



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

TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL PORCINA CON PRESENCIA DEL
ANTIBIÓTICO TILOSINA EN UN SISTEMA ANAEROBIO

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

PRESENTA:
M. en I. LILIANA GARCÍA SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS (TUTOR PRINCIPAL)
DR. MARCO ANTONIO GARZÓN ZÚÑIGA, FACULTAD DE INGENIERÍA-
CAMPUS MORELOS

COMITÉ TUTOR
DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES, INSTITUTO DE INGENIERÍA
DRA. GABRIELA ELEONORA MOELLER CHÁVEZ, FACULTAD DE INGENIERÍA-
CAMPUS MORELOS
DR. GERARDO BUELNA, CRIQ
DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ, FACULTAD DE INGENIERÍA

MÉXICO, D. F. JUNIO 2015

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Adalberto Noyola Robles
Secretario:	Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez
Vocal:	Dr. Gerardo Ramón Buelna Acedo
Primer Suplente:	Dra. Georgina Fernández Villagómez
Segundo Suplente:	Dr. Marco Antonio Garzón Zúñiga

Lugar donde se realizó la tesis:

FACULTAD DE INGENIERÍA, CAMPUS MORELOS

TUTOR

DR. MARCO ANTONIO GARZÓN ZÚÑIGA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Facultad de Ingeniería Campus Morelos por el apoyo brindado para la realización del trabajo de tesis.

Al Centre de Recherche Industrielle du Quebec (CRIQ) por el apoyo económico brindado para la realización de la presente tesis.

A la Universidad Politécnica del Estado de Morelos (UPEMOR) por las facilidades otorgadas para el uso del laboratorio de Cromatografía.

Al Dr. Marco Antonio Garzón Zúñiga, porque has sido un pilar fundamental a lo largo de mi vida profesional, en la licenciatura, maestría y ahora en el doctorado, siempre me has alentado a dar más de lo que a veces creo poder, has sido mi mentor y mi amigo. Gracias por los regaños, las quejas, las felicitaciones y sobre todo por la confianza y el apoyo. Gracias por llevarme de la mano estos años y por darme las herramientas tanto intelectuales como materiales para concluir esta etapa tan importante en mi vida.

Al Dr. Gerardo Buelna, por todo el apoyo incondicional que siempre tuve de su parte y por las enseñanzas y la orientación brindadas que me permitieron enriquecer mi trabajo de doctorado.

Al Dr. Adalberto Noyola, por el tiempo tan valioso que dedicó a cada una de las observaciones de este trabajo y las facilidades brindadas para capacitarme en algunas etapas de la experimentación.

A la Dra. Gabriela Moeller, por sus valiosas aportaciones para el desarrollo del trabajo.

A la Dra. Georgina Fernández, por sus enseñanzas para mejorar la redacción del presente trabajo de tesis.

A todos mis tutores GRACIAS por brindarme su tiempo, pero sobre todo por enseñarme su entrega, dedicación, compromiso y amor por la profesión, eso me ha enriquecido enormemente como persona y profesionista.

A Diego, Mariano, Ernesto, Juventino, Migue, Eduardo y Laura, muchas gracias por todo su apoyo durante la fase experimental de esta tesis.

DEDICATORIAS



Al tripie que me sostiene día a día: Pato, Leo y Ed

A Dios, nunca entenderé cuan bueno eres conmigo, gracias por darme tanto y por no dejarme caer cuando me siento derrotada.

A mi adorado ED por alentarme a seguir adelante, muy a tu manera, por siempre obligarme a dar todo de mí y por creer que puedo superar mis propias expectativas cuando siento que ya no es posible. Siempre has sido el hombre que admiro y me hace sentir muy feliz y orgullosa que vayamos de la mano profesional y sentimentalmente. Gracias por el hermoso hogar que me has dado, por mis maravillosos hijos y por amarme sin condiciones. Siempre serás mi hombre perfecto para compartir la vida, te amo y te necesito junto a mí a cada paso.

A mi hermoso LEITO por ser tan tierno, tan noble e inteligente. Siempre me cuidas y me das ánimos cuando me vez triste o decaída. Gracias mi cielo porque me das fuerza y aliento con un simple abrazo y un beso y porque me demuestras a cada momento que debo crecer como profesionista y como persona para darte un buen ejemplo a ti y a tu hermanito.

A mi pequeño PATRICIO GABRIEL, mi doctorado es tuyo vida mía, estuviste a mi lado estudiando desde que estabas en mi pancita y te toco vivir mis frustraciones y mis alegrías y me diste el aliento que necesitaba para ver las cosas desde un mejor ángulo. Has llenado mi vida de drama, felicidad, tantas cosas que jamás había vivido y que tú me trajiste en tu inocencia e inteligencia. Eres un angelito mi amor y sé que no hay mejor motivo para ser feliz que tenerte a ti a tu hermanito a mi lado. Te amo Cuchu.

A mi hermosa Mami, porque siempre estas a mi lado para no dejarme caer. Gracias a ti soy una mujer fuerte, porque me has enseñado la valentía y el coraje, porque me has dado el mejor ejemplo de ser madre y porque no solo has sido una madre, has sido un ángel con inmensas alas que siempre me ha protegido.

A mi suegra Caro y a mi cuñis Eliane, por ser mi familia y mi apoyo. No hay palabras que describan la admiración, el amor y agradecimiento que siento hacia ustedes. Gracias por compartir mis alegrías y mis tristezas y por estar siempre cuando las necesito.

A mi hermanito adorado Migue, por demostrarme lo valiente y buena que una persona puede ser. Por apoyarme y por estar siempre atento a mis necesidades. Te amo con todo mi corazón.

A mi Papá por siempre apoyarme en cada uno de mis pasos, por enseñarme a ser quien soy y por inculcarme los valores que me han hecho crecer como persona.

A mis tíos Álvaro, Irene, a mis primos Coco, Mary y Juan y a mi pequeña Valecito, por todo su amor.

A Paco por estar siempre pendiente de mi familia, gracias por todo el cariño que siempre nos ha demostrado.

A todos mis amigos que han estado a lo largo de este camino a mi lado siempre pendiente de mis triunfos y fracasos, les agradezco infinitamente su amistad y las palabras de aliento que siempre me han regalado: Mi adorado Serge (te extraño mi ojos azules), Yessy, Alma, Ly, Beto, Pepe, Nancy, Coco y Vale (va por las dos).

Por último y no menos importante a Tania, porque recorrimos juntas este camino que a veces sentíamos que no tenía fin, porque en este trayecto descubrimos una de las cosas más valiosas que el ser humano puede tener, un verdadero amigo que se vuelve hermano. Te quiero mucho mujercita, gracias por ser parte de mi vida.

A todos ustedes les dedico el resultado de tantos años de trabajo, porque cualquier esfuerzo es en vano si no hay alguien con quien compartirlo.

RESUMEN

Este trabajo estuvo enfocado en la evaluación de la concentración de tilosina en un digestor anaerobio con mezcla intermitente en la remoción de materia orgánica de un agua residual porcina a tres diferentes tiempos de residencia hidráulica (TRH).

Se caracterizó agua residual porcina de diferentes etapas de crecimiento de una granja (maternidad, destete y engorda) en varios estados de la República Mexicana. Las características físico-químicas de las aguas residuales porcinas presentaron altas concentraciones de materia orgánica (entre 3,302 y 37,833 mg L⁻¹ de DQO y entre 995 y 9,613 mg L⁻¹ de DBO₅), sólidos (entre 940 y 40,500 mg L⁻¹ de SST y entre 478 y 32,500 mg L⁻¹ de SSV) y nutrientes (entre 200 y 1,760 mg L⁻¹ de N-NH₄⁺ y entre 27 y 180 mg L⁻¹ de PT). El agua residual porcina que presentó las concentraciones más elevadas de contaminantes fue la proveniente de la etapa de engorda.

Se operó un digestor anaerobio a escala piloto (digestor anaerobio de sólidos y líquidos) de 0.481 m³ con tres diferentes tiempos de retención hidráulica (TRH) (30, 40 y 60 d) para tratar agua residual porcina real. Se encontró que el digestor operado con un TRH de 30 d fue capaz de remover 75±12% de DQO total, 62±13% de DQO soluble, 62±22% de ST y 65±19% de SV aplicando un carga orgánica volumétrica (COV) de 0.96±0.51 kg DQO m⁻³d⁻¹.

Se determinó mediante pruebas de actividad metanogénica específica (AME) el efecto de la tilosina en la producción de metano. Se encontró que a concentraciones de tilosina de 0.01 mg L⁻¹ la producción de metano es inhibida en un 49% en un lodo sin aclimatación al antibiótico.

Se evaluaron tres digestores anaerobios de 0.0045 m³ con diferentes TRH para obtener una biomasa aclimatada a la tilosina a concentraciones de 0.01 a 0.065 mg L⁻¹. Los resultados mostraron que con concentraciones de tilosina de 0.065 mg L⁻¹ la remoción de DQO es inhibida parcialmente comparada con concentraciones menores. Las remociones de DQO obtenidas fueron de 72±6, 75±4 y 71±6% para los reactores con TRH de 15, 20 y 25 d, respectivamente a una concentración de 0.065 mg L⁻¹ de tilosina. De acuerdo a un análisis estadístico se encontró que la concentración de tilosina sí tiene efecto sobre la remoción de materia orgánica presente en agua residual porcina.

Se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y un método de limpieza para determinar la presencia de tilosina en agua residual porcina en fase sólida y líquida. Las concentraciones de tilosina encontradas en muestras simples fueron de 0.056, 0.072 y 0.0086 mg L⁻¹ en la fase líquida para las etapas productivas de maternidad, destete y engorda, respectivamente, mientras que en la fase sólida las concentraciones de tilosina fueron de 0.0206 and 0.0178 mg L⁻¹ para las etapas productivas de maternidad y engorda, respectivamente En muestras compuestas, las

concentraciones de tilosina fueron de 0.0118 y 0.0024 mg L⁻¹ en la fase líquida y 0.0206 y 0.0178 mg L⁻¹ en la fase sólida, para las etapas de maternidad y engorda, respectivamente.

En la etapa experimental final del presente trabajo se evaluaron tres digestores anaerobios de 0.055 m³ (D1, D2 y D3) con diferentes concentraciones de tilosina (similares a las encontradas en agua residual porcina real). Se encontró que el funcionamiento de los digestores uno (TRH= 15 d), dos (TRH= 20 d) y tres (TRH= 25 d) operados con una COV de 1.18±0.14, 0.89±0.10 y 0.71±0.08 kg DQO m⁻³ d⁻¹, respectivamente fueron mejores a una concentración de tilosina de 0.08 mg L⁻¹. Durante esta etapa, la remoción de DQO fue de 68±8, 79±7 y 70±8%, y de ST 71±10, 69±9 y 66±11% para el D1, D2 y D3, respectivamente. La producción de biogás en esta etapa fue de 27±11, 31±17 y 28±13 L d⁻¹, mientras que el porcentaje de metano fue de 71±23, 70±20 y 75±23% para el D1, D2 y D3, respectivamente. Se encontró que el D2 presentó las mejores remociones.

Se evaluó una concentración de tilosina de 1.92 mg L⁻¹ encontrándose una disminución en la remoción de materia orgánica con remociones promedio de DQO total de 27±17 y de 14±24% para el D1 y D3, respectivamente. El análisis estadístico mostró que en esta etapa el TRH no tuvo influencia en la eficiencia de remoción de materia orgánica y que el digestor más afectado por el incremento de tilosina fue el D3.

De acuerdo a las cinéticas de remoción de tilosina en el D2, se encontró que el mecanismo primario de remoción del antibiótico en el digestor anaerobio de mezcla intermitente fue la adsorción en el lodo y posteriormente una biodegradación. La remoción de tilosina por biodegradación en el lodo fue del 82%. El digestor anaerobio operado con un TRH de 20 d, generó la mayor remoción tanto de materia orgánica como de tilosina.

ABSTRACT

This work was focused on the evaluation of the concentration of tylosin in an anaerobic digester with intermittent mixing in the removal of organic matter removal of swine wastewater to three different hydraulic residence times (HRT).

Swine wastewater of different growth stages of pig farm (breeding-gestation, nursery pigs and grow-finishing) in various states of Mexico was characterized. The physico-chemical characteristics of swine wastewaters show high concentrations of organic matter (between 3,302 and 37,833 mg L⁻¹ of COD and between 995 and 9,613 mg L⁻¹ of BOD), solids (between 940 and 40,500 mg L⁻¹ of TSS and between 478 and 32,500 mg L⁻¹ of VSS) and nutrients (between 200 and 1,760 mg L⁻¹ of N-NH⁺₄ and between 27 and 180 mg L⁻¹ of TP). The swine wastewater showed the highest concentrations of pollutants from grow-finishing.

A pilot scale anaerobic digester (anaerobic digester of solids and liquids) of 0.481 m³ with three different hydraulic retention times (HRT) (30, 40 and 60 d) was operated to treat swine wastewater. It was found that the digester operated with a HRT of 30 d was able to remove 75±12% of total COD, 62±13% of soluble COD, 62±22% of TS and 65±19% of VS applying a volumetric organic load (VOL) of 0.96±0.51 kg COD m⁻³d⁻¹.

Specific methanogenic activity (SMA) was determined in order to assess the effect of tylosin on methane production. It was found that at concentrations of 0.01 mg tylosin L⁻¹ methane production was inhibited by 49% in unacclimated sludge.

Three anaerobic digesters of 0.0045 m³ were evaluated with different HRT in order to obtain an acclimated biomass to tylosin at concentrations of 0.01 to 0.065 mg L⁻¹. The results showed that at concentrations of tylosin of 0.065 mg L⁻¹ COD the organic matter removal was partially inhibited compared with lower concentrations. COD removals were obtained 72±6, 75±4 and 71±6% for reactors with HRT of 15, 20 and 25 d, respectively, at a concentration of 0.065 mg L⁻¹ of tylosin. According to statistical analysis, the concentration of tylosin does have effect on the removal of organic matter present in swine wastewater.

An analytical method was developed for a high performance liquid chromatography (HPLC) and a cleaning method for the presence of tylosin in swine wastewater in a solid and liquid phase. Tylosin concentrations were found in single samples of 0.056, 0.072 and 0.0086 mg L⁻¹ in the liquid phase for the production stages, breeding-gestation, nursery pigs and grow-finishing, respectively. While in the solid phase, concentrations of tylosin were 0.0206 and 0.0178 mg L⁻¹ in liquid phase for breeding-gestation and grow-finishing, respectively. In composite samples, concentrations of tylosin were 0.0118 and 0.0024 mg L⁻¹ in the liquid phase and 0.0206 y 0.0178 mg L⁻¹ in the solid phase, for breeding-gestation and grow-finishing, respectively.

In the final experimental stage of this work, three anaerobic digester of 0.055 m³ (D1, D2 and D3) were evaluated with different concentrations of tylosin (similar to those found in real swine wastewater). It was found that the operation of the digesters one (HRT= 15 d), two (HRT= 20 d) and three (HRT= 25 d) operated with VOL of 1.18±0.14, 0.89±0.10 and 0.71±0.08 kg COD m⁻³ d⁻¹ respectively, were better at a concentration of tylosin of 0.08 mg L⁻¹. During this stage, the removal of COD was from 68±8, 79±7 and from 70±8%, of TS 71±10, 69±9 and 66±11% for D1, D2 y D3, respectively. The production of biogas in this stage was from 27±11, 31±17 and 28±13 L d⁻¹, meanwhile methane percent was 71±23, 70±20 and 75±23% for D1, D2 y D3, respectively. It was found that D2 presented the best removals.

At a 1.92 mg L⁻¹ concentration of tylosin, the system showed a decrease in the removal of organic matter with average removals of total COD of 27±17 and 14±24% for D1 and D3, respectively. The statistical analysis showed that in this stage, the HRT had no influence in the efficiency of organic matter removal and that the D3 digester was the most affected by the increase of tylosin was D3.

According to the kinetics of tylosin removal in D2, it was found that the primary mechanisms of antibiotic removal in the anaerobic digester of intermittent mixing was the adsorption in the sludge and later a degradation. The tylosin removal by degradation in the sludge was the 82%. The anaerobic digester operated with HRT of 20 d, achieved the highest removal of both organic matter and tylosin.

