. 195, pp. 2207-2211.
- Nakamura Y., Yamamoto H., Sekizawa J., Kondo T., Hirai N., Tatarazako N. (2008). The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere*. 70, pp. 865-873.
- Nandasena K., Yates R., Tiwari R., O'Hara F., Howieson J., Ninawi M., Chertkov O., Detter C., Tapia R., Han S., Woyke T., Pitluck S., Nolan M., Land M., Liolios K., Pati A., Copeland A., Kyrpides N., Ivanova N., Goodwin L., Meenakshi U., Reeve W. (2013). Complete genome sequence of *Mesorhizobium ciceri* bv. *biserrulae* type strain (WSM1271(T)). *Standards in Genomic Sciences*. 9(3), pp. 462-72.
- Nentwig G. (2007). Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates. Part II: The Antidepressant Drug Fluoxetine. *Environmental Contamination and Toxicology*. 52, 163-170.
- NEPTUNE Project. (2010). New sustainable concepts and processes for optimization and upgrading municipal wastewater and sludge treatment. Contract-No. 036845.
- Nielsen U., Hastrup C., Klausen M.M., Pedersen B.M., Kristensen G.H., Jansen J.L.C., Bak S.N., Tuerk J. (2013). Removal of APIs and bacteria from hospital wastewater by MBR plus O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PAC or ClO<sub>2</sub>. *Water Science & Technology*. 67.4, pp. 854-862.
- Nogueira R., Melo LF. (2006). Competition between *Nitrospira* spp. And *Nitrobacter* spp. in nitrite-oxidizing bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 95, pp.169-175.
- Oh Y.J., Lee H., Lim S. K., Kwon M., Lee J., Jang J., Lee J. H., Park H., Roh S., Choi H. (2016). *Lentibacillus kimchii* sp. nov., an Extremely Halophilic Bacterium Isolated from Kimchi. *International Meeting of the Microbiological Society of Korea*.
- Okada N., Nomura N., Nakajima-Kambe T., Uchiyama H. (2005). Characterization of the Aerobic Denitrification in *Mesorhizobium* sp. Strain NH-14 in Comparison with that in Related Rhizobia. *Microbes and Environments*. 20, pp. 208-215.
- Orias F. and Perrodin Y. (2013). Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review. *Science of the Total Environment*. 454-455, pp.250-276.
- Petrie B., Barden R., Kasprzyk-Hordern B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*. 72, pp. 3-27.
- Petrovic M. and Barceló D. (2007). LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*. 26, pp. 486-493.
- Phan H.V., Hai F.I. Zhang R., Kang J., Price W. E., Nghiem L.D. (2016). Bacterial Community Dynamics in an Anoxic-Aerobic Membrane Bioreactor - Impact on Nutrient and Trace. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 109, pp. 61-72.
- Piculell M., Welander P., Jönsson K., Welander T. (2016). Evaluating the effect of biofilm thickness on nitrification in moving bed biofilm reactors. *Environmental technology*. 37, pp. 732-743.
- Plascencia G. (2003). Curso de métodos. Espectrometría de masas. Instituto de biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pomati F., Castiglioni S., Zuccato E., Fanelli R., Vigetti D., Rossetti C., Calamari D. (2006). Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells. *Environmental Science and Technology*. 40, pp. 2442-2447.

- POSEIDON, detailed report related to the overall duration. (2004). Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage, and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse.
- Quan F., Yuxiao W., Tianmin W., Hao Z., Libing C., Chong Z., Hongzhang C., Xiugin K., Xin-Hui X. (2012). Effects of packing rates of cubic-shaped polyurethane foam carriers on the microbial community and the removal of organics and nitrogen in moving bed biofilm reactors. *Bioresource Technology*. 117, pp. 201-207.
- Quintana JB., Weiss S., Reemtsma T. (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research*. 39, pp. 2654-2664.
- Radjenovic J., Escher B.I., Rabaey K. (2011). Electrochemical degradation of the  $\beta$ -blocker metoprolol by Ti/Ru<sub>0.7</sub>Ir<sub>0.3</sub>O<sub>2</sub> and Ti/SnO<sub>2</sub>-Sb electrodes. *Water Research*. 45, pp. 3205-3214.
- Radjenović J., Petrović M., Barcelo D. (2009). Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*. 43, pp. 831-841.
- Ramil M., El Aref T., Kink G., Scheurer M., Ternes TA. (2010). Fate of Beta Blockers in Aquatic-Sediment Systems: Sorption and Biotransformation. *Environmental Science & Technology*. 44, pp. 962-970.
- Rattier M., Reungoat J., Keller J., Gernjak W. (2014). Removal of micropollutants during tertiary wastewater treatment by biofiltration: Role of nitrifiers and removal mechanisms. *Water Research*. 54, pp. 89-99.
- Resmi G., Thampi S.G., Chandrakaran S. (2010a). *Brevundimonas vesicularis*: A Novel Bio-sorbent for Removal of Lead from Wastewater. *International Journal of Environmental Research*. 4(2), pp. 281-288.
- Resmi G., Thampi S.G., Chandrakaran S., Elias P. (2010b). Biosorption of Lead by Immobilized Biomass of *Brevundimonas vesicularis*: Batch and Column Studies. *Journal Separation Science and Technology*. 45.
- Reungoat J., Escher B.I., MAcova M., Keller J. (2011). Biofiltration of wastewater treatment plant effluent: Effective removal of pharmaceuticals and personal care products and reduction of toxicity. *Water Research*. 45, pp. 2751-2762.
- Richardson SD., Kimura SY. (2016). Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*. 6, pp. 88, 546-582.
- Rittman BE., McCarty PL. (2001). *Biotechnology del Medio Ambiente Principios y Aplicaciones*. Editorial Mc-Graw Hill. Madrid, España.
- Rogers HR. (1996). Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. *The Science of the Total Environment*. 185, pp. 3-26.
- Rood D. (2007). *The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers*. Fourth Edition. Wiley- VCH. Sacramento, USA.
- Roos V., Gunnarsson L., Fick j., Larsson D.G. J., Rudén C. (2012). Prioritising pharmaceuticals for environmental risk assessment: Towards adequate and feasible first-tier selection. *Science of the Total Environment*. 421-422, pp.102-110.
- Rosal R., Rodríguez A., Perdigón-Melón J.A., Petre A., García-Calvo E., Gómez J., Agüera A., Fernández-Alba A.R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*. 44, pp. 578-588.
- Rossetti S., Blackall L.L., Levantesii C., Uccelletti D., Tandoi V. (2003). Phylogenetic and physiological characterization of a heterotrophic, chemolithoautotrophic Thiothrix strain isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53, pp. 1271-1276.
- Rubirola A., Llorca M., Rodriguez S., Casas N., Rodriguez I., Barcel D., Buttiglieri G. (2014). Characterization of metoprolol biodegradation and its transformation products generated in activated sludge batch experiments and in full scale WWTPs. *Water Research*. 63, pp. 21-32.
- Saha P., Krishnamurthi S., Mayilraj S., Prasad G.S. Bora T.C. Chakrabarti T. (2005). *Aquimonas voraii* gen. nov., sp. nov., a novel  $\gamma$  proteobacterium isolated from a warm spring of Assam, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, pp. 1491-1495.
- Santos Lúcia H.M.L.M., Araujo A.N., Fachini A., Pena A., Delereu-Matos., Montenegro M.C.B.S.M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*. 175, pp.45-95.

- Scheurer M., Ramil M., Metcalfe CD., Groh S., Ternes TA. (2010). The challenge of analyzing beta-blocker drugs in sludge and wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 396, pp. 845-856.
- Schmidt I., Sliemers O., Schmid M., Bock E., Fuerst J., Kuenen J.G., Jetten M., Strous M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*. 27, pp. 481-492.
- Siemens J., Huschek G., Siebe C., Kaupenjohann M. (2008). Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City Mezquital Valley. *Water Research*. 42, pp. 2124-2134.
- Simões M., Simões L.C. Vieira M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*. 43, pp. 573-583.
- Singh A., Kumar P., Kumari C., Sharma R. (2012). Genome Sequence of *Nitratireductor aquibiodomus* Strain RA22. *Journal of Bacteriology*. 194, pp. 6307.
- Singh N., Gadi R. (2012). Bioremediation of Ni(II) and Cu(II) from wastewater by the nonliving biomass of *Brevundimonas vesicularis*. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. 4(8), pp. 137-142.
- Sinha R.K., Krishnan K. P., Hatha A.A.M., Rahiman M., Thresyamma D.D., Kerkar S. (2017). Diversity of retrievable heterotrophic bacteria in Kongsfjorden, an Arctic fjord. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48, pp. 51-61.
- Smidt P.G., Nielsen H.K., Dorsh M., Stackebrandt E., Ursing J., Blom J., Christensen C., Fredericksen W., Hoffmann S., Holten W., Yin T.Y. (1994). *Lautropia mirabilis* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative motile coccus with unusual morphology isolated from the human mouth. *Microbiology*. 140, pp. 1787-1797.
- Spieck E., Bock E. (2005). The lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2, pp. 149-153.
- Spieck E., Lipski A. (2011). Cultivation, growth physiology, and chemotaxonomy of nitrite-oxidizing bacteria. *Methods in Enzymology*. 486, pp. 109-130.
- Spring S., Jäckel U., Wagner M., Kämpfer P. (2004). *Ottowia thiooxydans* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, N<sub>2</sub>O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of *Aquaspirillum gracile* to *Hylemonella gracilis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, pp. 99-106.
- Srinandan C.S., D'Souza Glen., Srivastava N., Bhusan B.B., Nerurkar A.S. (2012). Carbon sources influence the nitrate removal activity, community structure and biofilm architecture. *Bioresource Technology*. 117, pp. 292-299.
- Steunou A., Astier C., Ouchane S. (2004). Regulation of Photosynthesis Genes in *Rubrivivax gelatinosus*: Transcription Factor PpsR Is Involved in both Negative and Positive Control. *Journal of bacteriology*. 186, pp. 3133-3142.
- Stuart M., Lapworth D., Crene E., Hart A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*. 416, pp. 1-21.
- Suarez S., Lema J.M., Omil F. (2010). Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Research*. 44, pp. 3214-3224.
- Sui Q., Huang J., Deng S., Yu G., Fan Q. (2010). Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China. *Water Research*. 44, pp. 417-426.
- Surpin M.A., Maier R.J. (1998). Roles of the *Bradyrhizobium japonicum* terminal oxidase complexes in microaerobic H<sub>2</sub>-dependent growth. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1364, pp. 37-45.
- Sutton N. B., Van der Kraan G. M., Van Loosdrecht M. C. M., Muyzer G. (2009). Characterization of geochemical constituents and bacterial populations associated with As mobilization in deep and shallow tube wells in Bangladesh. *Water Research*. 43, pp. 1720-1730.
- Tadkaew N., Hai F.I., McDonakd J.A., Khan S.J., Nghiem L.D. (2011). Removal of trace organics by MBR treatment: The role of molecular properties. *Water Research*. 45, pp. 2439-2451.
- Takeuchi M., Hamana Koei., Hiraishi A. (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, pp. 1405-1417.
- Tang B., Yu C., Bin L., Zhao Y., Feng X., Huang S., Fu F., Ding J., Chen C., Li P., Chen Q. (2016). Essential factors of an integrated moving bed biofilm reactor-membrane bioreactor: Adhesion characteristics and microbial community of the biofilm. *Bioresource Technology*. 211, pp. 574-583.
- Taxe-Wuersch A., De Alencastro L.F., Grandjean D., Tarradellas J. (2005). Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research*. 39, pp. 1761-1772.

- Ternes T. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*. 32, pp. 3245-3260.
- Ternes T. and Joss A. (2006). *Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances: The Challenge of Micropollutants in Urban Water Management*. IWA Publishing. UK.
- Ternes TA., Herrmann N., Bonerz M., Knacker HS., Joss A. (2004). A rapid method to measure the solid–water distribution coefficient (Kd) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Research*. 38, pp. 4075-4084.
- Thomas F., Hehemann J., Rebuffet E., Czjzek M., Michel G. (2011). Environmental and gut *Bacteroidetes*: the food connection. *Frontiers in Microbiology*. 2, pp. 1-16.
- Torres AX., Buitrón G. (2012). Biodegradation of nonylphenols using nitrifying sludge, 4-chlorophenol-adapted consortia and activated sludge in liquid and solid phases. *Environmental Technology*. 33, pp. 1727–1737.
- Tortora GJ., Funke BR., Case CL. (2007). *Introducción a la microbiología*. 9ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Tran N.H., Urase T., Ngo H.H., Hu J., Ong S.L. (2013). Insight into metabolic and cometabolic activities of autotrophic and heterotrophic microorganisms in the biodegradation of emerging trace organic contaminants. *Bioresource Technology*. 146, pp. 721-731.
- Tran NH., Urase T., Kusakabe O. (2009). The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds. *Journal of Hazardous Materials*. 171, pp. 1051-1057.
- Triebkorn R., Casper H., Scheil V., Schwaiger J. (2007). Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 387, pp-1405-16.
- Tsukuda S., Christianson L., Kold A., Saito K., Summerfelt S. (2015). Heterotrophic denitrification of aquaculture effluent using fluidized sand biofilters. *Aquacultural Engineering* 64, pp. 49-59.
- Tünay O., Kabdasli I., Arslan-Alaton I. (2010). *Chemical Oxidation Applications for Industrial Wastewaters*. IWA Publishing.
- Urase T., Kikuta T. (2005). Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Research*. 39, pp.1289-1300.
- Valdivia A., González-Martínez., Wilderer P. A. (2007). Biological nitrogen removal with three different SBBR. *Water Science & Technology*. 55, pp. 245-254.
- Van Hulle S.W.H., Vandeweyer H.J.P., Meesschaert B.D., Vanrolleghem P.A., Dejana P., Dumoulin A. (2010). Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams. *Chemical Engineering Journal*. 162, pp. 1-20.
- Ventosa A., Nieto J., Oren A. (1998). Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62, pp. 504-544.
- Verlicchi P., Aukidy M. A., Zambello E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-A review. *Science of the Total Environment*. 429, pp. 123–155.
- Vieno N., Tuhkanen T., Kronberg L. (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research*. 41, pp. 1001-1012.
- Villegas-Navarro A., Rosas L.E., Reyes J.L. (2003). The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C 136, pp. 127-134.
- Vulliet E., Cren-Olivé. (2011). Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution*. 159, pp. 2929-2934.
- Wang B., Peng Y., Guo Y., Zhao M., Wang S. (2016). Illumina MiSeq sequencing reveals the key microorganisms involved in partial nitrification followed by simultaneous sludge fermentation, denitrification and anammox process. *Bioresource Technology*. 207, pp.118-125.
- WEF (2010). *Biofilm Reactors*. *Water Environment Federation*.
- Wei L., Si M., Long M., Zhu L., Li C., Shen X., Wang Y., Zhao L., Zhang L. (2015). *Rhizobacter bergeniae* sp. nov., isolated from the root of *Bergenia scopolosa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65, pp. 479-484.
- Wei X., Li B., Zhao S., Wang L., Zhang H., Li C., Wang S. (2012). Mixed pharmaceutical wastewater treatment by integrated membrane-aerated biofilm reactor (MABR) system - A pilot-scale study. *Bioresource Technology*. 122, pp. 189-195.

