



**UNIVERSIDAD DEL MAR**

Campus Puerto Ángel

**COMPORTAMIENTO, DESTINO Y BIODEGRADABILIDAD  
DE ANTIBIÓTICOS DURANTE LA HIDRÓLISIS DE ORINA  
HUMANA EN UN BIORREACTOR**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias Ambientales**

Presenta:

Ingeniera Jeannette Evelin Huerta Peña

Directora:

M.C. Belem Espinosa Chávez

Codirectora:

Dra. Susana García Ortega

Puerto Ángel, Oaxaca, México

2023

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Esta tesis se elaboró en los laboratorios de Ingeniería Ambiental de la Universidad del Mar, campus Puerto Ángel bajo la codirección de la M.C. Belem Espinosa Chávez y de la Dra. Susana García Ortega.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-868041) así como apoyo del proyecto: Obtención de estruvita a partir del tratamiento biológico anaerobio de aguas amarillas en un reactor LFI. CUP:2IE1603.

El posgrado en Ciencias Ambientales, opción terminal Química Ambiental de la Universidad del Mar campus Puerto Ángel se encuentra inscrito dentro del Programa Nacional de Posgrados del CONACYT.

## DEDICATORIA

Este trabajo de investigación es para todos aquellos, familiares y amigos que impulsaron y apoyaron mis planes de seguir adelante, a pesar de las adversidades y tropiezos siempre dándome su voto de confianza, para aquellos que cerca o lejos de mí, estuvieron atentos a cada paso que daba conforme avanzaba el tiempo.

Mi mejor acierto siempre será tenerlos cerca, gracias infinitas por todo lo cedido a mi persona, por sus consejos, por sus risas y por hacerme sentir parte de una familia, cuando la mía no estuvo cerca.

*Lo que distingue las mentes verdaderamente originales  
no es que sean las primeras en ver algo nuevo,  
sino que son capaces de ver como nuevo lo que es viejo,  
conocido, visto y menospreciado por otros.*

*Friedrich Nietzsche.*

*Omnibus est dubitandum...*

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, agradezco a la M. en C. Belem Espinosa Chávez y a la Dra. Susana García Ortega, por su guía, paciencia y orientación durante este camino, así como el conocimiento, asesoría y su apoyo incondicional, por sus enseñanzas dentro y fuera del ámbito académico, por impulsar mis metas y guiar mis pasos para mejorar como persona y profesional.

Gracias también al Dr. Aitor Aizpuru, Dra. Florina Ramírez Vives y Dra. Patricia Castilla Hernández, por el tiempo invertido en la revisión del escrito final, por sus preguntas acertadas para la mejora del documento.

A los donadores de orina, que sin ustedes el proyecto no se hubiera llevado a cabo.

A mis compañeros y amigos de trabajo en proyectos similares que hicieron mi estancia escolar más amena, dentro y fuera de las aulas y laboratorios, así como su apoyo incondicional en las buenas, pero sobre todo en los momentos de crisis.

A los profesores que impartieron clases y me enseñaron a ver más allá de lo evidente, por sus consejos y experiencias que enriquecieron mi camino e impulsaron a dar lo mejor día con día.

## RESUMEN

En este trabajo, se estudió el comportamiento de sulfametoxazol (SMX) en presencia de trimetoprima (TMP) durante el tratamiento de agua residual amarilla (orina humana) en un reactor anaerobio de lecho fluidizado inverso (LFI). El SMX y la TMP son antibióticos que pueden estar presentes en orina humana debido a que no son metabolizados completamente en el cuerpo humano. El tratamiento de agua residual amarilla (ARA) consiste en hidrolizar la urea en un reactor por medio de un consorcio de microorganismos ureolíticos. La hidrólisis de urea y por consecuencia el aumento de pH en el medio promueve la formación de un precipitado (estruvita), que por sus características y composición ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) puede utilizarse como un fertilizante de lenta liberación, proporcionando un valor agregado a un “residuo”, en este caso la orina humana. El desempeño del reactor para el tratamiento de ARA se evaluó durante 158 lotes. Se llevaron a cabo cinéticas de ureólisis para evaluar el desempeño de la biomasa ureolítica del reactor LFI a largo plazo. Además, se evaluó la biodegradabilidad, adsorción y bioadsorción de SMX en ARA e hidrólisis de SMX en agua, estos ensayos se realizaron en lote. También, se evaluó el efecto que SMX y TMP tienen en los parámetros cinéticos de la ureólisis, en la biomasa de microorganismos ureolíticos y en el desempeño del reactor. La determinación de SMX se realizó con el método de determinación de estándares de punto H (par de longitud de onda 260-304.7 nm). Entre los resultados más relevantes se encontró que a una concentración de 50 mg/L de SMX en presencia de 10 mg/L de TMP la remoción de SMX se llevó a cabo principalmente por biodegradación (85 % en 0.5 d). También, se presentó un proceso de adsorción en el soporte de poliuretano de baja densidad, sin embargo, hay un proceso de desorción con el aumento de pH, lo que ocurre al hidrolizarse la urea. La bioadsorción en la biomasa inerte y la hidrólisis de SMX fueron mínimos. La presencia de 50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP en el reactor LFI, aplicado cada tercer día, tuvo efecto en la biomasa. Al final del periodo en el que se aplicaron 10 pulsos de antibióticos, de manera intermitente, la biomasa registrada fue de 2.0 kg SVI/m<sup>3</sup> de soporte, mientras que al inicio del mismo periodo fue de 2.41 kg SVI/m<sup>3</sup>. La remoción promedio de urea en los lotes con antibióticos fue de 81.00 %, y la constante de ureólisis ( $k_u$ ) fue de  $1.7 \pm 0.22$  1/d. En comparación en lotes sin antibióticos la remoción de urea fue de 82.39 % y la  $k_u$  fue  $1.9 \pm 0.15$  1/d. El tratamiento de ARA en un biorreactor de LFI es una alternativa viable para la obtención de estruvita, sin embargo, se debe de considerar la inocuidad de los sólidos precipitados.

## Abstract

In this research, the behaviour of sulfamethoxazole (SMX) along with trimethoprim (TMP) was studied during the treatment of yellow wastewater (human urine) in a downflow fluidised bed reactor (DFFBR). SMX and TMP, both antibiotics, can be present in human urine due to the poor metabolization of the active ingredients. The biological treatment of yellow wastewater (YWW) in a DFFBR is performed through a consortium of ureolytic microorganisms, which can perform urea hydrolysis. The urea hydrolysis triggers the formation of a precipitate (struvite) due to the increase of pH. Struvite ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) is a slow-release fertilizer that would add value to a waste, in this case human urine. The performance of the DFFBR for YWW treatment was evaluated throughout 158 batches. Ureolysis kinetics were done to evaluate the performance of the ureolytic biomass within the DFFBR during the whole time the reactor was run. SMX biodegradability, adsorption and biosorption in a YWW matrix were evaluated in batches. Also, SMX hydrolysis in water was evaluated. Besides, the effect of SMX and TMP was evaluated on the ureolysis kinetics, on the biomass of ureolytic microorganisms and on the performance of the DFFBR. SMX was quantified using the H point standard additions method (260-304.7 nm wavelength pair). The removal of 50 mg/L of SMX in the presence of 10 mg/L of TMP was mainly due to biodegradation (85 % in 0.5 d). Adsorption of SMX occurred on the low-density polyurethane support material, however, desorption also happened at high pH. Biosorption on inert biomass and hydrolysis were minimum. Concentrations of SMX (50 mg/L) and TMP (10 mg/L) applied every other batch 10 times, into the reactor had an impact on the biomass. At the end of the last stage when the antibiotics were added, the biomass was  $2.0 \text{ kg/m}^3$  of immobilised volatile solids, while at the beginning of the same stage the biomass was  $2.41 \text{ kg/m}^3$ . The average urea removal during the antibiotics application was 81.0 %, and the ureolysis constant rate ( $k_u$ ) was  $1.7 \pm 0.22 \text{ 1/d}$ . In comparison, the average urea removal, while the reactor was treating YWW without antibiotics, was 82.39 % and the  $k_u$  was  $1.9 \pm 0.15 \text{ 1/d}$ . The treatment of YWW in a DFFBR is a viable alternative for the recovery of struvite, however, the innocuity of the solids must be considered.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
ÍNDICE DE CUADROS .....	xii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Orina humana .....	2
1.1.1. Hidrólisis de urea (ureólisis).....	2
1.1.2. Estruvita .....	4
1.1.2.1. Recuperación de estruvita a partir de orina humana.....	5
1.2. Contaminantes emergentes .....	6
1.2.1. Antibióticos .....	7
1.2.1.1. Sulfametoxazol y trimetoprima .....	8
1.3. Reactor anaerobio de lecho fluidizado inverso (LFI).....	10
2. ANTECEDENTES .....	12
3. JUSTIFICACIÓN .....	16
4. HIPÓTESIS .....	17
5. OBJETIVOS .....	18
5.1. Objetivo general. ....	18
5.2. Objetivos específicos. ....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
6.1. Orina humana. Agua residual amarilla.....	19
6.2. Inóculo. Lodo granular anaerobio. ....	19
6.3. Soporte de polietileno de baja densidad.....	19
6.4. Antibióticos. Sulfametoxazol y trimetoprima. ....	19
6.5. Técnicas analíticas.....	19
6.6. Operación del reactor de LFI.....	21
6.6.1. Inmovilización de biomasa en el soporte .....	21

6.6.2. Operación del reactor de LFI.....	21
6.6.3. Actividad ureolítica específica (AUE).....	23
6.7. Biodegradabilidad y comportamiento de antibióticos .....	24
6.7.1. Pruebas de biodegradabilidad .....	26
6.7.2. Prueba de bioadsorción .....	26
6.7.3. Prueba de adsorción.....	27
6.7.4. Prueba de hidrólisis .....	28
6.7.5. Cuantificación de antibiótico en agua residual amarilla .....	28
6.8. Constantes cinéticas. Modelo modificado de Gompertz .....	29
6.9. Desempeño del reactor de LFI con antibiótico.....	31
6.10. Caracterización de precipitados .....	31
6.10.1. Cuantificación de Mg <sup>2+</sup> .....	32
6.11. Análisis de datos .....	32
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	33
7.1. Operación y desempeño del reactor de LFI.....	33
7.1.1 Actividad ureolítica específica (AUE) y constantes cinéticas .....	40
7.2. Biodegradabilidad y comportamiento de antibióticos .....	45
7.2.1. Determinación de la concentración de antibióticos .....	45
7.2.2. Biodegradabilidad de antibióticos .....	45
7.2.3. AUE en presencia de antibióticos .....	49
7.2.4. Comportamiento de antibióticos. Adsorción, bioadsorción e hidrólisis ..	54
7.2.5. Desempeño del reactor de LI con antibiótico .....	57
7.3. Caracterización del precipitado recuperado.....	60
8 CONCLUSIONES.....	62
9 RECOMENDACIONES .....	63
10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
11. ANEXO.....	76



a.	Anexo 1: Validación del método adición de estándares de punto H para la cuantificación de sulfametoxazol y trimetoprima. ....	76
b.	Anexo 2. Análisis de Mg <sup>2+</sup> por espectroscopia de absorción atómica (EAA) ....	81
i.	Curva de calibración para la determinación de Mg <sup>2+</sup> .....	81
ii.	Preparación y análisis de la muestra .....	81
c.	Anexo 3: curvas de calibración.....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la ureasa. Modificado de Lebrette et al. (2014) como se citó en Rodríguez-Jiménez et al. (2016). .....	3
Figura 2. Estructura química de sulfametoxazol (a) y trimetoprima (b). .....	10
Figura 3. Reactor anaerobio de lecho fluidizado inverso (LFI) modificado de García-Calderón et al. (1997). .....	10
Figura 4. Reactor de lecho fluidizado. 1) línea de alimentación/recirculación, 2) columna de reacción (se encuentra la biomasa fija en el soporte), 3) nivelador/separador de tres fases, 4) bomba de recirculación/alimentación, 5) toma de muestra, 6) lavador de gas, 7) fondo cónico para la recuperación de precipitados. ....	22
Figura 5. Diagrama de Actividad Ureolítica Específica de la biomasa inmovilizada en el soporte. ARA: agua residual amarilla. ....	23
Figura 6. Diseño experimental para biodegradación, bioadsorción, adsorción e hidrólisis. $\text{NaN}_3$ : azida de sodio. ....	25
Figura 7. Diseño experimental cinética bioadsorción. ....	27
Figura 8. Cinética adsorción del antibiótico en el soporte de polietileno de baja densidad. ....	27
Figura 9. Metodología para cuantificar antibióticos en muestras de ARA. ....	29
Figura 10. Concentración de urea inicial (●), final (■) y porcentaje de remoción (◆) durante la etapa de inmovilización (I), ureólisis sin antibiótico (II) y con pulsos de antibiótico (III). ....	34
Figura 11. Evaluación de amonio inicial (●) y final (■) durante el periodo de inmovilización (I), ureólisis sin antibiótico (II) y con pulsos de antibiótico (III). ....	35
Figura 12. Perfil de evolución de pH a la entrada (●) y salida (■) durante el periodo de inmovilización (I), ureólisis sin antibiótico (II) y con antibiótico (III). ....	36
Figura 13. Evolución de la concentración de $\text{N-NH}_4^+$ a través del tiempo de reacción durante la determinación de cinéticas de ureólisis de la biomasa inmovilizada en el soporte de baja densidad utilizado en el reactor de LFI a través del tiempo de operación del reactor alimentado con ARA. ....	42
Figura 14. Cinética de degradación de SMX-TMP mediante biodegradación anaerobia. Las concentraciones evaluadas en el gráfico corresponden únicamente a SMX. ■ 50, ◆ 65 y ▲ 75 mg/L. ....	46

Figura 15. Consumo de urea (a) y producción de $\text{N-NH}_4^+$ (b) a través del tiempo con diferentes concentraciones de antibióticos; 50-10 (■), 65-13, (◆), 75-15 (▲) mg/L SMX-TMP y control (●) sin antibióticos.....	50
Figura 16. Comportamiento de pH a 50-10 (■), 65-13, (◆) y 75-15 (▲) mg/L SMX-TMP respectivamente en comparación con el control (●).....	53
Figura 17. Comportamiento de SMX durante la evaluación a través del tiempo de la biodegradación, bioadsorción, adsorción e hidrólisis. ....	54
Figura 18. Perfil de evolución de pH durante la evaluación de la biodegradación, bioadsorción, adsorción e hidrólisis a través del tiempo. ....	55
Figura 19. Espectro de absorbancia de SMX a 10 mg/L (-), de TMP a 10 mg/L (-) y la mezcla de ambos antibióticos (-). ....	78
Figura 20. Ejemplo de punto H para 0.0 mg/L de SMX en el par de longitudes de onda 260-304.7 nm. ....	78
Figura 21. Curva de calibración para la determinación de $\text{Mg}^{2+}$ .....	83
Figura 22. Curva de calibración $\text{N-NH}_4^+$ .....	83
Figura 23. Curva de calibración DQO.....	84
Figura 24. Curva de calibración $\text{SO}_4^{2-}$ .....	84
Figura 25. Curva de calibración $\text{PO}_4^{3-}$ .....	85

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración promedio inicial y final de los parámetros evaluados en el monitoreo del proceso de ureólisis en el RLFI durante la etapa II.....	38
Cuadro 2. Constantes cinéticas de ureólisis de la biomasa inmovilizada en el soporte usado en el reactor de LFI.....	41
Cuadro 3. Eliminación en lote de SMX y constante de velocidad de reacción. ....	48
Cuadro 4. Constantes cinéticas y AUE con diferente concentración de antibiótico. ....	52
Cuadro 5. Comparación de los valores promedio de remoción de los parámetros evaluados durante la operación del reactor (lotes 138 a 158) con y sin antibiótico. n=10. ....	58
Cuadro 6. Validación del método para SMX en orina hidrolizada humana (n=5). ....	79
Cuadro 7. Validación del método para TMP en orina hidrolizada humana (n=5). ....	79

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA: Absorción Atómica

AR: Aguas Residuales

ARA: Agua Residual Amarilla

AUE: Actividad Ureolítica Específica

CSTR: reactor de tanque agitado (por sus siglas en inglés)

CE: Contaminantes Emergentes

DQO: Demanda Química de Oxígeno

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (por sus siglas en inglés)

OF: Orina Fresca

OH: Orina Hidrolizada

PTAR: Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

LFI: Lecho Fluidizado Inverso

SMX: Sulfametoxazol

SF: Sólidos Fijos

ST: Sólidos Totales

SV: Sólidos Volátiles

SVI: Sólidos Volátiles Inmovilizados

TMP: Trimetoprima

Tr:Tiempo de Reacción

TRH: Tiempo de retención hidráulica

UASB: Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente (por sus siglas en inglés)

## 1. INTRODUCCIÓN

Una de las problemáticas de mayor preocupación a nivel mundial es el abastecimiento de agua para consumo humano, se sabe que este producto no está distribuido equitativamente con una población en aumento, además que una parte de esta agua está contaminada y requiere diversos tratamientos para consumirla.

De acuerdo con la NOM-001-SEMARNAT-2021 y la NOM-014-CONAGUA-2003, el concepto de aguas residuales se define como “Las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas”. De manera general las aguas residuales (AR) se clasifican en: aguas residuales domésticas, municipales, industriales o agrícolas (Kadlec y Knight, 1996 como se citó en Castañeda y Flores, 2013). Las aguas domésticas están constituidas por aguas grises (provenientes de lavado, ducha, etc.), aguas amarillas (orina) y aguas cafés (heces fecales) (Battistoni *et al.*, 1997; Kujawa-Roeleveld y Zeeman, 2006). Estas aguas llegan a las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), en donde por medio de tratamientos físicos, químicos o biológicos se reduce la carga orgánica y se disponen en cuerpos de agua como ríos o lagunas. Un inconveniente de las PTAR, es que la mayoría de ellas no están diseñadas para eliminar nutrientes (nitrógeno, fósforo) y compuestos emergentes como fármacos (Petrović, Gonzalez y Barceló, 2003). Una opción para aumentar la eficiencia de las PTAR y mejorar la calidad de agua tratada es separar los efluentes desde la fuente de generación y dar el tratamiento adecuado según sus características (De Anda Sánchez 2017). Haciendo alusión al concepto de la economía circular que busca revalorizar residuos que puedan ser usados como materia prima en otros procesos y se favorezca la reducción de costos de producción (Lett, 2014); las aguas amarillas son un ejemplo de residuos que pueden ser revalorizados debido a que a pesar de que constituyen únicamente el 1 % del volumen total de las AR, aportan grandes proporciones de nutrientes (81 % N, 53 % P y 62 % K en promedio) (Larsen y Maurer, 2011; Höglund, 2001 como se citó en Randall y Naidoo, 2018). Nutrientes que pueden ser utilizados para la producción de fertilizantes (Randall y Naidoo, 2018). Por ejemplo, la estruvita que es un mineral que se define como un fertilizante de lenta liberación (Latifian, Liu y Mattiassona, 2012).

## 1.1. Orina humana

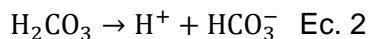
Es un compuesto de desecho de color amarillo secretado por los riñones como resultado de la depuración y el filtrado de la sangre, el cual se acumula en la vejiga y se expulsa por la uretra. A través de la orina, el cuerpo humano elimina sustancias tóxicas y un porcentaje de sales, contiene constituyentes orgánicos e inorgánicos. Una persona al año puede excretar por medio de la orina: 2.5-4.3 kg de N, 0.7-1.0 kg de P y 0.9-1.0 kg de K (Geigy Scientific Tables (1981) como la citaron en Kirchmann y Pettersson, 1995). En su composición se encuentran  $\text{Na}^+$  (1.17-4.39 g/L),  $\text{Ca}^{2+}$  (0.03-0.39 g/L) y  $\text{Mg}^{2+}$  (0.02-0.21 g/L), y compuestos que mayormente contienen nitrógeno, tales como urea (9.3-23.3 g/L), creatinina (0.67-21.5 g/L) y ácido úrico (0.04-0.67 g/L) (Randall *et al.*, 2016 como se citó en Randall y Naidoo, 2018). La concentración de estos compuestos depende principalmente de la actividad física, dieta y condiciones ambientales, entre otros factores (Rose *et al.*, 2015). Debido a su composición, la orina humana puede ser usada como fertilizante (estruvita) (Kirchmann y Pettersson, 1995; Tao *et al.*, 2019), dándole un valor agregado a dicho desecho.

### 1.1.1. Hidrólisis de urea (ureólisis)

De los nutrientes presentes en la orina, el N está en mayor proporción en forma de urea (80-90 %), amoníaco (7 %) y creatinina (6 %) (Larsen y Gujer, 1996; Kujawa-Roeleveld y Zeeman, 2006). De estos compuestos, la urea es hidrolizada hasta amonio y bicarbonato mediante la actividad de microorganismos ureolíticos que contienen la enzima ureasa. La ecuación general que describe el proceso de ureólisis (Ec.1) (Udert, Larsen y Gujer, 2003) está dada por:

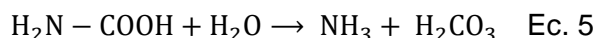


La ureasa cataliza la reacción de hidrólisis de la urea transformándola en carbamato y amoníaco, y posteriormente el carbamato es hidrolizado para transformarse en ácido carbónico y una segunda molécula de amoníaco (Moblely y Hausinger, 1989), incrementando simultáneamente el pH, esto debido a la disociación del ácido carbónico y la interacción de las moléculas de amoníaco y agua que se transforman en ion amonio e hidróxido (ecuaciones 2 y 3). Este incremento puede provocar la volatilización del amoníaco y por lo tanto disminuye el valor de la orina como fertilizante (Jaatinen *et al.*, 2016).

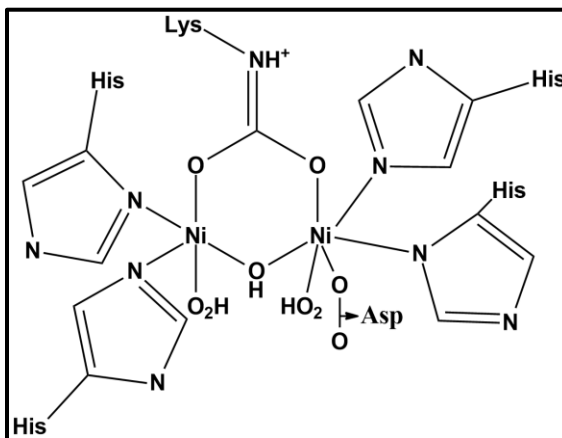




Para que la ureólisis pueda ocurrir, debe estar presente la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) (Fig. 1) también llamada amidohidrolasa de urea, enzima liberada por los microorganismos presentes en la orina y en ambientes naturales (Tang *et al.*, 2015; Chipako y Randall, 2020). Esta enzima es una metaloenzima con dos iones de níquel por unidad catalítica en el sitio activo (Amtul *et al.*, 2002 como se citó en Ray, Saetta, y Boyer 2017). En las ecuaciones 4 y 5 se describen las reacciones que se llevan a cabo en la transformación de urea a amoníaco (Mobley y Hausinger, 1989):



La obtención de estos productos, así como el aumento de pH son características consecuentes de la acción de la ureasa (Krajewska 2009b; Jaatinen *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Estructura química de la ureasa. Modificado de Lebrette *et al.* (2014) como se citó en Rodríguez-Jiménez *et al.* (2016).

La ureasa está organizada en un arreglo bipiramidal trigonal, el sitio activo, compuesto por un dímero de Ni de alto spin, su geometría de coordinación es octaédrica distorsionada (Fig. 1). Los sitios activos tienen diferente objetivo, uno se encarga de la unión y activación del sustrato (urea) y el otro de la unión y activación de la molécula de agua. La hidrólisis de urea con esta enzima es  $10^4$  veces más rápida que sin ella, y el proceso depende de la cantidad de ureasa en la orina o del ambiente circundante en el cual se lleva a cabo el proceso (Amtul *et al.*, 2002 como se citó en Ray, Saetta, y Boyer, 2017).



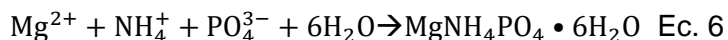
Entre los factores que afectan la hidrólisis están el pH y la temperatura, el pH aumenta al transformarse la urea en amonio-amoniaco y en carbonatos debido a la actividad de los microorganismos presentes en la orina (Krishnamoorthy *et al.*, 2020).

Los valores típicos de pH de la orina fresca (OF) oscilan entre 6 y 7 y al hidrolizarse llegan hasta 9.2-9.5, este valor es importante ya que indica que compuesto está mayormente presente en la solución (amoniaco o ion amonio) (Krishnamoorthy *et al.*, 2020).

Durante la hidrólisis de urea, se tienen las condiciones que favorecen la precipitación de minerales como calcita, hidroxiapatita y estruvita. La orina, al tener nutrientes como magnesio, nitrógeno en forma de ion amonio y fósforo como fosfato, al hidrolizarse la urea presente en esta matriz genera amoniaco, incrementándose el pH lo que favorece la interacción de estos tres nutrientes para finalmente precipitar como estruvita.

### 1.1.2. Estruvita

La estruvita, es un mineral blanco cristalino de formación ortorrómbica cuya fórmula molecular es  $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ , tiene un peso molecular de 247.42 g/mol, un *pks* de 13.2 (25 °C), químicamente es poco soluble a pH neutro y alcalino, es soluble en condiciones ácidas (pH menor a 5) (Taylor, Frazier y Gurney, 1963; Booker, Priestley y Fraser, 1999). Este mineral precipita cuando las relaciones de magnesio, amonio y fosfato se encuentran en una relación molar de 1:1:1 (Ec. 6) (Doyle y Parsons, 2002).