ÍNDICE

	Página
Resumen	VI
Abstract	VIII
Índice	X
Índice de tablas	XV
Índice de figuras	XVII
Lista de abreviaturas	XX
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Fármacos	3
2.1.1 Clasificación de fármacos	3
2.1.2 Fármacos en el medio ambiente	4
2.1.3 Fármacos veterinarios	4
2.1.3.1 Destino y rutas de exposición de fármacos veterinarios	4
2.1.3.2 Regulaciones de fármacos veterinarios	6
2.2 Antibióticos	6
2.2.1 Clasificación de los antibióticos	6
2.2.2 Modo y mecanismo de acción	6
2.2.3 Liberación de antibióticos en el ambiente	7
2.2.4 Resistencia bacteriana	8
2.2.5 Antibióticos en diferentes matrices	8
2.2.6 Antibióticos veterinarios	9
2.2.6.1 Antibióticos veterinarios en México	9
2.2.6.2 Toxicidad de antibióticos veterinarios	11
2.2.6.3 Remoción de antibióticos veterinarios	12
2.3 Antibióticos veterinarios en granjas porcinas	12
2.3.1 Resistencia bacteriana en granjas porcinas	13
2.3.2 Sistemas de tratamiento para la remoción de antibióticos presentes en agua residual porcina	14
2.4 Situación de la industria porcina en México	16
2.4.1 Regulación de descargas de aguas residuales porcinas en México	17
2.5 Tilosina	18
2.5.1 Características físico-químicas	19
2.5.2 Dosis administradas	20
	X

2.5.3	Contraindicaciones	20
2.5.4	Desdoblamiento (degradación) de la tilosina	21
2.5.5	Mecanismo de acción	22
2.5.6	Vida media	22
2.5.7	Resistencia bacteriana a la tilosina	23
2.5.8	Toxicidad	23
2.6	Digestión anaerobia	25
2.6.1	Metabolismo anaerobio	26
2.6.1.1	Factores que influyen la metanogénesis	26
2.6.2	Ventajas del uso de biodigestores en la producción porcina	27
3.	Hipótesis y objetivos	29
3.1	Hipótesis	29
3.2	Objetivo general	29
3.3	Objetivos específicos	29
3.4	Alcances	29
3.5	Justificación	30
4.	Metodología	32
4.1	Planteamiento metodológico	32
4.2	Caracterización físico-química de aguas residuales porcinas y selección de una para el desarrollo experimental	33
4.3	Arranque y operación de un digestor anaerobio a escala piloto	33
4.3.1	Análisis de varianza	36
4.4	Pruebas de actividad Metanogénica Específica (AME) con tilosina	36
4.4.1	Metodología general de la prueba de AME	37
4.4.2	Cálculos para la determinación de AME	39
4.4.3	AME en lodo anaerobio proveniente del digestor piloto con diferentes concentraciones de tilosina	40
4.5	Aclimatación de biomasa a la tilosina	41
4.5.1	Análisis de varianza	42
4.6	Implementación y validación de un método cromatográfico para la determinación de tilosina	42
4.6.1	Reactivos	43
4.6.2	Cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento (HPLC)	43
4.6.3	Estrategia para la detección del antibiótico	44
4.6.4	Validación del método cromatográfico para la detección de tilosina por medio de HPLC con muestras sintéticas	44
4.6.4.1	Límite de detección (LD)	44

4.6.4.2	Límite de cuantificación (LC)	45
4.6.4.3	Precisión del método	45
4.6.4.4	Exactitud del método	45
4.6.5	Validación del método cromatográfico para la detección de tilosina por medio de HPLC con muestras reales	45
4.6.5.1	Limpieza de la muestra en fase líquida	46
4.6.5.2	Limpieza de la muestra en fase sólida	47
4.6.5.3	Linealidad del método	47
4.6.5.3.1	Muestra sintética	48
4.6.5.3.2	Muestra real líquida enriquecida	48
4.6.5.3.3	Muestra sólida	48
4.7	Determinación de tilosina en agua residual porcina	48
4.8	Arranque y operación de tres digestores anaerobios con presencia de tilosina	49
4.8.1	Método para la detección de metano	52
4.8.1.1	Curva de calibración del metano	53
4.8.2	Determinación de concentración máxima de tilosina aplicada a los digestores anaerobios experimentales	53
4.8.3	Análisis de varianza	53
4.9	Cinéticas de remoción de materia orgánica y tilosina	54
5.	Resultados y Discusión	55
5.1	Selección de un agua residual porcina típica	55
5.2	Arranque y operación de un digestor anaerobio a escala piloto para la obtención de biomasa aclimatada al agua residual porcina	59
5.2.1	Comportamiento de los parámetros de campo	59
5.2.2	Comportamiento de la materia orgánica	62
5.2.3	Comportamiento de los sólidos	66
5.2.4	Comportamiento del N-NH ₄ ⁺	69
5.3	Pruebas de Actividad metanogénica específica (AME) con tilosina	71
5.3.1	Afectación del desempeño de biomasa expuesta a la tilosina	74
5.4	Aclimatación de biomasa a la tilosina	75
5.4.1	Comportamiento de los parámetros de campo	76
5.4.2	Comportamiento de la materia orgánica	78
5.4.3	Comportamiento de los sólidos	85
5.4.4	Pruebas de AME	87
5.4.5	Comportamiento del N-NH ₄ ⁺	91
5.5	Determinación de tilosina en agua residual porcina	92
5.6	Arranque y operación de tres digestores anaerobios con presencia de	93

tilosina	
5.6.1 Operación de digestores anaerobios con presencia de tilosina	93
5.6.1.1 Determinación de la concentración máxima de tilosina a aplicar en los digestores anaerobios experimentales	94
5.6.1.2 Comportamiento de los parámetros de campo	96
5.6.1.3 Comportamiento de la materia orgánica	97
5.6.1.4 Comportamiento de los sólidos	102
5.6.1.5 Producción de biogás y metano	105
5.6.1.6 Comportamiento de la tilosina	109
5.6.1.7 Comportamiento del N-NH ₄ ⁺	112
5.6.2 Cinéticas de remoción de materia orgánica y tilosina	114
5.6.2.1 Cinética de remoción	114
5.6.2.2 Modelos cinéticos	115
6. Conclusiones	121
7. Recomendaciones	123
8. Bibliografía	124
Anexo I. Implementación y validación de un método cromatográfico para la determinación de tilosina	134
I.1 Identificación de la tilosina mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento	134
I.2 Curva de calibración	138
I.3 Límite de detección	138
I.4 Límite de cuantificación	139
I.5 Precisión del método	139
I.6 Exactitud del método	140
I.7 Linealidad del método	140
I.7.1 Muestra sintética	140
I.7.2 Muestra real líquida enriquecida	140
I.7.3 Muestra real enriquecida (fase sólida y líquida)	141
1.8 Límite de confianza	142
Anexo II. Método para la detección de metano	143
II.1 Identificación de metano mediante cromatografía de gases	143
II.2 Curva de calibración del metano	145

Anexo III. Análisis estadístico	146
III.1 Arranque y operación de un digestor anaerobio a escala piloto	146
III.2 Aclimatación de biomasa a la tilosina	147
III.3 Digestores anaerobios con presencia de tilosina	148

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
2.1 Clasificación de los fármacos	3
2.2 Clasificación de los antibióticos	7
2.3 Antibióticos en diferentes matrices ambientales	10
2.4 Antibióticos utilizados en ganado porcino en Estados Unidos y México	13
2.5 Sistemas de tratamiento biológico para la remoción de antibióticos en residuos porcinos	15
2.6 Propiedades físico-químicas de la tilosina	19
2.7 Vida media de la tilosina	22
2.8 Toxicidad de la tilosina	24
4.1 Parámetros físico-químicos evaluados en la caracterización de aguas residuales porcinas	33
4.2 Tiempos de residencia utilizados en la operación del digestor anaerobio a escala piloto	35
4.3 Monitoreo del digestor a escala piloto	36
4.4 Solución nutritiva de macronutrientes y micronutrientes para la prueba de AME	37
4.5 Factor de conversión para cálculos de AME	40
4.6 Concentraciones de tilosina adicionadas en la prueba de AME con lodo anaerobio proveniente del digestor piloto	40
4.7 Cambios realizados durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina	42
4.8 Monitoreo del sistema (aclimatación de biomasa a la tilosina)	42
4.9 Tren de filtración para la limpieza de la fase líquida de agua residual porcina	46
4.10 Inóculo utilizado en los digestores con tilosina	49
4.11 Etapas experimentales evaluadas en la operación de los digestores anaerobios con presencia de tilosina	51
4.12 Monitoreo de los digestores anaerobios con presencia de tilosina	51
4.13 Concentraciones de tilosina adicionadas en la prueba de AME para los digestores anaerobios experimentales	53
4.14 Monitoreo de las cinéticas de degradación de materia orgánica y tilosina	54
5.1 Resultado de la caracterización de agua residual porcina en diferentes partes de la República Mexicana	57
5.2 Características de aguas residuales porcinas encontradas en otras investigaciones	58
5.3 Valores promedio de materia orgánica obtenidos en el digestor piloto	65
5.4 Valores promedio del comportamiento de los sólidos en el digestor piloto	68

5.5	Cantidades de reactivos e inóculo y características del lodo anaerobio proveniente del digestor testigo utilizado en la prueba de AME	71
5.6	Caracterización de la biomasa utilizada para inocular los reactores en la etapa de aclimatación a la tilosina	76
5.7	Valores promedio de materia orgánica obtenidos en los reactores anaerobios durante la etapa de aclimatación de la biomasa	83
5.8	Concentraciones de tilosina encontradas en agua residual porcina	92
5.9	Valores promedio de materia orgánica obtenidos en los digestores anaerobios con presencia de tilosina	100
5.10	Valores promedio de sólidos obtenidos en los digestores anaerobios con presencia de tilosina	104
5.11	Producción de metano en los digestores anaerobios con presencia de tilosina	108
5.12	Modelos cinéticos aplicados a los datos de consumo de sustrato medido en términos de DQO	119
I.1	Condiciones iniciales del cromatógrafo	134
I.2	Condiciones óptimas del HPLC	137
I.3	Concentración de blancos para cálculo de LD	138
I.4	Concentración de muestras sintéticas para cálculo de LC	139
I.5	Concentración de muestras para cálculo de CV	139
I.6	Cálculo del límite de confianza	142
II.1	Condiciones iniciales del cromatógrafo de gases	143
II.2	Condiciones óptimas del cromatógrafo de gases	144
III.1	Resumen de los resultados de ANOVA para el digestor anaerobio escala piloto	146
III.2	Resumen de los resultados de ANOVA para los reactores anaerobios en la etapa de aclimatación de biomasa a la tilosina	147
III.3	Resumen de los resultados de ANOVA para los digestores anaerobios con presencia de tilosina	148

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
2.1 Rutas de exposición anticipada de fármacos veterinarios en el medio ambiente	5
2.2 Estructura química de la tilosina	21
2.3 Diagrama esquemático de digestores anaerobios típicos	25
4.1 Diagrama de flujo del estudio sobre el efecto, transporte, distribución y degradación de la tilosina en digestores anaerobios	32
4.2 Diagrama esquemático y fotografía del digestor anaerobio experimental a escala piloto utilizado	34
4.3 Dimensiones del digestor experimental a escala piloto utilizado	35
4.4 Cámara de ambiente anaerobio utilizada en la experimentación	37
4.5 Fotografías de la prueba de AME	39
4.6 Reactores anaerobios utilizados en la etapa de aclimatación de biomasa a la tilosina	41
4.7 Cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento	43
4.8 Fotografías de los filtros utilizados después de filtrar la muestra de agua residual porcina	46
4.9 Fotografía y esquema de los digestores anaerobios utilizados	50
4.10 Fotografías de la toma de muestra del biogás	52
4.11 Cromatógrafo de gases SRI 8610	52
5.1 Parámetros de campo del digestor anaerobio a escala piloto: a) temperatura, b) pH, c) conductividad y d) alcalinidad	61
5.2 Comportamiento de la materia orgánica en el digestor anaerobio a escala piloto	64
5.3 Carga orgánica aplicada y su tasa de remoción en el digestor anaerobio a escala piloto	66
5.4 Remoción de sólidos en el digestor anaerobio a escala piloto	67
5.5 Carga de sólidos aplicada y su tasa de remoción en el digestor anaerobio a escala piloto	69
5.6 Comportamiento del nitrógeno amoniacal en el digestor anaerobio a escala piloto	70
5.7 Resultados de las pruebas de AME con lodo anaerobio proveniente de un digestor anaerobio con adición de tilosina	73
5.8 Resultados de la prueba de seguimiento de AME con biomasa sin adición de tilosina	74
5.9 Parámetros de campo de los reactores anaerobios durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina: pH y conductividad	78
5.10 Comportamiento de la materia orgánica en los reactores anaerobios	80

	durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina	
5.11	Carga orgánica aplicada y su tasa de remoción en los reactores anaerobios durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina	84
5.12	Comportamiento de los sólidos en los reactores anaerobios durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina	86
5.13	Carga de sólidos aplicada y su tasa de remoción en los reactores anaerobios durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina	87
5.14	AME de los reactores anaerobios durante los TRH de 30, 40 y 60 d: a) biomasa aclimatada a 0.01 mg L ⁻¹ de tilosina y b) biomasa aclimatada a 0.05 mg L ⁻¹ de tilosina	89
5.15	AME del reactor anaerobio R1 durante el TRH de 15 d: a) biomasa aclimatada a 0.05 mg L ⁻¹ de tilosina y b) biomasa aclimatada a 0.065 mg L ⁻¹ de tilosina	90
5.16	Valores promedios de nitrógeno amoniacal obtenidos en los reactores anaerobios durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina	91
5.17	Prueba de AME a diferentes concentraciones de tilosina en lodo proveniente de los digestores anaerobios experimentales	95
5.18	Comportamiento de parámetros de campo de los digestores anaerobios con presencia de tilosina	97
5.19	Comportamiento de la materia orgánica de los digestores anaerobios con presencia de tilosina	98
5.20	Carga orgánica aplicada y su tasa de remoción en los digestores anaerobios con presencia de tilosina	101
5.21	Remoción de ST y SV en los digestores anaerobios con presencia de tilosina	103
5.22	Carga de sólidos aplicada y su tasa de remoción en los digestores anaerobios con presencia de tilosina	105
5.23	Producción de biogás en los digestores anaerobios con presencia de tilosina	107
5.24	Comportamiento de la tilosina en los digestores experimentales: a) D1 (TRH= 15 d), b) D2 (TRH= 20 d) y c) D3 (TRH= 25 d)	110
5.25	Valores promedio de concentración de tilosina en los digestores anaerobios experimentales	112
5.26	Comportamiento del nitrógeno amoniacal de los digestores anaerobios con presencia de tilosina	113
5.27	Remoción de materia orgánica y tilosina en pruebas en batch	114
5.28	Linealización del modelo cinético de Primer Orden, Monod y Chen y Hashimoto por el método gráfico de Lineweaver-Burk para la remoción de materia orgánica con presencia de tilosina	117

5.29	Linealización del modelo cinético de Primer Orden, Monod y Chen y Hashimoto por el método gráfico de Lineweaver-Burk para la remoción de materia orgánica sin presencia de tilosina	118
I.1	Cromatograma de la tilosina con condiciones iniciales	134
I.2	Cromatograma de la tilosina a diferentes pH	135
I.3	Cromatograma de la tilosina a diferentes temperaturas	135
I.4	Cromatograma de la tilosina a diferentes longitudes de onda	136
I.5	Resultados del refractómetro a diferentes longitudes de onda	137
I.6	Curva de calibración de la tilosina obtenida con el HPLC	138
I.7	Porcentajes de recuperación obtenidos en muestras sintéticas para la determinación de tilosina	140
I.8	Porcentajes de recuperación obtenidos en muestras reales en fase líquida para la determinación de tilosina	141
I.9	Porcentajes de recuperación obtenidos en muestras reales en fase sólida y líquida para la determinación de tilosina	142
II.1	Cromatograma del biogás en condiciones iniciales de la columna	143
II.2	Cromatograma del biogás: a) con diferentes flujos de gas acarreador y b) con diferentes rampas de temperatura	144
II.3	Cromatogramas de identificación de picos	144
II.4	Curva de calibración del metano	145

LISTA DE ABREVIATURAS

CDE: Compuestos disruptores endocrinos

PPCP: Productos del cuidado personal

DQO: Demanda Química de Oxígeno

USFDA: Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

CVT: Carga volumétrica de tilosina

HPLC: Cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento

TRH: Tiempo de residencia hidráulico

ARP: Agua Residual Porcina

AME: Actividad Metanogénica Específica

SST: Sólidos Suspendidos Totales

SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles

ST: Sólidos Totales

STV: Sólidos Totales Volátiles

CH₄: Metano

DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxígeno

DQOt: Demanda Química de Oxígeno total

DQOs: Demanda Química de Oxígeno Soluble

Ptotal: Fósforo Total

TYL: Tilosina

Q: Caudal

ANOVA: Análisis de Varianza

LD: Límite de Detección

LC: Límite de Cuantificación

LCON: Límite de Confianza

CV: Coeficiente de Variación

COV: Carga Orgánica Volumétrica

DALYS: Digestores anaerobios de líquidos y sólidos

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente ha surgido una gran preocupación e interés sobre el estudio de los contaminantes emergentes, entendidos estos como aquellos productos químicos descubiertos en el agua que no habían sido detectados previamente o se detectan a niveles diferentes a lo esperado, cuyo riesgo a la salud humana y al ambiente asociado con su presencia, frecuencia de detección o fuente pueden ser desconocidos (EPA, 2014). Tal es el caso de los compuestos disruptores endocrinos (CDE), los farmacéuticos y los productos del cuidado personal (PPCP), los cuales están presentes en las aguas residuales municipales e industriales.