- Weigel S., Kallenborn R., Hühnerfuss H. (2004). Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1023, pp. 183-195.
- Wick A., Fink G., Joss A., Siegrist H., Ternes T. A. (2009). Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment. *Water Research*. 43, pp. 1060-1074.
- Wilde M.L., Mahmoud W.M.M., Kümmerer K., Martins A.F. (2013). Oxidation-coagulation of  $\beta$ -blockers by  $K_2FeVIO_4$  in hospital wastewater: Assessment of degradation products and biodegradability. *Science of the Total Environment*. 452-453, pp.137-147.
- Wu G., Nielsen M., Sorensen K., Zhan X., Rodgers M. (2009). Distributions and activities of ammonia oxidizing bacteria and polyphosphate accumulating organisms in a pumped-flow biofilm reactor. *Water Research*. 43, pp. 4599-4609.
- Wuertz S., Bishop P., Wilderer P. (2008). Biofilms in Wastewater Treatment. An Interdisciplinary Approach. IWA Publishing.
- Xiao E. X., Krumins V., Dong Y., Xia T., Ning Z., Xia Q., Sun W. (2016). Microbial diversity and community structure in an antimony-rich tailings dump. *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s00253-016-7598-1.
- Xu Y., Yuan Z., Jie Ni B. (2016). Biotransformation of pharmaceuticals by ammonia oxidizing bacteria in wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment*. 566-567, pp. 796-805.
- Ye L., Shao M., Zhang T., Yan A. H., Lok S. (2011). Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing. *Water Research*. 45, pp. 4390-4398.
- Yi T. and Harper W.F. (2007). The Link between Nitrification and Biotransformation of  $17\alpha$ -Ethinylestradiol. *Environmental Science & Technology*. 41, pp. 4311-4316.
- Yu C., Roh H., Huichu K. (2007).  $17\beta$ -Estradiol-Degrading Bacteria Isolated from Activated Sludge. *Environmental Science and Technology*. 41, pp. 486-492.
- Zhang J., Gu T., Zhoi Y., He J., Zheng L., Li W., Huang X., Li S. (2012). *Terrimonas rubra* sp. nov., isolated from a polluted farmland soil and emended description of the genus *Terrimonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62, pp- 2593-2597.
- Zhao J., Li Y., Zhang C., Zeng Q., Zhou Q. (2008). Sorption and degradation of bisphenol A by aerobic activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*. 155, pp. 305-311.
- Zhu Y., Zhang Y., Ren H., Geng J., Xu K., Huang H., Ding L. (2015). Physicochemical characteristics and microbial community evolution of biofilms during the start-up period in a moving bed biofilm reactor. *Bioresource Technology*. 180, pp.345-351.
- Zorn M. E. Gibbons R. D. Sonzogni W. C. (1997). Weighted Least-Squares Approach To Calculating Limits of Detection and Quantification by Modeling Variability as a Function of Concentration. *Analytical Chemistry*. 69, pp. 3069-3075.

---

## 7. PUBLICACIONES Y MEMORIAS EN CONGRESOS

### PUBLICACIONES EN REVISTAS

Flores Y., Mijaylova P. (2017). Biodegradability of fluoxetine, mefenamic acid, and metoprolol using different microbial consortiums. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI 10.1007/s11356-017-8413-y.

Flores Y., Mijaylova P. (2017). Removal of pharmaceuticals from municipal wastewater by aerated submerged attached growth reactors. *Journal of Environmental Management*. 192, 243-253.

### CONGRESOS

Y. Flores, P. Mijaylova, "Removal of pharmaceuticals from municipal wastewater by aerated submerged attached growth reactors", Memorias del 13th IWA Specialized Conference on Small Water and Wastewater Systems, Atenas, Grecia, 2016.

Y. Flores, P. Mijaylova, "Fluoxetine, mefenamic acid and metoprolol removal using immobilized biomass reactors", Memorias del 13th IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies, Jerez de la Frontera, España, 2016.

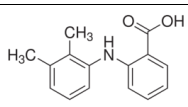
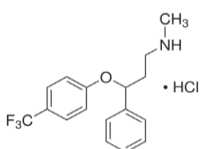
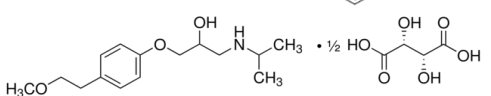
Y. Flores, N. Ramírez, M. Sánchez, P. Mijaylova and L.A. González, "Method Development for the Determination of Fluoxetine, Mefenamic Acid and Metoprolol concentrations in Wastewater and Suspended Biomass", Memorias del 4th IWA Young Water Professional Conference, Guanajuato, México, 2015.

**ANEXO 1****DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO MEFENÁMICO, FLUOXETINA Y METOPROLOL EN AGUA Y BIOMASA****Método**

El método analítico se implementó de la siguiente manera:

1. Se detectaron los compuestos y se identificaron los iones característicos.
2. Se seleccionó el agente derivatizante.
3. Se identificaron las mejores condiciones de operación del cromatógrafo de gases y del espectrómetro de masas/masas para la detección de los fármacos.
4. Se optimizó la derivatización (cantidad de agente derivatizante y tiempo de derivatización).
5. Se realizaron curvas de calibración de cada compuesto.
6. Se optimizó la extracción en fase sólida.
7. Se validó el método cromatográfico.

**Reactivos****Tabla A1.1.** Características de los compuestos farmacéuticos

Compuesto	Estructura	pK <sub>a</sub>	Peso molecular	Número CAS
Ácido mefenámico		3.89-4.48 <sup>a, b, c</sup>	241.29	61-68-7
Clorhidrato de fluoxetina		9.8-10.01 <sup>a, c</sup>	345.79	56296-78-7
Tartrato de metoprolol		9.08-9.6 <sup>a, c</sup>	684.81	56392-17-7

**Referencias:** <sup>a</sup> Rosal *et al.*, 2010; <sup>b</sup> Escher *et al.*, 2011; <sup>c</sup> Kovalova *et al.*, 2012.

**Equipo**

Se utilizó un cromatógrafo de gases con trampa iónica Varian CP-3800, acoplado a un espectrómetro de masas/masas Varian Saturn 2200, como fase estacionaria se usó una columna capilar de sílice fundida HP-5MS (5 %-fenil)-metilpolisiloxano de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25 µm de grosor, mientras que en la fase móvil, el gas acarreador fue helio.

**Soluciones**

Se prepararon soluciones estándar de 1000 µg·mL<sup>-1</sup> de cada compuesto, se tomó en consideración la corrección del peso de acuerdo a su pureza, se usó metanol como disolvente para el ácido mefenámico y el metoprolol, se usó acetona para la fluoxetina. Posteriormente, mediante una dilución adicional de la solución madre estándar con metanol o acetona, se prepararon diluciones primarias de cada compuesto, las soluciones fueron almacenadas en viales ámbar a 4 °C (las diluciones primarias de la solución estándar son estables por un año cuando se almacenan en viales ámbar a 10°C o menos) (Método EPA 526).



## **Análisis cualitativo y cuantitativo**

Para el análisis cualitativo se utilizó el equipo en modo SCAN (todos los iones comprendidos en un rango), haciendo un barrido desde 40 hasta 400  $m/z$ , de esta forma se identificaron los iones característicos de los compuestos. El análisis cuantitativo se efectuó a través del monitoreo selectivo de iones (SIM, por sus siglas en inglés), este modo de detección selecciona solo un ion o un conjunto, en lugar de adquirir un espectro completo en cada barrido, de tal manera que se logra tener una alta especificidad en la detección, ya que se eliminan las señales que podrían originarse por otros compuestos presentes en la muestra. El análisis cuantitativo se basa en la comparación del área del pico del componente de interés con la concentración conocida de los estándares.

## **Selección del agente derivatizante y optimización de la derivatización**

La derivatización de cada compuesto farmacéutico se realizó por duplicado y se evaluaron dos tipos de agentes derivatizantes: BSTFA + 1% TMCS (*N,O*-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida con 1 % de trimetilclorosilano) y MSTFA + 1% TMCS (*N*-Metil-*N*-(trimetilsilil) trifluoroacetamida con 1 % de trimetilclorosilano). Se colocó en un vial la dilución primaria de la solución estándar a una concentración de  $50.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácido mefenámico,  $14.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de fluoxetina,  $52.75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de metoprolol y se expuso a una corriente de nitrógeno con la finalidad de eliminar el disolvente, luego se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del derivatizante, se agitó en un agitador vortex y se calentó en la estufa a  $80^\circ\text{C}$  durante 30 min. Después de la derivatización, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente, se llevó nuevamente a sequedad con nitrógeno y posteriormente se aforó a un volumen de 1 mL con tolueno para su posterior inyección al cromatógrafo de gases. Una vez seleccionado el agente derivatizante, se evaluaron dos cantidades (50 y 100  $\mu\text{L}$ ) para la derivatización de distintas concentraciones de fármacos ( $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Además, las reacciones fueron investigadas a  $80^\circ\text{C}$  por 30, 60 y 90 min para determinar el tiempo de reacción óptimo. De esta manera, se seleccionaron las mejores condiciones para llevar a cabo la derivatización de los compuestos.

## **Condiciones de operación del equipo**

Como siguiente paso, para encontrar las condiciones que permitan establecer un método, se realizaron ensayos con las condiciones de operación del cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas/masas. Las condiciones de operación se variaron de acuerdo a la respuesta de los equipos como la resolución y el área de los picos. Para establecer las condiciones de operación del cromatógrafo de gases, se realizó una corrida con una mezcla de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cada fármaco.

## **Curvas de calibración y linealidad**

Se trazó una curva de calibración de cada compuesto farmacéutico para realizar la cuantificación en un rango de concentración de  $0.01$ - $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , de acuerdo al rango esperado en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. En una curva de calibración externa, cantidades conocidas de los analitos son diluidas en un disolvente apropiado para ser medidas. En una curva de calibración interna se toma en cuenta la influencia de la preparación de la muestra, se agrega una cantidad conocida del analito a una muestra matriz no contaminada, la composición de la matriz seleccionada debe ser cercana a la muestra real, las soluciones reciben todo el tratamiento de la muestra. En ambos casos, el rango de calibración usado debe cubrir las concentraciones encontradas en las muestras (Ternes y Joss, 2006). Para elaborar las curvas de calibración externas, se prepararon estándares de calibración a partir de la solución estándar con los fármacos a la concentración deseada, posteriormente se llevó a cabo la derivatización de los compuestos. El análisis en cada punto se realizó por triplicado y se graficó la media de las áreas de los picos. Un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la

respuesta obtenida cuando se aplica el método y la concentración del analito dentro del rango de trabajo. Se utiliza como criterio de la linealidad un coeficiente de correlación lineal (R) elevado.

## TRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN FASE LÍQUIDA

**Extracción en fase sólida (EFS).** La extracción en fase sólida fue usada para concentrar los compuestos farmacéuticos y remover componentes interferentes. Los fármacos fueron extraídos con cartuchos Oasis HLB, esto es con balance hidrofílico-lipofílico (el hidrofílico N-vinilpirrolidona y el lipofílico divinilbenzeno) con una capacidad de resina de 200 mg, partículas de 30  $\mu\text{m}$  y diámetro de poro de 84 Å. Una de las características de estos cartuchos es la retención de un amplio rango de compuestos tanto polares como no polares, proporcionando altas y reproducibles recuperaciones para compuestos ácidos, básicos y neutros, además, este tipo de cartuchos retienen los analitos ionizados (Huetos, 2004).

**Acondicionamiento y extracción.** Los cartuchos fueron acondicionados con 10 mL de metanol y 10 mL de agua (grado HPLC). Una vez acondicionados los cartuchos, 1 L de muestra a distintas concentraciones de fármacos ( $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) se hizo pasar a través de los cartuchos mediante vacío en un manifold. Durante la extracción en fase sólida las moléculas del analito son retenidas en el adsorbente, las moléculas de disolvente e interferencias no son retenidas, para eliminar los componentes de interferencias restantes, se hicieron pasar 4 mL de solución metanol-agua (5:95, v/v) a través del material adsorbente.

**Elución.** Los cartuchos fueron secados con vacío durante 3 h para eliminar la humedad. Para definir el procedimiento de elución adecuado, la elución se llevó a cabo con dos solventes diferentes (4 mL de acetato de etilo y 4 mL de metanol). Finalmente, los extractos de la elución fueron concentrados mediante una corriente suave de nitrógeno para su posterior derivatización.

**Derivatización.** Los analitos fueron derivatizados mediante silylación usando el derivatizante BSTFA + 1% TMCS, se usaron 100  $\mu\text{L}$  del derivatizante, la derivatización se llevó a cabo a  $80^\circ\text{C}$  durante 60 min, donde el hidrógeno del grupo ácido y amino de los fármacos puede ser reemplazado por el grupo trimetilsilil. Después de la derivatización, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente, se llevó nuevamente a sequedad con nitrógeno, posteriormente se aforó a 1 mL con tolueno para su inyección al cromatógrafo de gases.

## VALIDACIÓN DEL MÉTODO

### Exactitud y Precisión

La **exactitud** expresa la proximidad entre el valor verdadero y el valor experimentalmente encontrado, se determina como el porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito. Los porcentajes de recuperación se obtuvieron a partir de 7 muestras de 1.0 L fortificadas con los fármacos.

$$\% \text{ recuperación} = (\text{concentración cuantificada promedio} / \text{concentración teórica}) * 100$$

El porcentaje de recuperación de los compuestos debe ser del  $\pm 30 \%$  del valor verdadero.

La **precisión** se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa. La desviación estándar relativa se calcula al dividir la desviación estándar (S) entre el valor promedio del porcentaje de recuperación. La desviación estándar relativa expresada en términos de porcentajes también recibe el nombre de coeficiente de variación (CV).

$$CV = (S / \text{recuperación}) * 100$$

Los resultados de las réplicas analizadas deben ser menores al 20 %.

### Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

El **límite de detección** es la mínima concentración de un analito que puede ser identificada, medida y reportada con 99 % de confianza. El límite de cuantificación es la concentración mínima que puede ser reportada como un valor cuantificado de un analito en una muestra siguiendo los análisis. Esta concentración no debe ser más baja que el menor estándar de calibración.

La determinación de los límites de detección y cuantificación de los fármacos se realizó a partir del análisis estadístico de siete réplicas de blancos fortificados de laboratorio a una concentración cerca del mínimo nivel en la curva de calibración ( $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). El blanco fortificado de laboratorio es una alícuota de agua reactiva a la cual se le agregan cantidades conocidas de los analitos del método. Se analizaron las réplicas exactamente como una muestra, a través de todos los pasos y se calculó el límite de detección mediante la siguiente ecuación:

$$LD = St_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$$

$t = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$  = valor para la función de distribución  $t$  de Student a un 99 % de confianza para  $n-1$  grados de libertad = 3.7469

$n$  = número de réplicas

$S$  = desviación estándar de las réplicas analizadas

El **límite de cuantificación** puede ser establecido a una concentración que es mayor de tres veces el límite de detección o mediante la concentración en la curva de calibración a la cual la relación señal-ruido sea mayor de cinco (Método 526 EPA) o 10 veces la desviación estándar usada para calcular el límite de detección (Zorn *et al.*, 1997). El límite de cuantificación se calculó de la siguiente manera:

$$LC = 10(S) + X$$

$X$  = promedio de las 7 réplicas de blancos fortificados de laboratorio,  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

### MÉTODO ANALÍTICO EN SÓLIDO

Los fármacos que son sorbidos y permanecen en el lodo de los reactores son extraídos mediante un método de extracción con disolventes bajo tratamiento ultrasónico. En esta extracción sólido/líquido, un disolvente orgánico es agregado a la muestra sólida y la extracción toma lugar bajo tratamiento ultrasónico (Ternes y Joss, 2006). Para realizar la validación, se secó y se pesó biomasa libre de fármacos, posteriormente los fármacos fueron adicionados a la biomasa a una concentración de  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , después se adicionaron 25 mL de metanol y la muestra fue sonicada durante 20 min, el sobrenadante obtenido fue filtrado y colectado en un matraz bola, el mismo procedimiento se realizó tres veces, los sobrenadantes fueron concentrados en un rotaevaporador hasta casi 1 mL. Finalmente la muestra fue reconstituida a 500 mL con agua grado HPLC para seguir el mismo método de las muestras líquidas.