De acuerdo con Booker, Priestley y Fraser (1999) para que la precipitación de estruvita se lleve a cabo, se necesita un pH entre 8.8 y 9.4, en este rango se tiene una presencia promedio del 80 % de  $MgNH_4PO_4$  y un remanente de  $MgHPO_4$ . A pH mayor a 9.8 el amoniaco libre se volatiliza, disminuyendo la tasa de formación y pureza de la estruvita, y a un pH menor a 8 la precipitación ocurre lentamente y puede tardar varios días para lograr la precipitación total (Battistoni *et al.*, 1997). El estudio realizado por Momberg y Oellermann (1992) demuestra que la formación de los cristales de estruvita pasó de días (pH 7) a 1 h (pH 8.5), lo que refuerza lo dicho por Battistoni *et al.* (1997). Así como el pH es fundamental para la precipitación de este mineral, existen otros factores que influyen, como la composición y saturación iónica presente en la solución, mientras que para la forma del cristal depende principalmente de la temperatura a la que se lleva la reacción, la proporción molar de las especies, las cinéticas, la reacción reversible entre iones, etc.

(Booker, Priestley y Fraser, 1999), lo que define si un cristal es alargado, aglomerado o bien definido (Booker, Priestley y Fraser, 1999; Stratful, Scrimshaw y Lester, 2001).

La estruvita puede precipitar de varias maneras: precipitación física (aireación) para eliminar el CO<sub>2</sub> de la matriz tratada, alterando la presencia de carbonatos y por lo tanto aumenta el pH de la muestra (Battistoni *et al.*, 2000); por precipitación química en la que se agregan reactivos como NH<sub>4</sub>Cl, MgCl<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o NaOH en la matriz estudiada, esto con la finalidad de regular el pH y acelerar la precipitación de estruvita (Taylor, Frazier y Gurney, 1963; Booker, Priestley y Fraser, 1999; Latifian, Liu y Mattiassona, 2012) y por precipitación biológica (biomineralización), en la que actúan microorganismos capaces de producir estruvita, tales como *Bacillus pumilus*, *Brevibacterium antiquum*, *Myxococcus xanthus*, *Halobacterium salinarum* e *Idiomarina loihiensis* (Soares *et al.*, 2014; Leng, Colston y Soares, 2020). Los microorganismos tienen un papel importante en la biomineralización de la estruvita y se encuentran en ambientes naturales como suelo, formaciones geológicas, aguas superficiales, biopelículas, etc. (Siddique y Chahal, 2011).

#### **1.1.2.1. Recuperación de estruvita a partir de orina humana**

Posterior al descubrimiento de la estruvita (1939), se comenzaron a reportar problemas en PTAR, debido a incrustaciones de este mineral que reducían considerablemente el diámetro de las tuberías, lo que ocasionaba mayores gastos energéticos y económicos (Young y Schroeder 1998, como se citó en Doyle y Parsons, 2002). A pesar de que la estruvita genera diversos problemas en las PTAR, puede utilizarse como fertilizante (debido a su composición), de ahí la importancia de separar los efluentes desde su origen con la finalidad de evitar los problemas antes mencionados.

La precipitación del sólido puede ocurrir de manera espontánea en la orina cuando el pH incrementa, debido a que los iones de magnesio y calcio reaccionan con los iones de fosfato presentes en la orina, precipitando en forma de estruvita, hidroxiapatita o estruvita-K (Etter, Udert y Gounden, 2014).

En la orina se han encontrado diversos microorganismos capaces de precipitar estruvita, entre los que se tienen *Proteus mirabilis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Pseudomonas* (Burne y Chen 2000 citado por Krajewska, 2009a), a mayor concentración de urea presente en la orina mayor es el estímulo de los microorganismos ureolíticos y por lo tanto mayor precipitación del mineral se tendrá (Krajewska 2009a).

## 1.2. Contaminantes emergentes

A través de la orina se eliminan diferentes compuestos derivados del metabolismo humano tales como hormonas y compuestos químicos ingeridos vía oral o cutánea que son parcialmente metabolizados (Larsen y Maurer, 2011). Algunos de estos compuestos han sido clasificados como contaminantes emergentes (CE); los cuales tienen como característica estar en el medio ambiente (principalmente en el agua), en concentraciones muy bajas (ng/L o µg/L), algunos son persistentes y bioacumulables (Magi *et al.*, 2018). No existen directrices legislativas para regular su presencia en el medio ambiente (Patiño, Díaz y Ordóñez, 2014). Al no haber leyes que los regulen, su presencia tampoco es monitoreada (Stuart *et al.*, 2012). Estos contaminantes se clasifican principalmente en productos sintéticos (compuestos hechos por el hombre) y productos químicos naturales (hormonas excretadas por invertebrados y vertebrados) (Janna, 2011 como se citó en Dimpe y Nomngongo, 2016). Estas sustancias químicas existen en el medio ambiente en cantidades desconocidas y carecen de datos ecotoxicológicos extensos, y al ser descargados en el medio ambiente acuático podrían tener un efecto negativo para el ambiente y la salud (Stuart *et al.*, 2012), generando resistencia microbiana, riesgo de cáncer y alteraciones en el proceso reproductivo o durante el embarazo (Krishnan *et al.*, 1993; Witte, 1998).

Entre los CE se encuentran plaguicidas, hormonas, fármacos, productos para el cuidado personal, surfactantes y residuos de estos, edulcorantes artificiales, esteroides y diversos aditivos industriales (Petrović, Gonzalez y Barceló, 2003). Diversos estudios han detectado muchos de estos contaminantes a nivel traza en efluentes de aguas residuales, aguas superficiales y subterráneas, y ocasionalmente en agua potable (Fent, Weston y Caminada, 2006).

Debido a la creciente demanda en el consumo de fármacos, se ha puesto un interés particular en los efectos que estos pueden tener si se desechan de forma incorrecta.

### 1.2.1. Antibióticos

Los fármacos son producidos a partir de síntesis orgánica y por lo general son parcialmente metabolizados por el organismo después de consumirse (Jiménez 2011) siendo la orina la fuente más importante de eliminación de fármacos (Olsen *et al.*, 2009). Una parte del compuesto original o sus metabolitos (compuesto secundario de transformación del compuesto original) ingresan en las PTAR a través de orina o heces fecales que terminan introduciéndose en el ambiente después de su degradación parcial (Doll y Frimmel, 2003).

Una problemática particular de los fármacos en el medio es que son sustancias bioactivas (compuestos que afectan la actividad celular), lo cual hace que puedan transformarse fácilmente en otros compuestos, pudiendo ser más perjudiciales que el fármaco original (Rivera-Jaimes *et al.*, 2018). Debido a su persistencia y su alta actividad en concentraciones moderadas o bajas, los fármacos presentan un problema potencial al ambiente. Los residuos de antibióticos, fármacos utilizados para tratar infecciones, en el medio ambiente inducen resistencias en cepas bacterianas que causan una grave amenaza para la salud pública (Hirsch *et al.*, 1999). Actualmente un mayor número de infecciones no pueden tratarse con los antibióticos conocidos actualmente. Se estima que más del 70 % de las bacterias presentan resistencia contra al menos un antibiótico, y otras muestran patrones de resistencia múltiple (Hirsch *et al.*, 1999).

A pesar de que el descubrimiento de los antibióticos fue uno de los mayores logros de la ciencia médica del siglo pasado por los usos que se les da (tratamiento de infecciones o como promotores del crecimiento de animales) (Carvalho y Santos, 2016), actualmente son considerados como contaminantes importantes, debido al mal uso o al consumo excesivo, lo que provee concentraciones altas de estos compuestos al medio ambiente (Cetecioglu *et al.*, 2015).

Diferentes clases de antibióticos se han detectado en diversas matrices, por ejemplo efluentes de PTAR, aguas superficiales, ríos y AR en diversas concentraciones, tal es el caso de sulfametoxazol (SMX) (0.11-0.72 µg/L) y trimetoprima (TMP) (0.03-0.32 µg/L) (Hirsch *et al.*, 1999; Bischel *et al.*, 2015; Rivera-Jaimes *et al.*, 2018). En efluentes descentralizados (orina) se ha detectado la presencia de SMX (6800 µg/L), TMP (1300 µg/L) y claritromicina (17 µg/L) (Bischel *et al.*, 2015).

Debido al uso común de antibióticos en enfermedades infecciosas y al amplio espectro de uso médico que tienen sulfametoxazol y trimetoprima, que van desde enfermedades infecciosas, de oído, de tracto urinario o incluso como parte del tratamiento contra el virus de inmunodeficiencia humana, se decidió trabajar con ellos en esta investigación. Sus características se mencionan a continuación.

#### **1.2.1.1. Sulfametoxazol y trimetoprima**

Las sulfonamidas, también conocidas como sulfas, son derivados sintéticos de las sulfanilamidas ( $R=H$ ) (Won *et al.*, 2011). Debido a su bajo costo y alta eficiencia contra las infecciones bacterianas comunes, las sulfonamidas son de los agentes antibacterianos más usados en la medicina humana y veterinaria (Biswas *et al.*, 2007). La introducción de las sulfas en sistemas acuáticos genera principalmente resistencia microbiana, trayendo efectos adversos en los microorganismos, peces y plantas del medio, y como consecuencia a estos efectos se tiene la desestabilización en el ecosistema (Errayes *et al.*, 2017).

El sulfametoxazol (4-amino-N-(5-metil-3-isoxazol) bencenosulfonamida) (SMX) (Fig. 2a) tiene un peso molecular de 253.27 g/mol, es un antibiótico de amplio espectro bactericida (Baran *et al.*, 2011). Es un polvo color blanco inodoro, soluble en acetona, hidróxido de sodio diluido y etanol, y poco soluble en agua (Food and Drug Administration 2012) (FDA 2012); antibiótico polar de baja adsorción conocido como contaminante de las fuentes de agua (Müller *et al.*, 2013). No se ha previsto que sea genotóxico en condiciones de exposición laboral, en condiciones normales de uso no se conoce que ocurran daños a la salud, no tiene efectos carcinogénicos con la exposición ocupacional. Se ha detectado que las comunidades de microorganismos en los cuales tienen formación de biopelícula de agua dulce reaccionan a una exposición de 1.97 nmol/L de SMX con cambios en las actividades de transcripción de los genes implicados en la replicación y la transcripción, así como genes relacionados con elementos estructurales de la membrana celular y la membrana externa (Yergeau *et al.*, 2010 como se citó en Johansson, Janmar y Backhaus, 2014).

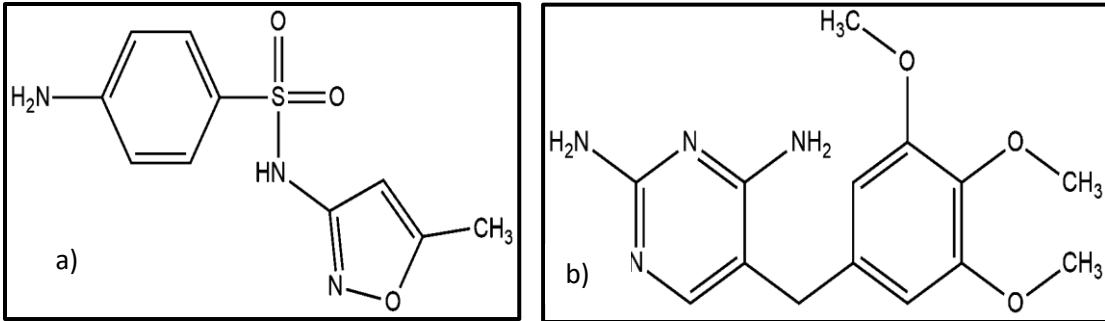
El mecanismo de acción de las sulfas afecta la formación del ácido tetrahidrofólico el cual participa en la síntesis de ácidos nucleicos y por lo tanto de proteínas. Además, inhibe la permeabilidad de la pared celular de las bacterias al ácido glutámico, el cual también es un componente esencial de la síntesis de ácido fólico. Las sulfas por sí solas son bacteriostáticas (inhibe el crecimiento de las bacterias), pero combinadas con

diaminopirimidinas (trimetoprima), se convierten en un bactericida (inhibe y destruye las bacterias), comparable a los antibióticos de amplio espectro (Baran *et al.*, 2011).

La eliminación de SMX en PTAR y ambientes naturales muestran resultados inconsistentes debido a factores como baja adsorción, potencial Redox, nutrientes disponibles, características del suelo, temperatura o variaciones de luz (Baumgarten *et al.*, 2011 como se citó en Müller *et al.*, 2013); lo cual ha dificultado una metodología adecuada en su remoción. Los metabolitos de SMX generados dependen del proceso de transformación así como los microorganismos presentes durante la reacción, por ejemplo, en presencia de bacterias oxidantes de amoníaco, el SMX se transforma principalmente en 4-nitro-sulfametoxazol (4-NO<sub>2</sub>-SMX) y en menor medida en desamino-sulfametoxazol (desamino-SMX) y N<sub>4</sub>-acetil-sulfametoxazol (Ac-SMX) (Kassotaki *et al.*, 2016). La degradación parcial de SMX por bacterias sulfato reductoras en condiciones anaerobias produce cinco compuestos que tienen un anillo isoxazol modificado (Jia *et al.*, 2017).

La trimetoprima (2,4-diamino-5-[3,4,5-trimetoxi-bencil] pirimidina) (TMP), es un compuesto blanco, inodoro y amargo, de peso molecular de 290.3 g/mol (Fig. 2b) (FDA 2012); es un agente antibacteriano de amplio espectro, y antiprotozoario, que actúa por inhibición competitiva de la dihidrofolato reductasa, fundamental en las células con gran tasa de crecimiento (Elshaer *et al.*, 2012). Las diaminopirimidinas usadas como antibacterianos muestran una gran selectividad y afinidad por las enzimas microbianas no afectando los sistemas enzimáticos de los animales superiores. El mecanismo de acción de las diaminopirimidinas las hace ideales para su combinación con otros medicamentos (Toral *et al.*, 2002).

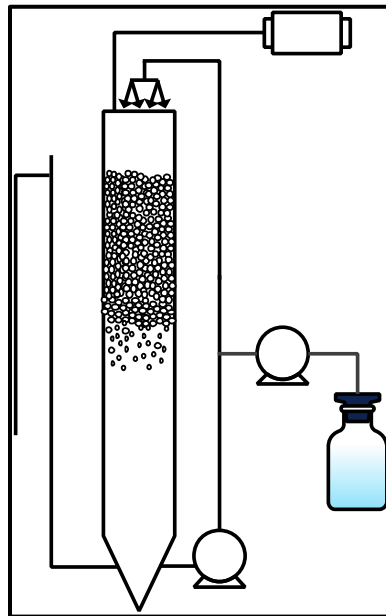
La combinación entre TMP y SMX origina un antibacteriano de amplio espectro, las formulaciones farmacéuticas que contienen estos fármacos han sido aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA), para su uso en: infección urinaria crónica, neumonía por *Pneumocystis carinii*, Shigelosis y otitis media (Toral *et al.*, 2002). Comercialmente, estos compuestos se encuentran mezclados en una relación 5:1 SMX-TMP en dosis de 800-160 y 400-80 mg de SMX-TMP respectivamente. El porcentaje excretado en la orina (72 h después del consumo) es de 66.8 % de TMP y 84.5 % de SMX, (del cual el 30 % es SMX libre y el resto es su metabolito Ac-SMX (FDA 2012).



**Figura 2.** Estructura química de sulfametoxazol (a) y trimetoprima (b).

### 1.3. Reactor anaerobio de lecho fluidizado inverso (LFI)

Estos sistemas funcionan a partir de un flujo de un fluido (líquido o gas) que facilita la fluidización de un lecho compuesto de partículas sólidas (soporte inoculado) cuando el fluido sigue una dirección descendente. A medida que el flujo incrementa, las partículas se separan, favoreciendo el contacto entre las fases presentes y generando en el sistema reaccionante una alta conversión y eficiencia (Fig. 3) debido a un mejor contacto entre la biomasa y el agua a tratar (Sowmeyan y Swaminathan, 2008). En este tipo de reactores, la densidad específica de las partículas es menor a la del fluido a tratar, logrando con esto que la expansión del lecho sea de forma descendente (Karamanev y Nikolov 1992 como se citó en García-Calderón *et al.*, 1997).



**Figura 3.** Reactor anaerobio de lecho fluidizado inverso (LFI) modificado de García-Calderón *et al.* (1997).

La velocidad superficial usada para fluidizar el soporte es un factor importante para la inmovilización de la biomasa, ya que si se usa alta velocidad superficial para la expansión del lecho se provoca estrés entre las partículas y la fase líquida lo que puede provocar el desprendimiento de la biopelícula (Iza 1991 como se citó en Meraz *et al.*, 1995). A baja velocidad superficial la expansión del lecho disminuye y la formación de la biopelícula se hace más lenta, por lo tanto disminuye también la eficiencia del sistema al no haber un buen contacto entre los microorganismos adheridos al soporte y la muestra a tratar (Meraz *et al.*, 1995).

Entre las ventajas que estos sistemas tienen está la separación del AR tratada de la biomasa utilizada, mayor contacto superficial entre la biomasa y la materia orgánica de la matriz, requiere bajos costos energéticos debido a que el material utilizado para colonizar tiene una densidad menor a la del AR (García-Calderon *et al.*, 1997; Sowmeyan y Swaminathan, 2008). La transferencia de masa incrementa si las partículas tienen una mayor superficie disponible (González, Ramírez y Monroy, 1992). Su configuración permite que los sólidos se sedimenten y se acumulen en el fondo cónico del reactor, facilitando su recolección (Houbron, Sandoval y Hernández, 2016). A pesar de eso, el periodo de estabilización es largo debido a la baja tasa de crecimiento de la biopelícula (Alvarado-Lassman *et al.*, 2010), lo que ha llevado a iniciar la operación de estos sistemas por lote para acortar dicho periodo mediante la inoculación de lodos en el material de soporte, una vez terminado el periodo de inoculación el lodo es retirado (Buffière y Moletta, 1999; Alvarado-Lassman *et al.*, 2010).



## 2. ANTECEDENTES

En México, la mayoría de la tecnología utilizada para el tratamiento de AR implica sistemas centralizados que utilizan tecnologías complejas que resultan ser costosas y de difícil mantenimiento, así como elevado consumo energético, resultando a corto plazo en un financiamiento difícil de mantener para la población a la que se le otorga el servicio. El estado de Oaxaca es un ejemplo de déficit en el tratamiento de aguas residuales, aun cuando en el estado se cuentan con 150 PTAR, solamente 25 de ellas funcionan adecuadamente, 30 operan de manera deficiente y 95 PTAR se encuentran abandonadas (Comisión Estatal del agua, CEA en Chawaga, 2019). Estos problemas y deficiencias en la operación de PTAR, no solo en México sino también en otros países ha llevado a buscar alternativas menos costosas y fiables para el tratamiento de estas aguas, dando con lo que actualmente se denomina descentralización de efluentes. El tratamiento de aguas residuales descentralizado consiste en diferentes enfoques de recolección, separación y reutilización, así como dar un tratamiento de acuerdo a sus características fisicoquímicas, mejorando así la eficiencia del tratamiento, lo que se traduce en la disminución de efectos sobre el medio ambiente y la salud pública (De Anda Sánchez, 2017).

En México se han desarrollado proyectos que abordan la descentralización de efluentes, por ejemplo para el tratamiento de aguas grises (Rojas *et al.*, 2017), el tratamiento de agua residual municipal (Santiago-Díaz, García-Albortante y Salazar-Peláez (2018) y el tratamiento de agua amarilla (orina) (Del Valle, 2017; Espinosa- Chávez *et al.*, 2022).

Siemens *et al.* (2008) evaluaron la concentración y la movilidad de algunos fármacos en aguas de riego de la Ciudad de México. En este estudio se hizo la evaluación teórica de medicamentos que entran en los sistemas de riego usando AR sin tratar, se plantearon modelos matemáticos para estimar la concentración introducida en dicha matriz. Además, se hicieron muestreos en agua subterránea poco profunda y agua de drenaje. Las muestras se analizaron por cromatografía líquida acoplado a espectroscopía de masas con ionización por electrospray. Entre los resultados encontrados, se observó la presencia de TMP en el sistema de drenaje con una concentración entre 0.11 a 0.32 µg/L, también se detectó en los canales del Valle del Mezquital con una concentración entre 0.28-0.31 µg/L.

Rivera-Jaimes *et al.* (2018) evaluaron la presencia de fármacos en aguas superficiales y residuales de Cuernavaca, Morelos; se analizaron con un HPLC acoplado a espectrometría de ionización, y se detectó la presencia de 12 grupos farmacéuticos (incluyendo antibióticos) con una detección superior al 70 % de fármacos en las 32 muestras analizadas. Se detectaron antibióticos como TMP (0.034-0.090 µg/L) y SMX (0.108-0.722 µg/L), estos valores son similares a los detectados en otros países.

Bischel *et al.* (2015) investigaron la presencia de microorganismos patógenos y fármacos presentes en la orina separada desde el origen. Las muestras analizadas provenían de baños secos y tanques de almacenamiento de la región de eThekweni, al Sur de Sudáfrica. Se determinó la presencia de bacterias (*Aeromonas* y *Clostridium perfringens*), virus (JC polyomavirus, adenovirus humano, rotavirus), y fármacos como SMX (6800 µg/L, máximo) y TMP (1300 µg/L, máximo). Este estudio reveló el peligro para la salud humana al utilizar orina directamente como fertilizante, por lo cual sugieren implementar procesos de tratamiento de la orina para disminuir el riesgo en la salud poblacional y reducir el impacto al medio ambiente.

Jaatinen *et al.* (2016) hicieron la evaluación de compuestos antivirales, antituberculóticos y antibióticos (TMP y SMX) añadidos a orina humana durante almacenamiento por seis meses a 20 °C. Probaron diferentes tratamientos: fármacos individuales, por grupo terapéutico, mezcla de cada grupo terapéutico con heces fecales y cada grupo terapéutico con un inhibidor de ureasa (N- (n butil) triamida tiofosfórica o NBPT por sus siglas en inglés), reportando que el inhibidor de ureasa reduce la remoción de los fármacos ya que no se obtuvieron mecanismos físicos ni biológicos que permitieran la remoción o eliminación de estos, indicando que el almacenamiento de la muestra no elimina la concentración de compuestos y por lo tanto los riesgos ecológicos no disminuyen.

Ronteltap, Maurer y Gujer (2007b) evaluaron el comportamiento de fármacos en la precipitación de estruvita durante la hidrólisis de orina separada desde el origen. Para ello, utilizaron un reactor de tanque agitado (CSTR, por sus siglas en inglés), con una concentración inicial conocida de los contaminantes (propranolol: 3 mg/L; estrona, estradiol y etilnilestradiol: 4 µg/L; ibuprofeno: 0.04 mg/L y carbamazepina y diclofenaco: 0.06 mg/L). El CSTR se trabajó con un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 36 h. Se tomaron y caracterizaron las muestras al final de la reacción, encontrando que la mayor parte de los fármacos estudiados se quedan en la fase líquida (98 %).

Con respecto al tratamiento de orina, Del Valle (2017) evaluó la recuperación de nitrógeno en forma de estruvita a partir de orina humana concentrada y diluida 16 veces a partir de un proceso de ureólisis en un biorreactor de lecho fluidizado inverso. Las eficiencias de ureólisis reportadas son: 94 y 86 % para orina concentrada y orina diluida 16 veces, respectivamente, los valores promedio de pH alcanzados fueron de 9.1 y 9.0, respectivamente. Además, al evaluar la adición de diferentes relaciones molares  $Mg:PO_4^{3-}$  para mejorar la recuperación de nitrógeno, en orina concentrada hidrolizada se recuperó 2229 mg/L de  $N-NH_4^+$  con la relación molar de 2.0:1.0, mientras que con orina diluida se obtuvo 665 mg/L de  $N-NH_4^+$  en la relación molar 1.5:1.0.

De Boer, Hammerton y Slootweg, (2018) evaluaron la bioacumulación de fármacos en tomates al utilizar como fertilizante estruvita recuperada con adsorbentes de orina humana mezclada con carbamazepina, sulfametoxazol e ibuprofeno, entre otros. Los autores detectaron baja presencia de fármacos en el tomate ( $< 0.0001$  %), excepto para carbamazepina ( $\leq 0.0003$  %), estos valores se encuentran muy por debajo de los límites de consumo diario permitidos y para que se presente en efecto tóxico de carbamazepina una persona adulta que pese 67 Kg debe consumir 73 Kg de tomate. También mencionan, como punto importante, que se debe hacer una investigación más extensa para evaluar diversos fármacos que por sus propiedades fisicoquímicas, podrían adsorberse en la estruvita y ocasionar mayores daños en los consumidores de los productos agrícolas, así como pruebas en otros cultivos, con el fin de asegurar el consumo de productos libres de CE.

Para conocer el papel que tienen las sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés) en los procesos involucrados en la degradación de antibióticos, Wang *et al.* (2018) evaluaron el comportamiento y la interacción de los antibióticos con los microorganismos presentes en una biopelícula. De acuerdo con este estudio, los compuestos poliméricos pueden intervenir en el transporte o transformación de antibióticos, por lo tanto, la interacción que estos puedan tener afecta los procesos de degradación de los antibióticos. Los autores evaluaron la hidrólisis, adsorción y biodegradación de los fármacos durante seis días. Los resultados obtenidos mostraron que la adsorción en las sustancias poliméricas seguida del proceso de bioadsorción ocurre en las primeras 52 h, la biodegradación se presenta después de las 72 h, hasta el final de la reacción.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la robustez del tratamiento de agua residual amarilla (orina) en un biorreactor anaerobio de lecho fluidizado inverso como opción de un sistema descentralizado. Además, de estudiar el comportamiento y la biodegradabilidad de dos antibióticos de uso común en México; sulfametoxazol y trimetoprima. Por último, evaluar el efecto de los antibióticos en la biomasa inmovilizada de microorganismos ureolíticos y en el desempeño del biorreactor.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Algunos de los problemas principales que enfrenta la humanidad desde el punto de vista de recursos y medio ambiente, son la limitación del recurso hídrico, además de la contaminación de este. Los sistemas actuales de tratamiento de aguas residuales presentan desventajas por los altos costos de manejo y mantenimiento, por falta de sustentabilidad. Las problemáticas antes mencionadas han sido y seguirán siendo temas de estudio que requieren diversas opciones. Por ejemplo, la separación de efluentes desde el origen y su tratamiento especializado puede tener las ventajas de lograr un tratamiento más eficiente, además que se pueden obtener recursos tales como nutrientes que pueden utilizarse como fertilizante en cultivos, dándole de esta manera un valor agregado a un residuo fomentando la economía circular. Tal es el caso del tratamiento de la orina por ureólisis biológica, en la que se obtiene estruvita.