En el caso específico de los fármacos, su importancia se debe a que se ha demostrado que causan efectos adversos en concentraciones hasta de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Una de las clases de fármacos más utilizada son los antibióticos. La problemática ambiental de los antibióticos radica en que generan resistencia bacteriana (Goñi-Urriza *et al.*, 2000; Guardabassi *et al.*, 2002), con frecuencia se utilizan en cantidades mayores a las apropiadas (Holstrom *et al.*, 2003), tal es el caso de México, son parcialmente metabolizados (Levy, 1992), afectan la eficiencia de los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Alatrache *et al.*, 2010), generalmente no son removidos en los sistemas de tratamiento (Rizzo *et al.*, 2009), además de que los medicamentos caducos se disponen inapropiadamente.

El mayor consumidor de antibióticos veterinarios a nivel mundial es Estados Unidos con 11,148 toneladas de antibióticos por año, seguido por Corea del Sur con 1,533 toneladas de antibióticos por año (Kim *et al.*, 2011). Generalmente el 10% de los antibióticos veterinarios son usados en el tratamiento de infecciones y el 90% restante es usado como promotor del crecimiento (lo cual induce resistencia bacteriana (McGeer, 1998) y para el cuidado profiláctico. Recientemente se han detectado concentraciones traza de fármacos veterinarios alrededor del mundo en suelos, aguas superficiales y aguas residuales municipales e industriales en concentraciones de $9.5\text{-}254,000 \text{ ng g}^{-1}$, $1.2\text{-}1,340 \text{ ng L}^{-1}$, $1\text{-}40,000,000 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente (Langhammer *et al.*, 1988; Lindsey *et al.*, 2001; Campagnolo *et al.*, 2002; Grote *et al.*, 2004; Zilles *et al.*, 2005; Ye y Weinberg, 2007). Se ha demostrado que en el caso de aguas residuales los sistemas de tratamiento convencionales no remueven eficazmente los fármacos (Heberer *et al.*, 2002; Kolpin *et al.*, 2002; Castiglioni *et al.*, 2006).

En el caso específico del agua residual proveniente de la industria porcina, las investigaciones actuales están enfocadas en la reducción de olor, la eliminación de nutrientes y la disposición apropiada del estiércol. Sin embargo, los estudios sobre el impacto de la presencia de compuestos emergentes tales como los antibióticos en la eficiencia de los sistemas de tratamiento de este tipo de aguas son limitados. La complejidad del agua residual porcina es que generalmente tiene una DQO superior a

15,000 mg L⁻¹ y una concentración de sólidos por arriba de 10,000 mg L⁻¹ lo que dificulta la detección de antibióticos. Por lo que es un reto determinar el mejor método para su detección y cuantificación en este tipo de aguas.

La digestión anaerobia es una tecnología establecida para el tratamiento de estiércol animal, sin embargo, existe muy poca información sobre los sistemas en los que se hace el tratamiento de agua residual porcina sin separación (fracción líquida y fracción sólida (estiércol)). Por otro lado, existen muchas investigaciones sobre el destino de los antibióticos en diferentes matrices, pero la información es limitada en cuanto al destino de los antibióticos en sistemas de digestión anaerobia.

En México el 38% de los residuos de granjas porcinas es liberado al medio ambiente sin tratamiento previo (De Victorica y Galván, 2005). Además por lo general no se cuenta con fosas de homogeneización o regulación, por lo que la mayor parte del tiempo el agua residual porcina va directo al sistema de tratamiento (cuando lo hay), lo cual puede afectar la actividad biológica del sistema debido al choque de carga de los contaminantes presentes, incluidos los antibióticos y otros compuestos inhibitorios.

Por lo anterior, en esta tesis se evaluó el efecto de la presencia de tilosina (un antibiótico veterinario muy usado en el mundo y en México) sobre la eficiencia de remoción de materia orgánica en digestores anaerobios que tratan agua residual porcina.

2. ANTECEDENTES

Becerril (2009) menciona que “Actualmente existe un interés creciente por los contaminantes emergentes, entre los que se encuentran los fármacos y los productos de uso personal, surfactantes, retardantes de fuego, aditivos industriales, esteroides y hormonas, así como los subproductos de la desinfección. Se ha demostrado que estos compuestos se encuentran diseminados en el ambiente y se han detectado en fuentes de abastecimiento de agua, aguas subterráneas e incluso en agua potable. Estos contaminantes corresponden, en la mayoría de los casos, a contaminantes no regulados, que pueden ser candidatos a regulación futura, dependiendo de investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitoreo con respecto a su incidencia”.

La característica principal de los contaminantes emergentes es que no necesitan persistir en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus elevadas tasas de transformación y remoción se compensan por su introducción continua en el ambiente. La mayoría de los contaminantes emergentes no han sido estudiados, por lo que es difícil predecir sus efectos en la salud humana y animal.

2.1. Fármacos

Un fármaco es una sustancia química purificada utilizada en la prevención, diagnóstico, tratamiento, mitigación y cura de una enfermedad con el fin de evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado o bien para modificar condiciones fisiológicas con fines específicos.

2.1.1. Clasificación de fármacos

Los fármacos se clasifican de acuerdo a su propósito tal como se muestra en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Clasificación de los fármacos

Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco
Analépticos	Analgésicos	Anestésicos	Antiácidos
Antiamebianos	Antibióticos	Anticoagulantes	Anticonvulsivantes
Antidepresivos	Antiespasmódicos	Antihelmínticos	Antihistamínicos
Antipiréticos	Antisépticos	Antitiroideos	Antitoxinas
Astringentes	Carminativos	Colagogos	Diaforéticos
Desinfectantes	Diuréticos	Ecbólicos	Eméticos
Estimulantes	Expectorantes	Fungicidas	Hematínicos
Hipnóticos	Hipotensores	Midriáticos	Mióticos
Narcóticos	Purgantes	Sedantes	Tónicos
Tranquilizantes			

2.1.2. *Fármacos en el medio ambiente*

Las sustancias farmacéuticas y los productos del cuidado personal han sido reconocidos como una clase importante de contaminantes orgánicos debido a sus propiedades fisicoquímicas, las cuales permiten su persistencia y bioacumulación en el medio ambiente provocando efectos negativos en ecosistemas acuáticos y terrestres en concentraciones bajas en el rango de ng a $\mu\text{g L}^{-1}$ (Naddeo *et al.*, 2009).

Durante la década de 1990 las investigaciones sobre fármacos y productos del cuidado personal, escasas hasta entonces, se comenzaron a enfocar en la liberación, el destino y las consecuencias de tales compuestos en el medio ambiente (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 1999). A partir de entonces se ha reportado la presencia de un gran número de fármacos en diferentes concentraciones, tales como: a) antiinflamatorios ($<0.5\text{-}246,000\text{ ng L}^{-1}$), b) reguladores de lípidos ($0.3\text{-}36,530\text{ ng L}^{-1}$), c) antibióticos ($<0.25\text{-}153,000\text{ ng L}^{-1}$), d) hormonas ($<0.2\text{-}255\text{ ng L}^{-1}$), e) antiepilépticos ($<1.0\text{-}2,100\text{ ng L}^{-1}$), f) β -bloqueadores ($<0.47\text{-}122,000\text{ ng L}^{-1}$), g) antidepresivos ($<0.12\text{-}612\text{ ng L}^{-1}$), h) antineoplásicos ($0.2\text{-}4,486\text{ ng L}^{-1}$) e i) medios de contraste de rayos X ($10\text{-}9,300\text{ ng L}^{-1}$), en influentes y efluentes de plantas de tratamiento de agua residual, agua superficial, agua subterránea, agua potable, además de otras matrices ambientales tales como suelo y sedimento (Santos *et al.*, 2010).

Los fármacos, desde el punto de vista ambiental, presentan las siguientes características que los hacen diferentes a los contaminantes químicos industriales convencionales:

- Incluyen compuestos formados por moléculas grandes y complejas, con diferente peso molecular, estructura, funcionalidad y forma.
- Son moléculas polares y tienen más de un grupo ionizable.
- Su persistencia en el medio ambiente es elevada, por lo que pueden acumularse por años, alcanzando altas concentraciones.
- Llegan al medio ambiente excretados por el hombre o por los animales en forma de conjugados, como un metabolito principal o como una mezcla de metabolitos.

2.1.3. *Fármacos veterinarios*

Los fármacos veterinarios o de uso animal son ingeridos, inyectados y aplicados tópicamente, sus mayores usos son como promotores del crecimiento, como agentes antibacterianos y como agentes desparasitantes.

2.1.3.1. *Destino y rutas de exposición de fármacos veterinarios*

Los fármacos son sustancias químicas biológicamente activas que al ser descargadas pueden interferir con sistemas biológicos específicos. En caso de presentarse una dilución de los fármacos en el medio ambiente, las bajas concentraciones resultantes podrían ser

inofensivas. Sin embargo, muchos fármacos son descargados localmente, lo que genera elevadas concentraciones en el sitio de descarga.

La mayor parte de los fármacos usados para propósitos veterinarios terminan en el estiércol (Figura 2.1). El estiércol es almacenado generalmente en tanques por un determinado tiempo y posteriormente es aplicado a los campos. Una vez esparcido el estiércol en los campos agrícolas la movilidad de los fármacos y sus metabolitos permite que estos lleguen al agua subterránea afectando los organismos terrestres y/o acuáticos. Los fármacos aplicados como aditivos alimentarios en granjas de peces son descargados directamente a los cuerpos receptores cuando no hay planta de tratamiento de aguas residuales.

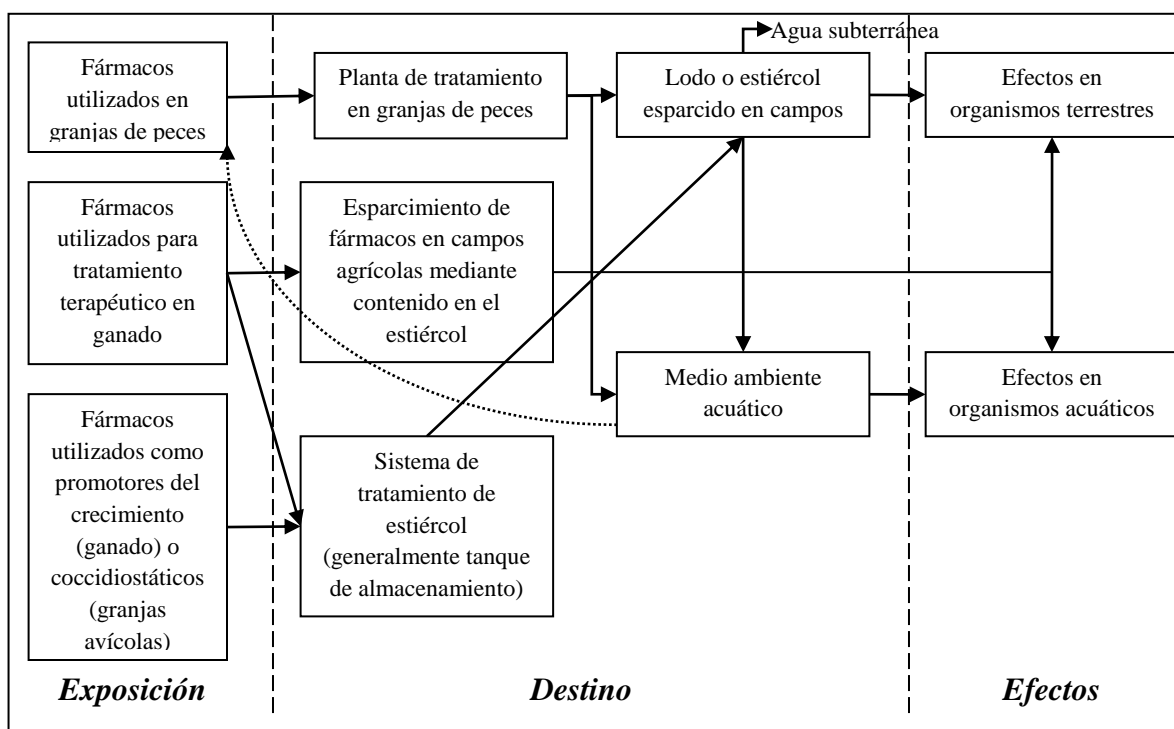


Figura 2.1 Rutas de exposición anticipada de fármacos veterinarios en el medio ambiente (Jørgensen y Halling-Sørensen, 2000)

Generalmente, las rutas de exposición son de gran importancia debido a que la cantidad total de fármacos emitidos al medio ambiente es relativamente baja comparada con otros compuestos químicos, sin embargo, una descarga local de fármacos puede provocar problemas ambientales en concentraciones entre 10-100 ng L⁻¹ (Jørgensen y Halling-Sørensen, 2000).

2.1.3.2. Regulaciones de fármacos veterinarios; *Error! Marcador no definido.*

Los fármacos veterinarios son regulados para su uso por las autoridades y deben cumplir con criterios específicos de calidad, eficacia y seguridad. Las autoridades los consideran seguros respecto a un animal tratado, al consumidor y al manejo individual del producto durante el tratamiento. Sin embargo, en la actualidad, los riesgos ambientales de productos farmacéuticos veterinarios se han convertido en materia de interés público y legal. No obstante, no existe en el mundo ninguna iniciativa para evaluar el riesgo ambiental de los fármacos veterinarios en el mercado, además no existen normas de descarga específica de éstos en el medio ambiente, por tal motivo se hace imprescindible el estudio sobre su afectación al medio ambiente.

2.2. Antibióticos

Un antibiótico es una sustancia química derivada o producida por microorganismos que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento o matar bacterias y otros microorganismos aún a bajas concentraciones (Groupe, 1990).

2.2.1. Clasificación de los antibióticos

Los antibióticos se clasifican de acuerdo a su estructura química como se muestra en la Tabla 2.2.

2.2.2. Modo y mecanismo de acción

Las sustancias antibacterianas para producir la acción bacteriostática (detener el crecimiento de las bacterias) o bactericida (matar bacterias), lo hacen interfiriendo los mecanismos fisiológicos mencionados a continuación.

- Inhibición de la síntesis de la pared celular: el componente esencial de dicha pared es el peptidoglucano, cuya síntesis es impedida por el antibiótico por inhibición de los sistemas enzimáticos correspondientes.
- Lesión de la membrana celular: en esta forma se afectan importantes funciones celulares, pues en la membrana existen sistemas enzimáticos vitales y además rige la entrada y salida de elementos nutritivos de manera que el antibiótico provoca un escape de proteínas y nucleótidos, lo que produce daño o muerte celular.
- Inhibición de la síntesis proteica: los antibióticos bloquean los pasos necesarios de dicha síntesis actuando sobre los ribosomas y en esta forma la vida de la bacteria queda afectada.
- Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos.