Los porcentajes de recuperación, límites de detección y cuantificación fueron determinados siguiendo los mismos pasos mencionados para las muestras líquidas. En muestras subsecuentes, para cuantificar los fármacos sorbidos en la biomasa, la biomasa debe ser secada por liofilización, seguido de la extracción con tratamiento ultrasónico.

## RESULTADOS

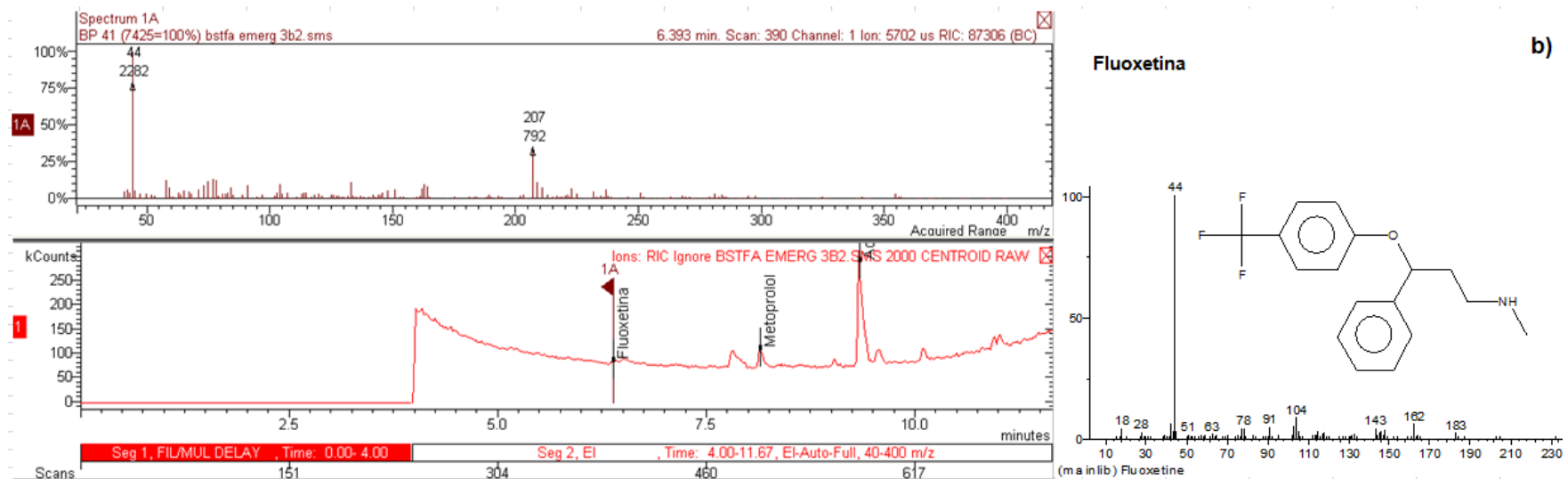
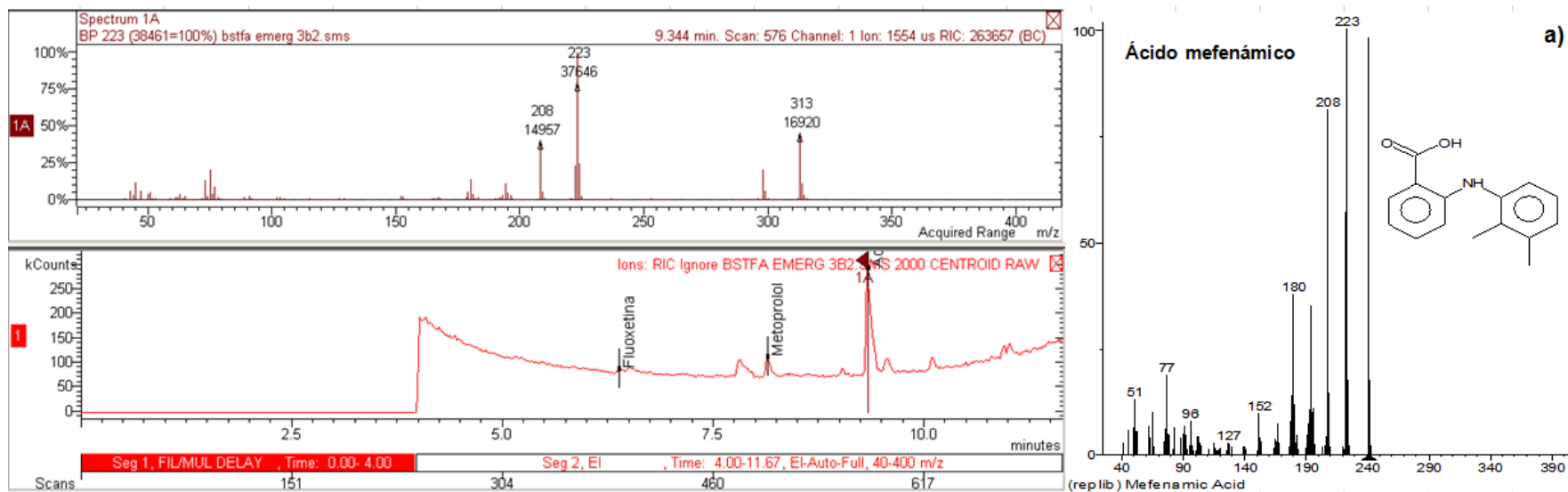
### Identificación de iones y condiciones de operación del equipo

Durante el análisis cualitativo los iones característicos identificados fueron: ácido mefenámico (223), fluoxetina (44) y metoprolol (72) (Figura A1.1). En términos de condiciones de operación seleccionadas, el volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{L}$  a una temperatura de 260  $^{\circ}\text{C}$  y una velocidad de flujo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , se aplicó un modo de inyección splitless (lo cual significa que la totalidad del volumen de inyección fue usado para el análisis). La programación de aumento de temperaturas (rampa de temperatura), ya sea en forma continua o por etapas, permite separar los diferentes analitos sin correr el riesgo de decompuestos. Se inició con una temperatura de 150  $^{\circ}\text{C}$  por 2 min; luego se aumentó a una velocidad de 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta llegar a 250  $^{\circ}\text{C}$  y finalmente se elevó la temperatura 15  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta 290  $^{\circ}\text{C}$ , como resultado se obtuvo un tiempo total de corrida de 14.67 min. El tiempo de retención es el tiempo que un compuesto tarda en recorrer la columna, éste se asigna al pico correspondiente, si la columna y todas las condiciones de funcionamiento de un equipo se mantienen constantes, el compuesto siempre tendrá el mismo tiempo de retención. El tiempo de retención del ácido mefenámico fue de 12.291 min, mientras que el tiempo de retención de la fluoxetina fue de 9.270 min y de 11.135 min para el metoprolol. La Tabla A1.2 muestra los iones y tiempos de retención reportados en la literatura. Se seleccionaron las siguientes condiciones del espectrómetro de masas: electroionización con 70 eV, temperatura de la trampa del ion de 250  $^{\circ}\text{C}$ , voltaje del multiplicador de 180 V y monitoreo selectivo de iones (223+44+72). Las Tablas A1.3 y A1.4 presentan las condiciones de los equipos que han sido reportadas en la literatura y las condiciones seleccionadas.

**Tabla A1.2.** Iones característicos y tiempos de retención

Fármaco	iones reportados, $m/z$	Tiempos de retención reportados, min	Ion característico	Tiempo de retención, min
Ácido mefenámico	<u>224</u> <sup>a, e</sup> , <u>298</u> <sup>e</sup>	14.35 <sup>e</sup> , 15-15.5 <sup>a</sup>	<b>223</b>	<b>12.291</b>
Fluoxetina	<u>44</u> <sup>c</sup> , 86 <sup>c</sup> , 117 <sup>c</sup> , 190 <sup>c</sup> , 352 <sup>c</sup>	11.48 <sup>c</sup>	<b>44</b>	<b>9.270</b>
Metoprolol	<u>72</u> <sup>d, g</sup> , 223 <sup>d</sup> , <u>223</u> <sup>f</sup> , 239 <sup>f</sup> , 324 <sup>f</sup>	19.15 <sup>d</sup> , 17.39 <sup>f</sup> , 15.0 <sup>g</sup>	<b>72</b>	<b>11.135</b>

**Referencias:** <sup>a</sup> Jones *et al.*, 2003; <sup>b</sup> Weigel *et al.*, 2004; <sup>c</sup> Lamas *et al.*, 2004; <sup>d</sup> Azzous *et al.*, 2010; <sup>e</sup> Baillon-Dhumez, 2010; <sup>f</sup> Bisceglia *et al.*, 2010, <sup>g</sup> Caban *et al.*, 2012. Iones de cuantificación (subrayados).



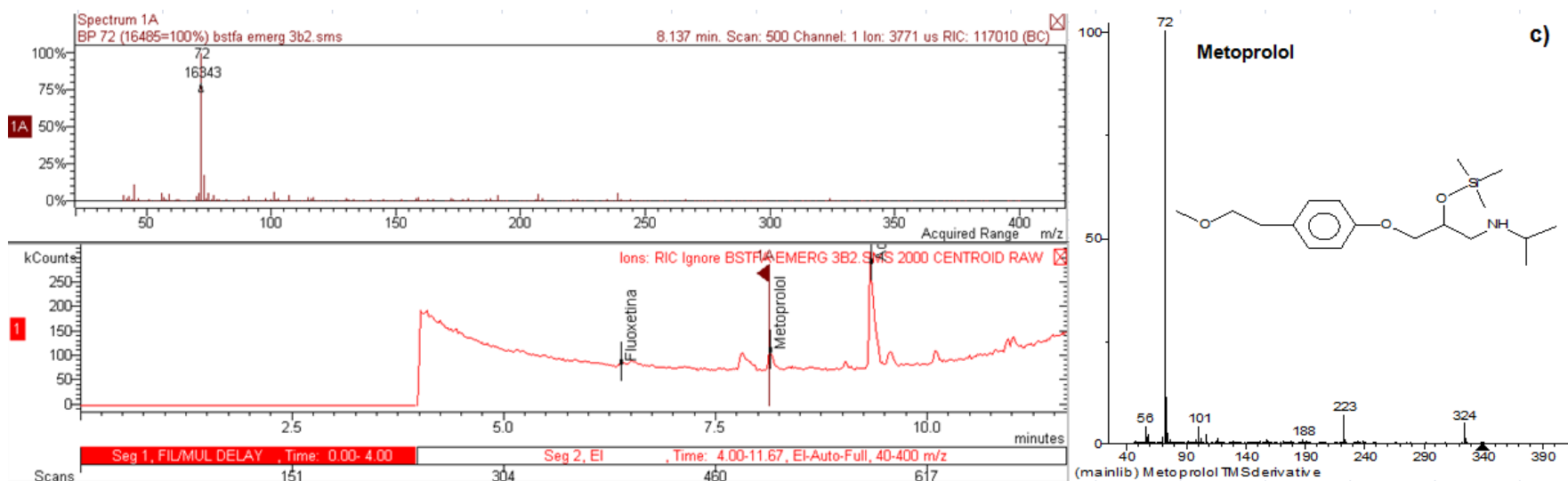


Figura A1.1. Iones presurosos: a) ácido mefenámico; b) fluoxetina; c) metoprolol

Tabla A1.3. Condiciones reportadas y seleccionadas del cromatógrafo de gases

	Condiciones reportadas	Condiciones seleccionadas
Temperatura del inyector	250 °C <sup>a</sup> , 240 °C <sup>c</sup> , 300 °C <sup>d</sup>	260 °C
Inyección	2 µL <sup>a, c, d</sup> , 1 µL <sup>b</sup>	1 µL
Modo de inyección	Splitless <sup>c</sup>	Splitless
Flujo de la columna	1 mL·min <sup>-1</sup> <sup>c</sup>	1 mL·min <sup>-1</sup>
Gas acarreador	Helio <sup>a, b, d</sup>	Helio
Condiciones de la columna (Gradiente de temperatura)	[70 °C (1min); 14 °C·min <sup>-1</sup> hasta 150 °C; 6 °C·min <sup>-1</sup> hasta 290 °C. Tiempo total de corrida 30 min] <sup>b</sup> [105 °C (1min); 8 °C·min <sup>-1</sup> hasta 285 °C, finalmente 10 min a 285 °C] <sup>c</sup> [100 °C (1 min); 10 °C·min <sup>-1</sup> hasta 300 °C y finalmente 10 min a 300 °C] <sup>d</sup>	[150 °C (2min); 10 °C·min <sup>-1</sup> hasta 250 °C; finalmente 15 °C·min <sup>-1</sup> hasta 290 °C] Tiempo total de corrida 14.67 min

Referencias: <sup>a</sup> Weigel *et al.*, 2004; <sup>b</sup> Azzous *et al.*, 2010; <sup>c</sup> Bisceglia *et al.*, 2010; <sup>d</sup> Caban *et al.*, 2012.

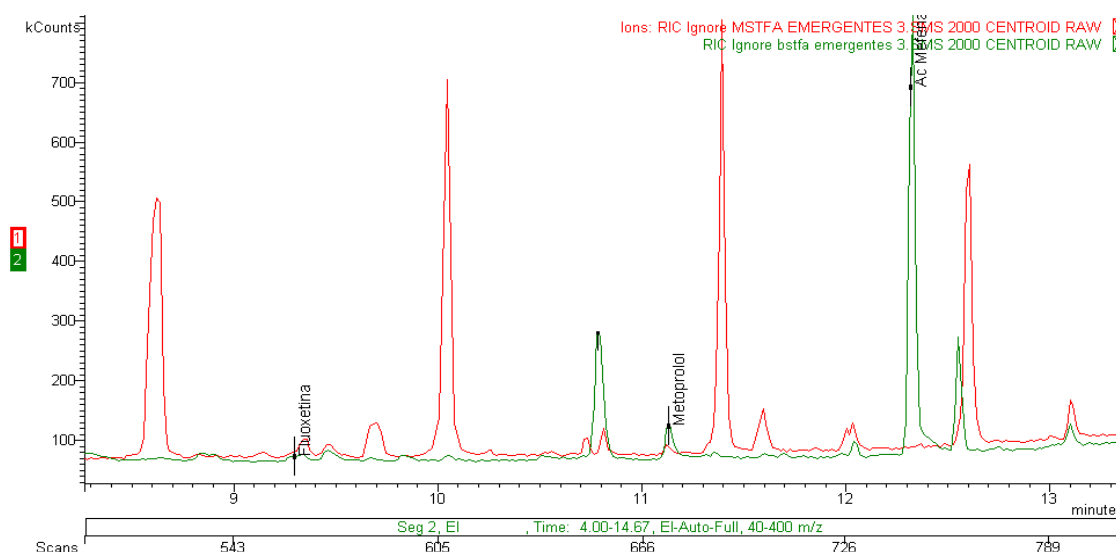
**Tabla A1.4.** Condiciones de operación del espectrómetro de masas/masas

	Condiciones reportadas	Condiciones seleccionadas
Tiempo de escaneo		1 s/escaneo
m/z	60-500 <sup>b</sup>	Monitoreo selectivo de iones (223+44+72)
Voltaje del multiplicador		180 volts
Modo de ionización	70 eV <sup>a,b,c</sup>	Electroionización con 70 eV
Temperatura de la trampa del ion	200°C <sup>a,b</sup>	250°C
Corriente de emisión	10 <sup>a</sup>	80 microamperes

Referencias: <sup>a</sup> Weigel *et al.*, 2004; <sup>b</sup> Azzous *et al.*, 2010; <sup>c</sup> Bisceglia *et al.*, 2010.