Sin embargo, también se sabe que en la orina se pueden encontrar compuestos no metabolizados, incluyendo antibióticos como SMX y TMP de los cuales 15-30 % y 60-67 % de lo consumido, respectivamente, es excretado sin alteración (Hirsch *et al.*, 1999, FDA, 2012). Entre los problemas ecológicos que la introducción de antibióticos trae consigo en matrices acuáticas está la formación de “superbacterias” resistentes a antibióticos que inducen resistencia en cepas bacterianas, bioacumulación en la cadena trófica y riesgos ligados a la pérdida de biodiversidad (García-Gómez, Gortáres-Moroyoqui y Droqui, 2011). Por lo anterior es necesario buscar opciones de tratamiento que reduzcan la presencia de estos compuestos antes de descargarse al medio ambiente.

En este trabajo se pretende estudiar el comportamiento de antibióticos específicos durante la hidrólisis de urea, ya que se ha reportado que ciertos antibióticos son susceptibles a hidrólisis en ambientes alcalinos, por lo tanto, pueden llegar a hidrolizarse en este tratamiento. Además, se pretende evaluar el efecto que pudieran tener los antibióticos en la población de microorganismos ureolíticos en un reactor de lecho fluidizado inverso.

#### **4. HIPÓTESIS**

El tratamiento de orina separada de origen en un reactor de LFI es un proceso robusto a largo plazo. La ureólisis de orina humana llevada a cabo en el reactor de LFI incrementa el pH en el sistema, generando las condiciones básicas que favorecen la hidrólisis de sulfametoxazol y trimetoprima, durante las primeras horas de tratamiento los antibióticos serán bioadsorbidos en la biomasa e hidrolizados en la fase líquida. La presencia de sulfametoxazol y trimetoprima en orina tienen un efecto negativo en los microorganismos ureolíticos y por consecuencia en la ureólisis de orina humana en un reactor de LFI.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general.**

Evaluar el efecto de trimetoprima y sulfametoxazol en la actividad ureolítica de la biomasa inmovilizada en un reactor anaerobio de lecho fluidizado inverso, así como el comportamiento de sulfametoxazol en lote durante la hidrólisis de urea presente en orina humana.

### **5.2. Objetivos específicos.**

- 1) Evaluar el desempeño de un reactor de LFI durante la hidrólisis de urea presente en orina humana a largo plazo.
- 2) Evaluar el comportamiento de sulfametoxazol en lote.
- 3) Evaluar la hidrólisis biológica de urea presente en orina humana en un reactor de LFI en presencia de sulfametoxazol y trimetoprima.
- 4) Evaluar el efecto de sulfametoxazol y trimetoprima en el desempeño de la biomasa del reactor de LFI.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Orina humana. Agua residual amarilla.

La fuente de orina utilizada en este estudio provino de donadores sanos (hombres y mujeres) cuya edad osciló entre 25-55 años. Las muestras fueron colectadas en botellas PET (tereftalato de polietileno, por sus siglas en inglés) y almacenadas en refrigeración a 4° C hasta su uso. Las muestras de orina colectadas durante 24 h se combinaron para obtener una mezcla, la cual se denomina en este trabajo como agua residual amarilla (ARA). El ARA se utilizó en cada experimento y como medio de alimentación para el reactor de LFI.

### 6.2. Inóculo. Lodo granular anaerobio.

El inóculo utilizado fue lodo granular anaerobio proveniente de un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) que trata efluentes municipales.

### 6.3. Soporte de polietileno de baja densidad.

Como material de soporte en el reactor LFI se utilizaron 120 g de partículas de polietileno de baja densidad (LDPE por sus siglas en inglés, 17070 Pemex), con diámetro promedio de partícula de 0.4 mm y con densidad aparente ( $\rho$ ) de 374 kg/m<sup>3</sup>.

### 6.4. Antibióticos. Sulfametoxazol y trimetoprima.

Se utilizaron dos tipos de antibiótico: grado analítico SMX = 99.9 % pureza y TMP  $\geq$  98 % pureza, (ambos de Sigma-Aldrich®) y antibiótico comercial en tabletas marca Soltrim® con composición de 800 mg de SMX y 160 mg de TMP.

### 6.5. Técnicas analíticas.

- pH. Potenciometría. El pH es una medida de la concentración de iones H<sup>+</sup> presentes en una solución, a temperatura constante, el potencial varía linealmente con el pH de la solución que está siendo medida, para esto se utiliza un electrodo patrón de hidrógeno y otro de referencia. Se usó un electrodo de vidrio que genera una corriente eléctrica proporcional a la corriente de protones de la muestra. Las muestras se analizaron con el equipo Oakton Waterproof.
- Demanda química de oxígeno (DQO). Micrométodo de reflujo cerrado (American Public Health Association, 2005) (APHA, 2005). La muestra es oxidada mediante la digestión de ácido sulfúrico y dicromato de potasio en presencia de sulfato de plata y sulfato de mercurio (III). Cuando una muestra es sometida a un proceso de digestión ácida, el ion dicromato (Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>) oxida la materia orgánica de la



muestra, esto resulta en el cambio del estado hexavalente del cromo ( $\text{Cr}^{6+}$ ) al estado trivalente ( $\text{Cr}^{3+}$ ), estas especies son coloreadas y absorbidas en la región visible del espectro a  $600 \pm 20$  nm. Las lecturas de absorbancia se realizaron con el colorímetro HACH DR/890 a una longitud de onda de 620 nm.

- Urea. Método del reactivo de Ehrlich (Levine, Leon y Steigmann, 1961). Esta determinación se basa en la reacción de urea con p-dimetilaminobenzaldehído. Al hacerse reaccionar la urea presente en la orina con el reactivo de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehído-ácido tricloroacético) se forma un complejo amarillo. Esta determinación se realizó en un espectrofotómetro PerkinElmer UV-Vis Lambda a 425 nm.
- Nitrógeno de amonio ( $\text{N-NH}_4^+$ ). Por el método de electrodo de ion selectivo (APHA, 2005). Este método se basa en el uso de un electrodo que contiene una membrana hidrofóbica permeable al gas amoníaco, el cual se libera cuando el ion amonio entra en contacto con una base fuerte (NaOH). Para el análisis se utilizó un adquisidor de datos Oakton ion 6<sup>+</sup> y el electrodo de amoníaco de alto rendimiento Orion™.
- Sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Por el método turbidimétrico (APHA, 2005). En este método se utiliza una solución (ácido acético) que facilita la precipitación del ion sulfato en presencia de cloruro de bario, para medir la turbidez generada por esta reacción se utilizó el colorímetro HACH DR/890 a una longitud de onda de 420 nm.
- Ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Método del aminoácido rango alto, con el uso del método 8178 del manual de procedimientos HACH DR 890 basado en APHA (2005). En este método el medio ácido y el molibdato reaccionan con ortofosfatos, reduciéndose a azul de molibdeno, complejo azul intensamente coloreado. La absorbancia de este complejo es detectada a 880 nm, se utilizó un colorímetro HACH DR/890.
- Magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Por absorción atómica (AA) (APHA, 2005) (ver anexo 2).
- Determinación de antibióticos. Para la determinación de SMX y TMP se utilizó el método propuesto por Givianrad *et al.* (2011), método de adición estándar del punto H (HPSAM, por sus siglas en inglés) (ver anexo 1).

## **6.6. Operación del reactor de LFI**

### **6.6.1. Inmovilización de biomasa en el soporte**

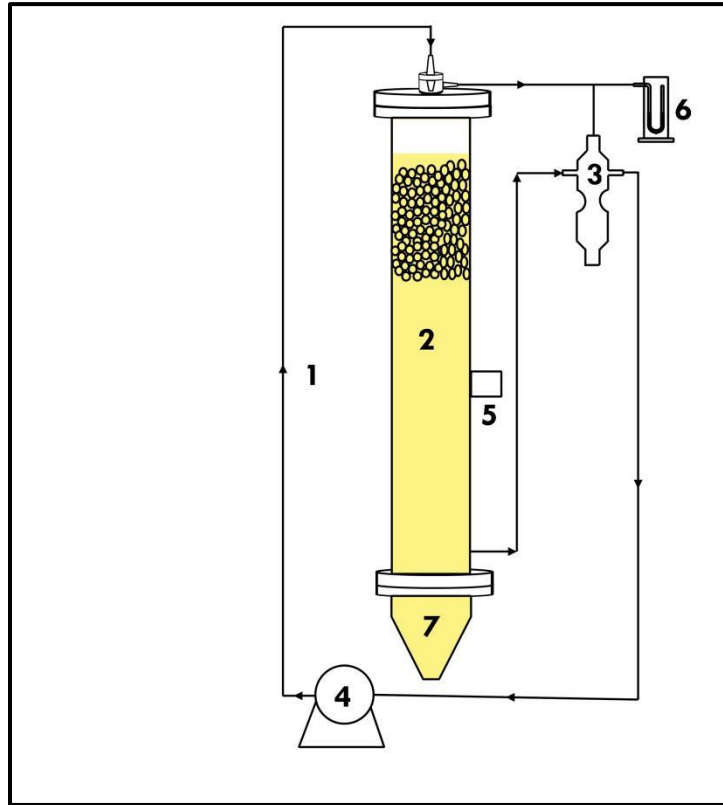
En el proceso de acondicionamiento se eliminan las propiedades hidrofóbicas de algunos compuestos como los plásticos, mejorando la interacción de los microorganismos y otros compuestos con el soporte. Las interacciones que ocurren entre la superficie celular y el sustrato permite a las bacterias eliminar las fuerzas de rechazo y lograr adherirse exitosamente (Nazar, 2007). El soporte se acondicionó durante 48 h en una solución que contenía 1.5 L de agua destilada, 1 g/L de peptona de caseína y 0.5 g/L de extracto de levadura, manteniéndolo en agitación. Posteriormente se retiró el medio líquido del frasco y se reemplazó con 2 L de ARA. El soporte se inoculó con 50 g de lodo granular anaerobio macerado y se mantuvo en agitación sin recambio de ARA durante 5 d. Posteriormente, cada 48 h se realizaron recambios de ARA. Los parámetros medidos fueron: pH,  $\text{N-NH}_4^+$ , urea, DQO,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  al inicio y final del tiempo de reacción. Después de 30 d, el soporte con biomasa inmovilizada se colocó en el reactor de LFI para evaluar la hidrólisis de urea presente en ARA.

Para dar seguimiento al proceso de inmovilización y durante el periodo de evaluación de ureólisis en el reactor LFI, se evaluó el contenido de sólidos volátiles inmovilizados (SVI), sólidos fijos (SF) y sólidos totales (ST) (APHA, 2005) de la biomasa inmovilizada en el soporte. Se tomaron 2 g de soporte colonizado y se colocaron en una botella serológica que contenía 25 mL de agua destilada la cual se sonicó durante 15 min para retirar la biomasa del soporte. El líquido se filtró con membranas de fibra de vidrio Whatman GF/A (1.6  $\mu\text{m}$ ) previamente puestos a peso constante. Este procedimiento se repitió hasta observar que el líquido no presentó turbidez. Los filtros se colocaron en la estufa por 12 h a 105 °C, posteriormente los filtros se pusieron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente, fueron pesados y llevados a calcinación en una mufla durante 1 h a 550 °C. Los filtros una vez calcinados se mantuvieron en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y fueron pesados de nuevo para obtener el peso de cenizas.

### **6.6.2. Operación del reactor de LFI**

El soporte colonizado se transfirió al reactor de LFI y se evaluó el proceso de ureólisis de urea presente en ARA. El reactor de LFI consistió en una columna de acrílico (Fig. 4) de 90.5 cm de largo (l) y 5.71 cm de ancho (diámetro interno de 5.13 cm (d)), con fondo cónico y una relación  $l/d=17.64$ . El volumen total que incluyó las líneas de transferencia y separador de tres fases fue de 2.8 L, el volumen de reacción fue de 2.3 L. Para la

alimentación y recirculación del reactor se usó una bomba peristáltica Cole-Parmer modelo 7553-70, con una velocidad superficial de 8.33 m/h que permitió una expansión del lecho de 30 % (velocidad de recirculación: 1.39 L/min).



**Figura 4.** Reactor de lecho fluidizado. 1) línea de alimentación/recirculación, 2) columna de reacción (se encuentra la biomasa fija en el soporte), 3) nivelador/separador de tres fases, 4) bomba de recirculación/alimentación, 5) toma de muestra, 6) lavador de gas, 7) fondo cónico para la recuperación de precipitados.

El reactor se operó por lote a temperatura ambiente en un rango de 27 °C a 37 °C (29.84 °C  $\pm$  2.25) con tiempo de reacción ( $t_r$ ) de 1 d, el reactor se alimentó por la parte superior con la mezcla de orina obtenida de diferentes donadores. Para evaluar el desempeño del reactor, se midieron las siguientes variables de respuesta: pH, DQO, urea, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y Mg<sup>2+</sup>, este último solo en muestras aleatorias.

### 6.6.3. Actividad ureolítica específica (AUE)

La capacidad que pueden presentar los microorganismos (presentes en la biomasa inmovilizada) para degradar la urea se evaluó en cinéticas de transformación de urea a amonio. Estas cinéticas se hicieron en botellas serológicas de 120 mL, se pusieron 0.040 g SVI/L y 100 mL del ARA (Fig. 5). Las botellas se sellaron con septos de teflón y casquillos de aluminio, y se colocaron en incubación a 35 °C y 100 rpm. Las pruebas se hicieron por triplicado y se utilizaron dos blancos, ambos con el soporte sonicado y lavado con HCl diluido, uno de los blancos se le puso orina filtrada (membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$ ) y al otro blanco orina sin filtrar. Lo anterior se hizo para establecer si la urea presente en ARA era hidrolizada de manera química o por los microorganismos presentes en la orina. Se tomaron alícuotas de 5 mL para medir las variables de respuesta (pH, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y urea cada 3 h y DQO al inicio y final de la cinética) durante el transcurso de la cinética.

Esta prueba se utilizó para evaluar la actividad de los microorganismos durante el proceso de inmovilización en el soporte (frasco de 2 L) y durante la operación del reactor de LFI tratando orina sin y con antibióticos. También se realizó esta prueba de manera simultánea con las cinéticas de biodegradabilidad, adsorción, bioadsorción en ARA e hidrólisis del antibiótico en agua ultrapura con sus respectivas variantes para cada cinética.



**Figura 5.** Diagrama de Actividad Ureolítica Específica de la biomasa inmovilizada en el soporte. ARA: agua residual amarilla.

A partir del perfil de producción de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a través del tiempo se calculó la máxima pendiente usando el modelo modificado de Gompertz (sección 6.8).

### 6.7. Biodegradabilidad y comportamiento de antibióticos

Para conocer el comportamiento de los antibióticos durante la hidrólisis de orina se realizaron pruebas en lote, las pruebas consistieron en evaluar por triplicado cinéticas de biodegradabilidad, bioadsorción, adsorción e hidrólisis (Fig. 6). Los ensayos se realizaron en botellas serológicas de 375 mL, el volumen de trabajo fue de 350 mL. En los ensayos para evaluar biodegradación y bioadsorción se pusieron 0.040 g SVI/L en cada botella. Para evaluar adsorción se usaron 4 g de soporte, pero en este caso sin biomasa, y para evaluar la hidrólisis de los antibióticos se disolvieron en agua destilada.

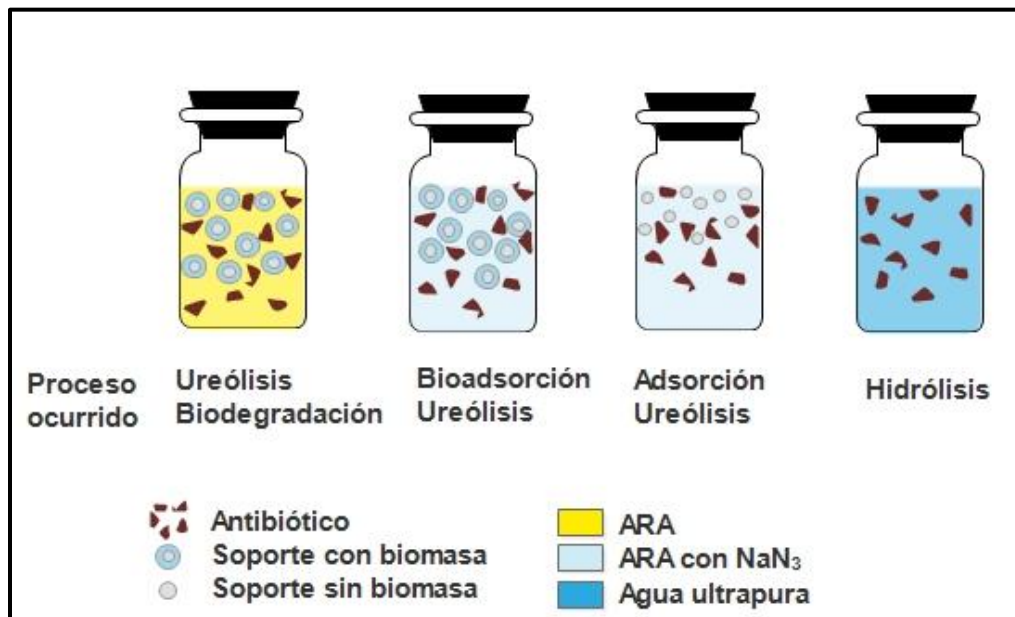
El soporte con biomasa inmovilizada usada en los ensayos de biodegradación y bioadsorción se obtuvo a partir del siguiente procedimiento. Se tomó inicialmente 2 g de soporte con biomasa inmovilizada directamente del reactor de LFI en el lote 88 (día 282). El soporte se lavó en baño ultrasónico para desprender la biomasa, posteriormente el agua (ultrapura) de lavado se filtró a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y finalmente los sólidos retenidos (biomasa) se transfirieron a una solución isotónica de NaCl (0.89 %). Para propagar la biomasa se tomó 0.1 mL de la solución isotónica y se sembraron por la técnica de estriado en cajas Petri que contenían medio de cultivo Stuart (Stuart *et al.*, 1945), medio que sirve para verificar la presencia de microorganismos ureolíticos, y se incubaron a 35°C durante 7 d. Posteriormente se tomaron colonias de microorganismos ureolíticos para inocular 60 g de soporte (partículas de 0.4 mm) previamente funcionalizado (como se describe en la sección 6.6.1), el proceso de inmovilización duró 20 d. Es importante mencionar que este procedimiento se realizó para evitar la desestabilización del sistema, ya que se tomaría más del 50% de soporte para dichas cinéticas, las cuales se llevaron a cabo al mismo tiempo que la evaluación del reactor de LFI sin antibiótico.

Se utilizó el antibiótico comercial Soltrim® con una composición de 800 mg de SMX y 160 mg de TMP. Se consideró el porcentaje promedio de cada antibiótico no metabolizado: 20 % para SMX y 60 % para TMP (Hirsch *et al.*, 1999; FDA, 2012; Bischel *et al.*, 2015). Generalmente estos compuestos se eliminan a través de la orina, por lo que las concentraciones usadas en este trabajo se calcularon tomando como base el porcentaje promedio de TMP no metabolizado. Para calcular la concentración promedio de antibiótico se calculó que el volumen de orina (7.5 L) era proveniente de 5 donadores, considerando que en promedio una persona excreta 1.5 L orina/d (Randall y Naidoo,

2018). Además, se consideró que al menos un donador estuviera en tratamiento con el antibiótico (dosis: 1 tableta c/24 h de SMX (800 mg) y TMP (160 mg)).

Se utilizó como medio de cultivo ARA esterilizada por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.2  $\mu\text{m}$  y posteriormente se adicionó el antibiótico comercial para la evaluación de biodegradación, bioadsorción y adsorción del antibiótico, mientras que para la evaluación de hidrólisis del antibiótico se utilizó agua ultrapura esterilizada por filtración y posteriormente adicionada con antibióticos (Fig. 6).

Las botellas se sellaron herméticamente y se cubrieron con papel aluminio para evitar la fotólisis de los antibióticos; que es un proceso de descomposición o disociación de los compuestos químicos causados por la luz natural o artificial (Guerrero, 2018), y se incubaron en oscuridad con agitación a 35 °C y 100 rpm durante seis días. A diferentes intervalos de tiempo se tomaron alícuotas de 10 mL para medir las variables de respuesta (pH, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, urea y concentración de antibiótico). La DQO se cuantificó al inicio y final de la cinética. La cuantificación de antibiótico se realizó como se describe en la sección 6.7.5.



**Figura 6.** Diseño experimental para biodegradación, bioadsorción, adsorción e hidrólisis. NaN<sub>3</sub>: azida de sodio.

### **6.7.1. Pruebas de biodegradabilidad**

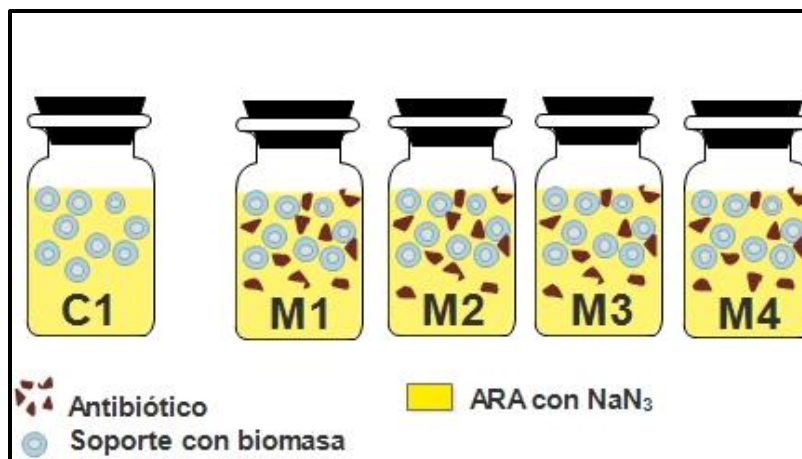
Para establecer las concentraciones de antibiótico a evaluar en las pruebas de biodegradabilidad, se consideró el porcentaje promedio no metabolizado de TMP, la dosis: 1 tableta c/24 h de SMX (800 mg) y TMP (160 mg) y que uno de 5 donadores consumiera el antibiótico. La concentración de antibiótico obtenida en base al contenido de TMP en 7.5 L de ARA fue de 13 mg/L y según la relación 1:5 TMP-SMX se tiene una concentración de SMX de 65 mg/L. A partir de esta concentración se establecieron dos concentraciones más a evaluar, se evaluaron las siguientes concentraciones: de SMX (50, 65 y 75) mg/L y de TMP (10, 13 y 15) mg/L. Estas concentraciones se obtuvieron a partir de una solución patrón preparada a partir de tabletas de Soltrim®; 1250 mg/L de SMX y 250 mg/L de TMP. Se pesó la cantidad correspondiente de tabletas previamente pulverizadas, el antibiótico se disolvió en una mezcla metanol-agua ultrapura (1:1). Posteriormente se preparó el ARA con antibióticos adicionando la alícuota correspondiente para cada concentración de antibiótico evaluada.

Como control se usó soporte con biomasa inmovilizada (sección 6.7), ARA esterilizada por filtración sin adición de antibiótico. Este control evaluó la actividad ureolítica sin antibiótico. Se dio seguimiento a la cinética de acuerdo con lo descrito en la sección 6.7.

Una vez obtenida la concentración en la que se tuvo menor efecto negativo del antibiótico en el proceso de ureólisis (50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP), se llevaron a cabo las pruebas de bioadsorción, adsorción, e hidrólisis, como se explica en los siguientes apartados.

### **6.7.2. Prueba de bioadsorción**

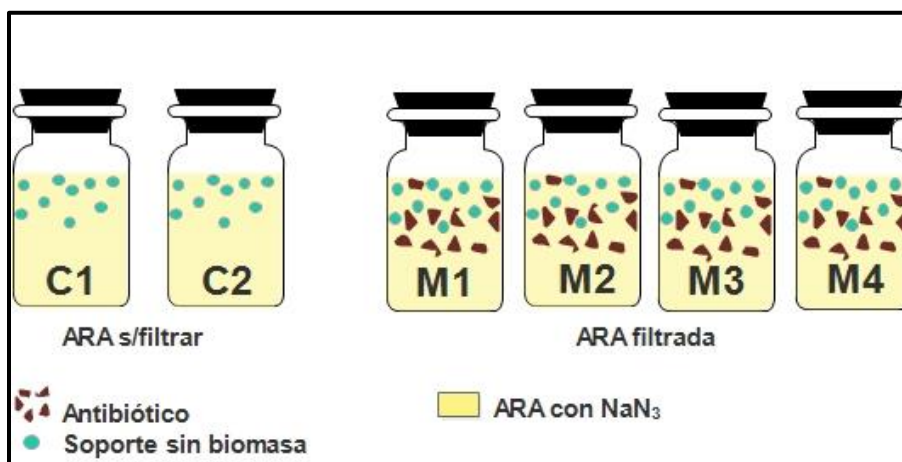
Para esta prueba (Fig. 7), se usó soporte inoculado con biomasa extraída del reactor LFI (sección 6.7). Para el control se utilizó soporte con biomasa inmovilizada y ARA (sin filtrar) que contenía azida de sodio  $\text{NaN}_3$  (2 g/L) para inhibir la actividad microbiana nativa. En las muestras (cuadruplicado) se utilizó soporte con biomasa inmovilizada, 50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP, ARA filtrada que contenía  $\text{NaN}_3$  (2 g/L), y se siguió la metodología descrita en el apartado 6.7.



**Figura 7.** Diseño experimental cinética bioadsorción.

### 6.7.3. Prueba de adsorción

En las cinéticas de adsorción se utilizó soporte funcionalizado (apartado 6.7) sin inocular (Fig. 8). Con este experimento se evaluó el proceso de adsorción de los antibióticos en el soporte de polietileno de baja densidad con tamaño de partícula de 0.4 mm. La concentración de antibióticos fue 50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP, ARA filtrada que contenía  $\text{NaN}_3$  (2 g/L) con la finalidad de inhibir la actividad microbiana nativa presente en ARA, y un control (duplicado) el cual consistió en soporte funcionalizado, ARA sin filtrar que contenía  $\text{NaN}_3$  (2 g/L), sin antibióticos. Este ensayo se diseñó para evaluar tanto la adsorción de los antibióticos en las partículas de polietileno, como si la urea presente en ARA se hidroliza sin la presencia de microorganismos. Las cinéticas fueron evaluadas como se describió en la sección 6.7.