Tabla 2.2 Clasificación de los antibióticos

Grupo	Nombre	Antibiótico prototipo
I	B-lactámicos	Penicilinas, cefalosporinas, monobactams, carbapenems
II	Aminoglucosidos	Gentamicina
III	Azúcares complejos	Clindamicina
IV	Polipeptídicos	Polimixina
V	Rifamicinas	Rifampicina
VI	Tetraciclinas	Clortetraciclina
VII	Amfenicoles	Cloramfenicol
VIII	Macrólidos	Eritromicina
IX	Misceláneos	Espectinomicina, virginiamicina, vancomicina, teicoplanina, capreomicina, cicloserina, fosfomicina, novobiocina, linezolid
X	Quimioterapéuticos antibacterianos	Sulfonamidas, sulfonamidas+trimetoprim, nitrofuranos, derivados de naftiridina y quinolonas
XI	Antifúngicos	Anfotericina B, imidazoles, griseofulvina, fluocitosina, nistatina, terbinafina
XII	Antivirósicos	Infecciones no VIH, infecciones VIH

2.2.3. Liberación de antibióticos en el medio ambiente

Los antibióticos son excretados al medio ambiente hasta en un 90% sin ser metabolizados, además, no son removidos en algunos sistemas de tratamiento y la disposición de medicamentos caducos por lo general es inadecuada (Levy, 1992). Actualmente en México opera el Sistema Nacional de Gestión de Residuos de Envases y Medicamentos A. C. (SINGREM), una asociación civil destinada a recolectar medicamentos caducos en supermercados y farmacias, entre otros y disponerlos adecuadamente hasta su destrucción final.

La mayor preocupación sobre la liberación de los antibióticos en el medio ambiente está relacionada principalmente con el potencial para el desarrollo de resistencia bacteriana (Goñi-Urriza *et al.*, 2000; Guardabassi *et al.*, 2002).

La información sobre el uso de antibióticos generalmente es escasa, por lo cual, son usados comúnmente en cantidades mayores a las apropiadas (Holmstrom *et al.*, 2003), tal es el caso de México. Una forma de reducir su sobreuso es a través de impuestos u otras restricciones, que en el caso de los antibióticos deberían tomar en cuenta que se utilizan grandes cantidades en la producción animal y que la resistencia bacteriana producida por

este uso puede ser transmisible a los seres humanos. Por lo tanto, es necesario prevenir esta transmisión enfocando los esfuerzos en la reducción de la resistencia bacteriana producida por las granjas ganaderas.

2.2.4. Resistencia bacteriana

Los antibióticos han revolucionado la salud humana y animal, sin embargo, en años recientes, su efecto ha disminuido y se ha incrementado la tasa de resistencia a antibióticos en muchas bacterias, esta problemática ha sido reconocida como una preocupación de salud pública global.

Las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos contra los antibióticos que son utilizados en su contra, los genes que codifican estos mecanismos de defensa están localizados en el cromosoma o en los extracromosomas de las bacterias y son transmitidos a la siguiente generación (transferencia vertical de genes), lo que provoca resistencia genética a los antibióticos (Zhang *et al.*, 2009; Gevers *et al.*, 2003; Huys *et al.*, 2005; Rizzotti *et al.*, 2005; Cocconcelli *et al.*, 2003).

Existen dos procesos principales a través de los cuales puede ocurrir la transmisión bacteriana del uso de antibióticos en animales a los humanos. El primero es una transmisión directa a través de la cadena alimenticia, es decir, por el consumo de animales con restos de antibióticos (Angulo *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2004; Simeoni *et al.*, 2008) y el segundo proceso, y posiblemente el más importante, es la transmisión indirecta de resistencia por medio de bacterias y en general a través del medio ambiente. Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha tomado medidas para disminuir esta resistencia y ha recomendado terminar con el uso de cualquier antibiótico para la promoción del crecimiento en animales si éstos son usados como medicamentos terapéuticos en humanos o si se tiene información sobre el incremento de la resistencia a antibióticos usados en medicina humana (Huycke *et al.*, 1998).

Numerosas investigaciones han demostrado la resistencia genética a diferentes antibióticos, tales como amoxicilina, ácido clavulánico, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, trimetoprima, vancomicina, cefazolina, ampicilina, penicilina, eritromicina, tilosina, tetraciclina, oxitetraciclina; entre otros, en sistemas de tratamiento de agua residual municipal, agua residual de hospitales y agua de río (Sapkota *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009).

2.2.5. Antibióticos en diferentes matrices

Se ha reportado la presencia de antibióticos en aguas residuales de hospitales, aguas residuales municipales, efluentes de plantas de tratamiento de agua residual municipal, aguas superficiales, aguas subterráneas e incluso agua potable, además de otras matrices

como suelo y estiércol (Tabla 2.3), sin embargo, a pesar de su detección, se conoce poco acerca de su distribución en el medio ambiente, su movilidad y su persistencia.

En la Tabla 2.3 se aprecia una gran variedad de antibióticos que han sido detectados en diferentes matrices, sobre todo en agua residual, sin embargo, las mayores concentraciones reportadas se han encontrado en lagunas porcinas (40 mg L^{-1}) y corresponden a antibióticos de uso veterinario, lo que puede indicar que los sistemas de tratamiento utilizados para los desechos animales no remueven eficazmente los antibióticos.

2.2.6. Antibióticos veterinarios

Los antibióticos veterinarios son utilizados como promotores del crecimiento (promueven la ganancia de peso por optimización de la proporción de conversión de alimento) en un 90%, para tratar infecciones activas y para el cuidado profiláctico (previniendo un ataque de alguna enfermedad y/o como protección para la granja de un brote de alguna enfermedad).

En la Unión Europea se usaron 5000 ton de antibióticos en animales en 1999 (Sarmah *et al.*, 2006), mientras que en Estados Unidos se utilizan 20.5 millones de kilogramos de antibióticos por año (Kolpin *et al.*, 2002), sin embargo, en México no se cuenta con datos acerca de la producción y el uso de antibióticos veterinarios debido a que las compañías farmacéuticas no están obligadas a reportar las cantidades de medicamento que son manufacturadas y vendidas. Además, los antibióticos también pueden ser comprados por internet sin ninguna vigilancia o regulación, práctica que fue prohibida en Estados Unidos en 2006.

2.2.6.1. Antibióticos veterinarios en México

En México se ha reportado un uso inadecuado de antibióticos por parte de médicos veterinarios y productores, así como la dispensación inapropiada en farmacias veterinarias privadas, además del uso de antibióticos en dosis bajas para promover el crecimiento en animales, lo cual incrementa el riesgo de desarrollo de resistencia bacteriana, el comercio de antibióticos de baja calidad, incluyendo productos sin bioequivalencia demostrada, la utilización de sales puras de antibióticos en la producción de pre-mezclas y mezclas de alimentos de animales.

Estudios nacionales demuestran elevadas tasas de resistencia bacteriana en patógenos tales como *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Campylobacter* transmitidos por alimentos mediante carnes crudas ofrecidas en diversos puntos de venta. En ciertas zonas del país se han detectado cepas de *Salmonella* resistentes a múltiples antibióticos, las cuales se han asociado con infecciones graves e inclusive mortales en niños pequeños (INSP, 2010).

Tabla 2.3 Antibióticos en diferentes matrices ambientales

Matriz	Antibiótico	Concentración detectada (ng L ⁻¹)	Referencia
Agua potable	Ácido oxolínico, Eritromicina, Flumequina, Roxitromicina, Sulfametoxazol, Tilosina, Sulfonamida	1.2-270	Ye and Weinberg, 2007; Richter <i>et al.</i> , 2007
Río	Cloranfenicol, clortetraciclina	60-160	Hirsch <i>et al.</i> , 1999; Kolpin <i>et al.</i> , 2002
Agua superficial	Clortetraciclina, Oxitetraciclina, Amoxicilina, Cefaclor, Cefalexina, Cloranfenicol, Ciprofloxacina, Claritromicina, Clindamicina, Demeclociclina, Doxicilina, Enrofloxacin, Eritromicina, Lincomicina, Nomensina, Norfloxacin, Oleandomicina, Oxitetraciclina, Penicilina G, Penicilina V, Roxitromicina, Salinomocina, Sulfadimetoxacina, Sulfametazina, Sulfametizol, Sulfametoxazol, Sulfatiazol, Sulfonamida, Tetraciclina, Tilosina,	0.19-15000	Hirsch <i>et al.</i> , 1999; Kolpin <i>et al.</i> , 2002; Watkinson <i>et al.</i> , 2009; Costanzo <i>et al.</i> , 2005; Alder <i>et al.</i> , 2001; Calamari <i>et al.</i> , 2003; Zuccato <i>et al.</i> , 2005; Kolpin <i>et al.</i> , 2004; Batt <i>et al.</i> , 2006; Christian <i>et al.</i> , 2003; Yang y Carlson, 2003; Ashton <i>et al.</i> , 2004; Lindsey <i>et al.</i> , 2001; Richter <i>et al.</i> , 2007;
Agua residual de Hospital	Amoxicilina, Cefalexina, Ciprofloxacina Clindamicina, Doxicilina, Enrofloxacin, Lincomicina, Norfloxacin, Oleandomicina, Penicilina V, Roxitromicina, Sulfametoxazol, Tetraciclina, Trimetoprima	0.29-130	Kümmerer, 2001; Watkinson <i>et al.</i> , 2009
Agua residual municipal	Ácido Nalidixico, Amoxicilina, Cefaclor Cefalexina, Ciprofloxacina, Clindamicina Clortetraciclina, Cloxacilina, Doxicilina, Enrofloxacin, Lincomicina, Norfloxacin Oleandomicina, Oxitetraciclina, Penicilina G, Penicilina V, Roxitromicina Salinomocina, Sulfametoxazol, Sulfatiazol Sulfasalazina, Sulfonamida, Tetraciclina, Tilosina, Trimetoprima	5-64000	Kümmerer, 2001; Watkinson <i>et al.</i> , 2009; Karthikeyan y Bleam, 2003; Richter <i>et al.</i> , 2007
Efluente PTAR	Ciprofloxacina, Claritromicina, Cloranfenicol, Doxicilina, Eritromicina Norfloxacin, Ofloxacin, Roxitromicina Sulfacetamida, Sulfadiazina, Sulfametazina, Sulfametoxazol, Sulfapiridina, Sulfisoxasol, Tetraciclina	1-560	Miao <i>et al.</i> , 2004; Hirsch <i>et al.</i> , 1999; Campagnolo <i>et al.</i> , 2002;
Laguna Porcina	Clortetraciclina, Sulfonamida, Tetraciclina,; Lincomicina, Oxitetraciclina, Tilmicosina, Tilosina	<2000-40000000	Zilles <i>et al.</i> , 2005; Thiele-Bruhn, 2003; Campagnolo <i>et al.</i> , 2002
Suelo	Clortetraciclina, Lincomicina, Oxitetraciclina, Tetraciclina, Tilmicosina, Tilosina	9.5-254000 (ng g ⁻¹)	Grote <i>et al.</i> , 2004; JiaXiang, 2003; Zilles <i>et al.</i> , 2005
Estiércol vacuno	Amoxicilina, Bacitracina, Clortetraciclina, Enrofloxacin, Oxitetraciclina, Tilosina	0.01-4 (mg Kg ⁻¹)	Christian <i>et al.</i> , 2003; Huang <i>et al.</i> , 2009; Hamscher <i>et al.</i> , 2002; Christian <i>et al.</i> , 2003;
Estiércol porcino	Bacitracina, Clortetraciclina, Lincomicina, Oleandomicina, Oxitetraciclina, Tetraciclina, Tilmicosina, Tilosina	<0.002-281 (mg Kg ⁻¹)	Zilles <i>et al.</i> , 2005; Hamscher <i>et al.</i> , 2002; Grote <i>et al.</i> , 2004; Huang <i>et al.</i> , 2009
Estiércol avícola	Salinomocina, Tiamulina	0.011-0.043	Schlusener <i>et al.</i> , 2003

Cabe destacar que la FAO considera un tema prioritario en materia de seguridad alimentaria el problema de las bacterias resistentes a los antibióticos en animales para consumo humano, por lo que existe una alta probabilidad de que en el futuro la resistencia bacteriana afecte la competitividad global de México para las exportaciones de alimentos.

En cuanto a la regulación del uso de antibióticos en animales, la NOM-064-ZOO-2000 “Lineamientos para la clasificación y prescripción de productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos”, reconoce que la prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios se debe realizar con base en el nivel de riesgo de sus ingredientes activos, tomando en consideración tanto los riesgos a la salud animal como a la salud humana. Dicha norma clasifica a los productos farmacéuticos veterinarios en tres grupos. Los antibióticos veterinarios se encuentran actualmente clasificados en el Grupo II, los cuales requieren para su venta receta médica simple expedida por un médico veterinario con cédula profesional, sin embargo, el requisito de la receta médica no siempre se hace cumplir.

2.2.6.2. Toxicidad de antibióticos veterinarios

Se ha encontrado que algunos antibióticos veterinarios son tóxicos para diferentes microorganismos, plantas e invertebrados.

Holten-Lützhof *et al.*, (1999) reportaron valores menores a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de EC_{50} para cianobacterias en presencia de amoxicilina, bencilpenicilina, sarafloxacina, espiramicina, tetraciclina y tiamulina. Kallaos *et al.*, (2007) encontraron que en Santa Bárbara, Estados Unidos, las concentraciones en el medio ambiente se encuentran en niveles de toxicidad aguda baja, por lo cual la principal afectación es el efecto crónico y/o sinérgico.

Batchelder (1982) y Migliore *et al.*, (1995, 1996) encontraron que los antibióticos provocan un crecimiento lento en algunas plantas como el frijol silvestre (*Phaseolus vulgaris*), la cebada (*Hordeum distichum L.*) y el maíz (*Zea mays*). Por otro lado Boleas *et al.*, (2005) observaron inhibición del crecimiento de la canola (*Brassica napus*) y el trigo (*Triticum aestivum*) en presencia de oxitetraciclina. López (2010) evaluó el efecto de la adición de tabletas caducas de amoxicilina y ácido acetilsalicílico (AAS) en el crecimiento de frijol y encontró que la adición de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AAS en el agua de riego no alteró el porcentaje de germinación de la planta ni el crecimiento de los tallo pero incrementó la longitud y ramificaciones de las raíces, mientras que, la adición de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de amoxicilina en el agua de riego alteró el porcentaje de germinación de la planta e inhibió el crecimiento de los tallos sin afectar el área follar o la longitud de las raíces pero si la cantidad de ramificaciones.

Baguer *et al.*, (2000) encontraron un 10% de inhibición en los parámetros de reproducción del colémbolo *Folsomia fimetaria* y del oligochaete *Enchytraeus crypticus* en concentraciones entre 61 y 149 mg kg⁻¹ de tilosina y oxitetraciclina, así como también de tiamulina, olaquinox y metronidazol (Jensen *et al.* 2003).

2.2.6.3. Remoción de antibióticos veterinarios

Una vez que los antibióticos son excretados en las heces y orina animal están sujetos a varios procesos tales como la sorción (Loke *et al.*, 2002; Thiele, 2000; Ingerslev y Halling-Sørensen, 2000; Huang *et al.*, 2009), transformación abiótica (hidrólisis y fotodegradación (Huang *et al.*, 2009) y transformación biótica en ambientes naturales y artificiales (Huang *et al.*, 2009). Estos procesos influyen directamente en el destino y transporte de estos compuestos en el medio ambiente, así como sus actividades biológicas.

2.3. Antibióticos veterinarios en granjas porcinas

Las aguas residuales porcinas están formadas por residuos sólidos y líquidos acarreados por el agua de lavado, sus principales componentes son una mezcla de excretas (heces y orina), agua, alimento desperdiciado, cama, suelo, desechos producidos durante el parto, entre otros. Existen muchos factores que determinan las tasas de excreción de heces y orina (también denominada purín) como son edad del animal, madurez fisiológica, cantidad y calidad del alimento consumido, cantidad de agua consumida y clima, entre otros factores. Las excretas porcinas tienen un alto contenido de materia orgánica biodegradable (55% aproximadamente) y elementos contaminantes como patógenos, nitrógeno, cobre, zinc y arsénico. En general, estos residuos se caracterizan por presentar un alto contenido de sólidos, alta concentración de materia orgánica, alto contenido de nutrientes y hoy en día, se han encontrado otros compuestos específicos tales como metales, hormonas y antibióticos, los cuales pueden provocar diferentes impactos ambientales (Belmonte *et al.*, 2008).

En la Tabla 2.4 se enlistan los antibióticos aprobados por la USFDA (Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés) y por la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) en México para su uso en ganado porcino.