### Selección del agente derivatizante y optimización de la derivatización

Los resultados de la comparación de los dos agentes derivatizantes (BSTFA + 1% TMCS y MSTFA + 1% TMCS) indicaron que BSTFA + 1% TMCS es el agente derivatizante más apropiado para la detección simultánea del ácido mefenámico, fluoxetina y metoprolol. Los mejores resultados fueron obtenidos adicionando un volumen de 100  $\mu\text{L}$  del derivatizante y calentando a 80°C durante 60 min. En la Figura A1.2 se observa la detección de los compuestos farmacéuticos con cada derivatizante.



**Figura A1.2.** Comparación de los agentes derivatizantes BSTFA + 1% TMCS y MSTFA + 1% TMCS

### Curvas de calibración

Los resultados cuantitativos fueron calculados por la integración de los picos de las áreas obtenidas en el monitoreo selectivo de iones. Un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida cuando se aplica el método y la concentración del analito dentro del rango de trabajo. Los criterios de aceptación implican un coeficiente de correlación lineal (R) elevado. Los coeficientes de regresión lineal ( $R^2$ ) de las curvas de calibración para el intervalo de concentración de 0.01-0.2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  fueron de 0.999 para el ácido mefenámico, 0.9983 para la fluoxetina y 0.9981 para el metoprolol (Figura A1.3), lo cual significa una correlación positiva.

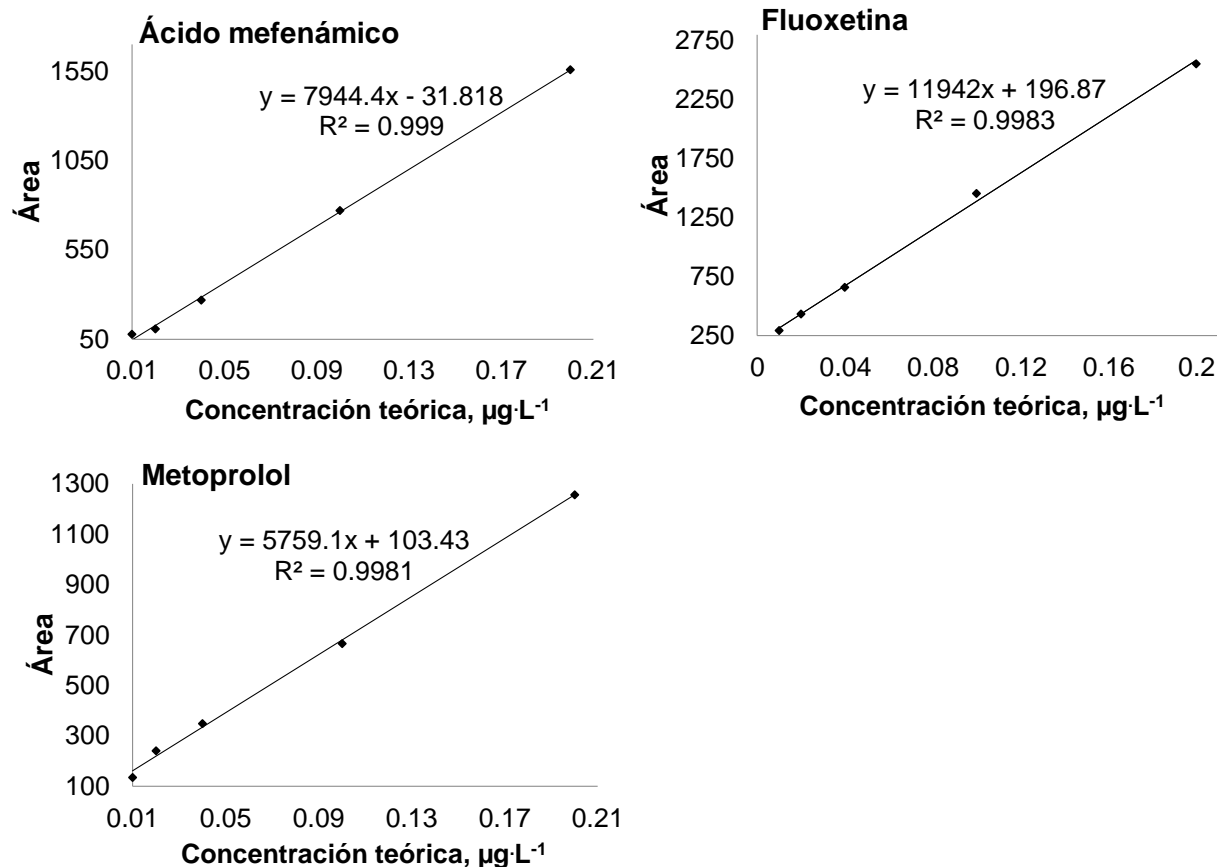


Figura A1.3. Curvas de calibración

### Validación del método

**Exactitud y precisión.** La eficiencia de la extracción en fase sólida se calculó a través de la comparación de las relaciones de área entre los compuestos eluidos después del procedimiento de extracción en fase sólida y de los estándares sin extraer. Después del procedimiento de extracción en fase sólida se obtuvieron recuperaciones promedio mayores al 90 %, por lo tanto, se cumplió con el criterio de aceptación del 70-130 % del valor verdadero, de acuerdo a estos resultados, los cartuchos OASIS HLB son adecuados para la extracción simultánea de los tres fármacos. Por otro lado, la validación del procedimiento de las muestras en fase sólida (biomasa suspendida) también cumplió con el criterio de aceptación, los porcentajes de recuperación promedio fueron mayores al 90 %. Los coeficientes de variación de los resultados de las siete réplicas fueron menores al 7 % para los tres compuestos en las fases líquida y sólida, éste debe ser menor al 20 %, por lo que se cumplió con el criterio de aceptación y los valores indicaron que el método es preciso. Los resultados de las siete réplicas realizadas para la validación de los métodos en fase líquida y sólida son presentados en las Tablas A1.5 y A1.6.

**Límites de detección y cuantificación.** Finalmente, los límites de cuantificación establecidos en la fase líquida fueron  $0.0125 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para el ácido mefenámico,  $0.0166 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para la fluoxetina y  $0.0163 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para el metoprolol, mientras que los límites de detección fueron  $0.0006 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0.0024 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $0.0024 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Del mismo modo, los límites de cuantificación establecidos en el caso de la fase sólida (biomasa suspendida) fueron  $0.1426 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  para el ácido mefenámico,  $0.1815 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  para la fluoxetina y  $0.1639 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  para el metoprolol, mientras sus límites de detección fueron  $0.0169 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $0.0277 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  para la fluoxetina y  $0.0208 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente.



Tabla A1.5. Porcentajes de recuperación de los fármacos en fase líquida

Muestra	ÁCIDO MEFENÁMICO			FLUOXETINA		METOPROLOL	
	Concentración teórica, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Concentración obtenida, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	% Recuperación	Concentración obtenida, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	% Recuperación	Concentración obtenida, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	% Recuperación
1	0.01	0.0109	109.00	0.0099	99.00	0.0109	109.00
2	0.01	0.0109	109.00	0.01	100.00	0.0093	93.00
3	0.01	0.0108	108.00	0.0104	104.00	0.0104	104.00
4	0.01	0.0112	112.00	0.0091	91.00	0.0093	93.00
5	0.01	0.0108	108.00	0.0109	109.00	0.0098	98.00
6	0.01	0.0111	111.00	0.0098	98.00	0.0093	93.00
7	0.01	0.0109	109.00	0.0109	109.00	0.0102	102.00
	Promedio	0.0109	109.20	0.0101	101.43	0.0099	98.86
	Desviación estándar	0.0002	1.40	0.0006	5.97	0.0006	5.89
	Coficiente de Variación	1.3816		6.3604		6.4356	
	<b>Límite de Detección</b>	0.0006		0.0024		0.00239	
	<b>Límite de Cuantificación</b>	0.0125		0.0166		0.01625	

**Tabla A1.6.** Porcentajes de recuperación de los fármacos en fase sólida

Muestra	ÁCIDO MEFENÁMICO			FLUOXETINA		METOPROLOL	
	Concentración teórica, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Concentración obtenida, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	% Recuperación	Concentración obtenida, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	% Recuperación	Concentración obtenida, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	% Recuperación
1	0.1	0.0961	96.10	0.1041	104.10	0.1138	113.80
2	0.1	0.0911	91.10	0.0991	99.10	0.1099	109.90
3	0.1	0.092	92.00	0.1115	111.50	0.1128	112.80
4	0.1	0.1007	100.70	0.1058	105.80	0.1125	112.50
5	0.1	0.1024	102.40	0.0993	99.30	0.1063	106.30
6	0.1	0.0996	99.60	0.1138	113.80	0.1048	104.80
7	0.1	0.1007	100.70	0.1185	118.50	0.0984	98.40
	Promedio	0.0975	96.46	0.1074	107.44	0.1084	108.36
	Desviación estándar	0.0045	4.19	0.0074	6.85	0.0056	5.14
	Coeficiente de Variación	4.6255		6.8911		5.1236	
	<b>Límite de Detección</b>	0.0169		0.0277		0.0208	
	<b>Límite de Cuantificación</b>	0.1426		0.1815		0.1639	

**Tabla A1.7.** Resumen de los datos de validación del método analítico

Compuesto	Ion	Recuperación, % Agua	CV Agua	LD, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Agua	LC, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Agua	Recuperación, % Biomasa	CV Biomasa	LD, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Biomasa	LC, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Biomasa
Ácido mefenámico	223	109 ± 1	1.38	0.0006	0.0125	90 ± 4	4.63	0.0169	0.1426
Fluoxetina	44	101 ± 6	6.36	0.0024	0.0166	99 ± 6	6.89	0.0277	0.1815
Metoprolol	72	99 ± 6	6.44	0.0024	0.0163	104 ± 5	5.12	0.0208	0.1639

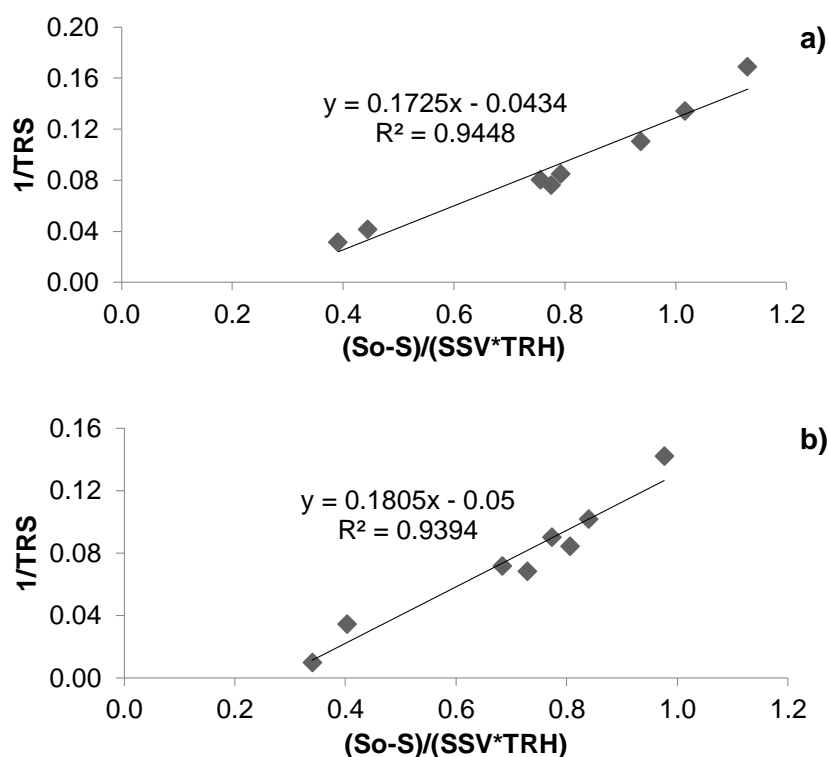
LD - límite de detección; LC - límite de cuantificación; CV - coeficiente de variación

**ANEXO 2****DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES CINÉTICOS**

Los coeficientes de producción de biomasa ( $Y$ ) y decaimiento endógeno ( $k_d$ ) fueron determinados mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{TRS} = Y \frac{S_0 - S}{SSV \cdot TRH} - k_d \quad \text{.....Metcalf y Eddy, 2014}$$

Los valores fueron obtenidos graficando  $1/TRS$  contra  $(S_0 - S)/(SSV \cdot TRH)$  de las diferentes fases experimentales con cada soporte, la pendiente de la línea recta es  $Y$  ( $gSSV \cdot gDQO^{-1}$ ) y la ordenada al origen es  $k_d$  ( $gSSV \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$ ).



**Figura A2.1. Coeficientes cinéticos.** a) Cintas de polietileno; b) Cubos de poliuretano

Los valores de los coeficientes cinéticos para cada tipo de soporte se presentan en la Tabla A.2.1.

**Tabla A.2.1.** Valores de los coeficientes cinéticos

<b>Soporte</b>	<b>Y</b> gSSV·gDQO <sup>-1</sup>	<b>k<sub>d</sub></b> gSSV·gSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>
Cintas de polietileno	0.17	0.04
Cubos de poliuretano	0.18	0.05

El coeficiente de producción de biomasa describe la relación de la cantidad de biomasa producida y la cantidad de sustrato consumido, debido a que la biomasa es principalmente material orgánico, un incremento en la biomasa puede ser medido por los sólidos suspendidos volátiles (SSV). El coeficiente de decaimiento endógeno representa la pérdida de masa celular debido a la oxidación de productos de almacenamiento interno para el mantenimiento celular, muerte celular y la depredación por organismos más altos en la cadena alimenticia, el coeficiente puede cambiar con la edad celular. Los valores típicos de Y en la literatura se encuentran en un rango de 0.2-0.6 gSSV·gDQO<sup>-1</sup>, los valores típicos de  $k_d$  se encuentran en un rango de 0.042-0.15 gSSV·gSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (WEF, 2010; Metcalf y Eddy, 2014). Los valores de Y calculados en este estudio son bajos en comparación con los valores típicos, lo cual puede deberse a los altos TRS en los reactores, esto quiere decir que el sustrato consumido por los microorganismos fue utilizado principalmente para sus requerimientos de energía para el mantenimiento celular.