**Figura 8.** Cinética adsorción del antibiótico en el soporte de polietileno de baja densidad.

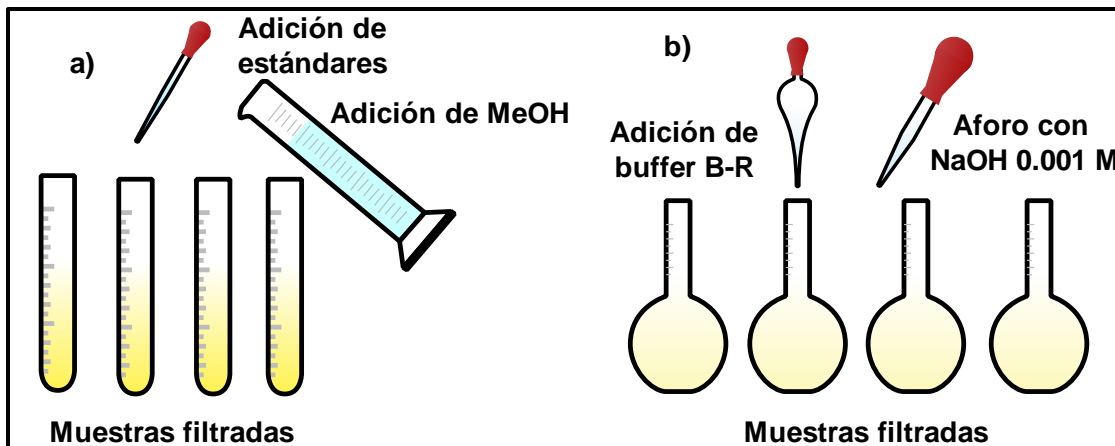


#### **6.7.4. Prueba de hidrólisis**

Para la prueba de hidrólisis se utilizó agua ultrapura y el antibiótico a la concentración de 50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP, esta prueba se hizo por duplicado. La metodología y la determinación del antibiótico se siguió de la misma manera que se describe en el apartado 6.7.

#### **6.7.5. Cuantificación de antibiótico en agua residual amarilla**

Para cuantificar la concentración de los antibióticos presentes en ARA se siguió la metodología propuesta por Givianrad *et al.* (2011), denominada “adición de estándar de punto H” (Fig. 9). Se tomó una alícuota de ARA en cada tiempo de muestreo de las cinéticas de biodegradación, bioadsorción, adsorción e hidrólisis, se colocaron en frascos ámbar y se congelaron para su posterior análisis. Para su caracterización, la muestra fue puesta a temperatura ambiente, posteriormente se filtró (filtros GF/A, 1.6  $\mu\text{m}$ ), se colocó 1 mL de la muestra filtrada en un tubo de centrifuga de 15 mL. Esto se hizo en 4 tubos previamente etiquetados con la concentración del analito añadido (0, 1, 5 o 10 mg/L de SMX y TMP) (Fig. 9a). Posteriormente se adicionaron los volúmenes necesarios de estándares para tener las concentraciones de antibióticos correspondientes en cada tubo. Los estándares fueron preparados previamente por separado con los antibióticos grado analítico. La solución patrón de SMX (250 mg/L) se preparó en NaOH 0.001 mol/L y la de TMP (250 mg/L) se diluyó en agua ultrapura. A cada tubo con la muestra de ARA y los estándares añadidos se agregó 10 mL de metanol (MeOH) grado HPLC, los tubos fueron cerrados y agitados por un minuto en vórtex, se centrifugaron durante 20 minutos a 1792 FCR (fuerza g). El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de fibra de vidrio (tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ) y se transfirió a matraces volumétricos de 25 mL (Fig. 9b), a los cuales se les añadió 2 mL de buffer Britton-Robinson (B-R) (pH mayor a 10), se agitaron nuevamente en vortex y finalmente se aforaron con NaOH 0.001 mol/L. Las cuatro soluciones fueron escaneadas en un espectrofotómetro UV/vis (UV lambda 365, Perkin Elmer) desde 320 a 210 nm. La base línea del espectro se hizo con ARA hidrolizada sin antibiótico siguiendo el mismo procedimiento antes descrito.



**Figura 9.** Metodología para cuantificar antibióticos en muestras de ARA.

Se construyeron curvas de calibración para cada muestra de ARA con antibióticos usando la información obtenida de los espectros de los cuatro estándares añadidos (0, 1, 5 o 10 mg/L). Se encontraron diferentes pares de longitud de onda que cumplieron con las características de linealidad y de pendientes separadas (Safavi y Abdollahi 2001; Shams *et al.*, 2004; Givianrad *et al.*, 2011). Para SMX se escogió el par de longitud de onda 260-304.7 nm, y para TMP fue 287-310 nm.

El método fue validado en ARA con cuatro concentraciones de ambos antibióticos por quintuplicado, los resultados se muestran en el Anexo 1.

### **6.8. Constantes cinéticas. Modelo modificado de Gompertz**

El modelo modificado de Gompertz fue utilizado inicialmente en proyectos de crecimiento poblacional (Pierce, 1991). También ha sido utilizado para diversos propósitos, como crecimiento celular (Trinidad, 2014) o producción de H<sub>2</sub> (Arreola-Vargas *et al.*, 2015). En este trabajo se usó el modelo modificado de Gompertz (Ec.7) para determinar los parámetros cinéticos asumiendo que la producción de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> es proporcional a la actividad microbiana ureolítica.

$$P = H_m \cdot \exp \left[ - \exp \left( \frac{R_m \cdot e}{H_m} \right) \cdot (\alpha - t) + 1 \right] \text{ Ec. 7}$$

P: Producción de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L) obtenida en el tiempo

H<sub>m</sub>: producción acumulada de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L) al final de la prueba

R<sub>m</sub>: tasa de producción máxima de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L·d)

α: duración de la fase de latencia (d)

e: constante matemática 2.718282

t: tiempo (d)

El modelo de Gompertz modificado se aplicó a los datos obtenidos en las pruebas de AUE durante toda la experimentación, para conocer la actividad de los microorganismos presentes en la biomasa a través del tiempo de operación del reactor con y sin adición de antibiótico. También se aplicó para determinar las constantes cinéticas de las pruebas de biodegradabilidad, adsorción, bioadsorción e hidrólisis.

Para calcular la AUE (g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/g SVI·d) se usó el perfil de producción de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a través del tiempo, a partir de esta información se calculó la máxima pendiente usando el modelo modificado de Gompertz. La pendiente o tasa de producción (R<sub>m</sub>) se dividió entre los SVI y se multiplicó por el volumen de trabajo en cada cinética, este procedimiento se aplicó para todas las cinéticas realizadas durante la investigación.

Para evaluar la ureólisis de urea, se consideró la cinética de reacción de primer orden (Ec. 8), para lo cual se evaluó el cambio de la concentración de urea [U] presente en el ARA a través del tiempo de reacción, la ecuación 8 se integró para poder calcular la constante de velocidad de ureólisis (*k<sub>u</sub>*), dando como resultado la forma exponencial (Ec.8.1)

$$\frac{d[U]}{dt} = -k_u[U] \quad \text{Ec. 8}$$

$$U = U_0 e^{-k_u t} \quad \text{EC. 8.1}$$

La concentración de U se calculó a partir de la ecuación 9

$$[U] = \left( U_0 - \left( \frac{NH_4^+}{Y} \right) \right) \quad \text{Ec. 9}$$

donde:

$U_0$  = concentración de urea (g/L) en  $t = 0$

$U$  = concentración de urea (g/L) a  $t = t$

$NH_4^+$  = generación de N-  $NH_4^+$  (g/L) a  $t = t$

$Y$  = rendimiento Urea/  $NH_4^+$

### **6.9. Desempeño del reactor de LFI con antibiótico**

Se evaluó el desempeño del reactor de LFI alimentado con ARA que contenía 50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP. Usando tabletas comerciales, previamente pulverizadas, se preparó una solución patrón que contenía 1000 mg/L de SMX y 200 mg/L de TMP, la muestra pulverizada se disolvió en una solución Metanol-agua en una proporción 1:1. Se tomó una alícuota de volumen adecuado y se mezcló con ARA para obtener la concentración de trabajo mencionada. El reactor se alimentó con los pulsos de antibiótico cada tercer lote (lote 139-158) intercalando lotes con y sin antibiótico (10 de cada uno), los lotes fueron evaluados con un tiempo de reacción ( $t_r$ ) de 1 d, la concentración de antibiótico en el reactor se evaluó a 0, 0.5 y 1 d de reacción. Otras variables de respuesta medidas se describen en el apartado 6.5.

### **6.10. Caracterización de precipitados**

Los precipitados generados durante el proceso de ureólisis ( $t_r$  1 d) de ARA en el reactor de LFI se retiraron por la parte cónica del reactor (Fig. 4 inciso 7). El ARA hidrolizada se colectó en conos Imhoff, se dejó sedimentar durante 1 hora, posteriormente el sobrenadante (ARA hidrolizada) fue separado y el sólido se colocó en tubos para centrifuga. Los sólidos se secaron a temperatura ambiente para evitar la pérdida de componentes por volatilización y posteriormente se pesaron en una balanza analítica.

La cuantificación de N- $NH_4^+$  y  $PO_4^{3-}$  en los sólidos se determinó teóricamente en base al precipitado recuperado en cada lote, considerando que la estruvita tiene 7.3 % de N- $NH_4^+$  y 38.7 %  $PO_4^{3-}$ , mientras que para la cuantificación de  $Mg^{2+}$  se utilizó el método de espectroscopia de absorción atómica (AA), de acuerdo con la metodología descrita a continuación.

### **6.10.1. Cuantificación de Mg<sup>2+</sup>**

Para cuantificar el Mg<sup>2+</sup> presente en los precipitados recuperados, se usó un espectrómetro de absorción atómica (Thermo Elemental SOLAAR). Se pesó 10 mg de sólidos precipitados previamente macerados y se colocaron en un matraz aforado (25 mL) al cual se añadió 1 mL de HCl concentrado para facilitar la disolución y se aforó con agua ultrapura. La disolución se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0.45 µm. Posteriormente se tomó 1 mL de la disolución filtrada y se colocó en un matraz aforado de 25 mL al cual se le agregaron 15 mL de una solución de lantano (1 %) y se aforó a 25 mL con agua ultrapura. Se utilizó una curva de calibración de 0-40 mg/L de Mg<sup>2+</sup> (anexo 3).

### **6.11. Análisis de datos**

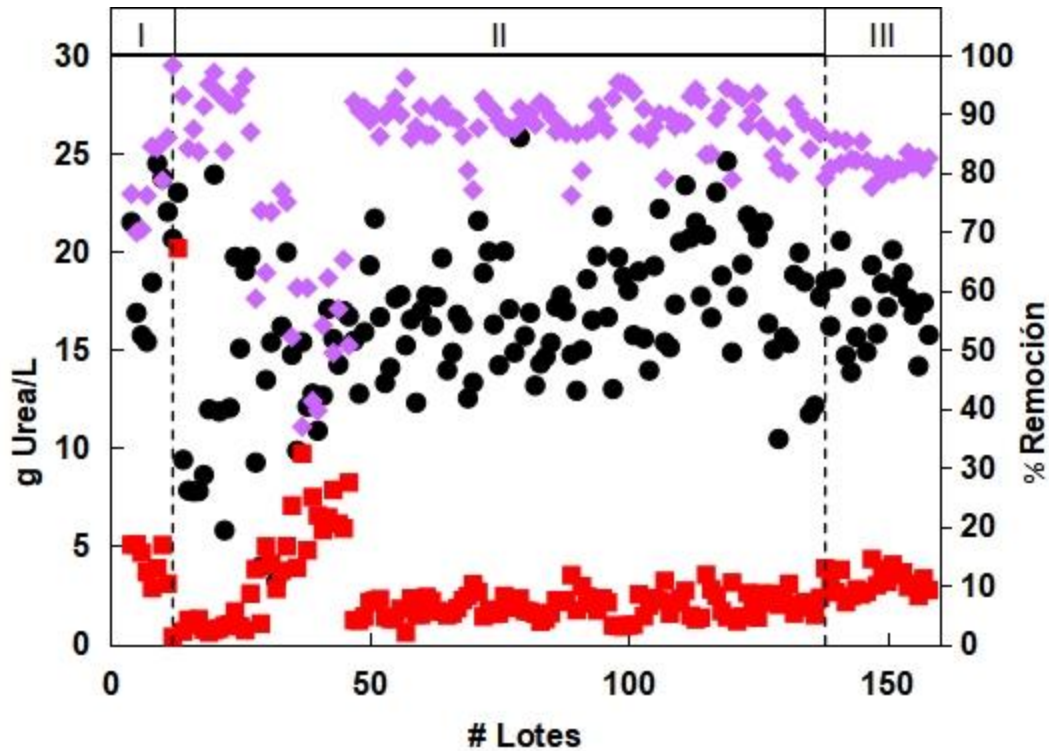
El análisis de resultados consistió en realizar estadística básica. Los resultados de las cinéticas se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y pruebas post hoc de Tukey con el uso del programa Statistica versión 8, para probar si existían diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. Se verificó normalidad y homocedasticidad. Se aplicó el método de transformación de Johnson en caso necesario. Las diferencias significativas fueron determinadas con un nivel de significancia  $P < 0.05$ . El modelo modificado de Gompertz se calculó para conocer las variables cinéticas de cada prueba, para ello se utilizó el programa Polymath versión 5.1.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 7.1. Operación y desempeño del reactor de LFI

Se evaluaron 158 lotes de ARA, con un tiempo de reacción ( $t_r$ ) de 1 d, con el objetivo de monitorear el proceso de ureólisis llevado a cabo por microorganismos que tienen presente la enzima ureasa. El período de evaluación comprendió tres etapas: inmovilización, etapa I (lote 1-12); la evaluación de ureólisis sin la presencia de antibiótico, etapa II (lote 13-138), y la etapa III alternando lotes sin y con antibiótico (50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP) (lote 139-158). Los resultados obtenidos de urea,  $N-NH_4^+$  y pH se muestran en las Figs. 10, 11 y 12. En esta sección se discutirán los resultados de las etapas I y II y en la siguiente se relacionará al desempeño del reactor con pulsos de antibiótico.

Durante la etapa de inmovilización (I), se observó a través del tiempo cambio en la coloración del soporte, lo que indicó que se estaba formando la biopelícula de microorganismos capaces de hidrolizar la urea. Lo anterior se reflejó en el porcentaje de remoción de urea ( $80.5 \% \pm 8.8$ ), el contenido de biomasa en el soporte ( $2.1 \text{ kg SVI/m}^3$  soporte seco  $\pm 0.6$ ) y la velocidad de ureólisis ( $r_u$  de  $6.8 \text{ g urea/L}\cdot\text{d} \pm 2.1$ ). La concentración de  $N-NH_4^+$  incrementó de 0.6 a 12.9 g/L, de la misma manera el pH incrementó de 6.2 a 9.2. Sin embargo, la eficiencia de remoción de DQO fue menor al 20 %. Adicionalmente, en el fondo del frasco se observó la formación de pequeños cristales.



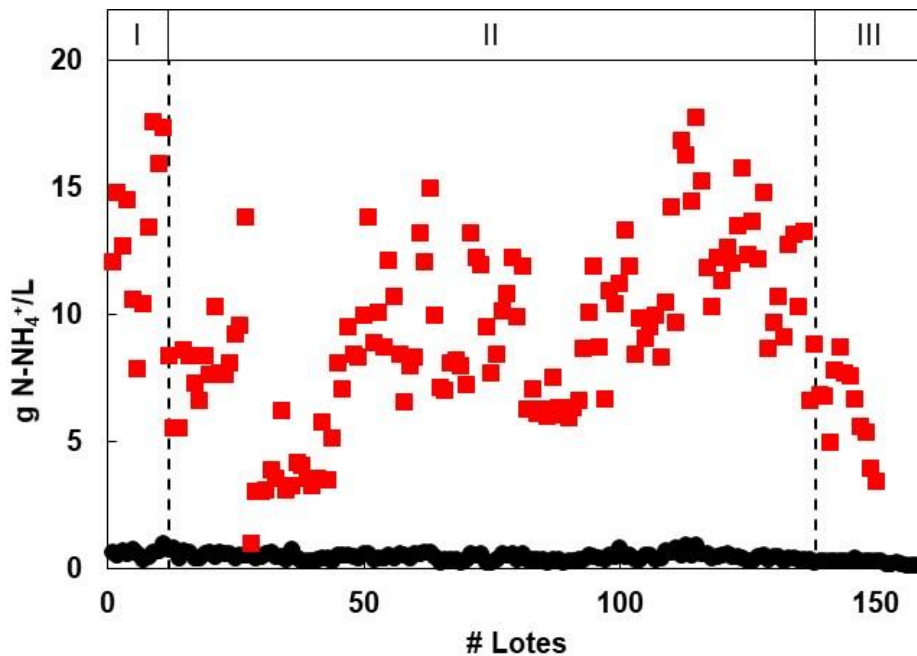
**Figura 10.** Concentración de urea inicial (●), final (■) y porcentaje de remoción (◆) durante la etapa de inmovilización (I), ureólisis sin antibiótico (II) y con pulsos de antibiótico (III).

En la segunda etapa el soporte con biomasa se transfirió al reactor de LFI y se observó un arranque eficiente del reactor (lotes 13-36); dada la estabilidad en la eficiencia de remoción de urea (Fig. 10), la cual fue similar (81.2 %) que la remoción cuantificada en la etapa I (80.5 %). La eficiencia de remoción de DQO también incrementó (31.3 %) aun cuando la biomasa del soporte disminuyó (1.85 kg SVI/m<sup>3</sup> soporte seco) debido a la hidrodinámica del reactor de LFI, que pudo generar esfuerzo de corte en la biopelícula. Sin embargo, el desempeño en el arranque fue aceptable. Posterior a este arranque, a través del tiempo se observó que el soporte se saturaba de sólidos que precipitaron durante el proceso de ureólisis; lo que pudo contribuir a la limitación de transferencia de nutrientes. Lo anterior se reflejó en la disminución de la eficiencia de remoción de urea, que disminuyó hasta 52 % (lotes 35-46), también en la disminución en la generación de amonio (4.4 g/L) y del valor de pH (8.9) (Fig. 11 y 12). Además, el soporte sedimentaba frecuentemente, por lo que se lavó con agua destilada, lo cual originó pérdida de biomasa (1.6 kg SVI/m<sup>3</sup> soporte seco), que pudo contribuir a la baja capacidad de remoción de urea. Para evitar la sedimentación del soporte por acumulación de precipitados, el lecho

del reactor se agitó de manera manual con una varilla de vidrio dos veces al mes para favorecer la separación de los sólidos precipitados. En consecuencia, el desempeño del reactor se estabilizó (lotes 47-138), las eficiencias de remoción promedio de urea y DQO fueron de  $88.5 \% \pm 4.2$  y  $37.5 \% \pm 15.5$  respectivamente y la biomasa inmovilizada promedio fue de  $2.3 \text{ kg SVI/m}^3 \text{ soporte seco} \pm 0.3$ .

Los valores de biomasa inmovilizada son cercanos a los valores reportados para reactores de LFI en donde se evaluó el proceso de ureólisis. Del Valle (2017), reportó  $3.1 \text{ kg SVI/m}^3$  (soporte seco) al operar el reactor con un  $tr$  de 0.29 d una remoción de urea mayor al 90 %, mientras que Espinosa-Chávez *et al.* (2022) reportaron para el mismo reactor con  $tr$  de 24 h, biomasa  $2.5 \text{ kg SVI/m}^3$  (soporte seco) y eficiencia de remoción de urea mayor al 90 %.

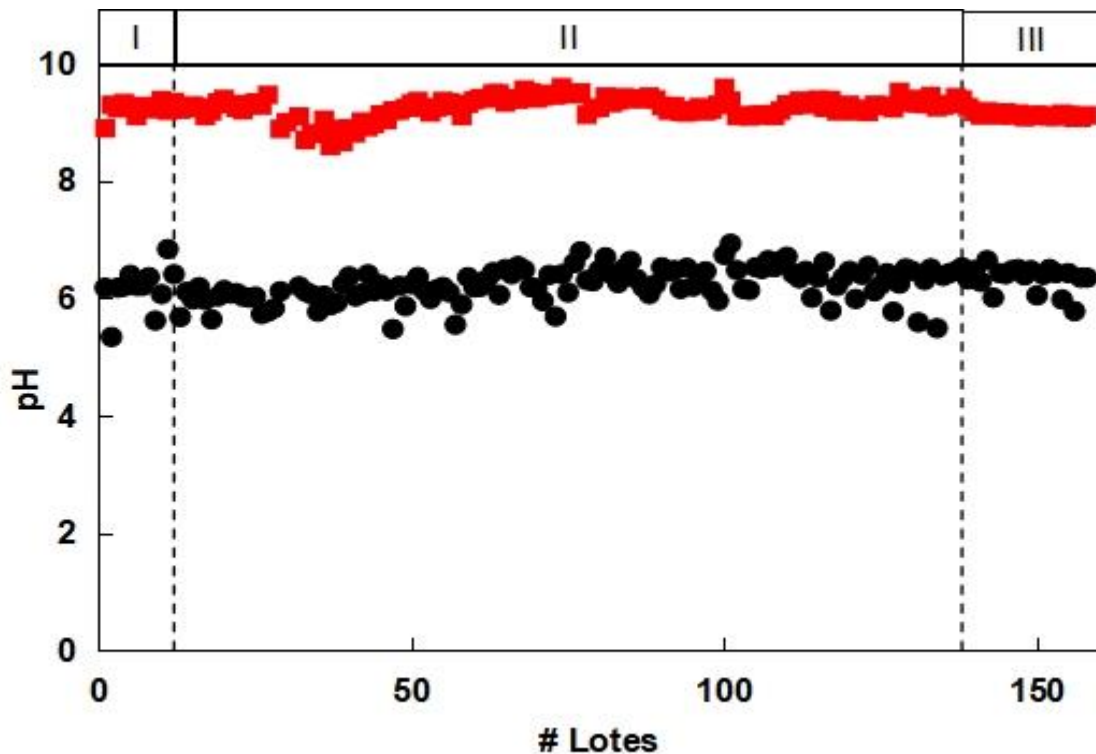
En la figura 11 se observa gran variabilidad en la concentración final de amonio y fue acorde con la inestabilidad de la concentración de urea en el ARA (Fig. 10). En los lotes 35-46, las concentraciones finales de  $\text{N-NH}_4^+$  fueron menores a 5 g/L (Fig. 11).



**Figura 11.** Evaluación de amonio inicial (●) y final (■) durante el periodo de inmovilización (I), ureólisis sin antibiótico (II) y con pulsos de antibiótico (III).



En cuanto al comportamiento de pH durante el monitoreo del reactor (Etapa II, Fig.12), el valor inicial de pH en el ARA osciló entre 5.5 y 6.7 mientras que el valor promedio al final del tiempo de reacción fue de  $9.2 \pm 0.3$ . Los cambios en las concentraciones iniciales y finales de urea, amonio y cambio de pH indica la presencia de microorganismos ureolíticos que son responsable de transformar la urea en bicarbonato y amoniaco, generando un incremento en el pH (Mobley y Hausinger, 1989). La diferencia en la concentración de los componentes del ARA sin hidrolizar se debe, como ya se mencionó anteriormente, a la composición de la orina, la cual se obtuvo de diferentes donadores y cada uno tiene distintos hábitos de alimentación. Además, factores como la edad, dieta o región geográfica contribuyen a la variación de los compuestos presentes en la orina de los donadores (Rose *et al.*, 2015).



**Figura 12.** Perfil de evolución de pH a la entrada (●) y salida (■) durante el periodo de inmovilización (I), ureólisis sin antibiótico (II) y con antibiótico (III).

Christiaens *et al.* (2019) evaluaron el proceso de hidrólisis en orina separada de origen, para la recuperación de nutrientes, utilizando un sistema anaerobio de tipo SBR (reactor secuencial por lotes, por sus siglas en inglés) con un volumen de operación de 0.7 L y un TRH de 0.4 d. El sistema se inoculó con bacterias anaerobias y se mantuvo en agitación constante a una temperatura de 28 °C. Entre los resultados obtenidos reportaron pH de 8.87 y remoción de 63 % de urea, estos valores son menores a los encontrados en este trabajo. El tipo de sistema, y las condiciones de operación del reactor son factores determinantes para la remoción de urea.

En el cuadro 1 se muestra los resultados promedio de los parámetros obtenidos durante el monitoreo del reactor en la Etapa II, comparado con trabajos realizados por Del Valle (2017) y Espinosa-Chávez *et al.* (2022) quienes evaluaron la ureólisis de orina (ARA) en reactores de lecho fluidizado inverso. Del Valle (2017) utilizó soporte de plástico de baja densidad inoculado con lodo granular anaerobio y tiempo de reacción de 0.29 d, Espinosa-Chávez *et al.* (2022) trabajaron con la misma configuración de reactor que se inoculó con lodo anaerobio, operado a temperatura ambiente y tiempo de reacción de un día.

Como se puede observar que en la cuantificación de  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y DQO el número de lotes es menor (85 lotes) comparado con el resto de los análisis (125 lotes), esto debido a que durante ese tiempo se comenzaron las pruebas para la determinación de antibiótico, por lo que se priorizó solo la alimentación y evaluación del reactor de LFI con los análisis de pH,  $\text{N-NH}_4^+$  y urea

**Cuadro 1.** Concentración promedio inicial y final de los parámetros evaluados en el monitoreo del proceso de ureólisis en el reactor de LFI durante la etapa II.