Tabla 2.4 Antibióticos utilizados en ganado porcino en Estados Unidos y México, (USDA, 2009; SAGARPA, 2004)

Antibiótico	Estados Unidos	México
Amoxicilina, ampicilina, ácido arsánico, bacitracina, bambamicina, efrotomicina, eritromicina, oleandomicina, penicilina, virgiamicina	✓	
Apramicina, clortetraciclina, gentamicina, lincomicina, neomicina, oxitetraciclina, tetraciclina, tiamulina, tilosina	✓	✓
Carbadox, espectinomina, higromicina B, ivermectina, levamisol, pirantel, roxarsone, sulfaclopiradicina, sulfametazina, sulfatiazol		✓

Se observa en la Tabla que existe una gran variedad de antibióticos que son utilizados en la industria porcina, algunos de ellos son usados a nivel local en cada país y otros a nivel mundial.

2.3.1. Resistencia bacteriana en granjas porcinas

Dependiendo de las prácticas y las regulaciones locales, los residuos porcinos son sujetos a una separación de sólidos y/o almacenado en lagunas, el residuo de ambos tratamientos es composteado y/o aplicado a la tierra. Cada paso de este proceso tiene el potencial de contaminar el suelo y el agua superficial con residuos de antibióticos. Sin embargo, muchos antibióticos no son fáciles de degradar (Daughton y Ternes, 1999) y son acumulados, como resultado una parte de las bacterias pueden desarrollar resistencia a estos antibióticos.

Algunos estudios han demostrado que el uso de antibióticos está asociado con la presencia de resistencia antibiótica en muestras fecales porcinas (Aarestrup and Carstensen, 1998; Bager *et al.*, 1997), lo que puede crear una resistencia en animales (Sengelov *et al.*, 2003). Cuando el estiércol líquido de las granjas porcinas es esparcido en los campos, los genes de resistencia bacteriana son transferidos al ambiente creando la posibilidad de resistencia genética a la biota del suelo (Halling-Sørensen *et al.*, 2001; Götz and Smalla, 1997; Smalla *et al.*, 2000; Koike *et al.*, 2007; Pei *et al.*, 2007). Chapin *et al.* (2005) y Gibbs *et al.*, (2004) encontraron altos niveles de *Enterococcus* resistentes a antibióticos en el aire de una granja porcina lo que podría representar una ruta de exposición para la transferencia de bacterias patógenas resistentes de cerdos a humano.

2.3.2. Sistemas de tratamiento para la remoción de antibióticos presentes en agua residual porcina

Muchas de las investigaciones actuales de manejo de agua residual proveniente de la industria porcina están enfocadas en la reducción de olor y la disposición apropiada del estiércol.

Es bien conocido que los cerdos reciben altas dosis de antibióticos para prevenir enfermedades y como precursores del crecimiento. Al respecto, se tiene muy poca información a nivel mundial sobre el efecto de estos antibióticos en sistemas de tratamiento. Por lo que un área nueva que necesita mayor atención es el efecto de la presencia de antibióticos veterinarios en los sistemas de tratamiento de agua residual porcina.

Son pocos los estudios que existen acerca de los residuos de antibióticos generados en granjas porcinas (estiércol y mezcla de orina, heces fecales y agua, que en su conjunto forman el agua residual), los cuales se han realizado en países desarrollados tales como Corea, Canadá, Dinamarca, China, Estados Unidos, Italia, Australia y Bélgica (Stone *et al.*, 2009; Angenent *et al.*, 2008; Macauley *et al.*, 2006; Zilles *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2009; Kolz *et al.*, 2005; Bao *et al.*, 2009; Rajić *et al.*, 2004; Poels *et al.*, 1984; Ginnivan, 1982; Campagnolo *et al.*, 2002; Massé *et al.*, 2000; Lallai *et al.*, 2002; Ben *et al.*, 2009; Jacobsen y Halling-Sørensen, 2006; Chénier y Juteau, 2009 y Han *et al.*, 2009), mientras que en países en vías de desarrollo no se tienen reportadas investigaciones. En dichos estudios se han encontrado elevadas concentraciones de antibióticos veterinarios en los efluentes de las granjas porcinas, por lo que se hace de suma importancia su investigación ya que representan un problema potencial para los sistemas de tratamiento de aguas.

Se han estudiado diferentes sistemas de tratamiento para la remoción de contaminantes en agua residual porcina, sin embargo por las características del agua se utilizan principalmente procesos biológicos. Para el caso de la remoción de antibióticos presentes en dichas aguas el tratamiento aplicado es predominantemente biológico encontrando principalmente como sistemas de tratamiento digestores y lagunas, sin embargo, en la mayoría de los casos no se reportan las remociones de los antibióticos encontrados.

En la Tabla 2.5 se enlistan los sistemas de tratamiento biológicos estudiados para la remoción de antibióticos en residuos porcinos. Se observa que los sistemas de tratamiento utilizados son principalmente anaerobios, teniendo al estiércol como la fracción principal de estudio, sin embargo existen muy pocos estudios dedicados a la fracción líquida y sólida en su conjunto. Además se observan inhibiciones en el proceso metanogénico en presencia de diferentes antibióticos.

Tabla 2.5 Sistemas de tratamiento biológico para la remoción de antibióticos en residuos porcinos

Sistema de tratamiento	Tipo de agua	TRH (d)	T (°C)	Antibiótico	Concentración utilizada (mg L ⁻¹)	Remoción (%)	Inhibición de producción de metano (%)	Referencia
Composteo	Estiércol	42	NR	Clortetraciclina	879.6	27	NR	Bao <i>et al.</i> , 2009
SBR aerobio	Estiércol	NR	25, 37 y 60°C	Tilosina y clortetraciclina	NR	NR	NR	Chénier y Juteau, 2009
Suelo aerobio	Estiércol	NR	NR	Metronidazol, olaquinox y tilosina	NR	90	NR	Ingerslev y Halling-Sørensen, 2001
ASBR	Estiércol cribado y diluido	20	25	Tilosina	1.6 (promedio)	99	Sin inhibición	Angenent <i>et al.</i> , 2008
Digestor anaerobio	Agua residual porcina	0-216	10-20	Clortetraciclina	28	57	27.8	Stone <i>et al.</i> , 2009
				Tilosina	1.1	100	Sin inhibición	
Laguna aerobia	Agua residual porcina	26 h	22-25	Tilosina	0.4	65	NR	Kolz <i>et al.</i> , 2005
Laguna anaerobia	Agua residual porcina	130 h	22-25	Tilosina	0.4	99	NR	
Laguna anaerobia	Agua residual porcina	NR	NR	Sulfonamidas, tetraciclinas, lincomicina y tilosina	1-25		20-50	Lotfin <i>et al.</i> , 2005
Digestor anaerobio	Agua residual porcina	20	30-33	Clortetraciclina	3.3-33.3	NR	Sin inhibición	Poels <i>et al.</i> , 1984
				Virgiamicina	1.7-16.7	NR	87	
				Tilosina	1.7-16.7	NR	Sin inhibición	
				Eritromicina	0.4-4	NR	Sin inhibición	
				Cloranfenicol	16.7-166.6	NR	Sin inhibición	
				Bacitracina	3.3-33.3	NR	86	
Digestor anaerobio	Agua residual porcina	NR	37	Amoxicilina	125, 250	NR	32	Lallai <i>et al.</i> , 2002
				Oxitetraciclina	60, 120	NR	Sin inhibición	
				Tiamfenicol	80, 160	NR	25	
SBR psicrófilico	Agua residual porcina diluida	28	20	Tilosina	NR	NR	Sin inhibición	Massé <i>et al.</i> , 2000
				Lincomicina	NR	NR	Sin inhibición	
				Tetraciclina	NR	NR	25	
				Sulfametazina	NR	NR	Sin inhibición	
				Penicilina	NR	NR	35	
				Carbadox	NR	NR	Sin inhibición	

NR: no reportado.

En cuanto a sistemas físico-químicos para la eliminación de antibióticos en años recientes se han desarrollado muchas investigaciones en cuanto al uso de procesos de oxidación avanzada para la remoción de farmacéuticos de aguas residuales (Dalrymple *et al.*, 2007; Klavarioti *et al.*, 2009; Rizzo *et al.*, 2009). Sin embargo, los procesos de oxidación avanzada no han podido encontrar una mineralización completa de los contaminantes orgánicos, los cuales pueden provocar la formación de intermediarios que pueden ser más peligrosos que el compuesto padre (Andreozzi *et al.*, 2005; Rizzo *et al.*, 2009).

En lo que respecta a residuos porcinos, la bibliografía refiere solamente una investigación a escala laboratorio que conjuga un sistema anaerobio como pretratamiento junto con un sistema de reacción con Fenton. Se encontró que bajo las condiciones óptimas, el reactivo de Fenton pudo degradar todos los antibióticos seleccionados y resistió las variaciones de DQO (0-419 mg L⁻¹) y SS (0-250 mg L⁻¹) en el efluente del SBR. El reactivo Fenton ayudó también a remover el carbón orgánico total, metales pesados (As, Cu y Pb) y fósforo total, además de inactivar las bacterias y reducir la toxicidad aguda (*Daphnia magna*) del agua residual (Ben *et al.*, 2009).

2.4. Situación de la industria porcina en México

La producción de carne de porcino en México ha crecido a una tasa media anual de 1.1% durante el periodo comprendido entre 2001 y 2011. Así en este último año el volumen de producción nacional se ubicó en 1.18 millones de toneladas (Navarrete, 2012). Los principales estados productores de carne de cerdo son Jalisco y Sonora, con un 19.2 y 18.9% de la producción total nacional en 2011, respectivamente. A nivel nacional existen 979,000 unidades de producción con 9,021,000 cabezas de ganado porcino. La mitad de las cabezas se encuentran en cuatro entidades federativas: Sonora, Jalisco, Guanajuato y Puebla. De acuerdo a la distribución zootécnica el 58.4% del total de cabezas de ganado porcino se encuentra en la etapa de engorda y desarrollo, 24.2% en la etapa de destete (menores de 8 semanas), 12.4% en la etapa de maternidad (vientres), 3.6% corresponden a los sementales y 1.3% corresponde a los animales de desecho (INEGI, 2007).

Se estima que un cerdo produce 5.8 kg de efluente diariamente (excretas y orina) o un volumen de 0.27 m³ animal⁻¹ mes⁻¹ (AgCert, 2006). En México la mayor parte de las excretas generadas en las granjas porcinas es liberada al medio ambiente sin tratamiento previo. Se estima que el 38% de las granjas vierten sus residuos en cuerpos receptores (De Victorica y Galván, 2005) lo que provoca contaminación en los mantos freáticos y en las aguas superficiales.

En México el tratamiento más común de los desechos biológicos de una granja porcina es como abono directo o en forma de composta (SAGARPA, 2004). Cuando se cuenta con otro tipo de sistemas de tratamiento (lagunas anaerobias, filtros, fosas) generalmente éstos

se encuentran en muy malas condiciones de operación y mantenimiento o simplemente no operan.

En años recientes se han instalado en el país biodigestores para el tratamiento de los residuos de granjas porcinas los cuales son alimentados tanto con la materia fecal como con la orina de los cerdos, además del agua de lavado de la granja, es decir, no existe una separación de sólidos previa al tratamiento anaerobio. Estos biodigestores son producto del PECC (Programa Especial de Cambio Climático), el cual es una iniciativa del gobierno que plantea estrategias y metas para enfrentar el cambio climático en México dirigidas a la mitigación de gases de efecto invernadero y a la adaptación de la sociedad a la vulnerabilidad como efecto de este fenómeno, por lo cual esta tecnología se enfoca en la emisión de metano, sin embargo, se conoce muy poco acerca de la eficiencia de estos sistemas y se desconoce el efecto de contaminantes tales como antibióticos sobre la remoción de materia orgánica.

Generalmente en las granjas porcinas mexicanas no se cuenta con fosas de homogeneización o regulación, por lo que, la mayor parte de las veces el agua residual porcina va directo al sistema de tratamiento, lo que puede afectar la actividad biológica debido al choque de carga o de tóxicos o de antibióticos.

2.4.1. Regulación de descargas de aguas residuales porcinas en México

Las normas de descarga aplicables a la industria porcina se encuentran regulados por los siguientes instrumentos regulatorios (Rivera, 2011):

- Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA): se encarga de regular que el aprovechamiento del agua en actividades pecuarias conlleve la responsabilidad del tratamiento de las aguas residuales antes de reintegrarlas a las aguas nacionales y así puedan ser utilizadas en otros procesos de producción (Art. 117). Además, establece que las aguas residuales provenientes de actividades agropecuarias que se descarguen en los sistemas de drenaje y alcantarillado o en cualquier depósito o corrientes de agua, así como los que se derramen en los suelos, deben sujetarse a los preceptos establecidos en la NOM-001-ECOL-1996.
- Ley de Aguas Nacionales (LAN): señala que es obligación de quienes deseen descargar aguas residuales (ya sea de traspaso, semitecnificadas o tecnificadas) solicitar un permiso, dar tratamiento a las aguas antes de ser vertidas, instalar medidores para determinar y reportar el volumen y las concentraciones de los contaminantes presentes en las aguas residuales que se generen, realizar el monitoreo de la calidad de las descargas (Art. 88 bis) y el pago del derecho correspondiente, establecido por la LFDMA para los porcicultores.

- Ley Federal de Derechos en Materia de Aguas (LFDMA): dispone que quienes descarguen aguas residuales en depósitos o corrientes de agua, en suelos o las infiltren en terrenos que potencialmente pueden contaminar el subsuelo o los acuíferos paguen un derecho (Art. 276), cuyo monto corresponderá al tipo de cuerpo receptor en donde se realice la descarga, al volumen de descarga y a los contaminantes vertidos (Art. 278 y 278-A). La LFDMA determinó que las concentraciones máximas de DQO (demanda química de oxígeno) y SST (sólidos suspendidos totales) que deben mantener las aguas residuales porcinas son 320 y 150 mg L⁻¹, respectivamente.
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996: establece los límites máximos permisibles (LMP) de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Esta norma regula las concentraciones de contaminantes tales como: grasas y aceites, materia flotante, sólidos sedimentables, sólidos suspendidos totales, demanda bioquímica de oxígeno (DBO), nitrógeno total, fósforo total, temperatura, pH, patógenos (coliformes fecales y huevos de helminto) y metales pesados.

Pese a que la normatividad mexicana exige que a partir del 1 de enero de 2010 las granjas porcinas cumplan con los límites máximos permisibles de contaminantes en sus aguas residuales, en la práctica esta situación no ocurre.

2.5. Tilosina

La tilosina es uno de los antibióticos veterinarios más utilizados en el mundo, regulado en Estados Unidos por la FDA (USDA, 2009) y en México por la SAGARPA (SAGARPA, 2004).

En el año 2000, en Estados Unidos se reportó que el antibiótico más utilizado en granjas porcinas (92% de las granjas) fue la tilosina (USDA, 2002) alcanzando ventas anuales entre 2 y 2.5 millones de kilogramos. Sin embargo más del 70% de la tilosina administrada es excretada en heces y orina de animales en su forma original (denominada también compuesto padre) conocida como tilosina A, razón por la cual el uso de este antibiótico se convierte en una problemática ambiental. En Corea, la tilosina se encuentra clasificada como uno de los 20 ingredientes activos de antibióticos veterinarios de mayor preocupación ambiental (Seo *et al.*, 2007), en el Reino Unido se encuentra en la lista de las medicinas veterinarias de riesgo prioritario (Boxall *et al.*, 2011) y en la Unión Europea fue prohibida como promotor del crecimiento en 1999 por la preocupación de la posible resistencia bacteriana que pudiera ser transmitida a humanos (Casewell *et al.*, 2003). Sin embargo, el uso de la tilosina como antibiótico para la prevención y tratamiento de enfermedades permanece (NOAH, 2013).