### ANEXO 3 ENRIQUECIMIENTO DE LOS CONSORCIOS MICROBIANOS

#### 3.1 Seguimiento al desempeño de los reactores durante el proceso de enriquecimiento de los consorcios

Amonio-nitrito oxidante								
Tiempo, d	N-NH <sub>4</sub> Influyente	N-NH <sub>4</sub> Efluente	N-NO <sub>2</sub> Efluente	N-NO <sub>3</sub> Efluente	Tasa de remoción N-NH <sub>4</sub>	Tasa de producción N-NO <sub>3</sub>	Remoción N-NH <sub>4</sub>	SSV Reactor
	mg·L <sup>-1</sup>				g·gSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>		%	mg·L <sup>-1</sup>
7	100	56.3	25	25	0.03	0.01	43.8	1720
14	180	73.5	25	57.5	0.07	0.04	59.2	1590
21	210	102.5	50	40	0.07	0.03	51.2	
28	220	80	50	30	0.09	0.02	63.6	1600
35	200	66.8	25	70	0.09	0.05	66.6	
42	250	61.3	63	65	0.13	0.04	75.5	1500
46	210	53.8	100	122.5	0.12	0.10	74.4	
49	210	68	100	120	0.11	0.09	67.6	1280
53	210	52.6	50	50	0.13	0.04	75.6	
56	220	51.3	25	85	0.14	0.07	76.7	1240
60	212	45	25	62.5	0.13	0.05	78.8	
63	200	43.3	25	80	0.12	0.06	78.4	1280
67	220	40	25	62.5	0.14	0.05	81.8	
70	240	30.8	50	70	0.16	0.05	87.2	1300
74	237	26	25	105	0.17	0.08	89.0	
77	286	20	37	207.5	0.21	0.16	93.0	1260
81	330	26	51	210	0.25	0.17	92.1	
85	370	28	68	235	0.28	0.19	92.4	1220

Nitrito oxidante							
Tiempo, d	N-NO <sub>2</sub> Influyente	N-NO <sub>2</sub> Efluente	N-NO <sub>3</sub> Efluente	Tasa de remoción N-NO <sub>2</sub>	Tasa de producción N-NO <sub>3</sub>	Remoción N-NO <sub>2</sub>	SSV Reactor
	mg·L <sup>-1</sup>			g·gSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>		%	mg·L <sup>-1</sup>
7	250	50	100	0.12	0.06	80.0	1660
14	350	70	129	0.17	0.08	80.0	1620
21	300	35	190	0.16	0.12	88.3	1580
28	400	58	265	0.22	0.17	85.5	1560
35	350	25	275	0.21	0.18	92.9	1400
42	325	25	250	0.21	0.18	92.3	1280
46	400	13	195	0.30	0.15	96.9	
49	325	23	200	0.26	0.17	93.1	1160
53	350	46	210	0.26	0.18	86.9	
56	375	52	200	0.31	0.19	86.3	1060
60	388	25	310	0.34	0.29	93.5	
67	450	38	345	0.36	0.30	91.7	1140
74	425	33	310	0.35	0.27	92.4	
77	475	15	335	0.41	0.30	96.8	
82	470	25	345	0.39	0.31	94.7	1130

Biomasa heterótrofa					
Tiempo, d	DQO Influyente	DQO Efluente	Tasa de remoción DQO	Remoción DQO	SSV Reactor
	mg·L <sup>-1</sup>		g·gSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>		mg·L <sup>-1</sup>
7	1215	198	0.63	83.7	1620
14	1278	93	0.71	92.7	1680
21	1240	47	0.70	96.2	1700
28	1297	54	0.71	95.8	1760
35	1263	33	0.68	97.4	1800
39	1245	30	0.66	97.6	1840
42	1238	32	0.65	97.4	1870

**ANEXO 4****PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD DE LOS FÁRMACOS EN LA BIOMASA SUSPENDIDA**

## 4.1 Concentraciones de los fármacos en los duplicados de la fase líquida durante las pruebas de biodegradabilidad

Tiempo, d	<b>Amonio-nitrito oxidante</b>					
	<b>Á. Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>	
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
0	9.6833	9.5110	9.7667	9.8958	9.6667	9.1889
2	6.4667	6.7333	6.0764	5.3900	8.9667	8.5889
4	5.9333	6.0667	5.1333	4.8000	8.4667	8.0667
6	4.0667	3.7556	4.4333	4.7667	6.9667	6.6333
8	3.1333	3.0667	3.8333	3.3667	5.2667	5.6667
10	2.4000	2.9333	2.2667	2.3778	4.4667	4.2000
12	1.2842	1.5220	1.9889	1.7000	4.0222	3.8756
16	1.2931	1.0531	1.8442	1.6311	3.5000	3.2156
20	0.9489	0.9467	0.7356	0.7022	2.8400	3.2000
24	0.6778	1.2089	0.8133	0.6978	2.8289	3.1622

Tiempo, d	<b>Nitrito oxidante</b>					
	<b>Á. Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>	
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
0	9.6491	9.5451	10.0898	9.7773	9.5387	9.3171
2	8.8967	8.7658	8.7813	8.6920	8.6787	8.2193
4	8.3180	8.8020	7.7653	7.9360	7.2651	7.6307
6	7.8744	8.0813	7.7420	7.9940	7.3747	7.1176
8	7.4796	7.3220	7.5893	7.6667	6.7431	7.0436
10	6.5451	6.7498	7.4067	7.2707	6.0849	6.5084
12	5.6048	5.1198	7.3427	6.9524	5.4847	5.0922
16	4.4758	4.7602	7.0457	7.1920	5.3138	4.9300
20	4.3738	4.1711	7.0720	6.9525	4.8758	5.2351
24	3.9116	4.1702	6.3947	6.8480	4.8482	5.2316

Tiempo, d	<b>Biomasa heterótrofa</b>					
	<b>Á. Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>	
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
0	10.1482	10.2558	9.5662	9.9631	9.4556	9.2122
2	8.2136	8.4291	9.0693	8.8671	9.1209	8.9720
4	7.8316	7.3316	8.8211	8.4311	9.1176	8.6669
6	6.9222	7.1778	8.1600	7.9393	8.5700	8.3649
8	6.6600	6.7962	7.2236	6.8540	8.2953	8.0771
10	5.6589	6.1837	6.4136	6.0809	6.8920	6.3869
12	4.5942	4.5044	4.1307	4.6336	5.6304	6.1584
16	3.8944	3.4407	1.7549	1.9089	4.3169	4.0504
20	2.6658	2.4880	0.6233	0.8673	3.5844	3.8191
24	2.3769	2.6213	0.6027	0.8182	3.3333	3.5482

## 4.2 Concentraciones de los fármacos en los duplicados de la fase sólida durante las pruebas de biodegradabilidad

Tiempo, d	<b>Amonio-nitrito oxidante</b>					
	<b>Á. Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>	
	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$					
0	0.4572	0.4801	1.0500	1.1431	0.1600	0.1867
2	0.4649	0.4318	1.1177	1.2193	0.1524	0.2286
4	0.4649	0.4826	1.1160	1.0855	0.2134	0.2362
6	0.4852	0.4039	0.9162	1.0838	0.2667	0.2870
8	0.4598	0.2337	1.1448	0.8552	0.2083	0.1804
10	0.4141	0.4623	1.1109	1.1901	0.4445	0.3760
12	0.4674	0.4293	1.1329	1.0279	0.3531	0.2464
16	0.3353	0.4217	1.1533	1.0042	0.3023	0.2515
20	0.3556	0.3937	1.1482	0.9128	0.2655	0.2743
24	0.4572	0.4801	1.0500	1.1431	0.1600	0.1867
Tiempo, d	<b>Nitrito oxidante</b>					
	<b>Á. Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>	
	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$					
0	0.3884	0.3972	0.6936	0.6282	0.1972	0.2004
2	0.4673	0.4210	0.8282	0.8802	0.2019	0.1897
4	0.5056	0.5648	0.7605	0.6887	0.2051	0.1982
6	0.6559	0.6535	0.6007	0.6464	0.2024	0.2069
8	0.5965	0.6552	0.5950	0.5778	0.2038	0.1940
10	0.6126	0.5975	0.6533	0.6978	0.2213	0.2333
12	0.5831	0.6422	0.6131	0.5964	0.2117	0.1985
16	0.7052	0.6065	0.6386	0.4166	0.2103	0.2339
20	0.5240	0.5694	0.6605	0.5249	0.2091	0.1956
24	0.3884	0.3972	0.6936	0.6282	0.1972	0.2004
Tiempo, d	<b>Biomasa heterótrofa</b>					
	<b>Á. Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>	
	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$					
0	1.2295	1.2264	0.7480	0.7316	0.2113	0.1812
2	0.7721	0.7629	1.1215	0.9867	0.2160	0.2117
4	0.7596	0.7454	1.1727	1.6144	0.2196	0.2009
6	0.7620	0.8607	0.8619	0.9574	0.2928	0.2504
8	0.8529	0.9505	0.7892	0.7572	0.2752	0.3702
10	0.9749	0.9441	0.8129	0.7750	0.3835	0.3150
12	0.9043	0.8690	0.8209	0.8979	0.3553	0.3979
16	0.9905	0.9526	0.8558	0.8117	0.3674	0.4360
20	0.9735	1.0104	0.9450	0.9067	0.4616	0.4811
24	1.2295	1.2264	0.7480	0.7316	0.2113	0.1812

## 4.3 Porcentajes de biodegradación promedio de los fármacos durante las pruebas de biodegradabilidad

Tiempo, d	Amonio-nitrito oxidante			Nitrito oxidante			Biomasa heterótrofa		
	AM	FLX	MTP	AM	FLX	MTP	AM	FLX	MTP
	<b>% Biodegradación</b>								
2	24.8	27.0	4.5	0.6	0.1	6.6	7.1	1.0	1.1
4	31.4	33.9	9.7	2.5	5.5	17.3	18.6	1.5	2.6
6	52.8	38.5	24.7	6.8	7.7	19.3	24.0	4.2	7.2
8	61.6	50.0	38.2	10.6	11.9	23.0	26.6	19.2	9.6
10	67.5	63.0	51.3	19.0	15.5	29.4	33.7	28.6	25.6
12	79.4	66.4	52.4	32.8	15.8	39.6	46.6	47.5	33.3
16	81.6	67.9	60.2	40.4	17.4	41.8	55.9	73.0	51.4
20	84.9	78.3	64.1	43.2	19.8	42.1	65.8	83.5	56.3
24	85.0	78.6	64.5	47.6	22.6	42.7	66.4	84.7	58.4

## 4.4 Porcentajes de sorción promedio de los fármacos durante las pruebas de biodegradabilidad

Tiempo, d	Amonio-nitrito oxidante			Nitrito oxidante			Biomasa heterótrofa		
	AM	FLX	MTP	AM	FLX	MTP	AM	FLX	MTP
	<b>% Sorción</b>								
2	6.4	14.6	2.4	7.4	12.0	3.8	11.3	7.1	2.0
4	6.1	15.6	2.7	8.3	15.5	3.7	7.1	10.1	2.1
6	6.5	14.7	3.1	10.0	13.1	3.9	6.9	13.4	2.1
8	6.1	13.3	3.9	12.3	11.3	3.9	7.5	8.7	2.7
10	4.7	13.3	2.7	11.7	10.6	3.8	8.3	7.4	3.2
12	6.0	14.8	5.7	11.4	12.3	4.3	8.8	7.6	3.5
16	6.1	14.4	4.2	11.5	11.0	3.9	8.2	8.3	3.8
20	5.2	14.4	3.9	12.3	9.6	4.2	8.9	8.0	4.0
24	5.1	13.8	3.8	10.3	10.7	3.9	9.1	8.9	4.7

## 4.5 Tasas de remoción promedio de los fármacos durante las pruebas de biodegradabilidad

Tiempo, d	Amonio-nitrito oxidante			Nitrito oxidante			Biomasa heterótrofa		
	AM	FLX	MTP	AM	FLX	MTP	AM	FLX	MTP
	<b>Tasa de remoción, <math>\mu\text{gSSV}^{-1}\text{d}^{-1}</math></b>								
2	2.6799	2.9915	0.4753	0.0655	0.0070	0.6982	0.8196	0.1151	0.1163
4	0.7050	0.7561	0.5497	0.2011	0.6050	1.1324	1.3183	0.0531	0.1549
6	2.3125	0.5125	1.5994	0.4703	0.2432	0.2151	0.6139	0.2903	0.4818
8	0.9556	1.2738	1.4231	0.4071	0.4748	0.3909	0.3000	1.6480	0.2516
10	0.6319	1.4375	1.3969	0.9059	0.4008	0.6829	0.8123	1.0345	1.6861
12	1.2865	0.3737	0.1138	1.4881	0.0344	1.0768	1.4825	2.0764	0.8101
16	0.1219	0.0826	0.4141	0.4110	0.0879	0.1162	0.5344	1.3999	0.9479
20	0.1783	0.5743	0.2069	0.1506	0.1381	0.0201	0.5687	0.5761	0.2578
24	0.0053	0.0150	0.0189	0.2409	0.1539	0.0287	0.0330	0.0683	0.1101



## 4.6 Evolución de la materia orgánica y nitrógeno durante las pruebas de biodegradabilidad

Tiempo, d	Amonio-nitrato oxidante			Nitrato oxidante		Heterótrofa
	N-NH <sub>4</sub>	N-NO <sub>2</sub>	N-NO <sub>3</sub>	N-NO <sub>2</sub>	N-NO <sub>3</sub>	DQO
	mg·L <sup>-1</sup>					
0	150.5			400		593
2	132	10	15	347	25	328
4	118	12.5	23.8	298	63.8	189
6	108	25	28.8	253	77.5	151
8	99	25	30	210	90	108
10	91	25	33.8	173	141.3	87
12	84	25	37.5	148	172.5	48
16	73	25	41.3	122	231.3	41
20	66	12.5	52.5	109	253.8	38
24	61	12.5	60	100	282.5	29

## 4.7 Tasas de remoción promedio de materia orgánica y nitrógeno durante las pruebas de biodegradabilidad

Tiempo, d	Amonio-nitrato oxidante		Nitrato oxidante	Heterótrofa
	N-NH <sub>4</sub>		N-NO <sub>2</sub>	DQO
	Tasa de remoción, mg·gSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>			
2	23.1		66.3	331
4	17.5		61.3	174
6	12.5		56.3	48
8	11.3		53.8	53
10	10.0		46.3	26
12	8.8		31.3	49
16	6.9		16.3	4
20	4.4		8.1	2
24	3.1		5.6	6

**ANEXO 5****DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE SORCIÓN  $K_d$  DE LA BIOMASA SUSPENDIDA**

## 5.1 Concentraciones de los fármacos en los duplicados de la fase líquida para la determinación del tiempo de equilibrio