Parámetro	Entrada			Salida		
	Este trabajo <sup>A</sup>	(Del Valle, 2017) <sup>B</sup>	(Espinosa-Chávez <i>et al.</i> , 2022) <sup>C</sup>	Este trabajo	(Del Valle, 2017)	(Espinosa-Chávez <i>et al.</i> , 2022)
<b>Urea</b>	16.21±4.1 <sup>a</sup>	12.96± 3.2	14.6± 5.7	2.54± 2.3 <sup>b</sup>	0.68 ± 0.4	1.0 ± 0.4
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	0.47 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.3	0.70 ± 0.4	9.10 ± 3.4 <sup>b</sup>	7.49 ± 2.3	7.0 ± 2.1
<b>pH</b>	6.23 ±0.3 <sup>a</sup>	6.60 ± 0.8	6.7 ± 0.9	9.23± 0.3 <sup>b</sup>	9.10±0.2	9.2±0.3
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	1.09 ±0.3 <sup>**a</sup>	0.80 ± 0.4	1.1 ± 0.6	0.78±0.3 <sup>**b</sup>	0.41 ± 0.3	0.9 ± 0.4
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	1.00 ±0.6 <sup>**a</sup>	1.04 ±0.3	1.2 ±0.4	0.73±0.5 <sup>**b</sup>	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.3
<b>DQO</b>	6.48 ±1.5 <sup>**a</sup>	8.31 ± 3	8.3 ± 3.2	4.22±1.0 <sup>**b</sup>	5.4 ± 1.8	6.3 ± 2.5
<b>Precipitado</b>	na	na	na	0.61±0.3 <sup>*</sup>	0.7	0.75

Na: no aplica

Unidades de concentración g/L

**A:** orina procedente de 8 donadores entre 25-55 años.

**B:** orina procedente de personas de 19-50 años.

**C:** orina procedente de 31 donadores entre 13 y 50 años

\*: n=125 lotes

\*\* : n=85 lotes

Superíndices diferentes en renglones significa que hay diferencias significativas,  $P=0.05$

Los porcentajes de remoción de urea, DQO,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  obtenidos en este trabajo durante la etapa II fueron de (84.3, 34.4, 34.3 y 28.6) % respectivamente. Estos porcentajes se encuentran dentro de las eficiencias de remoción que se pueden calcular a partir de los datos de Del Valle (2017) y Espinosa-Chávez *et al.* (2022).

El decremento en la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  (28.6 % de remoción) se debe principalmente a la precipitación, y que se recupera en los sólidos precipitados. Como plantea Udert, Larsen, y Gujer (2003) durante el proceso de ureólisis se precipitan fosfatos, y los precipitados contienen 28 % de fosfatos, este porcentaje es cercano al obtenido en esta investigación.

En el reactor, no solo se realizó eficientemente la hidrólisis de urea presente en ARA, sino además también se redujo la cantidad de materia orgánica en términos de DQO (34.4 %), la cual pudo ser fuente de carbono para los microorganismos ureolíticos como lo mencionan Udert *et al.* (2003). En cuanto a la remoción de magnesio y amonio, esta se atribuye a la formación de sales como  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , estos compuestos se pueden presentar como impurezas del precipitado recuperado dependiendo de la concentración de sulfato presente en la orina (Ronteltap, Maurer, y Gujer 2007a).

Diversos estudios han caracterizado la orina para evaluar el proceso de hidrólisis durante periodos de almacenamiento. Kirchmann y Pettersson (1995) investigaron su composición química y el uso de la orina como fertilizante, almacenándola en tanques sépticos durante seis meses. Al finalizar este periodo el pH es de 8.9 y la concentración de amonio de 0.77 g N- $\text{NH}_4$ /L. Así también, Jagtap y Boyer (2018) evaluaron procesos de obtención de estruvita a partir de orina almacenada por cuatro meses, obtuvieron un pH de 9.2. Comparando ambos estudios con lo obtenido en este trabajo; se encontraron valores superiores de pH y amonio que Kirchmann y Pettersson (1995), y un valor de pH similar que Jagtap y Boyer (2018). Sin embargo, al comparar el tiempo de reacción; en ambas investigaciones requirieron de varios meses para obtener la hidrólisis de orina, en este proyecto solo se necesitó de un día, con lo cual se reduce el tiempo significativamente.

### 7.1.1 Actividad ureolítica específica (AUE) y constantes cinéticas

En el transcurso de monitoreo del reactor se realizaron cinéticas de ureólisis para evaluar la rapidez con la que los microorganismos inmovilizados en el soporte transformaron la urea presente en el ARA, estas cinéticas concluían con base en la evolución de pH y la transformación de urea a amonio (1.4-2.5 d). En la primera etapa (inmovilización), se realizaron dos cinéticas (lotes 2 y 6). Durante el monitoreo del reactor sin antibiótico (Etapa II), las cinéticas se realizaron en los lotes 27, 71, 107 y 138 (Cuadro 2). El ajuste cinético del modelo de Gompertz a los datos experimentales (Fig. 13) permitió establecer el periodo de adaptación de cada cinética con buen ajuste ( $R^2 > 0.99$ ).

Durante la etapa de formación de biopelícula en el soporte (cinética-Lote 2), se observó que el proceso de ureólisis fue lento, y tardó 1.1 d para que se observara evolución del valor de pH y transformación de urea a amonio, los valores fueron de 6.5 y 0.5 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L para pH y amonio respectivamente. El valor de amonio (Fig. 13) aumentó rápidamente después de un día de evaluación. Al final de la reacción la remoción de urea fue del 93 % (pH de 9.29). La lenta transformación de urea se atribuye a que en esta etapa de inmovilización los microorganismos privilegiaron energéticamente la producción de exopolímeros para la formación de la biopelícula y la fijación en el soporte.

Como plantean Sheng, Yu, y Li (2010) durante la fase de formación de una biopelícula en sistemas aerobios o anaerobios, el consorcio de microorganismos presentes inicia el proceso de generación de exopolímeros. Estos son polímeros de gran peso molecular secretados por los microorganismos que tienen la función de soporte, los ayudan a mantenerse fijos en la superficie de un soporte inorgánico, esta investigación realizada brinda un panorama general del comportamiento de los microorganismos para la formación de la biopelícula en el soporte.

**Cuadro 2.** Constantes cinéticas de ureólisis de la biomasa inmovilizada en el soporte usado en el reactor de LFI.

Lote	Hm (gN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L)	Rm (gN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L·d)	α (d)	R <sup>2</sup>	AUE (gN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /gSVI·d)	k <sub>u</sub> 1/d	Biomasa inmovilizada (kg SVI/m <sup>3</sup> )	% Remoción urea	pH <sub>final</sub>
2 *	12.56±0.62	12.21±1.24	1.06±0.02	0.998±0.001	430.63±48.97	0.21±0.04	1.66	93.98	9.3±0.04
6 *	7.95 ± 1.00	5.41±0.18	0.44±0.03	0.999±0.000	64.44±4.10	0.56±0.01	2.54	92.54	9.2±0.02
27 **	11.35±3.04	10.60±7.55	0.61±0.12	0.991±0.013	257.25±183.88	0.64±0.3	1.85	88.53	9.3±0.05
71 **	7.71±0.41	10.43±0.98	0.29±0.002	0.999±0.000	328.76±26.48	0.64±0.03	2.02	91.76	9.5±0.01
107 **	15.37±0.68	11.18±0.56	0.49±0.01	0.996±0.002	521.53±26.10	0.67±0.03	2.59	86.19	9.2±0.01
138 **	10.85±0.10	28.94±0.96	0.28±0.01	0.998±0.001	611.80±19.98	1.25±0.05	2.41	90.35	9.3±0.017

Hm: producción máxima de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

Rm: tasa máxima de producción de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación

α: tiempo de latencia

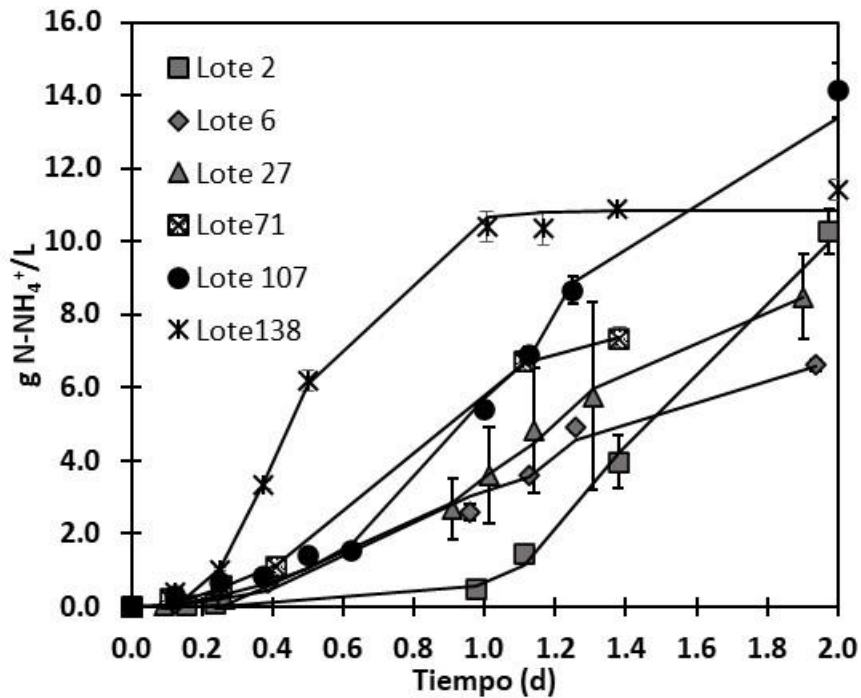
AUE: actividad ureolítica específica

SVI: sólidos volátiles inmovilizados en base seca

k<sub>u</sub>: constante de velocidad de ureólisis

\*: periodo de inmovilización

\*\* : periodo de ureólisis en el reactor



**Figura 13.** Evolución de la concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  a través del tiempo de reacción durante la determinación de cinéticas de ureólisis de la biomasa inmovilizada en el soporte de baja densidad utilizado en el reactor de LFI a través del tiempo de operación del reactor alimentado con ARA.

Las cinéticas de ureólisis realizadas a la biomasa inmovilizada a través del tiempo de operación del reactor durante la etapa II (Lotes 27 a 138) muestran una reducción en el tiempo de latencia ( $\alpha$ ) para la generación de amonio (Cuadro 2) de 1 a 0.28 d. Las tasas de producción de amonio ( $R_m$ ) incrementaron a través del tiempo de operación del reactor y el tiempo requerido para iniciar la producción de amonio disminuyó de 1 d a 0.28 d (Cuadro 2), el pH promedio alcanzado fue de 9.1. La eficiencia de remoción promedio de urea y DQO fue de 89.2 y 37.0 % respectivamente.

La evolución de la capacidad de transformar la urea a amoniaco por parte de los microorganismos inmovilizados se reflejó en el incremento de AUE (Cuadro 2), la cual no fue afectada por la variabilidad de la concentración de urea en el ARA (de 17.67 a 27 g urea/L). La biomasa se adaptó a las condiciones de operación del reactor, lo cual se reflejó en el incremento de la constante de velocidad de ureólisis ( $k_u$ ), la cual incrementó de 0.21 a 1.25 1/d (Cuadro 2).

Se han realizado estudios que dan a conocer la  $k_u$  involucrando microorganismos ureolíticos específicos. Okwadha y Li, (2010) utilizaron una bacteria del suelo, (*Sporosarcina pasteurii*) que produce la enzima ureasa para facilitar el proceso de hidrólisis, aumentando la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . Esta investigación da a conocer valores promedio de  $k_u$  entre (0.77 y 0.93) 1/d, estos resultados dependen de factores como cantidad de microorganismos, presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  disuelto, así como el tipo de bacterias presentes. Tobler *et al.* (2011) utilizaron para su estudio aguas subterráneas inoculadas con *S. pasteurii* y añadieron urea y  $\text{CaCl}_2$  con el mismo propósito que Okwadha y Li; favorecer la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ , pero en condiciones anóxicas, obteniendo una  $k_u$  de 2.35 1/d indicando, de igual manera que esta bacteria puede mejorar la precipitación de calcita.

Los resultados de  $k_u$  obtenidos en este trabajo son similares a los resultados presentados por Okwadha y Li, (2010) y Tobler *et al.* (2011), quienes aislaron microorganismos ureolíticos de otras matrices. El valor de esta constante depende de otros factores como concentración de urea inicial o temperatura (Ferris *et al.*, 2003; Mitchell y Ferris 2005). Los valores de  $k_u$  encontrados en este trabajo se encuentran por debajo del rango de valores de  $k_u$  (1.2 a 13 1/d) reportados para el mismo tipo de reactor en donde se usó orina humana como medio de cultivo y en donde la concentración de urea fue variable (12 a 27 g urea/L) durante el tiempo de operación del reactor (Espinosa-Chávez *et al.*, 2022). Las variaciones en los valores de  $k_u$  reportados para el mismo tipo de reactor alimentado con aguas amarillas, confirman la variabilidad de la composición de la orina en función de la zona geográfica y de los hábitos de alimentación de los donadores, además de la actividad metabólica que puede tener la biomasa microbiana inmovilizada. Sin embargo, en todos los casos se reporta la capacidad de estos microorganismos para precipitar minerales con diferentes finalidades como la precipitación de estruvita (esta investigación) o calcita para regenerar grietas en edificios.



La biomasa cuantificada en el lote 27 disminuyó en comparación a la biomasa cuantificada en la cinética 6 (etapa de inmovilización). Lo anterior se atribuye a la presencia de partículas del lodo granular que se usó para la inoculación, además, durante los primeros lotes de operación del reactor ocurrió un proceso de lavado y selección de microorganismos. Después de estos procesos, se mantuvieron los microorganismos que se adaptaron a usar la urea como fuente de alimentación. La biomasa inmovilizada incrementó posteriormente y se mantuvo estable (Cuadro 2), la cantidad promedio fue de  $2.22 \text{ kg SVI/m}^3 \pm 0.3$  de biomasa inmovilizada.

En un estudio realizado por Del Valle (2017), en el que utiliza el mismo tipo de reactor y medio de cultivo, pero con menor TRH y tiempo de evaluación (0.29 d y 30 lotes), obtuvo en promedio  $3.1 \text{ kg SVI/m}^3$  de biomasa inmovilizada y una AUE de  $121.4 \text{ gN-NH}_4^+/\text{gSVI}\cdot\text{d}$ , en comparación, los valores de biomasa determinados en esta investigación ( $2.22 \text{ kg SVI/m}^3$ ) son cercanos, mientras que la AUE ( $611.8 \text{ gN-NH}_4^+/\text{gSVI}\cdot\text{d}$ , antes de introducir antibiótico al sistema) es 5 veces mayor, demostrando que aunque había menor biomasa, los microorganismos en la biopelícula degradaron de manera eficiente la urea presente en la orina.

Diversos estudios han evaluado la formación de biopelículas en reactores de LFI; Meraz *et al.* (1995) utilizaron polietileno de baja densidad como medio de soporte y acetato como sustrato, por un periodo de evaluación de 135 días, obteniendo una concentración de biomasa final de  $3.6 \text{ kg SVI/m}^3$ , mientras que Arnaiz *et al.* (2003) utilizaron como medio de soporte Extendsphere<sup>®</sup> y AR sintética con lactosuero, el reactor tuvo un TRH final de 3.7 días (147 días operación), logrando inmovilizar  $7.39 \text{ kg SVI/m}^3$  al final de la evaluación. Comparando estos resultados con los valores reportados en esta investigación la biomasa fijada fue menor ( $2.22 \text{ kg SVI/m}^3$ ) en un periodo de evaluación mayor (531 d). Hay que tener en cuenta que el tamaño y forma del soporte, el medio de alimentación (en el presente estudio ARA real) y las condiciones de operación del reactor influyen en la fijación y comportamiento del consorcio de microorganismos en la biopelícula.

## **7.2. Biodegradabilidad y comportamiento de antibióticos**

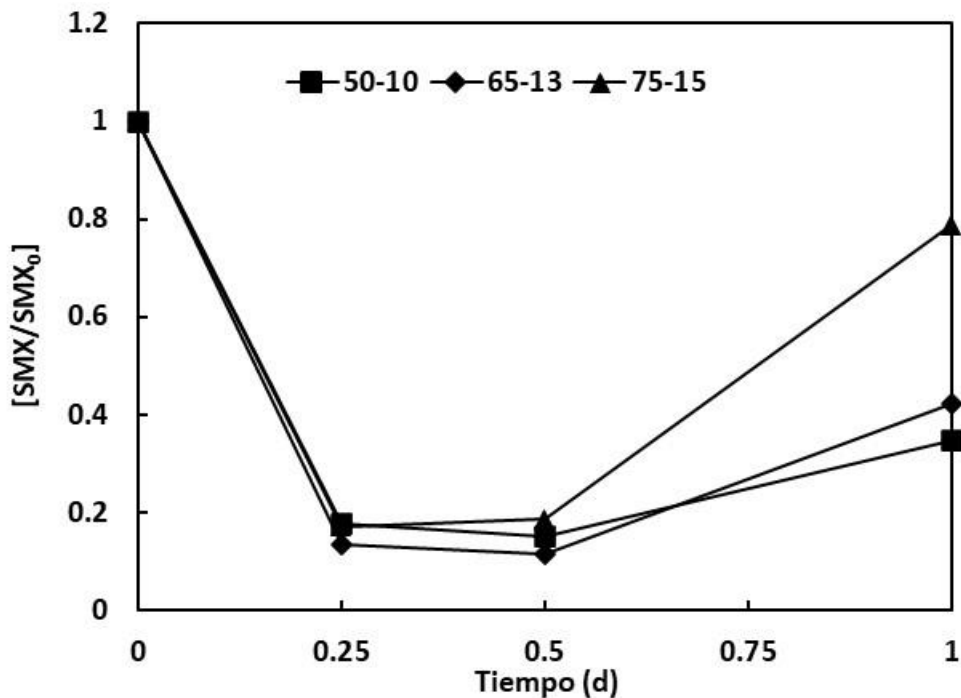
Para conocer los procesos ocurridos en el sistema, se llevaron a cabo cinéticas de biodegradabilidad con tres concentraciones de antibiótico SMX y TMP, con la finalidad de conocer la concentración con menos impacto en la actividad ureolítica de la biomasa y poder evaluarla posteriormente en el reactor de LFI. Una vez obtenida esta concentración, se hicieron cinéticas de adsorción, bioadsorción e hidrólisis para comprender el comportamiento del antibiótico dentro del sistema (biomasa y soporte), los resultados obtenidos se muestran en los siguientes apartados.

### **7.2.1. Determinación de la concentración de antibióticos**

De acuerdo con el método de detección de antibióticos, denominado “método de adición estándar del punto H” (Givianrad *et al.*, 2011), se realizó la validación del método. Los porcentajes de recuperación encontrados fueron 120 % para SMX mientras que para TMP se encontraron porcentajes de recuperación muy elevados (por arriba de 100 %), (Anexo 1) cuando en el estudio realizado por Givianrad y colaboradores presentan porcentajes de recuperación máximo de 106% para SMX y 109% para TMP. Con base a estos resultados se concluyó que el método de determinación aplicado en una matriz compleja como lo es la orina hidrolizada (ARA) no fue lo suficientemente robusto para determinar concentraciones de TMP. Por lo anterior se presentan únicamente los resultados para SMX, cuyo límite de detección fue de 2.0 mg/L medido en el par de longitud de onda 260-304.7 nm. En los ensayos reportados, se adicionaron ambos antibióticos, debido a que se usó el antibiótico Soltrim®.

### **7.2.2. Biodegradabilidad de antibióticos**

Los resultados de biodegradabilidad de las tres concentraciones de antibiótico comercial Soltrim® evaluadas en lote se muestran en la figura 14.



**Figura 14.** Cinética de degradación de SMX-TMP mediante biodegradación anaerobia. Las concentraciones evaluadas en el gráfico corresponden únicamente a SMX. ■ 50, ◆ 65 y ▲ 75 mg/L.

La mayor biodegradación del antibiótico SMX ocurre en los primeros 0.5 d de reacción, los porcentajes de biodegradación fueron de 88.4, 85.1 y 81.4 % para las concentraciones de 65, 50 y 75 mg/L de SMX, respectivamente. Estas eficiencias de biodegradación son mayores con respecto a porcentajes de biodegradación reportados para biomasa anaerobia presente en un reactor operado por lote secuenciado, con tiempo de reacción de 0.958 d. Cetecioglu *et al.* (2015), reportaron que al incrementar la concentración de SMX de 1 a 40 mg/L la eficiencia de biodegradación disminuye de 99 a 59 %, mientras que con una concentración de 45 mg/L de SMX se observó un efecto inhibitorio en la actividad de los microorganismos debido a que la eficiencia de biodegradación del antibiótico disminuyó considerablemente hasta 6 %. El estudio de Cetecioglu *et al.* (2015) brinda una panorámica general de lo que puede ocurrir al añadir el antibiótico en el reactor, teniendo en cuenta que la concentración utilizada fue de 50 mg SMX/L y la posible consecuencia que esto traiga en el consorcio microbiano que se tiene en nuestro sistema.

Por otro lado, un aspecto a considerar en este trabajo es que después de los 0.5 d de reacción (Figura 14) para las tres concentraciones de antibiótico se observó un incremento en la cuantificación, lo cual se atribuye a que pudo cuantificarse un producto de transformación con estructura muy similar (isómero) a la molécula original de SMX, esto se basa en lo reportado por Ouyang *et al.* (2020), quienes bajo condiciones sulfato-reductoras reportan la transformación de la molécula de SMX en dos productos, el primer producto es la forma reducida, rompimiento del enlace N-O del anillo isoxazol y el segundo producto presenta un reordenamiento del anillo isoxazol por lo que es un isómero de la molécula original. El método de detección usado en este trabajo (HPSAM) se basa en la absorbancia; considerando que el anillo aromático que tienen SMX y los productos de transformación encontrados por Ouyang *et al.* (2020), es responsable por la absorbancia con el mismo coeficiente de extinción molar a 270 nm, esto podría ser la razón por la cual las absorbancias incrementaron en muestras colectadas a 1 d de reacción. Cabe mencionar que Ouyang *et al.* (2020) detectaron los productos de transformación en cultivos de microorganismos sulfato reductores después de 24 días por lo que concluyeron que la transformación de SMX fue directamente catalizada por actividad microbiana. Otro punto por considerar es que en el tiempo de reacción de 1d se detectó disminución significativa ( $P < 0.05$ ) de las concentraciones de sulfatos (Cuadro 1), lo cual podría indicar la presencia de microorganismos sulfato reductores en el consorcio de microorganismos ureolíticos. Por lo anterior, sería importante que en un futuro se evaluaran los productos de la biodegradación del antibiótico con una técnica más robusta, además de identificar los microorganismos del consorcio.

La degradación de SMX en el sistema de biomasa inmovilizada se ajustó al modelo cinético de primer orden, los resultados encontrados (Cuadro 3) indican que la constante de velocidad de reacción  $k$  (1/d) no incrementó al incrementar la concentración de antibiótico, por lo que la concentración 75 mg/L de SMX tuvo un efecto inhibitorio en la actividad metabólica de los microorganismos. Los valores de  $k$  y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) son similares a los reportados por Wei *et al.* (2019), quienes evaluaron la cinética de biodegradación de SMX presente en agua residual en un reactor de membrana anaerobio operado por lote, y reportan que al incrementar la concentración del antibiótico su eficiencia de eliminación y el de la materia orgánica en términos de DQO disminuyen debido al efecto inhibitorio sobre los microorganismos anaerobios.

**Cuadro 3.** Eliminación en lote de SMX y constante de velocidad de reacción.

<b>SMX-TMP</b>	<b>Remoción</b>	<b>Constante de velocidad de</b>	<b>Vida media</b>
<b>(mg/L)</b>	<b>(%)</b>	<b>reacción</b>	
		<b><i>k</i> (1/d)</b>	<b><i>t</i><sub>1/2</sub> (d)</b>
50-10	85.1	3.8	0.18
65-13	88.4	4.3	0.16
75-15	81.4	3.7	0.19

Hay estudios que indican que la degradación de SMX no siempre depende del compuesto primario (antibiótico), sino de otros compuestos que tengan carbono en su estructura química (acetato, metanol, glucosa o amoniaco) y que pueden ser utilizados como sustrato, llevando a cabo un proceso de biodegradación inespecífica por medio de un mecanismo co-metabólico. Estas fuentes secundarias aumentan la tasa de degradación de fármacos como SMX, TMP, entre otros (Alexy, Kümpel y Kümmerer, 2004; Drillia., 2005; Xu *et al.*, 2011).