Muchos de los estudios acerca de la tilosina se han enfocado en su identificación y cuantificación en diferentes matrices por ejemplo tejido animal (Prats *et al.*, 2001; Cherlet *et al.*, 2002; De Liguoro *et al.*, 1998), leche (Bang-Ce *et al.*, 2008), miel (Thompson *et al.*, 2003), alimento (Civitareale *et al.*, 2004), agua superficial (Hu *et al.*, 2008) y subterránea (Blackwell *et al.*, 2004), estiércol porcino (Jacobsen y Halling-Sørensen, 2006) y agua residual porcina (Tagiri-Endo *et al.*, 2009); en su biosíntesis y producción (Stratigopoulos *et al.*, 2004; Keatinge-Clay 2007; Butler *et al.*, 2001); en sus efectos en diferentes microorganismos principalmente patógenos (Diarra *et al.*, 1999; Cornick 2009; Westergaard *et al.*, 2001; Bager *et al.*, 2000), en la degradación de la tilosina A en sistemas de tratamiento aerobios por ejemplo lodos activados (Prado *et al.*, 2009) y SBR (Chénier y Juteau, 2009) y anaerobios a escala laboratorio (Kolz *et al.*, 2005; Stone *et al.*, 2009; Angenent *et al.*, 2008; Chelliapan *et al.*, 2006); en su transferencia de una matriz a otra (De Liguoro *et al.*, 2003), en la identificación de sus transformaciones (Hu *et al.*, 2008) y en producción de metabolitos (Kolz *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2007). Sin embargo, se desconoce el efecto de la concentración de tilosina sobre la remoción de materia orgánica, sólidos y producción de biogás en conjunto en un sistema anaerobio alimentado con agua residual porcina sin separación de sólidos (estiércol y fracción líquida).

2.5.1. Características físico-químicas

En la Tabla 2.6 se muestran algunas propiedades fisicoquímicas de la tilosina.

Tabla 2.6 Propiedades físico-químicas de la tilosina

Propiedad	Valor	Referencia
pKa	3.31; 7.50	Qiang y Adams, 2004
	7.4	O'Neil <i>et al.</i> , 2001
	7.1	Mejía, 2008
Log Kow	1.63	McFarland <i>et al.</i> , 1997
	2.5-3.5	Wollenberger <i>et al.</i> , 2000
Kd (suelo arenoso)	8.3-128	Rabølle y Spliid, 2000
Kd (arcilla)	92	Gupta <i>et al.</i> , 2002
Kd (estiércol porcino fresco)	240	Loke <i>et al.</i> , 2002
	36-295	Blackwell <i>et al.</i> , 2004
Koc (arena)	5500-7990	
Koc (estiércol porcino)	110	

pKa= Constante de disociación.

Kow= Coeficiente de partición octanol-agua. Si Log Kow<1 la sustancia es soluble en agua, si Log Kow>1 la sustancia es adsorbible en lodo.

Kd= coeficiente de adsorción. Si Kd<2 la sustancia es hidrofílica, si Kd>2 la sustancia es hidrofóbica

Koc= coeficiente de distribución entre el carbono orgánico y el agua

La tilosina (Fórmula molecular: $C_{46}H_{77}NO_{17}$) fue obtenida en 1959 por McGuire *et al.*, de un filtrado de cultiva de *Streptomyces fradie*, el cual se aisló de una muestra de tierra de Tailandia. Pertenece al grupo de los macrólidos y se utiliza únicamente en medicina veterinaria. El espectro antimicrobiano ha sido descrito como esencialmente Gram-positivo.

La tilosina es una base débil, en estado seco se cristaliza en pequeñas láminas blanco-amarillentas. La solubilidad de la base en agua tiene efecto en la proporción de 5 mg mL^{-1} a 25°C . Se disuelve bien en la mayoría de los disolventes orgánicos. Forma sales hidrosolubles como los tartratos, los fosfatos, los gluconatos, los lactatos y el clorhidrato.

2.5.2. Dosis administradas

La tilosina es usada en ganado porcino, ganado vacuno y aves de corral para el tratamiento de infecciones. En terneros, la tilosina puede ser administrada en la leche a una concentración de 40 mg kg^{-1} y por vía intramuscular a una concentración de $4\text{-}10 \text{ mg kg}^{-1}$. Después de administrar la tilosina al ganado vacuno existe un periodo de espera de 14 d y en el caso del cerdo de 21 d para que el fármaco sea desechado. La tilosina se concentra en la leche y persiste durante largo tiempo, por lo que no debería administrarse a animales en lactancia

En cerdos las dosis en agua son de 25 mg kg^{-1} , en alimento de $3\text{-}7 \text{ mg kg}^{-1}$ y por vía intramuscular de $2\text{-}10 \text{ mg kg}^{-1}$ para la prevención y control de enfermedades tales como la disentería y la neumonía zoética. La tilosina es usada como aditivo alimentario en cerdos de hasta 6 meses de edad a dosis entre $5\text{-}20 \text{ mg kg}^{-1}$ y en cerdos de hasta 4 meses de edad a dosis de $10\text{-}40 \text{ mg kg}^{-1}$.

En aves de corral la tilosina es administrada en agua para beber a una dosis de 75 mg kg^{-1} , para tratar enfermedades crónicas respiratorias complejas en gallinas e infecciones de sinusitis en pavos, principalmente. La tilosina también ha sido usada para el control de emergencia de la enfermedad “Loque americana” (enfermedad bacteriana) en abejas (Boxall *et al.*, 2011).

2.5.3. Contraindicaciones

La tilosina no se debe administrar en gallinas de postura porque el huevo puede adquirir concentraciones altas del antibiótico, además de que las gallinas no se deben inyectar por vía intramuscular tres días antes de su sacrificio, ni 24 h si la sustancia se proporciona vía oral. En el caso de pavos debe ser de 5 d de espera para el consumo humano después de administrar la tilosina. Las vacas lactantes se deben retirar de la línea de ordeña durante 96 h para evitar el consumo de leche por el ser humano ya que en la leche hay aproximadamente 1 mg.mL^{-1} de tilosina. Los cerdos no se deben sacrificar en un lapso de

21 d tras la administración del fármaco si se utiliza la vía intramuscular y de 4 d si se utiliza la vía oral (Sumano y Ocampo, 1997).

2.5.4. Desdoblamiento (degradación) de la tilosina

La tilosina consiste principalmente de tilosina (factor A), aunque pueden estar presentes diferentes cantidades de desmicosina (factor B), macrocina (factor C) y relomicina (factor D) dependiendo de la fuente de manufactura (Figura 2.3), sin embargo la mayor parte de la actividad biológica reside en la tilosina factor A.

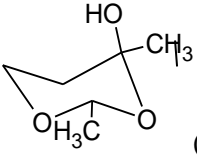
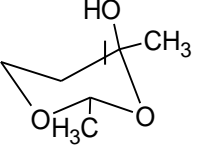
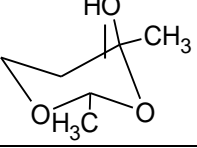
Fórmula general				
Compuesto	R1	R2	R3	Bioactividad relativa
Tilosina (Factor A)	-CHO	-CH ₃	 (Micarosa)	1.00
Desmicosina (Factor B)	-CHO	-CH ₃	-H	0.83
Macrocina (Factor C)	-CHO	-H		0.75
Relomicina (Factor D)	-CH ₂ OH	-CH ₃		0.35

Figura 2.3 Estructura química de la tilosina

Contrario a la base, el tartrato de tilosina es soluble en agua hasta una proporción de 600 mg mL⁻¹. Las soluciones son estables durante 30 d a temperatura ambiente y a un pH de 4-9. Por hidrólisis ácida (pH inferior a 4) se descompone en dos fracciones: el azúcar y la desmicosina (Tilosina B), un producto microbiológicamente activo que posee propiedades físico-químicas similares a la tilosina factor A. Si prosigue el desdoblamiento se liberan los sacáridos neutros micarosa y micaminosa. La tilosina A es convertida en diferentes formas bajo condiciones ácidas, neutrales o alcalinas (Paesen *et al.*, 1995). Algunos estudios han mostrado que los productos de degradación (tilosina B, C, D) son degradados o mineralizados en condiciones aerobias y anaerobias (Kolz *et al.*, 2005; Ingerslev y Halling-Sørensen, 2001).

2.5.5. Mecanismo de acción

La tilosina llega por difusión pasiva al interior de las bacterias y bloquea la síntesis de proteína bacteriana al unirse a la sub-unidad ribosomal 30S. En general el antibiótico es bacteriostático, pero a dosis elevadas puede ser bactericida.

2.5.6. Vida media

La vida media de la tilosina encontrada en diferentes investigaciones se presenta en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7 Vida media de la tilosina

Matriz	Temperatura (°C)	Vida media (d)	Referencia
Estiércol porcino	20	2	Loke <i>et al.</i> , 2000
Arena+ estiércol líquido		3.3-8.1	Ingerslev y Halling-Sørensen, 2001
Estiércol líquido	23	2.4	Oliveira <i>et al.</i> , 2002
Estiércol porcino+ desechos de cama		3.6	De Liguoro, 2003

La tilosina factor A en agua fue degradada en un promedio de 200 d por fotólisis con luz solar y en la oscuridad su pérdida en el mismo intervalo de tiempo fue sólo del 6%. La tilosina C y D son relativamente estables excepto en agua ultrapura en la luz. En el suelo, la tilosina A tiene una disipación promedio de 7 d y la tilosina D es altamente más estable con una disipación promedio de 8 d en suelo esterilizado y no esterilizado. Con los resultados anteriores se demostró que la sorción y la degradación abiótica (fotólisis) son los mayores factores que influyen la pérdida de tilosina en el medio ambiente. (Hu y Coats, 2007).

Kolz *et al.*, (2005) encontraron que los tiempos de desaparición para el 90% de la tilosina, tilosina D y tilosina B en lodos anaerobios fue entre 30 y 130 horas, sin embargo después de ocho meses de incubación del lodo anaerobio aún se encontró tilosina residual remanente en forma de tilosina B.

2.5.7. Resistencia bacteriana a la tilosina

La resistencia bacteriana ocurre por alteración del receptor ribosomal lo cual dificulta la entrada del antibiótico a la célula bacteriana, siendo muy común la resistencia cruzada a otros antibióticos del grupo, por ejemplo la espiramicina y la eritromicina.

2.5.8. Toxicidad

En los seres humanos se han reportado interacciones farmacológicas relevantes entre algunos antibióticos macrólidos, estos implican la formación de complejos estables con enzimas de la subfamilia CYP3A lo cual puede resultar en una disminución de las tasas de biotransformación de fármacos coadministrados. Interacciones similares con CYP450s, principalmente CYP3A, se han encontrado con la tilosina en estudios *in vitro* en microsomas en cerdos, ratas, cabras y ganado vacuno (Zweers-Zeilmaker *et al.*, 1999).

No existe información disponible acerca de los efectos tóxicos de la tilosina en humanos. En la Tabla 2.8 se presentan los valores de toxicidad de la tilosina en diferentes especies.

Se observa en la Tabla que existen datos de toxicidad de la tilosina para diferentes organismos tanto unicelulares como pluricelulares aerobios. En cuanto al efecto del antibiótico en organismos anaerobios, se han encontrado resultados contradictorios pues se han descrito efectos desde insignificantes (Massé *et al.*, 2000; Chelliapan *et al.*, 2006) hasta inhibición considerable de la metanogénesis (Sanz *et al.*, 1996; Lotfin *et al.*, 2005) en sistemas de tratamiento, por lo que es importante investigar el efecto de la tilosina en digestores anaerobios como los que se encuentran localizados en la República Mexicana y son utilizados para tratar las aguas residuales generadas en granjas porcinas.

Tabla 2.8 Toxicidad de la tilosina

Toxicidad	Concentración	Unidades	Especie	Referencia
LD ₅₀	5000 (vía oral)	mg kg ⁻¹	Rata	Boxall <i>et al.</i> , 2011
	695 (intravenoso,)			Boxall <i>et al.</i> , 2011
	100 (intravenoso)			Sumano y Ocampo, 1997
	321 (intravenoso)			Boxall <i>et al.</i> , 2011
	3000 (subcutáneo,)			Boxall <i>et al.</i> , 2011
	>5000 (oral)			Boxall <i>et al.</i> , 2011
	>500 (oral)		Ratón	Sumano y Ocampo, 1997
	>784 (subcutáneo)			Boxall <i>et al.</i> , 2011
	>386 (intravenoso)			Boxall <i>et al.</i> , 2011
	600 (intravenoso)			Sumano y Ocampo, 1997
	>2000 (dérmico)			Boxall <i>et al.</i> , 2011
	5 (oral)			Conejo
	Cerdo	Sumano y Ocampo, 1997		
LC ₅₀	>1.05 (inhalación)		Rata	Boxall <i>et al.</i> , 2011
EC ₅₀	0.411	mg L ⁻¹	S. capricornutum	Eguchi <i>et al.</i> , 2004
	1.38			Halling-Sørensen <i>et al.</i> , 2000
	0.95			De Liguoro <i>et al.</i> , 2003
	1.38			Halling-Sørensen, 2000
	680		D. magna	Wollenberger <i>et al.</i> , 2000
	17.5		Bacterias provenientes de un sistema de lodos activados (experimento aerobio)	Halling-Sørensen <i>et al.</i> , 2003
	54.7		Microorganismos de lodos activados	Halling-Sørensen <i>et al.</i> , 2001
	6.1		Bacterias provenientes de un sistema de lodos activados (experimento anaerobio)	Halling-Sørensen <i>et al.</i> , 2001a
	0.034		M. aeruginosa	Halling-Sørensen <i>et al.</i> , 2000
	LOEC		700	
NOEC	45		D. magna	Wollenberger <i>et al.</i> , 2000
	0.206		S. capricornutum	Eguchi <i>et al.</i> , 2004
	50		Nitrosomonas europaea	Halling-Sørensen <i>et al.</i> , 2001a
LC ₁₀ /EC ₁₀	5000/3306		Lombriz	Baguer <i>et al.</i> , 2000
CIM	0.78-100		Bacterias patógenas de animales y humanos	Hamil <i>et al.</i> , 1965
	6.25-100		Bacterias patógenas de las plantas	Hamil <i>et al.</i> , 1965

LD= dosis letal

LC= concentración letal

EC= concentración efectiva

LOEC= concentración más baja en la que se observa efecto

NOEC= concentración en la que no se observa efecto

CIM= concentración inhibitoria mínima

2.6. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso en el cual se usan microorganismos en ausencia de oxígeno para la estabilización de materiales orgánicos mediante su conversión a biomasa y compuestos como dióxido de carbono y metano. La digestión anaerobia como método de tratamiento de residuos permite reducir la cantidad de materia orgánica contaminante y al mismo tiempo producir energía.

El proceso de digestión anaerobia se lleva a cabo en un reactor completamente cerrado. El influente se introduce en el reactor continua o intermitentemente y es retenido en el mismo durante periodos de tiempo variables.

Actualmente se utilizan dos tipos de digestores, de baja y alta carga (Figura 2.4). En el proceso de digestión de baja carga generalmente no se calienta ni se mezcla el contenido del digestor. Los tiempos de residencia para este proceso varían entre 30 y 60 d. En un proceso de digestión de alta carga el contenido del digestor se calienta y mezcla completamente. El tiempo de residencia necesario es de 15 d o menor. La combinación de estos dos procesos básicos se conoce como proceso de doble etapa. La función básica de la segunda fase consiste en separar los sólidos digeridos del líquido sobrenadante, aunque puede tener lugar una digestión adicional y cierta producción de gases.

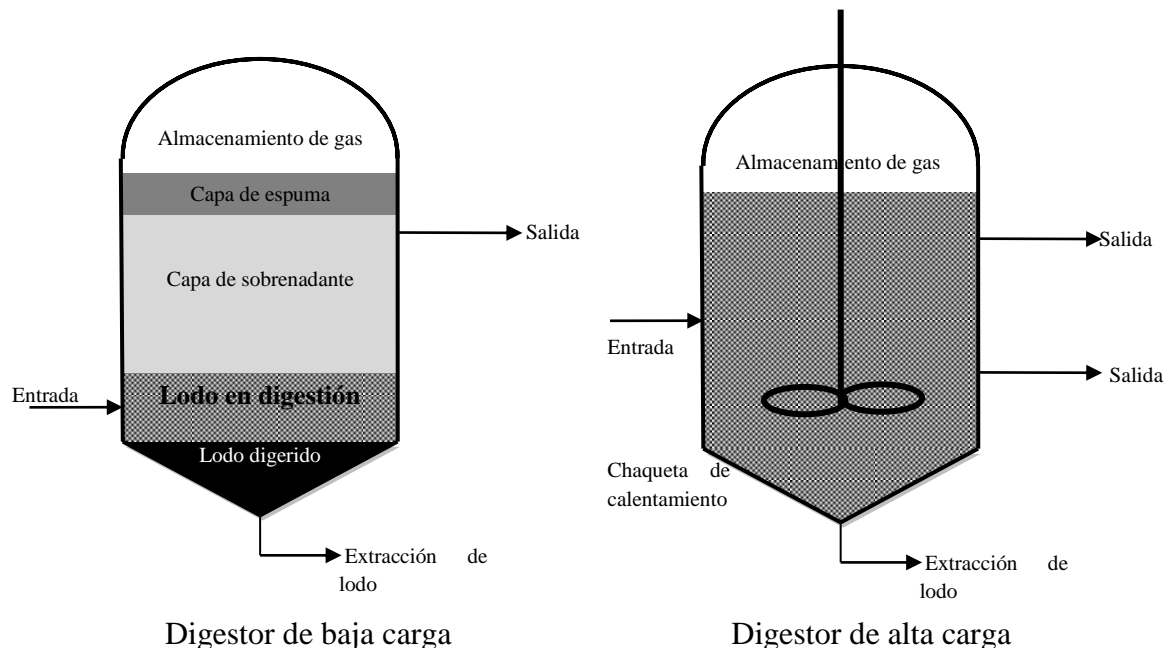


Figura 2.4 Diagrama esquemático de digestores anaerobios típicos

2.6.1. *Metabolismo anaerobio*

La cinética del tratamiento anaerobio puede ser descrita en tres pasos: a) hidrólisis de compuestos de alto peso molecular, b) formación de ácidos grasos volátiles y c) producción de metano (metanogénesis). En el primer paso se lleva a cabo una hidrólisis enzimática de sustancias orgánicas complejas dando como resultado compuestos orgánicos solubles más simples. El segundo paso consiste en la conversión bacteriana de estos compuestos a sustancias orgánicas de bajo peso molecular, principalmente AGV (ácidos grasos volátiles). En el tercer y último paso los productos anteriores son fermentados por bacterias estrictamente anaerobias a metano y dióxido de carbono principalmente, los cuales constituyen los productos finales del proceso.