Tiempo, min	<b>Amonio-nitrito oxidante</b>					
	<b>Á. Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>	
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
0	10.7478	10.4982	10.5276	10.5523	10.1528	10.5044
3	6.1925	5.8925	5.0734	4.8734	9.1707	8.7707
6	4.6763	4.4763	3.5714	3.2714	8.8853	8.5153
12	3.8866	3.6066	2.7947	2.5547	8.2915	7.9715
18	3.9846	3.5846	2.7716	2.5716	8.3161	7.9461
24	3.8304	3.6104	2.7228	2.5118	8.3697	7.9697
48	4.0050	3.6450	2.7400	2.5800	8.2740	7.8940
Tiempo, min	<b>Nitrito oxidante</b>					
	<b>Á. Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>	
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
0	10.3478	10.0478	10.0276	10.1576	9.9528	10.1428
3	5.9725	6.2725	5.3434	5.5434	9.3707	9.4907
6	4.8563	5.2163	4.3914	4.5814	8.5853	8.7253
12	3.9186	4.2386	3.2347	3.4547	8.5515	8.4515
18	3.6246	3.4746	2.4916	2.6616	8.1161	8.0361
24	3.6304	3.4674	2.5228	2.6528	8.1297	7.9397
48	3.6250	3.4850	2.4900	2.6700	8.0640	7.9840
Tiempo, min	<b>Biomasa heterótrofa</b>					
	<b>Á. Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>	
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
0	10.3478	10.0478	10.0276	10.1576	9.9528	10.1428
3	5.9725	6.2725	5.3434	5.5434	9.3707	9.4907
6	4.8563	5.2163	4.3914	4.5814	8.5853	8.7253
12	3.9186	4.2386	3.2347	3.4547	8.5515	8.4515
18	3.6246	3.4746	2.4916	2.6616	8.1161	8.0361
24	3.6304	3.4674	2.5228	2.6528	8.1297	7.9397
48	3.6250	3.4850	2.4900	2.6700	8.0640	7.9840

5.2 Concentraciones de los fármacos en los duplicados de la fase líquida para la determinación de los coeficientes de sorción  $K_d$ 

<b>Amonio-nitrito oxidante</b>											
<b>Á. Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>		<b>Á.Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>	
<b><math>C_0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math></b>						<b><math>C_e \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math></b>					
0.5126	0.4798	0.4978	0.5082	0.4968	0.5102	0.4206	0.3261	0.3250	0.3000	0.4444	0.5333
0.9851	0.9796	0.9958	0.9722	0.9887	0.992	0.6887	0.5139	0.6809	0.6596	0.8811	0.9111
2.5097	2.5103	2.4946	2.5254	2.4952	2.5092	1.1524	1.4288	1.6939	1.6331	2.1564	2.3333
4.9236	4.9794	4.9137	4.8663	4.967	4.9875	2.2588	2.18	3.3086	3.1944	4.5796	4.6667
7.4983	7.5106	7.4871	7.5289	7.4912	7.5113	2.7221	3.1302	4.7755	4.9080	6.9222	6.8111
10.0639	9.9884	10.1266	9.9934	10.1103	9.9316	3.9243	4.1864	6.6450	6.5262	8.9333	9.1556
<b>Nitrito oxidante</b>											
<b>Á. Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>		<b>Á.Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>	
<b><math>C_0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math></b>						<b><math>C_e \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math></b>					
0.4913	0.496	0.4822	0.489	0.5064	0.4956	0.3772	0.4374	0.3450	0.2648	0.4886	0.4778
0.9867	1.0285	1.0176	1.0548	1.0172	1.0181	0.8145	0.8372	0.7595	0.6774	0.9627	0.9915
2.4897	2.4793	2.4771	2.4689	2.5098	2.5104	1.9726	1.9020	1.6652	1.7405	2.2450	2.4494
5.0396	5.0617	5.0481	5.0879	5.0496	5.1292	3.7926	3.6845	3.3802	3.4993	4.7077	4.5078
7.4921	7.5123	7.462	7.442	7.4931	7.5011	5.5698	5.6865	4.8554	4.9891	6.9913	6.8231
9.9852	10.035	9.9697	9.9863	9.9492	10.065	7.4551	7.3460	6.6384	6.5409	9.3539	9.2289
<b>Biomasa heterótrofa</b>											
<b>Á. Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>		<b>Á.Mefenámico</b>		<b>Fluoxetina</b>		<b>Metoprolol</b>	
<b><math>C_0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math></b>						<b><math>C_e \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math></b>					
0.4913	0.496	0.4822	0.489	0.5064	0.4956	0.4136	0.4119	0.3406	0.3582	0.4696	0.4858
0.9867	1.0285	1.0176	1.0548	1.0172	1.0181	0.8466	0.8170	0.7345	0.7812	0.9987	0.9620
2.4897	2.4793	2.4771	2.4689	2.5098	2.5104	1.9400	1.8399	1.6671	1.6020	2.3129	2.3692
5.0396	5.0617	5.0481	5.0879	5.0496	5.1292	3.8218	3.7349	3.4580	3.3517	4.4970	4.6472
7.4921	7.5123	7.462	7.442	7.4931	7.5011	5.4757	5.6615	4.7499	4.9350	6.8132	7.0075
9.9852	10.035	9.9697	9.9863	9.9492	10.065	7.2457	7.3336	6.3118	6.4662	8.9094	9.0428

5.3 Concentraciones de los fármacos en los sólidos para la determinación de los coeficientes de sorción  $K_d$ 

<b>Amonio-nitrito oxidante</b>			<b>Nitrito oxidante</b>			<b>Biomasa heterótrofa</b>		
<b>AM</b>	<b>FLX</b>	<b>MTP</b>	<b>AM</b>	<b>FLX</b>	<b>MTP</b>	<b>AM</b>	<b>FLX</b>	<b>MTP</b>
<b><math>\mu\text{gSST}^{-1}</math></b>								
0.0595	0.1905	0.0146	0.0863	0.1807	0.0178	0.0809	0.1362	0.0233
0.1334	0.3138	0.0943	0.1818	0.3177	0.0406	0.1758	0.2784	0.0373
0.5137	0.8465	0.2573	0.5472	0.7701	0.1629	0.5946	0.8384	0.1690
1.1447	1.6385	0.3541	1.3121	1.6282	0.4816	1.2723	1.6631	0.5173
1.9540	2.6663	0.6346	1.8741	2.5298	0.5899	1.9336	2.6096	0.5867
2.6059	3.4744	0.9765	2.6096	3.3884	0.7157	2.7204	3.5890	1.0310

**ANEXO 6****DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE SORCIÓN  $K_d$  EN LA BIOMASA INMOVILIZADA****6.1 Concentraciones de los fármacos en los duplicados de la fase líquida para la determinación del tiempo de equilibrio**

Tiempo, min	Cintas de polietileno, PE					
	Á.Mefenámico		Fluoxetina		Metoprolol	
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
0	10.7478	10.4982	10.5276	10.5523	10.1528	10.5044
3	6.1925	5.8925	5.0734	4.8734	9.1707	8.7707
6	4.6763	4.4763	3.5714	3.2714	8.8853	8.5153
12	3.8866	3.6066	2.7947	2.5547	8.2915	7.9715
18	3.9846	3.5846	2.7716	2.5716	8.3161	7.9461
24	3.8304	3.6104	2.7228	2.5118	8.3697	7.9697
48	4.0050	3.6450	2.7400	2.5800	8.2740	7.8940

Tiempo, min	Cubos de poliuretano, PU					
	Á.Mefenámico		Fluoxetina		Metoprolol	
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
0	10.3478	10.0478	10.0276	10.1576	9.9528	10.1428
3	5.9725	6.2725	5.3434	5.5434	9.3707	9.4907
6	4.8563	5.2163	4.3914	4.5814	8.5853	8.7253
12	3.9186	4.2386	3.2347	3.4547	8.5515	8.4515
18	3.6246	3.4746	2.4916	2.6616	8.1161	8.0361
24	3.6304	3.4674	2.5228	2.6528	8.1297	7.9397
48	3.6250	3.4850	2.4900	2.6700	8.0640	7.9840

**6.2 Concentraciones de los fármacos en los duplicados de la fase líquida para la determinación de los coeficientes de sorción  $K_d$** 

Cintas de polietileno, PE											
Á.Mefenámico		Fluoxetina		Metoprolol		Á.Mefenámico		Fluoxetina		Metoprolol	
$C_0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$						$C_e \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
0.4987	0.5122	0.5282	0.5069	0.5084	0.5189	0.4206	0.3261	0.1339	0.1135	0.3987	0.3672
0.9916	1.0728	1.0163	1.1143	1.0178	1.0682	0.6887	0.5139	0.3596	0.2648	0.6982	0.4521
2.4817	2.5143	2.5149	2.5108	2.5085	2.4892	1.1524	1.4288	0.586	0.7155	1.7841	1.6941
5.0561	4.8836	5.1619	5.1032	5.1960	5.0892	2.2588	2.18	1.1939	1.2631	4.1129	4.3665
7.5092	7.5139	7.5067	7.5112	7.4987	7.4826	2.7221	3.1302	2.061	1.8998	6.0227	5.7772
10.0642	9.9789	9.9872	10.0630	9.9928	9.9814	3.9243	4.1864	2.9606	2.805	8.3928	8.0796

Cubos de poliuretano, PU											
Á.Mefenámico		Fluoxetina		Metoprolol		Á.Mefenámico		Fluoxetina		Metoprolol	
$C_0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$						$C_e \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
0.4987	0.5122	0.5282	0.5069	0.5084	0.5189	0.2297	0.2296	0.1570	0.1648	0.4146	0.4484
0.9916	1.0728	1.0163	1.1143	1.0178	1.0682	0.5263	0.4756	0.2894	0.2780	0.9204	0.6948
2.4817	2.5143	2.5149	2.5108	2.5085	2.4892	0.8787	0.9348	0.4742	0.418	1.9045	2.0401
5.0561	4.8836	5.1619	5.1032	5.1960	5.0892	1.8621	2.2820	1.2802	1.4602	4.5089	4.3009
7.5092	7.5139	7.5067	7.5112	7.4987	7.4826	2.5446	2.7699	1.6476	1.7070	6.0486	5.4889
10.0642	9.9789	9.9872	10.0630	9.9928	9.9814	3.5847	3.7677	2.5835	2.6715	7.8392	8.1645

**6.3** Concentraciones de los sólidos en los duplicados para la determinación de los coeficientes de sorción  $K_d$ 

<b>Cintas de polietileno, PE</b>		<b>Cubos de poliuretano, PU</b>	
<b>SST</b>		<b>SST</b>	
$g \cdot L^{-1}$			
2.0580	2.7440	3.7249	3.9650
2.5166	2.5394	3.7745	3.5116
2.3950	2.3596	3.6862	3.8336
2.5480	2.3254	3.3150	3.2964
2.5530	2.2100	3.2398	3.5240
2.4990	2.4540	3.3650	3.4458

**6.4** Concentraciones de los fármacos en los sólidos para la determinación de los coeficientes de sorción  $K_d$ 

<b>Cintas de polietileno, PE</b>			<b>Cubos de poliuretano, PU</b>		
<b>A.Mefenámico</b>	<b>Fluoxetina</b>	<b>Metoprolol</b>	<b>A.Mefenámico</b>	<b>Fluoxetina</b>	<b>Metoprolol</b>
$\mu g \cdot g^{-1}$					
0.0550	0.1640	0.0544	0.0717	0.0927	0.0214
0.1704	0.2979	0.1850	0.1458	0.2145	0.0646
0.5079	0.7833	0.3196	0.4232	0.5497	0.1400
1.1288	1.6022	0.3705	0.8766	1.1381	0.2232
1.9254	2.3215	0.6679	1.4354	1.7244	0.5091
2.4091	2.8840	0.7070	1.8633	2.1723	0.5830

**ANEXO 7****BALANCES DE MASA EN LOS REACTORES CON BIOMASA INMOVILIZADA****7.1 Método 1.** Balances de masa en los reactores PE1 y PE2**Cintas de polietileno**

Carga orgánica, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	<b>ACIDO MEFENÁMICO</b>							
	<b>µg·d<sup>-1</sup></b>					<b>%</b>		
	<b>Influente</b>	<b>Efluente</b>	<b>Remoción</b>	<b>Biodegradación</b>	<b>Sorción</b>	<b>Remoción</b>	<b>Biodegradación</b>	<b>Sorción</b>
3	545.5 ± 4.6	333.5 ± 17.7	212.0 ± 22.3	206.3 ± 22.7	5.7 ± 0.4	38.7 ± 3.7	37.7 ± 3.8	1.1 ± 0.08
3 R	603.5 ± 65.5	175.0 ± 38.7	428.5 ± 102.2	422.1 ± 104.1	6.4 ± 0.1	70.4 ± 7.6	69.3 ± 7.7	1.1 ± 0.10
6	1148.2 ± 74.6	704.2 ± 14.2	444.1 ± 60.4	433.2 ± 58.9	10.8 ± 1.5	38.5 ± 2.9	37.6 ± 2.8	0.9 ± 0.10
6 R	1357.5 ± 13.2	676.1 ± 17.5	681.4 ± 30.7	669.9 ± 30.9	11.6 ± 0.2	50.3 ± 1.8	49.4 ± 1.8	0.8 ± 0.02
9	1635.7 ± 13.9	1197.7 ± 41.3	438.0 ± 55.3	420.3 ± 57.0	17.7 ± 1.8	26.5 ± 3.3	25.4 ± 3.4	1.1 ± 0.12
9 R	1809.8 ± 96.4	964.4 ± 45.0	845.4 ± 121.3	822.0 ± 121.1	23.4 ± 0.2	46.2 ± 6.3	44.9 ± 6.4	1.3 ± 0.13
12	2294.5 ± 149.1	1834.5 ± 54.9	460.0 ± 94.2	433.1 ± 92.0	26.9 ± 2.2	19.8 ± 3.0	18.6 ± 2.9	1.2 ± 0.06
12 R	2712.6 ± 26.4	1747.0 ± 74.8	965.6 ± 101.2	928.0 ± 103.9	37.6 ± 2.7	30.5 ± 3.3	34.1 ± 3.5	1.4 ± 0.11
	<b>FLUOXETINA</b>							
3	206.2 ± 0.4	50.7 ± 6.1	155.5 ± 5.7	152.7 ± 6.1	2.8 ± 0.3	75.5 ± 2.9	74.1 ± 3.0	1.4 ± 0.16
3 R	226.4 ± 7.8	14.5 ± 0.7	211.9 ± 8.5	209.5 ± 8.0	2.4 ± 0.5	93.6 ± 0.5	92.5 ± 0.3	1.1 ± 0.16
6	462.6 ± 28.8	64.4 ± 1.6	398.2 ± 30.4	391.3 ± 31.2	6.9 ± 0.8	86.0 ± 1.3	84.5 ± 1.5	1.5 ± 0.24
6 R	519.4 ± 44.8	72.4 ± 7.3	447.0 ± 52.1	440.7 ± 52.3	6.4 ± 0.1	86.0 ± 2.7	84.7 ± 2.8	1.2 ± 0.14
9	618.4 ± 1.1	211.4 ± 11.8	407.0 ± 10.7	399.3 ± 11.0	7.7 ± 0.2	65.9 ± 1.8	64.6 ± 1.8	1.2 ± 0.04
9 R	679.0 ± 23.3	84.2 ± 19.4	594.9 ± 42.7	587.1 ± 43.1	7.7 ± 0.4	87.5 ± 3.3	86.4 ± 3.4	1.1 ± 0.09
12	924.4 ± 57.6	387.4 ± 56.1	537.0 ± 63.7	523.6 ± 63.0	13.5 ± 0.8	57.7 ± 8.8	56.2 ± 8.8	1.5 ± 0.02
12 R	1037.8 ± 89.5	252.4 ± 25.7	785.4 ± 65.2	769.7 ± 63.0	15.7 ± 2.1	75.7 ± 4.4	74.1 ± 4.3	1.5 ± 0.07
	<b>METOPROLOL</b>							
3	559.0 ± 0.4	246.7 ± 15.9	312.3 ± 43.3	309.0 ± 43.7	3.4 ± 0.4	55.8 ± 4.9	55.2 ± 5.0	0.6 ± 0.11
3 R	552.5 ± 7.8	186.1 ± 7.1	366.3 ± 12.7	362.9 ± 12.5	3.4 ± 0.2	66.4 ± 1.6	65.7 ± 1.5	0.6 ± 0.03
6	1206.6 ± 28.8	531.0 ± 12.0	675.7 ± 144.7	669.0 ± 145.3	6.7 ± 0.7	55.5 ± 5.7	54.9 ± 5.8	0.6 ± 0.11
6 R	1307.0 ± 44.8	557.6 ± 2.1	749.5 ± 64.1	743.1 ± 64.0	6.4 ± 0.1	57.4 ± 2.1	56.9 ± 2.2	0.5 ± 0.02
9	1676.3 ± 1.1	1002.3 ± 42.4	674.1 ± 39.7	664.0 ± 39.4	10.1 ± 0.3	40.3 ± 0.2	39.7 ± 0.2	0.6 ± 0.01
9 R	1656.7 ± 23.3	768.7 ± 35.8	887.9 ± 52.4	877.9 ± 52.4	10.1 ± 0.1	53.7 ± 2.7	53.1 ± 2.7	0.6 ± 0.00
12	2411.2 ± 57.6	1604.0 ± 68.1	807.2 ± 147.1	798.2 ± 148.6	8.9 ± 1.5	33.1 ± 4.4	32.7 ± 4.5	0.4 ± 0.10
12 R	2611.8 ± 89.5	1403.3 ± 39.8	1208.5 ± 84.0	1197.8 ± 84.3	10.7 ± 0.2	46.6 ± 0.5	46.2 ± 0.5	0.4 ± 0.03