Cabe mencionar que el proceso de degradación de antibióticos depende también de la matriz a tratar y del proceso llevado a cabo para su degradación. Alexy, Kümpel y Kümmerer (2004) utilizaron AR municipal contaminada con SMX o TMP, con una alta y baja concentración. La carga microbiana inicial fue entre 10 a 1000 ufc/mL. Entre sus resultados reportan que tanto el SMX como la TMP no son fácilmente biodegradables. Sin embargo, en presencia de un compuesto mineral (acetato de sodio) se logra degradar 13 y 27 % para SMX y TMP, respectivamente. Los autores concluyen que la biodegradabilidad de estos compuestos mejora en presencia de una fuente de carbono alterna fácilmente biodegradable. Sin embargo, también reportaron un efecto negativo en la población microbiana a través del tiempo. Por su parte, Drillia *et al.* (2005) llegaron a una conclusión opuesta. En sus ensayos evaluaron la degradación de SMX en condiciones aerobias en un reactor secuencial en lote. Utilizaron un medio sintético, y la biomasa de lodos activados fue acondicionada a la presencia de SMX. La biodegradación ocurre en ausencia de fuentes de carbono o amonio, mientras que, en presencia de

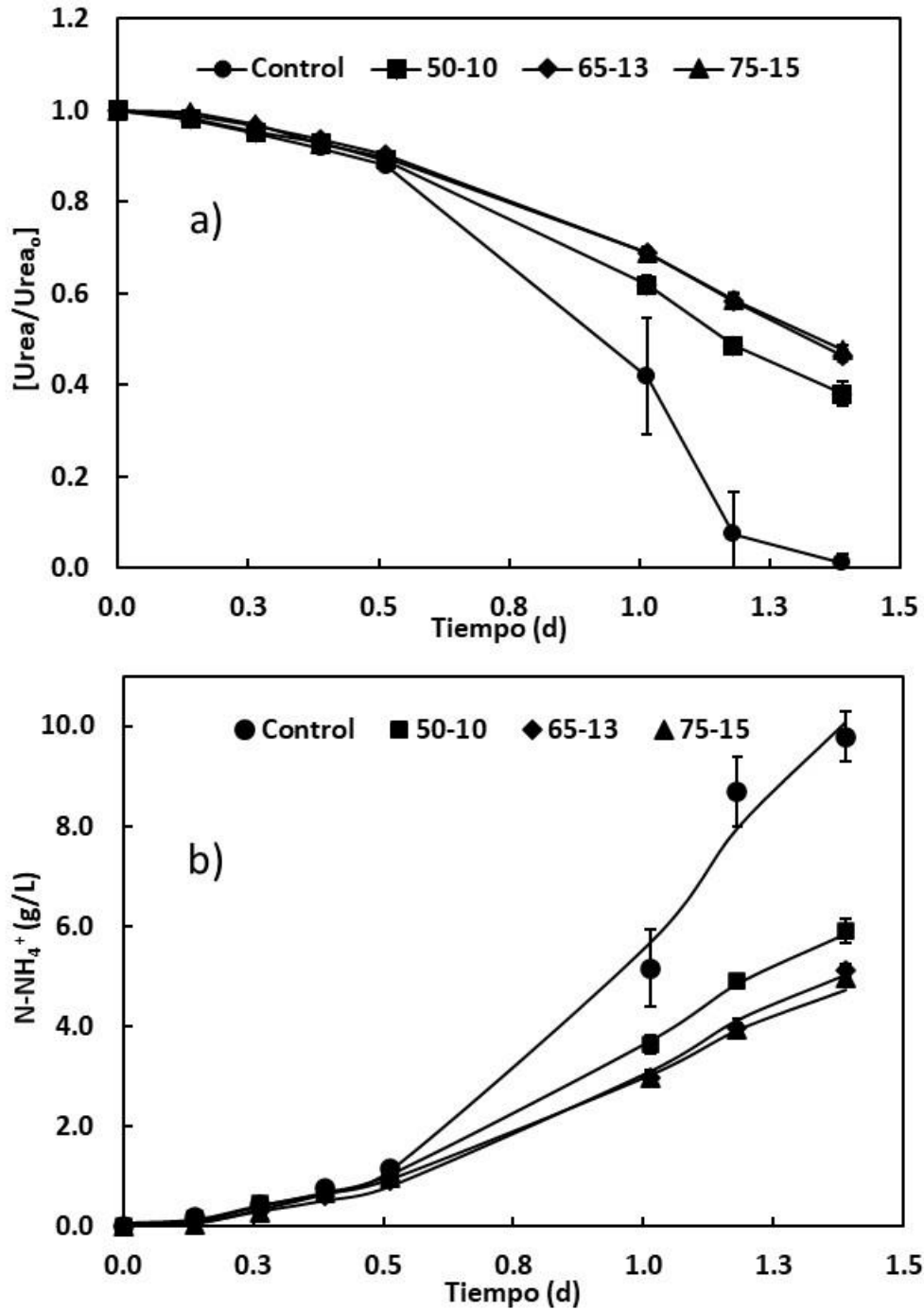
fuentes alternas de fáciles de degradar, las concentraciones del antibiótico se mantuvieron intactas durante el tiempo de reacción.

En este trabajo se detectó biodegradación de SMX en una matriz que inherentemente tiene fuentes de carbono y nitrógeno, por lo que se puede decir que el consorcio de microorganismos presentes en el reactor de LFI fue capaz de degradar SMX a través de un proceso co-metabólico.

### **7.2.3. AUE en presencia de antibióticos**

Durante el ensayo de biodegradabilidad de SMX se monitoreó el consumo de urea, la producción de  $\text{N-NH}_4^+$  y la evolución de pH, entre otros parámetros, y así evaluar el efecto de las tres concentraciones de antibiótico en los parámetros cinéticos de la AUE. Para observar esto, se comparó con un tratamiento sin antibiótico (control), para determinar si existe algún efecto en el proceso de ureólisis.

En la figura. 15 se puede observar que durante los primeros 0.5 d de monitoreo no hubo diferencia en el consumo de urea y tampoco en la producción de amonio de los tres tratamientos con antibióticos con respecto al control. Sin embargo, después de los 0.5 d de reacción se aprecia una diferencia marcada en la evolución de las especies evaluadas. Con respecto a las concentraciones de antibióticos se aprecia que la concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  (Fig. 15 b) es menor al aumentar la concentración de los antibióticos; lo cual indica que a mayor concentración de antibióticos hay un efecto negativo en la actividad de los microorganismos ureolíticos después de 0.5 d. El mismo efecto se observa en el consumo de urea (Fig. 15 a). En el caso de los tratamientos con 65 mg/L de SMX y 13 mg/L de TMP y con 75 mg/L de SMX y 15 mg/L de TMP los perfiles de consumo de urea y producción de  $\text{N-NH}_4^+$  fue similar a través del tiempo de reacción.



**Figura 15.** Consumo de urea (a) y producción de  $N-NH_4^+$  (b) a través del tiempo con diferentes concentraciones de antibióticos; 50-10 (■), 65-13, (◆), 75-15 (▲) mg/L SMX-TMP y control (●) sin antibióticos.

En el cuadro 4 se muestran las constantes cinéticas encontradas con el modelo modificado de Gompertz, los valores de AUE indican que a mayor concentración de antibióticos mayor fue el impacto sobre la actividad de los microorganismos ureolíticos. Se encontró que entre la muestra control y la concentración más baja de antibióticos (50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP), se redujo más del 50 % la AUE, corroborando el efecto negativo de los antibióticos en la AUE. El análisis de varianza de una vía mostró diferencias significativas de la AUE ( $F(4,07) = 18.63$ ,  $P < 0.05$ ) y el análisis post hoc de Tukey mostró que la AUE del control fue mayor que la AUE de los tres tratamientos con antibiótico. Entre los tratamientos con antibiótico se identificó dos grupos (Cuadro 4). Se determinó que el tratamiento con mayor concentración de antibióticos presentó la AUE más baja significativamente, en comparación con el tratamiento con menor concentración de antibióticos. El análisis de varianza de una vía de Hm mostró que también hubo diferencias significativas ( $F(4,07) = 8.82$ ,  $P < 0.05$ ). Al comparar los cuatro tratamientos, el análisis post hoc de Tukey mostró que Hm del control fue significativamente mayor que para los tratamientos con antibióticos (Cuadro 4). Adicionalmente, el análisis de varianza de Rm entre los cuatro tratamientos también presentó diferencias significativas ( $F(4,07) = 17.15$ ,  $P < 0.05$ ). De igual manera el análisis post hoc de Tukey mostró que Rm del control fue significativamente mayor que para los tratamientos con antibióticos. También hay dos grupos entre los tratamientos con antibiótico, el tratamiento con 75 mg/L de SMX y 15 mg/L de TMP presentó una tasa de producción de  $N-NH_4^+$  significativamente menor que en el tratamiento con 50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP (Cuadro 4).

Con respecto a la remoción de urea en el tratamiento sin antibióticos se obtuvo el mayor porcentaje, casi alcanzando el 100 %. Sin embargo, en los tratamientos con antibióticos el porcentaje de remoción de urea disminuyó conforme aumentó la concentración de antibióticos (Cuadro 4).

La transformación de urea a ion amonio influye directamente en el comportamiento del pH (Fig. 16), en este ensayo se encontró que en el control (sin antibiótico) tuvo el mayor valor (9.4) en 1.4 d mientras que para los tratamientos con antibióticos el valor de pH fue muy similar (9.2) en 1.4 d.



**Cuadro 4.** Constantes cinéticas y AUE con diferente concentración de antibiótico.

	Hm (gN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L)	Rm (gN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L·d)	α (d)	R <sup>2</sup>	AUE (gN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /gSVI·d)	k <sub>u</sub> 1/d	% Remoción urea
<b>Control</b>	18.10±3.36 <sup>a</sup>	11.70±0.13 <sup>a</sup>	0.50±0.006	0.992±0.002	318.70±4.15 <sup>a</sup>	0.93±0.11 <sup>a</sup>	98.9
<b>50-10*</b>	9.90±0.46 <sup>b</sup>	6.00±0.18 <sup>b</sup>	0.40±0.02	0.999±0.001	163.60±4.11 <sup>b</sup>	0.51±0.02 <sup>ab</sup>	61.9
<b>65-13*</b>	11.36±3.05 <sup>b</sup>	5.53±0.48 <sup>bc</sup>	0.47±0.09	0.999±0.001	150.85±12.96 <sup>bc</sup>	0.40±0.01 <sup>bc</sup>	53.6
<b>75-15*</b>	9.20±1.32 <sup>b</sup>	5.02±0.16 <sup>c</sup>	0.40±0.05	0.998±0.000	136.50±3.96 <sup>c</sup>	0.39±0.01 <sup>c</sup>	52.1

Hm: producción máxima de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

Rm: tasa de producción de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación

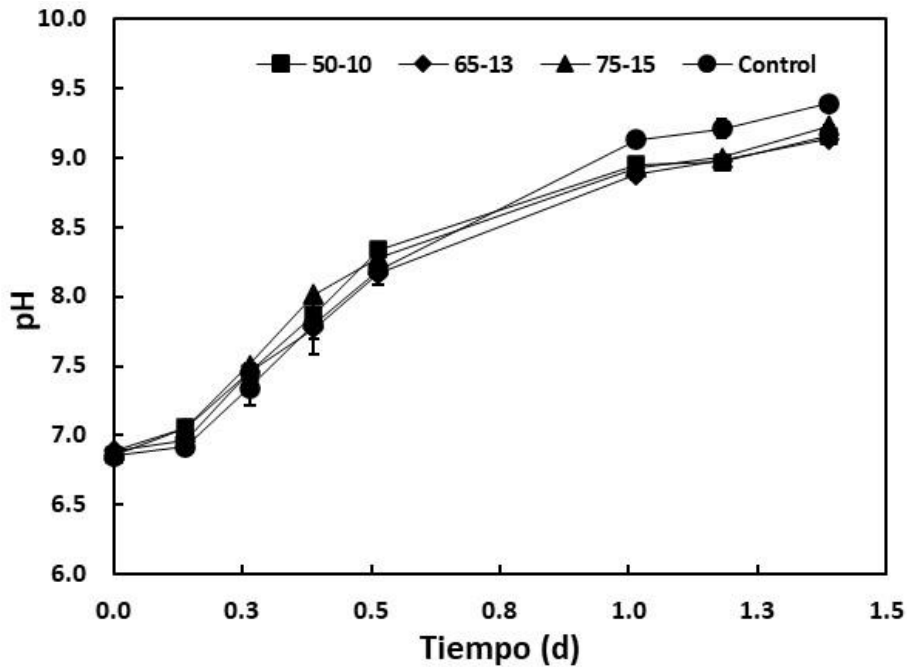
α: tiempo necesario para tener Rm

AUE: actividad ureolítica específica

SVI: sólidos volátiles inmovilizados

\*:mg/L SMX-TMP

Nota: Letras iguales entre columnas son medias iguales.



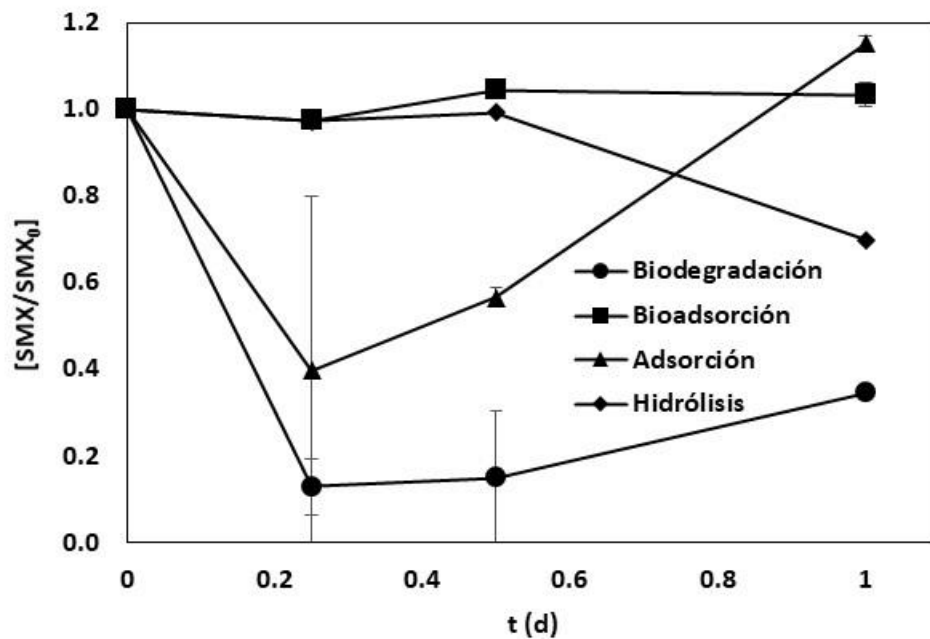
**Figura 16.** Comportamiento de pH a 50-10 (■), 65-13, (◆) y 75-15 (▲) mg/L SMX-TMP respectivamente en comparación con el control (●).

De acuerdo con la figura 16 durante las primeras horas de monitoreo, el pH no se vio afectado significativamente entre el control y los tratamientos con antibiótico. Sin embargo, el análisis de varianza para pH a 1 día de monitoreo, este análisis mostró diferencias significativas ( $F(4.06)=28.3$ ,  $p<0.05$ ) entre los tratamientos y el control, en el análisis post hoc de Tukey se verificó que el pH del control (sin antibióticos) alcanzó el pH promedio de 9.1, siendo significativamente mayor que en los tratamientos con antibióticos.

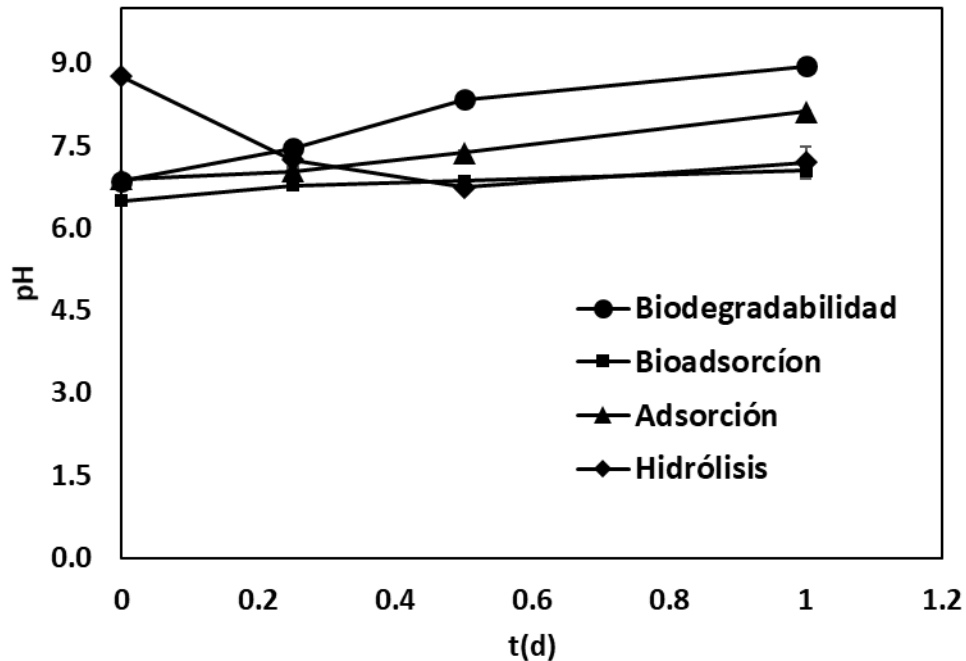
Con los resultados obtenidos en la cinética de biodegradación se decidió evaluar la concentración de antibiótico de 50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP en cinéticas por lote para evaluar el comportamiento y destino del antibiótico en la biopelícula y soporte, así como en medio acuoso y posteriormente en el reactor LFI. El análisis de estos fenómenos se expone en el siguiente apartado y posteriormente se analizará el desempeño del reactor con pulsos de antibiótico.

#### 7.2.4. Comportamiento de antibióticos. Adsorción, bioadsorción e hidrólisis

Los ensayos en lote para evaluar el comportamiento de los antibióticos en la biopelícula, soporte y en medio acuoso se realizaron con la concentración más baja evaluada en los ensayos de biodegradabilidad (50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP). Recordando que la cinética de adsorción se realizó con soporte sin biomasa, la cinética de bioadsorción con soporte colonizado con biomasa y la de hidrólisis sin soporte, en todos adicionando  $\text{NaN}_3$  con la finalidad de inhibir el proceso de biodegradación y cualquier actividad biológica. La figura 17 muestra el perfil de evolución de la biodegradación, bioadsorción, adsorción e hidrólisis de SMX durante un día.



**Figura 17.** Comportamiento de SMX durante la evaluación a través del tiempo de la biodegradación, bioadsorción, adsorción e hidrólisis.



**Figura 18.** Perfil de evolución de pH durante la evaluación de la biodegradación, bioadsorción, adsorción e hidrólisis a través del tiempo.

La figura 17 muestra que la bioadsorción de SMX en la matriz de la biomasa inmovilizada sin actividad microbiana ocurrió en los primeros 0.5 d de evaluación, el 2.7 % de la concentración inicial de antibiótico es la que quedó adsorbida en la biomasa. Posteriormente, se observó un incremento en la concentración de antibiótico cuando el pH del medio tuvo un valor de 7.0 (Fig. 18), lo que indica que podría haber ocurrido desorción del antibiótico. La bioadsorción ocurrida fue muy baja, no es un proceso que impacte en el comportamiento de SMX en las matrices evaluadas.

Con respecto a la adsorción del antibiótico en el soporte de polietileno de baja densidad, se encontró que el fenómeno de adsorción ocurrió rápidamente en los primeros 0.5 d, quedando retenido el 43.5 % de la concentración inicial de SMX, esto sucedió cuando el pH del medio cambió de 6.9 a 7.4 (Fig. 18). Sin embargo, cuando el pH fue mayor de 7.4 se observó que la concentración de antibiótico incrementó en el medio, lo que podría indicar que ocurrió un proceso de desorción del antibiótico del soporte. Hay que considerar que en este ensayo el soporte sólo fue funcionalizado y no tenía biomasa adherida.

En cuanto a la hidrólisis se observó estabilidad de la molécula de SMX debido a que no se detectó disminución de su concentración a los 0.5 d de reacción aun cuando el pH cambio de 8.8 a 6.7. Posteriormente, al día de reacción, la concentración de SMX se redujo 4 % con respecto al valor inicial.

El proceso de ureólisis solamente se observó en la biodegradación cuantificando a las 24 horas de reacción una concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  de 3.6 g/L, mientras que en la bioadsorción y adsorción los valores encontrados fueron de 0.07 y 0.16 mg/L de  $\text{N-NH}_4^+$  respectivamente.

En investigaciones anteriores se ha reportado que la adsorción de SMX en sustancias húmicas disminuye al incrementar el pH del medio de 5 a 9 (Liu *et al.*, 2017). En biopelículas se ha reportado que las sustancias poliméricas extracelulares (SPE), sustancias claves para la aglomeración de microorganismos e interacción con su entorno (Flemming *et al.*, 1996), confieren características fisicoquímicas a las biopelículas y pueden tener formas iónicas en función del pH, por ejemplo, a  $\text{pH} > 7$ , las SPE generalmente están cargadas negativamente (Bryers, 2000), y a este valor de pH la especie predominante de SMX es la forma aniónica (Wunder *et al.*, 2011). En soportes de plásticos de polietileno la mayor adsorción de antibióticos (SMX) ocurre a pH ácido y cercano al neutro, posteriormente se presenta una desorción del antibiótico a pH básico debido a que la especie de SMX que predomina en ambientes alcalinos es la forma aniónica, lo que favorece la repulsión electrostática entre el SMX y el microplástico de polietileno (Guo *et al.*, 2019). El SMX se elimina principalmente por biotransformación en plantas de tratamiento de agua residual debido principalmente por su naturaleza iónica negativa y baja capacidad de adsorción a pH neutro (Yang *et al.*, 2011; Carballa *et al.*, 2018).

Se concluye que debido a que la biomasa en el reactor de LFI se encuentra en forma de biopelícula (soporte con biomasa inmovilizada) es difícil que el antibiótico sea adsorbido en el material de soporte (polietileno de baja densidad), además de que tiene baja adsorción en la biomasa inactiva. Por lo tanto, la disminución de la concentración del antibiótico se debe principalmente a la actividad microbiana, la cual ocurre en las primeras 12 horas de reacción con alta eficiencia. Si bien la concentración de 50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP afecta a la actividad ureolítica, el proceso de ureólisis no se inhibe, lo que indica que el reactor es una propuesta robusta para el tratamiento de aguas amarillas en presencia de antibióticos, esta evaluación se detalla en un apartado posterior.

### 7.2.5. Desempeño del reactor de LI con antibiótico

La última etapa de esta investigación fue evaluar el efecto de la presencia de antibióticos en el desempeño del reactor LFI, para lo cual se adicionaron pulsos de antibiótico (lote 139 -158) con una concentración de 50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP (10 pulsos de antibiótico cada tercer lote). En esta etapa se hizo el seguimiento al contenido de SVI en el soporte del reactor, además de los parámetros de la eficiencia del reactor y se cuantificó la concentración de SMX en los días 0, 0.5 y 1 d de reacción.

En el cuadro 5 se observa que las eficiencias de remoción de urea, DQO y  $\text{PO}_4^{3-}$  con antibiótico fueron relativamente menores con respecto a las eficiencias cuantificadas sin adición de antibiótico. La cuantificación de  $\text{N-NH}_4^+$  y pH fue muy similar entre los tratamientos, encontrando valores de  $6.17 \pm 1.8$  y  $6.80 \pm 1.45$  mg/L de amonio y  $9.14 \pm 0.05$  y  $9.15 \pm 0.09$  valores de pH durante la evaluación con y sin antibiótico, respectivamente.

De acuerdo al trabajo de Cetecioglu *et al.* (2015) reporta que la concentración de SMX (1 a 45 mg/L) afecta la remoción de DQO en un tratamiento anaerobio de AR en un reactor anaerobio por lote secuencial, tratando agua residual sintética con 2250 mg/L DQO, esta investigación arroja porcentajes de remoción de DQO entre 97-93 % a concentraciones entre 1 y 40 mg/L SMX durante los días 78 a 127 y para la concentración más alta (45 mg/L SMX) reportaron porcentaje de remoción de 86 % al inicio de añadir esa concentración, colapsando el sistema al final de la investigación con 26 % (168 d), en comparación de 97 % del control durante todo el ensayo.

**Cuadro 5.** Comparación de los valores promedio de remoción de los parámetros evaluados durante la operación del reactor (lotes 138 a 158) con y sin antibiótico. n=10.

Parámetro	% remoción	
	Con antibiótico	Sin antibiótico
<b>Urea</b>	80.96	82.39
<b>DQO</b>	31.34	39.29
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	35.56	33.68
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	20.79	26.18

Respecto a la biomasa cuantificada en el soporte, se observó una reducción en el contenido de SVI. Antes de iniciar con los pulsos de antibiótico la concentración de biomasa fue de 2.41 kg SVI/m<sup>3</sup> y al final de la operación del reactor fue de 2.0 kg SVI/m<sup>3</sup>. La pérdida del 17 % de biomasa no afectó de manera considerable el proceso de ureólisis, como lo indican las cinéticas de ureólisis que se evaluaron en esta etapa. Los valores de la constante de ureólisis específica ( $k_u$ ) para la evaluación con antibiótico y sin antibiótico fueron de  $1.7 \pm 0.22$  1/d y  $1.9 \pm 0.15$  1/d, respectivamente; mientras que el tiempo de vida media de urea fue de  $0.41 \pm 0.05$  d y  $0.37 \pm 0.05$  d con y sin antibiótico.

En cuanto a la eficiencia de eliminación de SMX se observó que en los 0.5 d de reacción la eficiencia de eliminación fue de  $52 \pm 16.6$  %. Al igual que en las cinéticas en lote con antibiótico, se observó que la concentración de antibiótico incrementó después de 0.5 d de reacción, sin embargo, el incremento no fue tan alto como el que se apreció en las cinéticas en lote, en tres cinéticas no se observó el incremento en la concentración de antibiótico, por lo que al final de 1 d de reacción la eficiencia de eliminación fue de  $57 \pm 19.9$  %. El valor de la velocidad específica de transformación del antibiótico ( $k$ ) en el reactor fue de  $1.2 \pm 0.3$  1/d, este valor es inferior al encontrado en las cinéticas realizadas en botella (Cuadro 3). Los resultados indican que el antibiótico tiene efecto en la concentración de biomasa, pero no afecta de manera considerable al proceso de ureólisis del ARA.

Azimi *et al.* (2017) proponen la remoción simultánea de SMX y TMP en un biorreactor rotatorio continuo (dividido en tres compartimientos) durante un año a diversas concentraciones (6-30, 12-60 y 24-120) mg/L TMP-SMX, estos autores reportan un TRH óptimo de 36 h para que TMP se biodegrade completamente y que la remoción de SMX disminuye conforme aumenta la concentración (80 al 60 %), lo cual arroja datos comparables a los obtenidos en este trabajo, ya que en el experimento de cinéticas en lote, los tratamientos con alta concentración de antibióticos exhibieron disminución de la biodegradabilidad de SMX al final del tiempo de reacción (5 d).

Xu *et al.* (2011) analizaron los efectos que tiene el SMX durante su proceso de biodegradación y biotransformación en agua en un sistema aerobio. Los resultados obtenidos sugieren que no hay dependencia entre la concentración inicial y el proceso de biodegradación, aunque a concentraciones de 50 mg/L y 100 mg/L ocurre el proceso de inhibición de los microorganismos presentes. Mediante pruebas vía HPLC reportaron la presencia de un metabolito (N<sub>4</sub>-acetil-SMX). En el presente trabajo la concentración de 50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP tuvieron un efecto negativo en el consorcio microbiano, tal y como lo reportan en Xu *et al.* (2011).

En el estudio realizado por Alexy, Kümpel, y Kümmerer (2004) se reportan porcentajes de remoción biológica de SMX y TMP de 38 y 46 % respectivamente utilizando un medio mineral (acetato de sodio), pero se reporta una disminución microbiana tal y como sucede en este trabajo. Esto implica que solo una parte del compuesto activo puede mineralizarse, mientras que el resto o la formación de algún metabolito puede repercutir negativamente en la comunidad microbiana o generar resistencia bacteriana en el medio ambiente.