2.6.1.1. *Factores que influyen en la metanogénesis*

Varios factores ambientales pueden afectar la eficiencia de la digestión anaerobia y la metanogénesis:

- Composición de nutrientes
- Oxígeno disuelto contenido en el digester anaerobio
- Temperatura del digester
- pH
- Concentración de sólidos volátiles
- Concentración de ácidos volátiles

Además de los parámetros antes mencionados existen sustancias tóxicas comunes e inactivantes a los microorganismos en un digester lo cual repercute en la generación de metano, dichas sustancias son:

- Iones de metales pesados: Ciertos metales pueden ser tóxicos si están presentes en grandes concentraciones en el digester anaerobio. Los metales pesados que más influyen en el proceso de digestión son mercurio, cadmio, cromo, plomo, cobre y níquel
- Sulfuros: La formación de sulfuros es una consecuencia inevitable de la reducción anaerobia de sulfatos y de la composición de aminoácidos con contenido de sulfuro. La inhibición o efectos tóxicos pueden ocurrir a concentraciones de 200 mg L⁻¹ de sulfuros en un reactor mesofílico. El sulfuro disuelto puede reaccionar con cualquier metal pesado, excepto el cromo y precipitarlo, así puede funcionar como un quelador de metales pesados tóxicos.
- Gas amoniacado disuelto: El efecto tóxico del amoniacado puede ser confinado a los metanógenos, pero cantidades moderadas tienen algunos efectos en los organismos

hidrolíticos y formadores de ácidos, sin embargo el nivel preciso al cual el nivel de amoníaco es tóxico es incierto. Algunos investigadores han encontrado que concentraciones de gas amoníaco mayores a 700 mg L^{-1} tienen poco efecto en la metanogénesis, mientras que otros reportan inhibición a concentraciones tan bajas como 150 mg L^{-1} .

- Ácidos volátiles no ionizados: Una alta acumulación de ácidos grasos de bajo peso molecular tales como el butírico, propiónico y acético (AV) causa una caída en el pH del digestor. Las fallas que pueden provocar son una inhibición de metanógenos para convertir estos ácidos a metano, carga shock del digestor con AV y la infiltración de sustancias inhibitorias tales como metales pesados, hidrocarburos clorados, cianuros, formaldehidos o cloroformo.
- Cianuro: El cianuro y los nitrilos (nombre genérico de los compuestos que contienen átomos de nitrógeno unidos con triples enlaces a carbonos) inhiben completamente la metanogénesis, sin embargo, no en todos los casos ocurre este fenómeno.
- Otros inhibidores: Algunos detergentes, solventes, plaguicidas, herbicidas, insecticidas y fungicidas.

2.6.2. Ventajas del uso de biodigestores en la producción porcina

La digestión anaerobia para el tratamiento de agua residual porcina ofrece diferentes ventajas tales como: prevenir las emisiones de compuestos orgánicos volátiles, controlar olores, mineralizar nutrientes y recuperar energía a través de la producción de metano. El material resultante de la biodigestión (efluente) contiene altas concentraciones de nutrientes que se encuentran más disponibles como el nitrógeno, fósforo y potasio. Las principales ventajas de los digestores biológicos para el tratamiento de efluentes porcinos son (Bonmati y Flotats, 2002):

- Disminuye la cantidad de vectores transmisores de enfermedades y la diseminación de malos olores.
- Homogeneización de la composición, más intensa cuanto mayor es el tiempo de residencia hidráulico.
- Eliminación de ácidos grasos volátiles (AGV) y otros compuestos fácilmente degradables. La materia orgánica resultante es lentamente o difícilmente degradable, el estiércol digerido no presenta olor desagradable y es un producto más estable. En procesos térmicos posteriores se evitan problemas por volatilización de compuestos.
- Reducción de sólidos totales y volátiles, reducción de materia orgánica degradable y mantenimiento de las concentraciones de nutrientes, transformación de nitrógeno

orgánico a amoniacal. En caso de separar la fase acuosa, el producto resultante presentará un menor volumen, manteniendo la misma riqueza fertilizante.

- Homogeneización en la distribución de partículas, lo cual favorece el diseño y aplicación en procesos posteriores de secado. Hidrólisis de partículas de pequeño tamaño y coloidales y reducción de compuestos orgánicos solubles con lo cual se facilita la separación entre fases solubles y suspensión.
- Consistencia pastosa de la fracción sólida de la porcínaza digerida, lo cual favorece su manipulación.
- Disminución muy significativa de la relación de alcalinidad para favorecer un proceso posterior de nitrificación total o parcial. A su vez y debido a la reducción de materia orgánica, el consumo energético en este proceso será inferior al de la nitrificación de la fracción líquida de la porcínaza fresca.
- Balance energético positivo y proceso productor neto de energía renovable. Contribuye a disminuir las necesidades externas de energía para procesos térmicos posteriores. Permite el tratamiento de mezclas con otros residuos para optimizar la producción energética y facilitar la gestión integral de residuos orgánicos en la zona de aplicación.
- Disminuye potencialmente el uso de fertilizantes sintéticos en la agricultura al utilizar adecuadamente el efluente como fertilizante.
- Elimina coliformes fecales.
- El proceso contribuye a la disminución en la generación de gases de efecto invernadero si el metano producido sustituye una fuente no renovable de energía.
- Es económicamente benéfico para las empresas por la generación de energía eléctrica y por su ahorro por este concepto.
- Puede adaptarse al tamaño de las explotaciones porcínas, por lo tanto puede usarse en granjas de gran escala, pero también puede usarse el modelo de plantas de biogás de polietileno de bajo costo aplicado a granjas pequeñas, el cual ha sido adoptado por parte de agricultores en América Latina (Rivera, 2011).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

La disminución de la carga volumétrica de tilosina (CVT) en sistemas anaerobios de baja carga disminuye la probabilidad de un efecto inhibitorio en la biomasa permitiendo una remoción de materia orgánica eficiente.

3.2. Objetivo general

Evaluar el efecto de la concentración de tilosina en un sistema anaerobio con mezcla intermitente sobre la remoción de materia orgánica con tres diferentes tiempos de residencia hidráulica.

3.3. Objetivos específicos

- Seleccionar y caracterizar el efluente para el presente estudio proveniente de aguas residuales de la industria porcina de las diferentes etapas productivas (maternidad, destete, engorda, mezcla).
- Obtener biomasa aclimatada al tratamiento de agua residual porcina mediante la operación de un digester anaerobio a escala piloto (0.48 m³).
- Implementar y validar un método analítico para la detección de tilosina por HPLC-UV-Vis.
- Determinar la concentración de tilosina umbral de inhibición de la metanogénesis en la biomasa del digester anaerobio.
- Determinar la concentración de tilosina en residuos (lodos y agua residual) de una granja porcina en México.
- Determinar los mecanismos que participan en la remoción de tilosina en un sistema biológico anaerobio.
- Evaluar la influencia de la concentración de tilosina y del TRH sobre la generación de biogás en un digester anaerobio sin separación de sólidos.

3.4. Alcances

- Se utilizará agua residual porcina real.
- Se utilizará un sistema anaerobio de 0.48 m³ para la obtención de biomasa aclimatada al tratamiento de agua residual porcina.
- Se utilizarán sistemas anaerobios de 0.055 m³ con alimentación y mezclado intermitente para la determinación de la influencia de la concentración de tilosina sobre diferentes TRH.

3.5. Justificación

La razón por la cual los productos farmacéuticos son de interés en el tratamiento de aguas residuales es porque al ser sustancias desarrolladas con la intención de realizar un efecto biológico, pueden afectar a la parte activa (biomasa) de los sistemas de tratamiento. Asimismo porque son compuestos persistentes se desarrollan a fin de evitar que la sustancia se inactive antes de tener un efecto curativo), tendiendo a bioacumularse y provocar efectos nocivos cuando son descargados en ecosistemas acuáticos y terrestres. Algunos compuestos no son persistentes pero si de lenta biodegradación por lo que su constante introducción al medio ambiente puede provocar un efecto inhibitorio similar que afecta el medio ambiente.

Para atacar la problemática generada por los fármacos, se tiene que ir a la fuente principal de su liberación, es decir, la utilización de estos compuestos tanto en humanos como en animales. Existe una gran cantidad de información acerca del destino y transformaciones de dichos compuestos liberados por humanos, sin embargo, en cuanto a los fármacos de uso veterinario la información es escasa. Las investigaciones sobre éstos fármacos se han realizado principalmente en países desarrollados donde su uso es más restringido. En los países en desarrollo, en donde las leyes sobre el uso y venta de fármacos para uso animal son menos estrictas, las investigaciones son escasas. Además, en México la problemática se agrava porque por lo general no se le da un adecuado tratamiento a los desechos animales.

En cuanto a las aguas residuales generadas en granjas porcinas, son pocos los estudios que existen acerca de los residuos de antibióticos liberados al medio ambiente y su afectación a los sistemas de tratamiento (cuando existe). Además la detección de antibióticos se dificulta en este tipo de aguas residuales porque las elevadas concentraciones de sólidos (superiores a 10,000 mg L⁻¹) y materia orgánica (DQO superiores a 15,000 mg L⁻¹) no permiten detectar tan fácilmente dichos compuestos, ya que deben ser aislados de la muestra pues se encuentran en concentraciones tan bajas como ng L⁻¹.

Uno de los antibióticos veterinarios más utilizados en México y en el mundo es la tilosina, la cual es usada principalmente como promotor del crecimiento en granjas porcinas en Estados Unidos, México y otros países. Sin embargo, en la Unión Europea está prohibido su uso para este fin debido a la preocupación sobre la generación de resistencia bacteriana en el medio ambiente y en animales, la cual puede ser transferible a los humanos.

La tilosina ha sido estudiada en algunos sistemas anaerobios para el tratamiento de aguas residuales, sin embargo, se han encontrado resultados contradictorios, puesto que por un lado algunas investigaciones indican que la presencia de tilosina afecta de forma negativa la metanogénesis (Sanz *et al.*, 1996; Lotfin *et al.*, 2005), mientras que por otro lado también se ha encontrado que la presencia (aún a altas concentraciones) de tilosina no tiene ningún

efecto inhibitorio sobre la metanogénesis (Massé *et al.*, 2000; Chelliapan *et al.*, 2006). Por lo anterior, para evaluar el efecto de la presencia de tilosina sobre un sistema de tratamiento se deben realizar estudios específicos para cada tipo de agua residual en particular (Chelliapan *et al.*, 2006). En ese sentido, la finalidad de la presente tesis es evaluar el efecto de la tilosina en agua residual porcina en digestores anaerobios con diferentes tiempos de residencia hidráulica.

4. METODOLOGÍA

4.1. Planteamiento metodológico

En la Figura 4.1 se presenta el planteamiento metodológico en el que se sustenta la presente investigación.

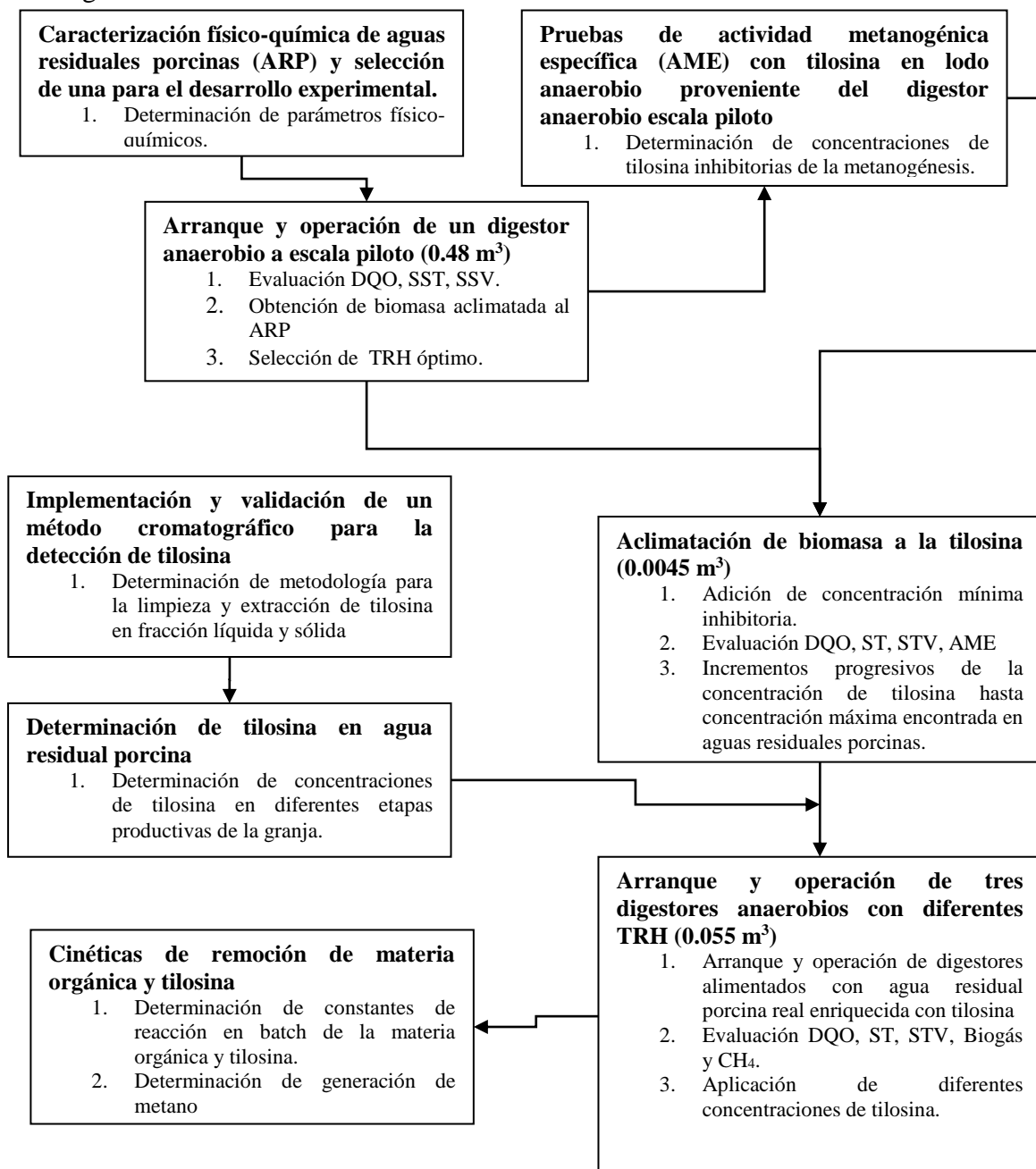


Figura 4.1 Diagrama de flujo del estudio sobre el efecto, transporte, distribución y degradación de la tilosina en digestores anaerobios

4.2. Caracterización físico-química de aguas residuales porcinas y selección de una para el desarrollo experimental

Se analizaron las aguas residuales generadas en cinco granjas porcinas en diferentes estados de la República Mexicana (Puebla, Morelos, Campeche y Yucatán) con el fin de determinar sus características físico-químicas en diferentes etapas de desarrollo de los animales. Las muestras fueron tomadas en los canales de descarga de las porquerizas antes de entrar al tren de tratamiento (en caso de contar con él). Las muestras fueron recolectadas en botellas plásticas y almacenadas a 4°C para su posterior análisis. Los parámetros evaluados se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Parámetros físico-químicos evaluados en la caracterización de aguas residuales porcinas

Parámetro	Técnica
DQO	APHA, 2012
DBO ₅	APHA, 2012
SST	APHA, 2012
SSV	APHA, 2012
NTK	APHA, 2012
N-NH ₄	APHA, 2012
N (NO ₃ +NO ₂)	APHA, 2012
P _{total}	APHA, 2012
Coliformes Fecales	APHA, 2012

Con los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica y de acuerdo con la información proporcionada por los productores porcinos de cada una de las granjas con respecto al uso y administración de medicamentos a los animales en cada etapa de crecimiento de la granja, se eligió un agua residual porcina que presentara altas concentraciones de materia orgánica y sólidos y además estuviera libre de antibióticos para ser utilizada en la fase experimental inicial de la presente investigación.