**Nota:** Últimos 30 días de la fase

**7.2 Método 1.** Balances de masa en los reactores PU1 y PU2**Cubos de poliuretano**

Carga orgánica, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	ACIDO MEFENÁMICO							
	µg·d <sup>-1</sup>					%		
	Influente	Efluente	Remoción	Biodegradación	Sorción	Remoción	Biodegradación	Sorción
3	545.5 ± 4.6	232.9 ± 23.0	312.6 ± 27.7	308.6 ± 27.8	3.9 ± 0.1	57.2 ± 4.6	56.5 ± 4.6	0.7 ± 0.03
3 R	603.5 ± 65.5	138.3 ± 25.0	465.2 ± 90.5	461.4 ± 90.9	3.8 ± 0.4	76.8 ± 6.6	76.1 ± 6.8	0.6 ± 0.14
6	1148.2 ± 74.6	516.8 ± 19.0	631.5 ± 93.6	622.2 ± 93.0	9.3 ± 0.5	54.7 ± 4.7	53.9 ± 4.7	0.8 ± 0.02
6 R	1357.5 ± 13.2	556.3 ± 4.0	801.2 ± 17.2	790.5 ± 17.6	10.7 ± 0.3	59.0 ± 0.8	58.3 ± 0.9	0.8 ± 0.03
9	1635.7 ± 13.9	817.1 ± 25.7	818.6 ± 39.7	807.9 ± 38.9	17.7 ± 0.7	50.0 ± 1.9	49.4 ± 1.8	0.7 ± 0.04
9 R	1809.8 ± 96.4	655.8 ± 4.5	1154.0 ± 91.8	1140.2 ± 89.7	13.8 ± 2.1	63.5 ± 3.6	62.8 ± 3.6	0.8 ± 0.03
12	2294.5 ± 149.1	1660.3 ± 38.4	634.1 ± 117.5	612.1 ± 117.0	22.0 ± 0.5	27.3 ± 6.5	26.3 ± 6.6	1.0 ± 0.01
12 R	2712.6 ± 26.4	1407.7 ± 4.2	1304.9 ± 22.2	1279.4 ± 23.2	25.5 ± 0.9	48.1 ± 0.4	47.2 ± 0.4	0.9 ± 0.04
	FLUOXETINA							
3	206.2 ± 0.4	38.5 ± 6.0	167.7 ± 5.6	166.3 ± 5.7	1.4 ± 0.1	81.3 ± 2.9	80.6 ± 2.9	0.7 ± 0.04
3 R	226.4 ± 7.8	12.9 ± 1.5	213.6 ± 9.2	212.4 ± 9.2	1.2 ± 0.0	94.3 ± 0.8	93.8 ± 0.9	0.5 ± 0.00
6	462.6 ± 28.8	44.2 ± 2.7	418.5 ± 26.1	413.1 ± 25.7	5.3 ± 0.5	90.4 ± 0.0	89.3 ± 0.1	1.2 ± 0.05
6 R	519.4 ± 44.8	54.5 ± 8.4	464.9 ± 53.2	460.8 ± 53.9	4.1 ± 0.7	89.4 ± 2.6	88.6 ± 2.8	0.8 ± 0.20
9	618.4 ± 1.1	133.1 ± 17.2	485.3 ± 16.1	479.7 ± 16.8	5.6 ± 0.7	78.5 ± 2.7	77.6 ± 2.8	0.9 ± 0.11
9 R	679.0 ± 23.3	52.6 ± 3.4	626.5 ± 26.7	621.1 ± 25.8	5.3 ± 1.0	92.3 ± 0.8	91.5 ± 0.6	0.8 ± 0.11
12	924.4 ± 57.6	293.6 ± 68.1	630.8 ± 75.6	620.0 ± 76.0	10.8 ± 0.4	67.8 ± 9.4	66.7 ± 9.4	1.2 ± 0.09
12 R	1037.8 ± 89.5	193.9 ± 42.9	843.9 ± 82.4	831.7 ± 81.6	12.2 ± 0.8	81.2 ± 5.6	80.0 ± 5.6	1.2 ± 0.03
	METOPROLOL							
3	559.0 ± 0.4	243.1 ± 22.0	316.0 ± 49.4	313.2 ± 49.8	2.8 ± 0.4	56.4 ± 6.0	55.9 ± 6.1	0.5 ± 0.09
3 R	552.5 ± 7.8	171.3 ± 27.2	381.2 ± 32.7	379.1 ± 32.5	2.1 ± 0.2	69.0 ± 5.2	68.6 ± 5.2	0.4 ± 0.04
6	1206.6 ± 28.8	441.4 ± 3.4	765.3 ± 136.1	760.0 ± 136.5	5.2 ± 0.4	63.1 ± 4.3	62.7 ± 4.3	0.4 ± 0.07
6 R	1307.0 ± 44.8	421.7 ± 24.2	885.4 ± 37.8	881.3 ± 38.2	4.0 ± 0.4	67.5 ± 0.0	67.2 ± 0.1	0.3 ± 0.05
9	1676.3 ± 1.1	933.0 ± 70.4	743.3 ± 152.5	736.2 ± 153.9	7.1 ± 1.4	44.3 ± 6.7	43.8 ± 6.8	0.4 ± 0.11
9 R	1656.7 ± 23.3	638.3 ± 74.8	1018.3 ± 91.5	1010.7 ± 90.6	7.6 ± 0.9	61.5 ± 4.9	61.0 ± 4.8	0.5 ± 0.05
12	2411.2 ± 57.6	1448.7 ± 10.0	962.4 ± 175.1	955.1 ± 174.5	7.4 ± 0.7	39.4 ± 6.1	39.1 ± 6.1	0.3 ± 0.00
12 R	2611.8 ± 89.5	1311.6 ± 77.2	1300.2 ± 200.9	1290.4 ± 201.9	9.8 ± 0.9	49.7 ± 5.2	49.3 ± 5.3	0.4 ± 0.06

**Nota:** Últimos 30 días de la fase

**7.3 Método 2.** Balances de masa en los reactores PE1 y PE2**Cintas de polietileno**

Carga orgánica, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	ACIDO MEFENÁMICO							
	µg·d <sup>-1</sup>					%		
	Influyente	Efluente	Remoción	Biodegradación	Sorción	Remoción	Biodegradación	Sorción
3	545.5 ± 4.6	333.5 ± 17.7	212.0 ± 22.3	203.3 ± 23.4	8.0 ± 0.3	38.7 ± 3.7	37.2 ± 3.9	1.6 ± 0.22
3 R	603.5 ± 65.5	175.0 ± 38.7	428.5 ± 102.2	423.8 ± 105.5	3.6 ± 0.1	70.4 ± 7.6	69.6 ± 9.9	0.8 ± 0.30
6	1148.2 ± 74.6	704.2 ± 14.2	444.1 ± 60.4	426.7 ± 61.6	16.9 ± 1.0	38.5 ± 2.9	37.0 ± 3.1	1.5 ± 0.15
6 R	1357.5 ± 13.2	676.1 ± 17.5	681.4 ± 30.7	666.7 ± 30.3	15.0 ± 0.8	50.3 ± 1.8	49.2 ± 1.8	1.1 ± 0.02
9	1635.7 ± 13.9	1197.7 ± 41.3	438.0 ± 55.3	335.4 ± 61.8	96.0 ± 1.7	26.5 ± 3.3	20.3 ± 3.7	6.3 ± 0.45
9 R	1809.8 ± 96.4	964.4 ± 45.0	845.4 ± 121.3	763.7 ± 149.7	76.1 ± 6.1	46.2 ± 6.3	41.6 ± 9.2	4.6 ± 0.96
12	2294.5 ± 149.1	1834.5 ± 54.9	460.0 ± 94.2	373.7 ± 98.0	85.7 ± 5.5	19.8 ± 3.0	16.0 ± 3.2	3.7 ± 0.28
12 R	2712.6 ± 26.4	1747.0 ± 74.8	965.6 ± 101.2	880.0 ± 98.5	87.5 ± 6.6	30.5 ± 3.3	32.3 ± 3.3	3.1 ± 0.09
	FLUOXETINA							
3	206.2 ± 0.4	50.7 ± 6.1	155.5 ± 5.7	153.5 ± 6.1	1.7 ± 0.2	75.5 ± 2.9	74.5 ± 3.1	1.0 ± 0.19
3 R	226.4 ± 7.8	14.5 ± 0.7	211.9 ± 8.5	211.3 ± 8.5	0.5 ± 0.0	93.6 ± 0.5	93.3 ± 0.5	0.3 ± 0.04
6	462.6 ± 28.8	64.4 ± 1.6	398.2 ± 30.4	395.8 ± 30.7	2.2 ± 0.0	86.0 ± 1.3	85.5 ± 1.4	0.5 ± 0.09
6 R	519.4 ± 44.8	72.4 ± 7.3	447.0 ± 52.1	444.6 ± 52.5	2.6 ± 0.3	86.0 ± 2.7	85.5 ± 2.8	0.5 ± 0.11
9	618.4 ± 1.1	211.4 ± 11.8	407.0 ± 10.7	379.3 ± 13.0	25.2 ± 1.6	65.9 ± 1.8	61.4 ± 2.1	4.5 ± 0.37
9 R	679.0 ± 23.3	84.2 ± 19.4	594.9 ± 42.7	583.9 ± 45.8	12.8 ± 10.9	87.5 ± 3.3	85.9 ± 3.9	1.6 ± 0.52
12	924.4 ± 57.6	387.4 ± 56.1	537.0 ± 63.7	509.0 ± 69.9	24.1 ± 1.3	57.7 ± 8.8	54.6 ± 9.6	3.1 ± 0.80
12 R	1037.8 ± 89.5	252.4 ± 25.7	785.4 ± 65.2	766.7 ± 68.2	20.9 ± 2.0	75.7 ± 4.4	73.8 ± 4.8	1.8 ± 0.46
	METOPROLOL							
3	559.0 ± 0.4	246.7 ± 15.9	312.3 ± 43.3	311.4 ± 43.4	0.8 ± 0.0	55.8 ± 4.9	55.6 ± 4.9	0.2 ± 0.03
3 R	552.5 ± 7.8	186.1 ± 7.1	366.3 ± 12.7	365.6 ± 12.8	0.7 ± 0.1	66.4 ± 1.6	66.2 ± 1.6	0.1 ± 0.01
6	1206.6 ± 28.8	531.0 ± 12.0	675.7 ± 144.7	673.9 ± 144.9	1.7 ± 0.3	55.5 ± 5.7	55.3 ± 5.8	0.2 ± 0.03
6 R	1307.0 ± 44.8	557.6 ± 2.1	749.5 ± 64.1	747.5 ± 64.2	2.0 ± 0.1	57.4 ± 2.1	57.2 ± 2.1	0.1 ± 0.02
9	1676.3 ± 1.1	1002.3 ± 42.4	674.1 ± 39.7	663.6 ± 39.5	10.4 ± 0.4	40.3 ± 0.2	39.7 ± 0.2	0.6 ± 0.02
9 R	1656.7 ± 23.3	768.7 ± 35.8	887.9 ± 52.4	879.3 ± 53.2	8.1 ± 0.9	53.7 ± 2.7	53.2 ± 2.7	0.5 ± 0.05
12	2411.2 ± 57.6	1604.0 ± 68.1	807.2 ± 147.1	797.7 ± 147.5	9.4 ± 0.9	33.1 ± 4.4	32.7 ± 4.4	0.4 ± 0.06
12 R	2611.8 ± 89.5	1403.3 ± 39.8	1208.5 ± 84.0	1199.1 ± 84.3	9.6 ± 1.2	46.6 ± 0.5	46.3 ± 0.5	0.4 ± 0.03