Finalmente, se observó que la eficiencia de eliminación de sulfatos fue mayor durante la evaluación del reactor con pulsos de antibiótico, esta reducción de la concentración de sulfato puede atribuirse a que pudo ser utilizado por un grupo de bacterias que participan en la degradación de SMX. En este proceso, el sulfato actúa como un aceptor de electrones para remover compuestos orgánicos (entre ellos fármacos) por bacterias sulfato-reductoras, que pueden atacar el anillo isoxazol, así como los grupos funcionales como sulfonamida o amina del compuesto principal (Jia *et al.*, 2017; Ouyang *et al.*, 2020). Las bacterias sulfato reductoras también pueden usar metanol como fuente de carbono, en esta investigación se aportó metanol debido a que se utilizó como medio de disolución del antibiótico. Al respecto, se ha reportado que las bacterias sulfato reductoras son



capaces de degradar SMX (Jia *et al.*, 2017). Se han reportado casos clínicos en los que las bacterias reductoras de sulfato se encuentran presentes en el organismo humano (del género *Desulfovibrio*), causando problemas en la salud (Predaria *et al.*, 2017; Machaca *et al.*, 2022), por lo que podemos deducir su presencia en la orina humana, que pueden estar mezcladas con los microorganismos ureolíticos debido a la similitud de características (alcalófilas y mesófilas en algunas de ellas); también existe la presencia de enzimas en los consorcios de bacterias sulfato-reductoras que tienen un papel importante en la degradación de compuestos como el SMX (Jia *et al.*, 2017), por lo que se deben realizar estudios específicos en el consorcio bacteriano presente en el soporte para confirmar esta información y conocer la función que las bacterias sulfato-reductoras tienen al estar en conjunto con los microorganismos ureolíticos.

### **7.3. Caracterización del precipitado recuperado**

Durante la segunda etapa de operación del reactor lotes 13 a 138 (sin antibiótico) se obtuvo 0.61 g de precipitados/L  $\pm$  0.31, mientras que para la etapa de operación del reactor de LFI con pulsos de antibiótico se obtuvo 0.60 g de precipitados/L  $\pm$  0.37, esto sugiere que el uso de antibióticos no influyó en la precipitación del sólido recuperado y que la recuperación del precipitado va a estar en función de la composición del ARA y pH que influye directamente en la precipitación del sólido durante la hidrólisis de orina (Tilley, Atwater y Mavinic, 2008). Los precipitados recuperados en este trabajo son menores a los reportados en la literatura para la misma configuración del reactor en el que se trataron aguas amarillas (Del Valle 2007 y Espinosa-Chávez *et al.*, 2022).

Para la caracterización de los precipitados recuperados durante el proceso de ureólisis en el reactor LFI, se tomaron muestras de manera aleatoria durante las tres etapas. A partir de la disolución de los precipitados en HCl se realizó la determinación y cuantificación de  $Mg^{2+}$ , posteriormente se realizó la cuantificación estequiométrica de los moles teóricos de  $H_2O$ ,  $NH_4^+$  y  $PO_4^{3-}$  considerando la ecuación 4. Los resultados obtenidos indican que el  $62.5 \pm 11.7$  % de los precipitados corresponde a estruvita y el porcentaje restante corresponde a impurezas, las cuales pueden favorecerse por ciertas condiciones como el exceso de amonio en el medio, Stratful *et al.* (2001) reportan que para que haya una buena recuperación de estruvita, el pH debe ser mayor a 8.5 pero si existe un exceso de  $N-NH_4^+$ , es probable que una parte del recuperado no sea estruvita. De acuerdo a cálculos termodinámicos teóricos de He *et al.* (2013), si existen altas concentraciones de  $N-NH_4^+$  el rango de pH para la precipitación de estruvita se encuentra

entre 5 y 10, mientras que a bajas concentraciones de  $\text{N-NH}_4^+$  el rango de pH para la obtención de estruvita oscila entre 7 y 10. A su vez, Randall y Naidoo (2018) reportan que de los compuestos químicos presentes en la orina, el  $\text{Mg}^{2+}$  presenta bajas concentraciones (20-205 mg/L), siendo este el reactivo limitante para la precipitación de estruvita. Liu *et al.* (2013) propone que el parámetro que más afecta la precipitación de fósforo en forma de estruvita es la relación molar Mg/P, ya que mientras mantienen una relación molar de 1.0, el porcentaje de precipitación es de 85 %, pero al aumentar esta relación a 1.3 la eficiencia aumenta a 96 %, esto debido al aumento en el grado de saturación al aumentar la relación molar que influye directamente en la eficiencia de remoción del fósforo. Estos autores también estudian la influencia del pH, y reportan que a pH de 9.2 la principal impureza es la presencia de potasio (0.19 % promedio en peso), mientras que el aumento de pH de 8.7 a 10 no influye en la precipitación de P, pero sí en la calidad de los cristales de estruvita formados.

En relación a la estruvita, Shu *et al.* (2006) propusieron que por cada 100 m<sup>3</sup> de agua residual se puede obtener hasta 1 kg de estruvita; considerando el rendimiento de estruvita a partir del tratamiento de ARA en esta investigación (en promedio 0.42 g/L de estruvita) y considerando el mismo volumen de ARA, se pueden recuperar 42 kg de estruvita bajo las condiciones de operación del reactor LFI, por lo que es de gran importancia fomentar la separación de efluentes desde el origen con el objetivo de incrementar la eficiencia de tratamiento de efluentes en las PTAR al eliminarse la orina que es el principal portador de nutrientes en el agua residual y por otro lado revalorizar a un efluente separado desde el origen como la orina humana.

## 8 CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se hacen las siguientes conclusiones.

El desempeño del reactor LFI empleado en este trabajo para el tratamiento de aguas amarillas (orina humana) durante 125 lotes fue adecuado. La operación del sistema por lote con  $t_r$  de un día resultó con eficiencias de ureólisis mayor a 83 % y remoción de DQO mayor a 30 %. Se logró recuperar 0.61 g de precipitados por litro de orina tratada, de los cuales el 62.5 % corresponden a estruvita.

Con respecto al comportamiento de SMX en lote se concluye que la biodegradación fue el proceso que predominó, debido a que, aunque hubo adsorción en el soporte de polietileno de baja densidad durante las primeras horas, también se dio un proceso de desorción importante con valores de pH cercanos a 9.0. Los procesos de bioadsorción (en la biomasa inerte) y la hidrólisis fueron mínimos. Durante la biodegradación la concentración de SMX se redujo en más del 80 % a los 0.5 d de reacción. Sin embargo, puede haber una transformación a un isómero al final del proceso.

La ureólisis en presencia de antibióticos (50 mg/L de SMX y 10 mg/L de TMP) en el reactor LFI con un  $t_r$  de un día fue del 81 % de remoción de urea, con una pérdida de biomasa del 17 %, lo que sugiere un efecto negativo del antibiótico en la cantidad de biomasa inmovilizada, pero sin afectar de manera importante el proceso de ureólisis.

El tratamiento de orina separada desde el origen en un reactor LFI es una alternativa para la obtención de estruvita y obtención de un efluente que pudiera reutilizarse como fuente de nutrientes en otros procesos. Sin embargo, la presencia de antibióticos es un factor que se debe de considerar para la inocuidad tanto del efluente como de la estruvita.

## **9 RECOMENDACIONES**

Con base en los resultados obtenidos y las conclusiones anteriores se hacen las siguientes recomendaciones.

El análisis simultáneo de SMX y TMP en orina hidrolizada requiere de una técnica más robusta, debido a que el método espectroscópico de adición de estándar de punto H no fue lo suficientemente robusto para eliminar las interferencias debidas a la naturaleza de la matriz. Adicionalmente, es necesario utilizar métodos analíticos que permitan elucidar los posibles compuestos de transformación tanto del SMX como de la TMP.

Es necesario realizar una técnica de detección de los antibióticos en el precipitado recuperado para saber si el antibiótico está o no presente.

Es conveniente que el reactor de LFI se monitoree por más tiempo con pulsos de antibióticos, para conocer si a través del tiempo este puede tener un efecto negativo en la eficiencia de ureólisis.

## 10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexy, R., Kümpel T., y Kümmerer K. (2004). Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test. *Chemosphere* 57 (6), 505–12.
- Alvarado-Lassman, A., Sandoval-Ramos A., Flores-Altamirano M.G., Vallejo-Cantú N.A., y Méndez-Contreras J.M. (2010). Strategies for the startup of sethanogenic inverse fluidized-bed reactors using colonized particles.” *Water Environment Research*, 82 (5), 1–5.
- American Public Health Association. (2005). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. Vol. 5.
- Arnaiz, C., Buffiere P., Moletta R., Elmaleh S., y Lebrato J. (2003). Anaerobic digestion of dairy wastewater by inverse fluidization: the inverse fluidized bed and the inverse turbulent bed reactors. *Environmental Technology*, 24 (11), 1431–43.
- Arreola-Vargas, J., Alatríste-Mondragón F., Celis L., y Razo-Flores E. (2015). Sequential hydrolysis of oat straw and hydrogen production from hydrolysates: role of hydrolysates constituents. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, 10756–65.
- Azimi, N., Najafpour G., Hassani A., y Borghei S. (2017). Simultaneous sulfamethoxazole and trimethoprim removal and biofilm growth characteristics in attached growth bioreactor. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15 (2), 415–26.
- Baran, W., Adamek E., Ziemiańska J., y Sobczak A. (2011). Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Journal of Hazardous Materials*, 196, 1–15.
- Battistoni, P., Fava, G., Pavan, P., Musacco, A., y Cecchi, F. (1997). Phosphate removal in anaerobic liquors by struvite crystallization without addition of chemicals: preliminary results. *Water Research* 31(11), 2925–29.
- Battistoni, P., Pavan, P., Prisciandaro, M., y Cecchi F. (2000). Struvite crystallization: a feasible and reliable way to fix phosphorus in anaerobic supernatants. *Water Research*, 34(11), 3033–41.

- Bischel, H., Özel B., Strande L., McArdell C., Udert K., y Kohn T. (2015). Pathogens and pharmaceuticals in source-separated urine in Ethekeini, South Africa. *Water Research*, 85, 57–65.
- Biswas, A., Rao G., Kondaiah N., Anjaneyulu A., y Malik J. (2007). Simple multiresidue method for monitoring of trimethoprim and sulfonamide residues in buffalo meat by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (22), 8845–50.
- Booker, N. A., Priestley A. J., y Fraser I. H. (1999). Struvite formation in wastewater treatment plants: opportunities for nutrient recovery. *Environmental Technology*, 20 (7), 777–82.
- Bryers, J. D. (2000). Biofilms II. *Process analysis and applications*. Wiley Interscience.
- Carballa, M., Fink G., Omil F., Lema J. M., Ternes T. (2018). Determination of the solid – water distribution coefficient ( $K_d$ ) for pharmaceuticals , estrogens and musk fragrances in digested sludge. *Water Research*, 42, 287-295.
- Carvalho, I., y Santos L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: a review of lakes, China. *Environment International*, 94, 736–57.
- Castañeda, A. A., y Flores H. E. (2013). Tratamiento de aguas residuales domésticas Mediante plantas macrófitas típicas en los Altos de Jalisco, México. *Revista de Tecnología y Sociedad*, 3 (5), 1–18.
- Cetecioglu, Z., Ince B., Orhon D., e Ince O. (2015). Anaerobic sulfamethoxazole degradation is driven by homoacetogenesis coupled with hydrogenotrophic methanogenesis. *Water Research*, 90, 79–89.
- Chawaga, P. (13 de febrero de 2019). Only 25 out of 150 wastewater treatment plants in Oaxaca, Mexico are fully functional. <https://www.wateronline.com/>
- Chipako, T L, y Randall D G. (2020). Urine treatment technologies and the importance of pH. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8 (1), 1–11.

- Christiaens, M., De Vrieze J., Clinckemaiillie L., Ganigué R., y Rabaey K. (2019). Anaerobic ureolysis of source-separated urine for NH<sub>3</sub> recovery enables direct removal of divalent ions at the toilet. *Water Research*, 148, 97–105.
- De Anda Sánchez, J. (2017). Saneamiento descentralizado y reutilización sustentable de las aguas residuales municipales en México. *Sociedad y Ambiente*, (14), 119–43.
- De Boer, M. A., Hammerton M., y Slootweg J. C. (2018). Uptake of pharmaceuticals by sorbent-amended struvite fertilisers recovered from human urine and their bioaccumulation in tomato fruit. *Water Research*, 133, 19–26.
- Del Valle, L. (2017). Efecto de la relación Mg:P para recuperar nitrógeno en forma de estruvita a partir de orina humana tratada en un biorreactor LFI. (Tesis de licenciatura, Universidad del Mar).
- Dimpe, K. M., y Nomngongo P. N. (2016). Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 82, 199–207.
- DOF. 2022. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021, Que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- DOF. 2009. Norma Oficial Mexicana NOM-014-CONAGUA-2003, Requisitos para la recarga artificial de acuíferos con agua residual tratada. Comisión Nacional del Agua, México.
- Doll, T. E., y Frimmel F. H. (2003). Fate of pharmaceuticals - photodegradation by simulated solar UV-light. *Chemosphere*, 52 (10), 1757–69.
- Doyle, J. D., y Parsons S. A. (2002). Struvite formation, control and recovery. *Water Research*, 36, 3925–40.
- Drillia, P., Dokianakis S. N., Fountoulakis M. S., Kornaros M., Stamatelatou K., y Lyberatos G. (2005). On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process : the example of the antibiotic sulfamethoxazole. *Journal of Hazardous Materials*, 122, 259–65.

- Elshaer, A., Hanson P., Worthington T., Lambert P., y Mohammed A. R. (2012). Preparation and characterization of amino acids-based trimethoprim salts. *Pharmaceutics*, 4 (1), 179–96.
- Errayes, S., Lahcen A., Idrissi L., Marcoaldi C., Chiavarini S., y Amine A. (2017). A sensitive method for the determination of sulfonamides in seawater samples by solid phase extraction and UV–Visible Spectrophotometry. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 181 (1), 276–85.
- Espinosa-Chávez, B., Ramírez-Vives F., Zeeman G., y Monroy-Hermosillo O. (2022). Start-up and performance of a down flow fluidised bed reactor for biological treatment of yellow wastewater and nutrient recovery. *Water Science and Technology*, 85 (11), 3208–24.
- Etter, B, Udert K. M., y Gounden T. (2014). VUNA – scaling up nutrient recovery from urine. *In Technology for Development International Conference*, 1–7.
- Fent, K., Weston A. A., y Caminada D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76 (2), 122–59.
- Ferris, F. G., Phoenix V., Fujita Y., y Smith R. W. (2003). Kinetics of calcite precipitation induced by ureolytic bacteria at 10 to 20°C in artificial groundwater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68 (8), 1701–10.
- Flemming, H.-C., Griebe T., y Schaule G. (1996). Antifouling strategies in technical systems -a short review. *Water Science and Technology*, 34 (5–6), 517–24.
- García-Calderon, D., Buffiere P., Moletta R., y Elmaleh S. (1997). Influence of biomass accumulation on bed expansion characteristics of a down-flow anaerobic fluidized-bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 57 (2), 136–44.
- García-Gómez, C., Gortáres-Moroyoqui P., y Drogui P. (2011). Contaminantes emergentes : efectos y tratamientos de remoción. *Revista Química Viva*, 10 (2), 96–105.
- Guerrero Vara, A. I. (2018). Determinación de la cinética de degradación fotoquímica de sulfametoxazol. (Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México). Toluca, Estado de México.



- Givianrad, M. H., Saber-Tehrani M., Aberoomand-Azar P., y Mohagheghian M. (2011). H-point standard additions method for simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical formulations and biological fluids with simultaneous addition of two analytes. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78 (3), 1196–1200
- González G., Ramírez F., y Monroy O. (1992). Development of biofilms in anaerobic reactors. *Biotechnology Letters*, 14 (2), 149–54.
- Guo, X., Chen C., y Wang J. (2019). Sorption of sulfamethoxazole onto six types of microplastics. *Chemosphere*, 228,300-308.
- He, G. X., He L. H., Zhao Z. W., Chen X. Y., Gao L. L., y Liu X. H. (2013). Thermodynamic study on phosphorus removal from tungstate solution via magnesium salt precipitation method. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 23 (11), 3440–47.
- Hirsch, R., Ternes T., Haberer K., y Kratz K. L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environmet*, 225, 109–18.
- Houbron, E., Sandoval M. E., y Hernández A. F. (2016). Tratamiento de vinazas en un reactor de lecho fluidizado inverso anaerobio. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 32 (3), 255–66.
- Jaatinen, S. T., Palmroth M. R. T, Rintala J. A., y Tuhkanen T. A. (2016). The effect of urine storage on antiviral and antibiotic compounds in the liquid phase of source-separated urine. *Environmental Technology*. 37 (17), 2189–98.
- Jagtap, N., y Boyer T. H. (2018). Integrated, multi-process approach to total nutrient recovery from stored urine. *Environmental Science: Water Research and Technology*, 4, 1639–50.
- Jia, Y., Khanal S. K., Zhang H., Chen G., y Lu H. (2017). Sulfamethoxazole degradation in anaerobic sulfate-reducing bacteria sludge system. *Water Research*, 119, 12–20.
- Jiménez, C. (2011). Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmaceuticos. *Revista Lasallista de Investigación*, 8 (2), 143–53.

- Johansson, C. H., Janmar L., y Backhaus T. (2014). Toxicity of ciprofloxacin and sulfamethoxazole to marine periphytic algae and bacteria. *Aquatic Toxicology*, 156, 248–58.
- Kassotaki, E., Buttiglieri G., Ferrando-Climent L., Rodriguez-Roda I., y Pijuan M. (2016). Enhanced sulfamethoxazole degradation through ammonia oxidizing bacteria co-metabolism and fate of transformation products. *Water Research*, 94, 111–19.
- Kirchmann, H., y Pettersson S. (1995). Human urine - chemical composition and fertilizer use efficiency. *Fertilizer Research*, 40 (2), 149–54.
- Krajewska, B. (2009a). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59, 9–21.
- Krajewska, B. (2009b). Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: a review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59 (1–3), 22–40.
- Krishnamoorthy, N., Dey B., Arunachalam T., y Paramasivan B. (2020). Effect of storage on physicochemical characteristics of urine for phosphate and ammonium recovery as struvite. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 153, 1–10.
- Krishnan, V, Stathis P., Permuth F., Tokes L., y Feldman D. (1993). Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132 (6), 2279–86.
- Kujawa-Roeleveld, K., y Zeeman G. (2006). Anaerobic treatment in decentralised and source-separation-based sanitation concepts. *Environmental Science and Bio/Technology*, 5, 115–39.
- Larsen, T. A., y Maurer M. (2011). Source separation and decentralization. *In Treatise on Water Science*, 4, 203–29.
- Larsen, T. A., y Gujer W. (1996). Separate management of anthropogenic nutrient solutions (human urine). *Water Science and Technology*, 34 (3–4), 87–94.
- Latifian, M., Liu J., y Mattiassona B. (2012). Struvite-based fertilizer and its physical and chemical properties. *Environmental Technology*, 33 (24), 2691–97.

- Lehtoranta, S., Malila R., Särkilahti M., y Viskari E.-L. (2022). To separate or not? A comparison of wastewater management systems for the new city district of Hiedanranta, Finland. *Environmental Research*, 208, 1–12.
- Leng, Y., Colston R., y Soares A. (2020). Understanding the biochemical characteristics of struvite bio-mineralising microorganisms and their future in nutrient recovery. *Chemosphere*, 247, 1-35.
- Lett, L. A. (2014). Las amenazas globales, el reciclaje de residuos y el concepto de economía circular. *Revista Argentina de Microbiología*, 46 (1), 1–2.
- Levine, J. M., Leon R., y Steigmann F. (1961). A rapid method for the determination of urea in blood and urine. *Clinical Chemistry*, 7 (5) 488–93.
- Liu, X., Lu S., Liu Y., Meng W., y Zheng B. (2017). Adsorption of sulfamethoxazole (SMZ) and ciprofloxacin (CIP) by humic acid (HA): characteristics and mechanism. *RSC Advances*, 7 (80), 50449–58.
- Liu, X., Hu Z., Zhu C., Wen G., Meng X., y Lu J. (2013). Influence of process parameters on phosphorus recovery by struvite formation from urine. *Water Science and Technology*, 68 (11), 2434–40.
- Machaca, M., Bodean M. L., Montaña S., d, García S. D., Stecher D., Vay C. A. y Almuzarac M. N. (2022). Descripción de un caso de sepsis abdominal por *Desulfovibrio desulfuricans*. *Revista Argentina de Microbiología*. 54,314-17
- Magi, E., Di Carro M., Mirasole C., y Benedetti B. (2018). Combining passive sampling and tandem mass spectrometry for the determination of pharmaceuticals and other emerging pollutants in drinking water. *Microchemical Journal*, 136, 56–60.
- Meraz, M., Monroy O., Noyola A., Ilangovan K. (1995). Studies on the dynamics of immobilization of anaerobic bacteria on a plastic support. *Water Science and Technology*, 32 (8), 243–50.
- Mitchell, A. C., y Ferris F. G. (2005). The coprecipitation of sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater: temperature and kinetic dependence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69 (17), 4199–4210.
- Mobley, T. H., y Hausinger R. P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Acan Society for Microbiology*, 53 (1). 85–108.

- Momberg, G A., y Oellermann R. A. (1992). The removal of phosphate by hidroxiapatite and struvite crystallisation in South Africa. *Water Science and Technology*, 26 (5), 987–96.
- Müller, E., Schüssler W., Horn H., y Lemmer H. (2013). Aerobic biodegradation of the sulfonamide antibiotic sulfamethoxazole by activated sludge applied as co-substrate and sole carbon and nitrogen source. *Chemosphere*, 92 (8), 969–78.
- Nazar, J. (2007). Biopelículas bacterianas. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 67, 61–72.
- Okwadha, G., y Li J. (2010). Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere*, 81 (9), 1143–48.
- Olsen, G., Chang S. C., Noker P., Gorman G., Ehresman D., Lieder P., y Butenhoff J. (2009). A comparison of the pharmacokinetics of perfluorobutanesulfonate (pfbs) in rats, monkeys, and humans. *Toxicology*, 256 (1–2), 65–74.
- Ouyang, W.-Y., Birkigt J., Richnow H., y Adrian L. (2021). Anaerobic transformation and detoxification of sulfamethoxazole by sulfate-reducing enrichments and *Desulfovibrio vulgaris*. *Environmental Science and Technology*, 55, 271–82.
- Patiño, Y., Díaz E., y Ordóñez S. (2014). Performance of different carbonaceous materials for emerging pollutants adsorption. *Chemosphere*, 119, 124–30.
- Pérez-López, E. (2014). Idoneidad del método de análisis de magnesio en agua potable por absorción atómica con curva de calibración cuadrática. *Revista Tecnología En Marcha*, 27 (4), 22–29.
- Petrović, M., Gonzalez S., y Barceló D. (2003). "Analysis and Removal of Emerging Contaminants in Wastewater and Drinking Water." ("Trends Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water") *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (10), 685–96.
- Pierce, H. O. (1991). La función de Gompertz-Makeham en la descripción y proyección de fenómenos demográficos. (Tesis de maestría, Colegio de México).
- Predari, S. C., De Paulis, A. N., Bertona, E., Guevara Nuñez D., Suárez, J. P. y Castello L. (2017). *Anaerobiospirillum succiniciproducens* y *Desulfovibrio desulfuricans* en

- dos casos de bacteriemias insidiosas, informe breve. *Revista Argentina de Microbiología*, 49 (2), 146-152.
- Randall, D. G., y Naidoo V. (2018). Urine: the liquid gold of wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6 (2), 2627–35.
- Ray, H., Saetta D., y Boyer T.H. (2017). Characterization of urea hydrolysis in fresh human urine and inhibition by chemical addition. *Environmental Science: Water Research and Technology*, 4 (1), 87–98.
- Rivera-Jaimes, J. A., Postigo C., Melgoza-Alemán R. M., Aceña J., Barceló D, y López de Alda M. (2018). Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: occurrence and environmental risk assessment. *Science of The Total Environment*, 613–614, 1263–74.
- Rodríguez-Jiménez, T., Ojeda-Barrios D. L., Blanco-Macías F., Valdez-Cepeda R. D., y Parra-Quezada R. (2016). Ureasa y níquel en la fisiología de las plantas. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 22 (2), 69–81.
- Rojas-Z, U., Fajardo-O, C., Moreno-Andrade I., y Monroy O. (2017). Greywater treatment in an aerobic sbr: sludge structure and kinetics. *Water Science and Technology*, 76 (6), 1535–44.
- Ronteltap, M., Maurer M., y Gujer W. (2007a). Struvite precipitation thermodynamics in source-separated urine." *Water Research*, 41 (5), 977–84.
- Ronteltap, M., Maurer M., y Gujer W. (2007b). The behaviour of pharmaceuticals and heavy metals during struvite precipitation in urine. *Water Research*, 41, 1859–68.
- Rose, C., Parker A., Jefferson B., y Cartmell E. (2015). The characterization of feces and urine: a review of the literature to inform advanced treatment technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45 (17), 1827–79.
- Safavi, A., y Abdollahi H. (2001). Application of the H-point standard addition method to the speciation of Fe(ii) and Fe(iii) with chromogenic mixed reagents. *Talanta*, 54 (4), 727–34.
- Santiago-Díaz, Á. L., García-Albortante J., y Salazar-Peláez M. L. (2018). UASB-Septic tank as an alternative for decentralized wastewater treatment in Mexico. *Environmental Technology*, 40 (14), 1–12.

- Shams, E., Abdollahi H., Yekehtaz M., y Hajian R. (2004). H-point standard addition method in the analysis by differential pulse anodic stripping voltammetry simultaneous determination of lead and tin. *Talanta*, 63 (2), 359–64.
- Sheng, G. P., Yu H. Q., y Li X. Y. (2010). Extracellular Polymeric Substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnology Advances*, 28 (6), 882–94.
- Shu, L., Schneider P., Jegatheesan V., y Johnson J. (2006). An economic evaluation of phosphorus recovery as struvite from digester supernatant. *Bioresource Technology*, 97 (17), 2211–16.
- Siddique, R., y Chahal N. K. (2011). Effect of ureolytic bacteria on concrete properties. *Construction and Building Materials*, 25 (10), 3791–3801.
- Siemens, J, Huschek G., Siebe C., y Kaupenjohann M. (2008). Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world 's largest wastewater irrigation system , Mexico City – Mezquital Valley. *Water Research*, 42, 2124–34.
- Skoog, D., West D., Holler F., y Stanley C. (2005). *Fundamentos de química analítica*, 8a. edición. Thomson Learning.
- Soares, A., Veeram M., Simoes F., Wood E., Parsons S. A., y Stephenson T. (2014). Biostruvite : a new route to recover phosphorus from wastewater. *Clean.-Soil Air Water*, 42 (7), 994–97.
- Sowmeyan, R., y Swaminathan G. (2008). Performance of inverse anaerobic fluidized bed reactor for treating high strength organic wastewater during start-up phase. *Bioresource Technology*, 99 (14), 6280–84.
- Stratful, I., Scrimshaw M. D., y Lester J. N. (2001). Conditions influencing the precipitation of magnesium ammonium phosphate. *Water Research*, 35 (17), 4191–99.
- Stuart, M., Lapworth D., Crane E., y Hart A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 416, 1–21.
- Stuart, C. A., Van Stratum, E., y Rustigian, R. (1945). Further studies on urease production by proteus and related organisms. *Journal of Bacteriology*, 49(5), 437–444.

- Tang, W. T., Dai J., Liu R., y Chen G. H. (2015). Microbial ureolysis in the seawater-catalysed urine phosphorus recovery system: kinetic study and reactor verification. *Water Research*, 87, 10–19
- Tao, W., Bayrakdar A., Wang Y., y Agyeman F. (2019). Three-stage treatment for nitrogen and phosphorus recovery from human urine: hydrolysis, precipitation and vacuum stripping. *Journal of Environmental Management*, 249, 1–9.
- Taylor, A. W., Frazier A. W., y Gurney E. L. (1963). Solubility products of magnesium ammonium and magnesium potassium phosphates. *Transactions of the Faraday Society*, 59, 1580–84.
- Tilley, E., Atwater J., y Mavinic D. (2008). Recovery of struvite from stored human urine. *Environmental Technology*, 29 (7), 797–806.
- Tobler, D. J., Cuthbert M. O., Greswell R. B., Riley M. S., Renshaw J. C., Handley-Sidhu S., y Phoenix V. R. (2011). Comparison of rates of ureolysis between *Sporosarcina pasteurii* and an indigenous groundwater community under conditions required to precipitate large volumes of calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75 (11), 3290–3301.
- Toral, M, Lara N., Tapia E., Torres C., y Richter P. (2002). Estudio espectral y determinación simultánea de sulfametoxazol y trimetoprim por espectrofotometría derivada digital. *Boletín de La Sociedad Chilena de Química*, 47, 241–51.
- Trinidad, A. (2014). Modelos de crecimiento en biología, su significado biológico y selección del modelo por su ajuste. (Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa). Iztapalapa, CDMX.
- Udert, K. M., Larsen T. A., y Gujer W. (2003). Estimating the precipitation potential in urine-collecting systems. *Water Research*, 37 (11), 2667–77.
- Udert K. M., Larsen T. A., Biebow M., y Gujer W. (2003). Urea hydrolysis and precipitation dynamics in a urine-collecting system. *Water Research*, 37, 2571-82.
- US FDA. (2012). BACTRIM™ sulfamethoxazole and trimethoprim DS (Double Strength) Tablets and Tablets USP. Food and Drug Administration, Washington, DC.

- Wang, L., Li Y., Wang L., Zhu M., Zhu X., Qian Ch., y Li W. (2018). Responses of biofilm microorganisms from moving bed biofilm reactor to antibiotics exposure: protective role of extracellular polymeric substances. *Bioresource Technology*, 254, 268–77.
- Wei, C-H., Sanchez-Huerta C., Leiknes T., Amy G., Zhou H., Hu X., Fang Q., y Rong H. (2019). Removal and biotransformation pathway of antibiotic sulfamethoxazole from municipal wastewater treatment by anaerobic membrane bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 380, 1–8.
- Witte, W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science's Commpass*, 279, 996-997.
- Won, S. Y., Lee C. H., Chang H. S., Kim S. O., Lee S. H., y Kim D. S. (2011). Monitoring of 14 sulfonamide antibiotic residues in marine products using HPLC-PDA and LC-MS/MS. *Food Control*, 22 (7), 1101–7.
- Wunder, D. B., Bosscher V. A., Cok R. C., y Hozalski R. M. (2011). Sorption of antibiotics to biofilm. *Water Research*, 45, 2270–80.
- Xu, B., Mao D., Luo Y, y Xu L. (2011). Sulfamethoxazole biodegradation and biotransformation in the water-sediment system of a natural river. *Bioresource Technology*, 102 (14), 7069–76.
- Yang, X., Flowers R. C., Weinberg H. S., y Singer P. C. (2011). Occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in an advanced wastewater reclamation plant. *Water Research*, 45, 5218–28.



## 11. ANEXO

### a. Anexo 1: Validación del método adición de estándares de punto H para la cuantificación de sulfametoxazol y trimetoprima.

Para conocer el par de longitudes de onda en la determinación simultánea de SMX y TMP, se llevó a cabo la metodología propuesta por (Givianrad *et al.*, 2011).

La validación del método se realizó en dos etapas. En la primera, se corroboraron los espectros de los antibióticos tanto por separado como juntos. En la segunda, se hicieron curvas de calibración para ambos antibióticos, con 5 repeticiones por concentración, usando diferentes pares de longitud de onda. A continuación, se explican ambas etapas y se dan los resultados obtenidos.

Antes de comenzar cada una de las pruebas todo el material a utilizar se dejó en una solución de HCl al 10 % por un par de horas para retirar material que pudiera interferir en el análisis, una vez transcurrido este tiempo se enjuagó profusamente con agua ultrapura y se secó.

Los espectros de los antibióticos se midieron en un espectrofotómetro de UV/vis (Lambda 365, Perkin Elmer). Se prepararon disoluciones patrón de SMX en NaOH 0.001 mol/L y de TMP en agua ultrapura a una concentración de 250 mg/L usando antibióticos grado analítico. Se prepararon disoluciones con una concentración final de 10 mg/L de TMP o 10 mg/L de SMX, cada una por separado y como mezcla de acuerdo con la siguiente metodología:

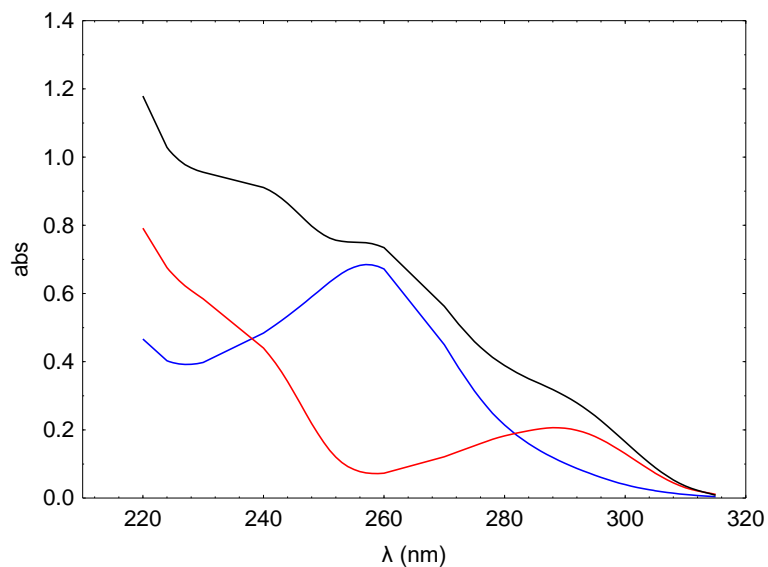
- En matraces de 25 mL se colocaron alícuotas de los estándares analíticos para tener concentraciones de 10 mg/L de cada antibiótico por separado y como mezcla
- Se agregó 2 mL de buffer Britton-Robinson (pH mayor a 10)
- Los matraces se aforaron con agua ultrapura, y se tomaron lecturas de absorbancia en un rango de 320 a 210 nm.

En la segunda etapa se procedió a preparar las siguientes mezclas de antibióticos en ARA: 5-25, 10-50 y 15-75 mg/L TMP-SMX a partir de una disolución patrón (200 mg/L de TMP, 1000 mg/L de SMX) preparada con la tableta comercial Soltrim®, en metanol grado HPLC-agua ultrapura (1:1). Los estándares para hacer la adición fueron preparados por separado con los antibióticos grado analítico. La disolución patrón de SMX (250 mg/L) se preparó en NaOH 0.001 mol/L y la de TMP (250 mg/L) se diluyó en agua ultrapura. Cada

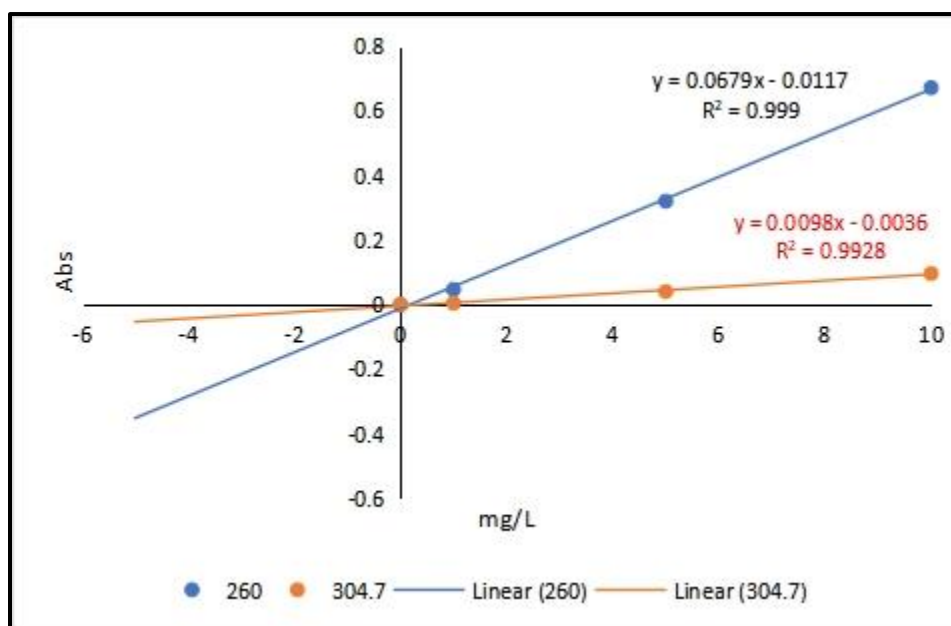
una de las mezclas de ARA con antibióticos incluyendo un blanco (sin antibiótico), fueron analizadas por el método de adición de estándares de punto H por quintuplicado, siguiendo la metodología mencionada en el apartado 6.7.5. Los espectros de absorbancia fueron medidos de 320 a 210 nm. La línea base se hizo con ARA sin antibiótico siguiendo la misma metodología.

Los espectros obtenidos (Fig. 19) son similares a los reportados por Givianrad (2011). Las lecturas de absorbancias máxima de los compuestos se encuentran alrededor de 260 nm para SMX y 290 nm para TMP en los espectros de los antibióticos por separado, y en la mezcla también se observa la adición de los dos espectros. Es importante mencionar que las absorbancias más altas de cada compuesto se usan para encontrar los pares de longitudes de onda que servirán para encontrar el punto H (punto de intersección de dos señales lineales). Para encontrar estos pares de longitudes se deben tomar en cuenta varios aspectos: la señal del estándar añadido debe ser lineal mientras que la del interferente también debe cumplir con linealidad (Safavi y Abdollahi 2001) además las pendientes que forman estas señales lineales a diferentes longitudes de onda deben ser lo más alejadas posibles entre sí para tener una mejor sensibilidad (Shams *et al.*, 2004).

Una vez que se realizaron los espectros, se graficó absorbancia contra longitud de onda de acuerdo con lo reportado por Givianrad *et al.* 2011, como se muestra en la Fig. 20.



**Figura 19.** Espectro de absorbancia de SMX a 10 mg/L (-), de TMP a 10 mg/L (-) y la mezcla de ambos antibióticos (-).



**Figura 20.** Ejemplo de punto H para 0.0 mg/L de SMX en el par de longitudes de onda 260-304.7 nm.

**Cuadro 6.** Validación del método para SMX en orina hidrolizada humana (n=5).

mg/L	Blanco		25		50		75	
$\lambda$ (nm) (pares)	Determinado mg/L	Determinado mg/L	Recuperado (%)	Determinado mg/L	Recuperado (%)	Determinado mg/L	Recuperado (%)	
<b>258-304.7</b>	3.76 $\pm$ 0.7	15.40 $\pm$ 1.2	61.6	60.07 $\pm$ 2.0	120.2	82.85 $\pm$ 1.4	110.5	
<b>260-304.7</b>	3.67 $\pm$ 0.7	15.57 $\pm$ 1.2	62.3	60.47 $\pm$ 1.8	120.9	83.55 $\pm$ 1.4	111.4	

**Cuadro 7.** Validación del método para TMP en orina hidrolizada humana (n=5).

mg/L	Blanco		5		10		15	
$\lambda$ (nm) (pares)	Determinado mg/L	Determinado mg/L	Recuperado (%)	Determinado mg/L	Recuperado (%)	Determinado mg/L	Recuperado (%)	
<b>287-297</b>	4.78 $\pm$ 2.0	5.19 $\pm$ 1.7	103.9	16.00 $\pm$ 1.7	160.0	33.98 $\pm$ 2.3	226.5	
<b>287-310</b>	3.74 $\pm$ 1.9	5.51 $\pm$ 0.9	110.1	18.71 $\pm$ 1.6	187.1	34.02 $\pm$ 2.0	226.8	

Después de revisar diferentes pares de longitudes de onda para cada compuesto, en los cuadros 6 y 7 se presentan los dos pares de longitud de onda que dieron el punto H con los valores más cercanos a las concentraciones agregadas y por lo tanto con un mejor porcentaje de recuperación. Se seleccionó de entre ellas los pares a utilizar para este trabajo (260-304.7 nm para SMX y 287-310 nm para TMP). El límite de detección para SMX fue de 2.0 mg/L y para TMP = 5.8 mg/L.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para SMX fueron aceptables para las tres concentraciones (Cuadro 6). Sin embargo, los porcentajes de recuperación para TMP rebasaron valores aceptables en las concentraciones 10 y 15 mg/L (Cuadro 7), por esta razón se consideró que este método no es lo suficientemente robusto para determinar TMP en presencia de SMX en ARA.

**b. Anexo 2. Análisis de Mg<sup>2+</sup> por espectroscopia de absorción atómica (EAA)**

Fundamento:

La espectroscopia de absorción atómica (EAA) se utiliza para cuantificar elementos metálicos, consiste en medir especies atómicas por medio de la absorción de energía a determinada longitud de onda específica para cada elemento. La disolución es aspirada y atomizada en forma de bruma pasa por el quemador, el cual está a alta temperatura, los átomos elevan su nivel de energía. Al regresar a su estado basal, se emite la energía absorbida, esta es cuantificada en un detector. La cantidad de energía absorbida es proporcional a la concentración del analito. (Pickering, 1980 como se citó en Pérez-López 2014).

La mayoría de las técnicas espectroscópicas se usan para la determinación de moléculas y/o iones, mientras que la EAA se usa para el análisis de átomos, además de ser una técnica confiable y en condiciones habituales el error relativo de la técnica es del 1-2 % (Skoog *et al.*, 2005) por lo que es una técnica confiable para la determinación elemental de metales como Mg y Ca.

Es importante mencionar que, para realizar la curva de calibración y el análisis de las muestras, se debe poner el material en HNO<sub>3</sub> al 10 % (2 h), enjuagar con agua destilada y posteriormente con agua ultrapura (estos residuos se almacenan, neutralizan y se desechan). El material debe estar completamente seco antes de usar.

**i. Curva de calibración para la determinación de Mg<sup>2+</sup>**

Se prepararon los estándares para la curva de Mg<sup>2+</sup> (0, 2, 5, 10, 20 y 40 mg Mg<sup>2+</sup>/L) a partir de una solución patrón comercial (1000 mg/L), se añadió 1 mL de HCl a cada estándar y se aforó a 25 mL con agua ultrapura

**ii. Preparación y análisis de la muestra**

La estruvita fue previamente secada de manera natural, macerada en mortero y se pasó por un tamiz para homogenizar el tamaño de partícula, se pesaron 10 mg de la muestra, se colocó en un matraz aforado (25 mL), se adicionó 1mL de HCl concentrado, se agitó para disolver y se aforó con agua ultrapura. Finalmente, la muestra líquida se filtró con filtros GF/A (1.6 µm).

Para el análisis de las muestras y estándares (curva), se tomó 1 mL de la muestra filtrada y se colocó en un matraz aforado (25 mL), se adicionó 15 mL de lantano al 1 % ( $\text{La}_2\text{O}_3$ -HCl-agua ultrapura) (elimina las interferencias que la muestra pueda tener) y se aforó con agua ultrapura. Las muestras se leyeron en un espectrómetro de absorción atómica Thermo Elemental, el programa utilizado en el equipo fue solar AA system<sup>®</sup>, para la determinación se ocupó acetileno-aire, las lecturas fueron tomada a una longitud de onda de 285.2 nm con una corriente de lámpara de 75 %, el método utilizado fue por regresión lineal de mínimos cuadrados y se graficó absorbancia contra la concentración de magnesio (Fig. 21).

Es importante mencionar que la curva de calibración se realizó cada vez que se analizaron las muestras

c. Anexo 3: curvas de calibración

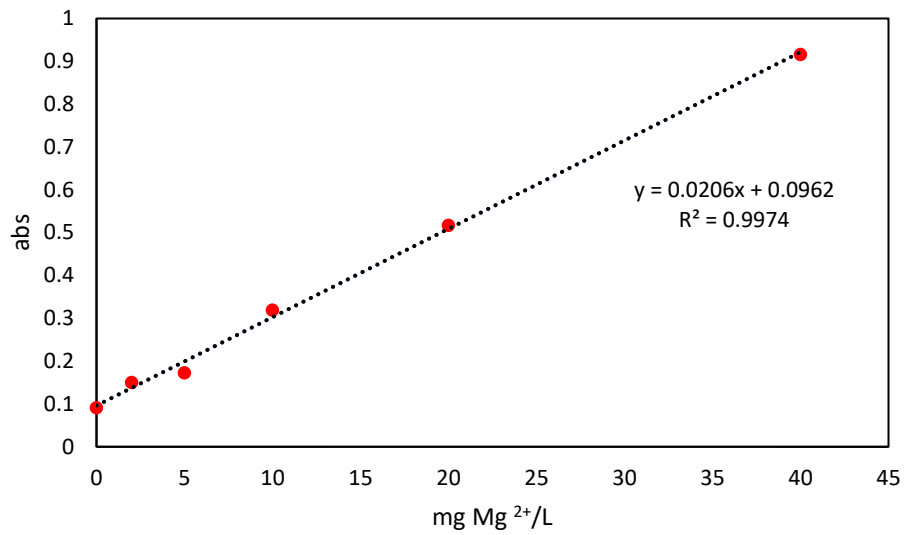


Figura 21. Curva de calibración para la determinación de Mg<sup>2+</sup>.

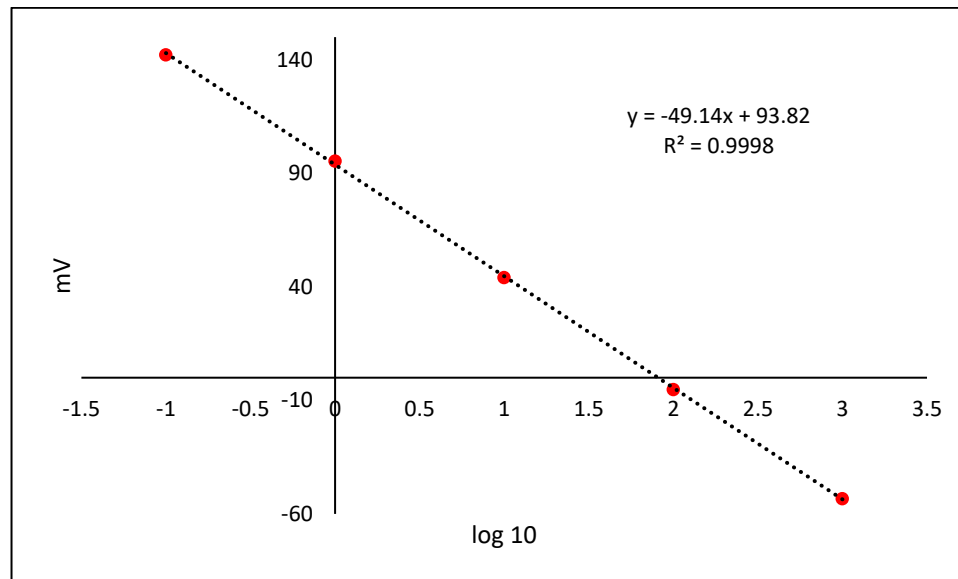
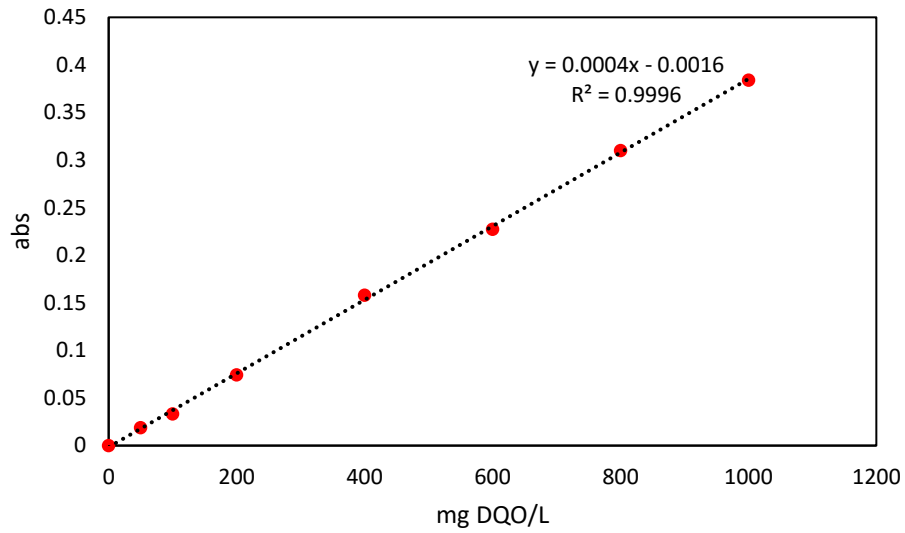
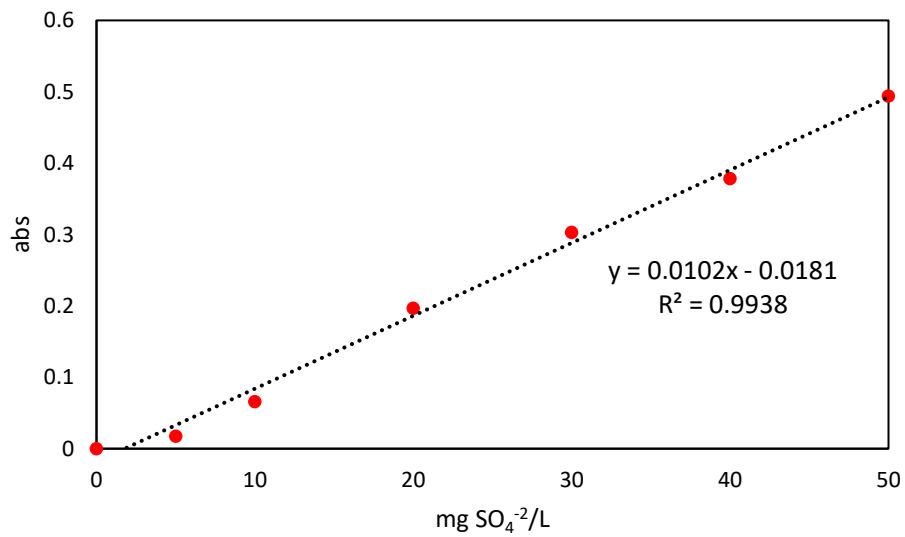


Figura 22. Curva de calibración N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

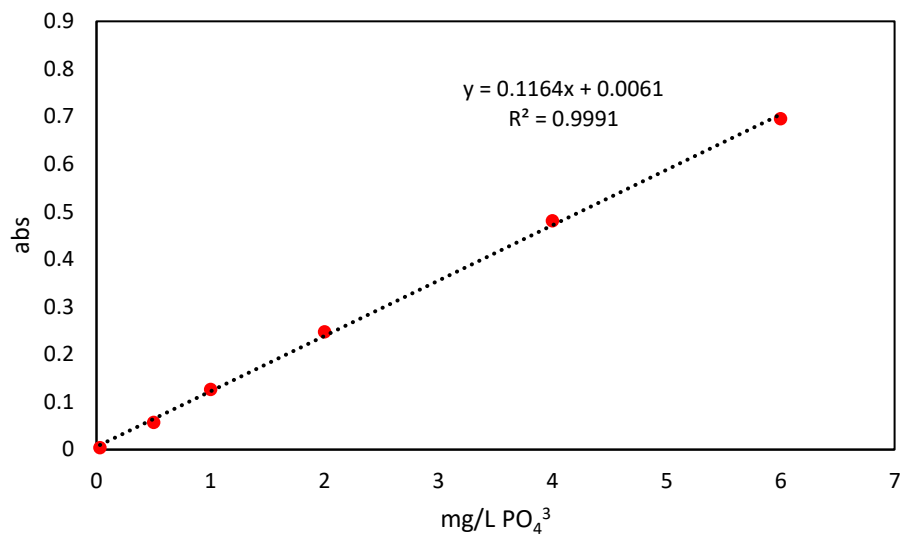




**Figura 23.** Curva de calibración DQO.



**Figura 24.** Curva de calibración  $\text{SO}_4^{2-}$ .



**Figura 25.** Curva de calibración PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.