**Nota:** Últimos 30 días de la fase



**7.4 Método 2.** Balances de masa en los reactores PU1 y PU2**Cubos de poliuretano**

Carga orgánica, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	<b>ACIDO MEFENÁMICO</b>							
	<b>µg·d<sup>-1</sup></b>					<b>%</b>		
	<b>Influente</b>	<b>Efluente</b>	<b>Remoción</b>	<b>Biodegradación</b>	<b>Sorción</b>	<b>Remoción</b>	<b>Biodegradación</b>	<b>Sorción</b>
3	545.5 ± 4.6	232.9 ± 23.0	312.6 ± 27.7	307.3 ± 28.5	4.5 ± 0.4	57.2 ± 4.6	56.3 ± 4.7	1.0 ± 0.16
3 R	603.5 ± 65.5	138.3 ± 25.0	465.2 ± 90.5	462.4 ± 91.1	3.1 ± 2.3	76.8 ± 6.6	76.3 ± 6.8	0.5 ± 0.16
6	1148.2 ± 74.6	516.8 ± 19.0	631.5 ± 93.6	621.1 ± 94.2	10.0 ± 0.3	54.7 ± 4.7	53.9 ± 4.8	0.9 ± 0.08
6 R	1357.5 ± 13.2	556.3 ± 4.0	801.2 ± 17.2	790.8 ± 16.8	10.7 ± 0.5	59.0 ± 0.8	58.3 ± 0.8	0.8 ± 0.03
9	1635.7 ± 13.9	817.1 ± 25.7	818.6 ± 39.7	764.6 ± 41.1	52.9 ± 1.2	50.0 ± 1.9	46.7 ± 2.0	3.3 ± 0.12
9 R	1809.8 ± 96.4	655.8 ± 4.5	1154.0 ± 91.8	1110.0 ± 93.5	48.7 ± 15.6	63.5 ± 3.6	61.1 ± 4.0	2.5 ± 0.36
12	2294.5 ± 149.1	1660.3 ± 38.4	634.1 ± 117.5	567.7 ± 122.8	64.7 ± 4.6	27.3 ± 6.5	24.4 ± 6.9	2.9 ± 0.31
12 R	2712.6 ± 26.4	1407.7 ± 4.2	1304.9 ± 22.2	1245.7 ± 20.0	60.8 ± 3.2	48.1 ± 0.4	46.0 ± 0.3	2.2 ± 0.07
	<b>FLUOXETINA</b>							
3	206.2 ± 0.4	38.5 ± 6.0	167.7 ± 5.6	166.3 ± 5.9	1.1 ± 0.1	81.3 ± 2.9	80.6 ± 3.0	0.7 ± 0.14
3 R	226.4 ± 7.8	12.9 ± 1.5	213.6 ± 9.2	213.2 ± 9.3	0.8 ± 1.1	94.3 ± 0.8	94.1 ± 0.9	0.2 ± 0.04
6	462.6 ± 28.8	44.2 ± 2.7	418.5 ± 26.1	417.0 ± 26.1	1.4 ± 0.1	90.4 ± 0.0	90.1 ± 0.0	0.3 ± 0.00
6 R	519.4 ± 44.8	54.5 ± 8.4	464.9 ± 53.2	463.2 ± 53.5	1.9 ± 0.3	89.4 ± 2.6	89.1 ± 2.7	0.3 ± 0.10
9	618.4 ± 1.1	133.1 ± 17.2	485.3 ± 16.1	471.2 ± 17.9	13.3 ± 1.8	78.5 ± 2.7	76.2 ± 3.0	2.3 ± 0.29
9 R	679.0 ± 23.3	52.6 ± 3.4	626.5 ± 26.7	620.8 ± 27.4	10.7 ± 14.4	92.3 ± 0.8	91.4 ± 0.9	0.8 ± 0.13
12	924.4 ± 57.6	293.6 ± 68.1	630.8 ± 75.6	611.8 ± 81.0	15.6 ± 1.2	67.8 ± 9.4	65.7 ± 10.0	2.1 ± 0.67
12 R	1037.8 ± 89.5	193.9 ± 42.9	843.9 ± 82.4	830.9 ± 85.5	15.2 ± 1.2	81.2 ± 5.6	80.0 ± 6.0	1.3 ± 0.41
	<b>METOPROLOL</b>							
3	559.0 ± 0.4	243.1 ± 22.0	316.0 ± 49.4	315.0 ± 49.5	0.8 ± 0.1	56.4 ± 6.0	157.6 ± 6.0	0.2 ± 0.03
3 R	552.5 ± 7.8	171.3 ± 27.2	381.2 ± 32.7	380.6 ± 32.9	0.7 ± 0.6	69.0 ± 5.2	68.9 ± 5.3	0.1 ± 0.02
6	1206.6 ± 28.8	441.4 ± 3.4	765.3 ± 136.1	763.9 ± 136.2	1.4 ± 0.1	63.1 ± 4.3	63.0 ± 4.3	0.1 ± 0.01
6 R	1307.0 ± 44.8	421.7 ± 24.2	885.4 ± 37.8	884.2 ± 37.8	1.2 ± 0.2	67.5 ± 0.0	67.4 ± 0.0	0.1 ± 0.01
9	1676.3 ± 1.1	933.0 ± 70.4	743.3 ± 152.5	734.3 ± 153.2	8.5 ± 0.4	44.3 ± 6.7	43.7 ± 6.8	0.5 ± 0.07
9 R	1656.7 ± 23.3	638.3 ± 74.8	1018.3 ± 91.5	1012.1 ± 92.5	6.3 ± 2.4	61.5 ± 4.9	61.1 ± 4.9	0.4 ± 0.07
12	2411.2 ± 57.6	1448.7 ± 10.0	962.4 ± 175.1	954.0 ± 175.7	8.2 ± 0.3	39.4 ± 6.1	39.1 ± 6.1	0.4 ± 0.05
12 R	2611.8 ± 89.5	1311.6 ± 77.2	1300.2 ± 150.9	1292.5 ± 201.6	8.1 ± 0.3	49.7 ± 5.2	49.4 ± 5.3	0.3 ± 0.04

**Nota:** Últimos 30 días de la fase

## 7.5 Producción de sólidos y lodo extraído en los reactores con biomasa inmovilizada

**CINTAS DE POLIETILENO**

Carga orgánica, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Producción de sólidos		Lodo extraído			
	Px1	Px2	Sólidos	Á. MEFENÁMICO	FLUOXETINA	METOPROLOL
	g·L <sup>-1</sup>	g·d <sup>-1</sup>	g·d <sup>-1</sup>	µg·d <sup>-1</sup>		
3	0.037 ± 0.005	3.432 ± 0.157	0.164 ± 0.002	0.3188 ± 0.0166	0.1223 ± 0.0107	0.1920 ± 0.0340
3 R	0.033 ± 0.004	3.312 ± 0.108	0.461 ± 0.098	1.1896 ± 0.2767	0.2968 ± 0.0501	0.4804 ± 0.0501
6	0.035 ± 0.003	7.799 ± 0.257	0.347 ± 0.034	0.8270 ± 0.0354	0.2870 ± 0.0641	0.3526 ± 0.0751
6 R	0.029 ± 0.004	7.274 ± 0.349	0.682 ± 0.101	1.5396 ± 0.1355	0.4950 ± 0.0417	0.5972 ± 0.0831
9	0.127 ± 0.010	11.921 ± 0.140	1.138 ± 0.093	2.6650 ± 0.0301	0.6433 ± 0.0453	1.5181 ± 0.3793
9 R	0.117 ± 0.012	11.640 ± 0.163	2.498 ± 0.137	6.4789 ± 0.3648	1.3716 ± 0.1172	2.6859 ± 0.0965
12	0.068 ± 0.006	15.009 ± 0.413	1.726 ± 0.186	4.5385 ± 0.3996	1.3719 ± 0.1904	1.4581 ± 0.3952
12 R	0.068 ± 0.012	16.909 ± 0.873	3.243 ± 0.310	8.9213 ± 0.7625	2.3869 ± 0.1621	2.2877 ± 0.5268

**CUBOS DE POLIURETANO**

Carga orgánica, gDQO·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	Producción de sólidos		Lodo extraído			
	Px1	Px2	Sólidos	Á. MEFENÁMICO	FLUOXETINA	METOPROLOL
	g·L <sup>-1</sup>	g·d <sup>-1</sup>	g·d <sup>-1</sup>	µg·d <sup>-1</sup>		
3	0.041 ± 0.005	3.819 ± 0.098	0.167 ± 0.020	0.3114 ± 0.0539	0.0588 ± 0.0126	0.1757 ± 0.0551
3 R	0.035 ± 0.004	3.519 ± 0.115	0.120 ± 0.024	0.2610 ± 0.0363	0.0431 ± 0.0001	0.1090 ± 0.0135
6	0.037 ± 0.003	8.176 ± 0.248	0.122 ± 0.086	0.1880 ± 0.0542	0.0552 ± 0.0148	0.0853 ± 0.0658
6 R	0.035 ± 0.005	8.720 ± 0.360	0.106 ± 0.023	0.2188 ± 0.0904	0.0635 ± 0.0080	0.0821 ± 0.0059
9	0.127 ± 0.010	12.000 ± 0.175	0.307 ± 0.009	0.5116 ± 0.0373	0.1383 ± 0.0169	0.2997 ± 0.0727
9 R	0.117 ± 0.013	11.680 ± 0.229	1.661 ± 0.245	3.0707 ± 1.1090	0.6740 ± 0.2813	1.6391 ± 0.6307
12	0.072 ± 0.006	15.888 ± 0.503	1.332 ± 0.169	3.3106 ± 0.2348	0.9507 ± 0.1743	0.7699 ± 0.2345
12 R	0.068 ± 0.011	17.050 ± 0.677	4.015 ± 0.103	9.8306 ± 1.1620	2.2918 ± 0.5253	2.8999 ± 0.7969

**Nota:** Últimos 30 días de la fase

## ANEXO 8

### CINÉTICAS DE REMOCIÓN DE LOS FÁRMACOS EN LA BIOMASA INMOVILIZADA

#### 8.1 Concentraciones de los fármacos en los duplicados de la fase líquida durante las cinéticas de remoción

Tiempo, min	Cintas de polietileno, PE					
	Á.Mefenámico		Fluoxetina		Metoprolol	
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
0	5.5930	6.3192	2.0162	2.1444	5.3686	6.2517
30	5.4478	5.6171	1.2001	1.3571	5.1728	5.3091
60	5.1260	5.1090	0.8441	0.9187	4.6252	4.7647
90	4.7130	4.5950	0.7127	0.7870	3.9620	4.2220
120	4.4494	3.9456	0.6853	0.6458	3.2992	3.8002
150	4.2346	3.7937	0.5929	0.5568	2.9542	3.2810
180	3.9175	3.6869	0.5473	0.5268	2.7646	2.9939
210	3.7625	3.5687	0.5150	0.5092	2.5498	2.6335
240	3.4223	3.5292	0.4475	0.4571	2.2559	2.3854
270	3.2997	3.4365	0.3978	0.3727	2.1195	2.2866
300	3.1803	3.3798	0.3748	0.3626	2.1059	2.1778
360	3.0854	3.3671	0.3435	0.3418	1.9849	2.0844

Tiempo, min	Cubos de poliuretano, PU					
	Á.Mefenámico		Fluoxetina		Metoprolol	
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
0	5.6035	5.6236	1.9820	2.0155	5.5129	5.4328
30	5.3283	5.0521	1.2248	1.1936	4.8250	4.6357
60	4.6491	4.7946	1.0212	0.9872	3.6928	4.2891
90	4.3194	4.2864	0.8562	0.7521	3.3138	3.6828
120	3.9630	3.8296	0.8014	0.6290	3.0093	3.0285
150	3.5939	3.7693	0.6028	0.5368	2.5985	2.9093
180	3.2100	3.5891	0.4560	0.4713	2.3875	2.6510
210	2.9390	3.2383	0.4118	0.4360	2.1840	2.3400
240	2.6788	2.7681	0.3950	0.4034	1.8690	1.9157
270	2.4193	2.3093	0.3432	0.3617	1.5992	1.7320
300	2.2452	2.1493	0.2686	0.3186	1.4542	1.5606
360	2.1629	2.0492	0.2698	0.3068	1.4186	1.4928

#### 8.2 Porcentajes de remoción promedio de los fármacos durante las cinéticas de remoción

Tiempo, min	Cintas de polietileno, PE			Cubos de poliuretano, PU		
	Á.Mefenámico	Fluoxetina	Metoprolol	Á.Mefenámico	Fluoxetina	Metoprolol
	% Remoción					
30	7.1	38.5	9.8	7.5	39.5	13.6
60	14.1	57.6	19.2	15.9	49.8	27.1
90	21.9	64.0	29.6	23.3	59.8	36.1
120	29.5	68.0	38.9	30.6	64.2	44.8
150	32.6	72.4	46.3	34.4	71.5	49.7
180	36.2	74.2	50.4	39.4	76.8	54.0
210	38.5	75.4	55.4	45.0	78.8	58.7
240	41.6	78.3	60.1	51.5	80.0	65.4
270	43.5	81.5	62.1	57.9	82.4	69.6
300	44.9	82.3	63.1	60.9	85.3	72.5
360	45.8	83.5	65.0	62.5	85.6	73.4

## 8.3 Evolución de la materia orgánica y nitrógeno durante las cinéticas de remoción

Tiempo, min	Cintas de polietileno, PE				Cubos de poliuretano, PU			
	DQO	N-NH <sub>4</sub>	N-NO <sub>2</sub>	N-NO <sub>3</sub>	DQO	N-NH <sub>4</sub>	N-NO <sub>2</sub>	N-NO <sub>3</sub>
	mg·L <sup>-1</sup>							
0	228	25.3			240	27.3		
30	187	21.5	2	2	190	23	2	2.5
60	168	18.5	4	4.5	166	19.8	3	4
90	151	16.5	3	5	150	17.5	4	6
120	138	15	4	6.5	136	15.5	3	8
150	112	14	3	7	115	13.8	2	10.5
180	101	13	2	8	103	12.5	3	11.5
210	88	12.5	3	9.5	87	10.8	4	13
240	79	11.8	3	11	67	9	3	14.5
270	68	10.5	2	12.5	60	7	2	17
300	64	9.5	2	13	57	5.3	2	18
360	61	9.1	2	14	53	4.5	2	18.5

## 8.4 Porcentajes y tasas de remoción de la materia orgánica y nitrógeno durante las cinéticas de remoción

Tiempo, min	Cintas de polietileno, PE				Cubos de poliuretano, PU			
	DQO	N-NH <sub>4</sub>	DQO	N-NH <sub>4</sub>	DQO	N-NH <sub>4</sub>	DQO	N-NH <sub>4</sub>
	% Remoción		Tasa, mg·m <sup>-2</sup> ·h <sup>-1</sup>		% Remoción		Tasa, g·m <sup>-2</sup> ·h <sup>-1</sup>	
30	18.0	14.9	8.2	0.75	20.7	15.6	10.0	0.86
60	26.3	26.7	3.8	0.60	30.6	27.5	4.8	0.66
90	33.7	34.7	3.4	0.40	37.4	35.8	3.3	0.45
120	39.4	40.6	2.6	0.30	43.2	43.1	2.8	0.40
150	50.8	44.6	5.2	0.20	51.9	49.5	4.2	0.35
180	55.9	48.5	2.3	0.20	56.9	54.1	2.4	0.25
210	61.3	50.5	2.5	0.10	63.8	60.6	3.3	0.35
240	65.2	53.5	1.8	0.15	72.1	67.0	4.1	0.35
270	70.1	58.4	2.2	0.25	74.9	74.3	1.3	0.40
300	72.0	62.4	0.9	0.20	76.3	80.7	0.7	0.35
360	73.1	64.0	0.5	0.08	78.1	83.5	0.8	0.15

## 8.5 Tasas de remoción de los fármacos durante las cinéticas de remoción

Tiempo, min	Cintas de polietileno, PE			Cubos de poliuretano, PU		
	Á.Mefenámico	Fluoxetina	Metoprolol	Á.Mefenámico	Fluoxetina	Metoprolol
	Tasa, µg·m <sup>-2</sup> ·h <sup>-1</sup>					
30	0.0851	0.1610	0.1143	0.0855	0.1595	0.1500
60	0.0833	0.0798	0.1096	0.0946	0.0414	0.1494
90	0.0931	0.0264	0.1211	0.0846	0.0404	0.0995
120	0.0917	0.0169	0.1089	0.0821	0.0180	0.0968
150	0.0368	0.0182	0.0868	0.0434	0.0294	0.0535
180	0.0426	0.0076	0.0479	0.0570	0.0214	0.0474
210	0.0274	0.0050	0.0577	0.0628	0.0080	0.0520
240	0.0381	0.0120	0.0544	0.0738	0.0050	0.0747
270	0.0216	0.0135	0.0236	0.0726	0.0094	0.0458
300	0.0177	0.0033	0.0123	0.0337	0.0119	0.0320
360	0.0108	0.0052	0.0215	0.0184	0.0011	0.0104