4.3. Arranque y operación de un digestor anaerobio a escala piloto

Se operó un digestor anaerobio a escala piloto de 0.48 m³ con el fin de obtener biomasa aclimatada al tratamiento de aguas residuales porcinas. El digestor anaerobio utilizado fue de tipo alemán, con tapa y fondo cónico, con una inclinación de 45° (Stukenberg *et al.*, 1992). El digestor fue de material y forma comercial, utilizado generalmente como fosa séptica y adaptado para ser utilizado como digestor.

El digester fue operado sin mezcla simulando el modo de operación de los biodigestores que recientemente se han instalado en varias granjas del país. El digester fue alimentado con agua residual de una granja porcina sin separación, es decir, la mezcla de heces, orina, alimento y agua de lavado de las naves de cerdos. El agua residual fue recolectada una vez por semana durante toda la experimentación y almacenada a 4°C para prevenir su degradación. El agua residual porcina fue temperada previo a su alimentación en el digester por aproximadamente 2 h.

El digester utilizado fue herméticamente sellado y operado a una temperatura constante de 30°C por medio de una chaqueta de calentamiento. La alimentación se realizó por medio de un solo pulso de agua residual porcina al día, debido a la dificultad del manejo de este tipo de aguas que contienen una gran cantidad de sólidos y favorecen el taponamiento de las bombas y tuberías. La alimentación se realizó por el fondo del digester, en la zona de la parte cónica para favorecer una mínima mezcla una vez al día durante el pulso de alimentación. Para tal efecto, el agua de alimentación se depositaba en un cárcamo de bombeo colocado 0.5 m por arriba del digester lo que permitió vencer la carga hidráulica del mismo. En la Figura 4.2 se muestra un diagrama esquemático del digester y una fotografía del digester utilizado en esta fase experimental.

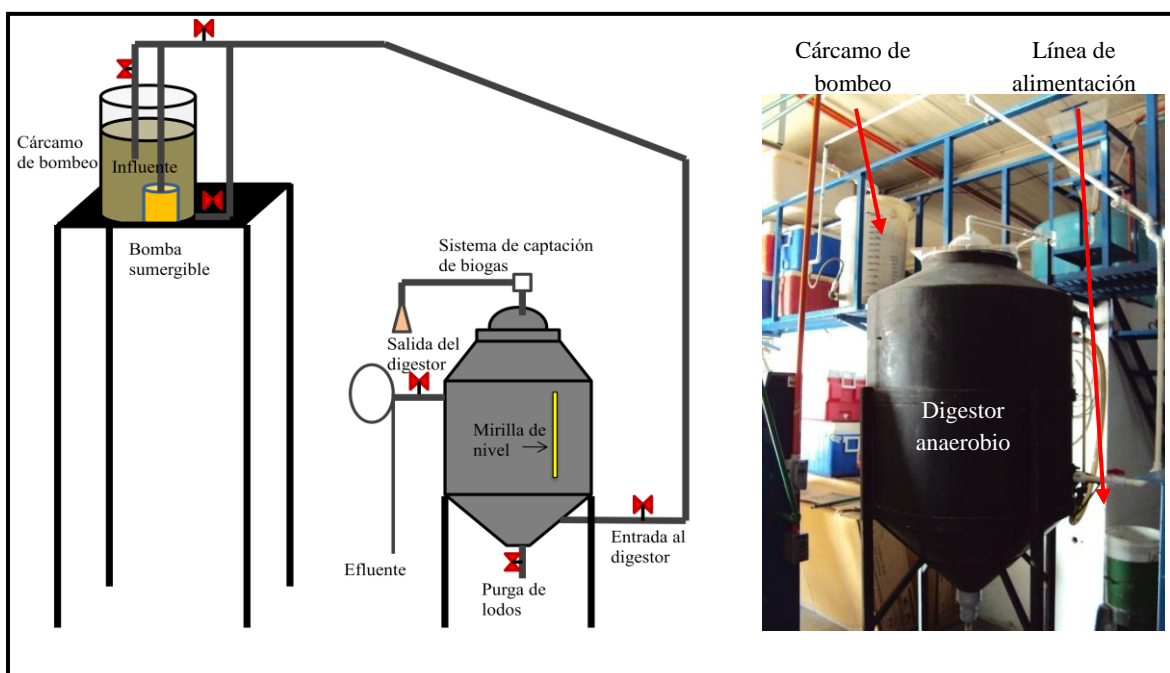


Figura 4.2 Diagrama esquemático y fotografía del digester anaerobio experimental a escala piloto utilizado

El digester utilizado tiene una capacidad total de 600 L y un volumen útil de 481 L, lo que permite tener el espacio necesario para el biogás producido y espacio adicional en caso de

presentarse formación de espuma. En la Figura 4.3 se muestran las dimensiones del digestor utilizado.

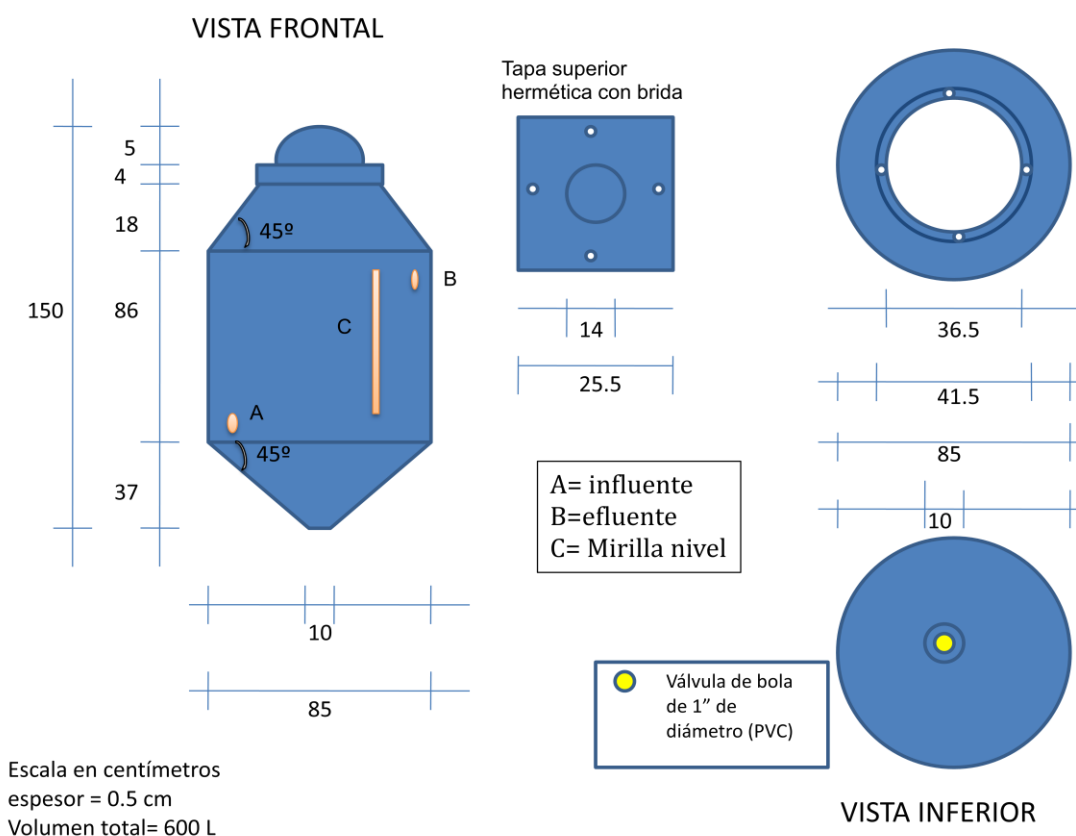


Figura 4.3 Dimensiones del digestor experimental a escala piloto utilizado

Los biodigestores instalados en la República Mexicana operan con altos TRH entre 60 y 90 d, por lo que se decidió iniciar la operación del digestor experimental con un TRH de 40 d para observar su comportamiento y de acuerdo a los resultados obtenidos de esta etapa disminuir o aumentar el tiempo de residencia. El digestor experimental a escala piloto fue operado entonces con tres tiempos de residencia hidráulica diferentes como se muestra en la Tabla 4.2, iniciando con 40 d, luego 30 d y finalmente con 60 d de TRH.

Tabla 4.2 Tiempos de residencia utilizados en la operación del digestor anaerobio a escala piloto

TRH (d)	Q (L d ⁻¹)	Tiempo de duración (d)	Periodo de operación (d)
30	16	163	154-316
40	12	153	1-153
60	8	176	317-498

Los parámetros de seguimiento medidos en el digestor anaerobio a escala piloto para la obtención de biomasa aclimatada al agua residual porcina se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Monitoreo del digestor a escala piloto

Parámetro	Frecuencia	Técnica
pH	1 vez por semana	Potenciométrico
Temperatura	1 vez por semana	Termopar
Conductividad	1 vez por semana	Electrodo
DQOt y DQOs	1 vez por semana	APHA, 2012
SST y SSV	1 vez por semana	APHA, 2012
ST y STV	1 vez por semana	APHA, 2012
N-NH ₄	1 vez por semana	APHA, 2012

4.3.1. Análisis de varianza

Con los valores de materia orgánica y sólidos obtenidos para los tres TRH (30, 40 y 60 d) se realizó un análisis de varianza ANOVA unidireccional con el software estadístico Minitab 15 con el objetivo de comparar los resultados obtenidos y descartar que las diferencias entre los resultados de cada TRH se deban a errores en la medición y en realidad sean producto específicamente del tipo de tratamiento (TRH aplicado).

4.4. Pruebas de Actividad Metanogénica Específica (AME) con tilosina

La prueba de Actividad Metanogénica Específica (AME o SMA, por sus siglas en inglés) ha sido muy estudiada para determinar la actividad de un lodo en varios procesos anaerobios y su potencial para convertir sustratos complejos en metano (Ince *et al.*, 1995, McHugh *et al.*, 2004; Sumino *et al.*, 2007). De esta forma a partir de cantidades conocidas de biomasa bajo condiciones establecidas y un sustrato definido se puede evaluar la producción de metano por unidad de biomasa a lo largo de un periodo de tiempo. Realizar la prueba de AME es importante para determinar la capacidad de la biomasa anaerobia para el tratamiento de ciertos tipos de efluentes o residuos y para evaluar el comportamiento del lodo bajo el efecto de compuestos potencialmente inhibitorios o tóxicos y determinar su valor umbral (Souto *et al.*, 2010).

La prueba de AME se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Souto *et al.*, (2010), (con algunas modificaciones), en el que se evaluó la influencia de diferentes condiciones de incubación a fin de estandarizar el protocolo para la prueba.

4.4.1. Metodología general de la prueba de AME

Se prepararon dos soluciones nutritivas, una de macronutrientes y otra de micronutrientes como se describe en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Solución nutritiva de macronutrientes y micronutrientes para la prueba de AME

Macronutrientes	Concentración (g L ⁻¹)	Micronutrientes	Concentración (g L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	6.50	FeCl ₃ ·6H ₂ O	2.00
K ₂ HPO ₄	1.50	ZnCl ₂	0.05
NH ₄ Cl	5.00	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.03
Na ₂ S·9H ₂ O	0.50	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.50
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.00	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.05
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.00	AlCl ₃ ·6H ₂ O	0.05
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.00
		H ₃ BO ₃	0.01
		HCl	1 mL/L

Las soluciones se calentaron hasta su ebullición y se burbujeó una corriente de nitrógeno hasta que las soluciones se enfriaron. Posteriormente las soluciones fueron llevadas a una cámara de ambiente anaerobio marca Coy (Figura 4.4) y vaciadas en botellas serológicas de 60 mL de acuerdo a la relación de volúmenes descrita más adelante.



Figura 4.4 Cámara de ambiente anaerobio utilizada en la experimentación

En el procedimiento original se menciona que las botellas son selladas herméticamente con tapón de hule y aluminio y después son sacadas de la cámara anaerobia (la cual sólo trabaja con N₂, en este caso) y purgadas con una mezcla de N₂: CO₂ (70%, 30%, v/v). Posteriormente se introducen nuevamente a la cámara para inocularlas.

En la presente experimentación la cámara anaerobia trabajo directamente con la mezcla de N₂: CO₂ (70%, 30%, v/v) con la finalidad de realizar todo el procedimiento dentro de la cámara y no manipular demasiado las botellas, asegurando de esta manera la atmósfera anaerobia dentro de las mismas una vez selladas herméticamente.

Las botellas fueron inoculadas con lodo anaerobio (aclimatado al agua porcina en el digester piloto) previamente puesto a vacío a 20 psi por 24 h en la precámara de la cámara de ambiente anaerobio, lo que permitió eliminar el sustrato remanente que pudiera contener. El lodo utilizado para las pruebas de AME debe ser caracterizado previamente en cuanto al contenido de SSV ya que debe guardar una relación F/M de 0.4 g DQO g SSV⁻¹.

A las botellas inoculadas con el lodo se les adicionó una solución de acetato de sodio (2.0 g DQO L⁻¹ o 1.7 g L⁻¹ como acetato de sodio) como fuente de carbono y energía.

La relación que debe guardarse para esta prueba de acuerdo a lo reportado por Souto *et al.*, (2010) es la siguiente:

Solución de acetato de sodio: Inóculo: Macronutrientes: Micronutrientes

(9.03 L: 1 L: 1 L: 10 mL)

Los cálculos se realizan en base a la relación F/M mencionada anteriormente para un volumen de 60 mL, guardando un espacio libre del 10% de la capacidad del frasco para la fase gaseosa.

Una vez que los frascos fueron llenados con la solución de macronutrientes, micronutrientes, lodo anaerobio y solución de acetato de sodio (en ese orden), se adiciona la concentración de tilosina deseada, con un blanco sin antibiótico. Cada muestra se realiza por triplicado.

Posteriormente, los frascos fueron sellados con tapón de hule y aluminio y retirados de la cámara de ambiente anaerobio. Para mantener un mejor contacto entre la biomasa y el medio, los frascos se mantuvieron en agitación por medio de un agitador orbital a 100 rpm y a una temperatura de 30°C (similar a la del digester anaerobio a escala piloto, de donde fue tomado el inóculo)

Para medir el metano generado se utilizó un método volumétrico por medio de desplazamiento de líquido, puesto que Souto *et al.*, (2010), demostraron que estadísticamente no existen diferencias en la medición de metano con una solución alcalina, un método cromatográfico y un método manométrico. La solución utilizada para el lavado del biogás y obtención del metano consistió en una solución 0.1 M de NaOH, la cual fue colocada en una botella serológica de 1 L, sellada con tapón de hule y aluminio y colocada en forma invertida (frasco Mariotte). La botella fue conectada por medio de mangueras al frasco con inóculo y a una probeta (Figura 4.5). Una vez colocado el sistema de medición de metano, se tomó la lectura del líquido desalojado en la probeta a intervalos de tiempo regulares a fin de identificar el periodo de tiempo en el que se obtiene la máxima producción de metano de acuerdo a la concentración de fuente de carbono adicionada.



Figura 4.5 Fotografías de la prueba de AME

4.4.2. Cálculos para la determinación de AME

La actividad metanogénica específica se determinó de acuerdo a la Ecuación 4.1.

$$\text{Ecuación 4.1 } A_{CH_4} = \frac{R * 24}{FC * MSSV}$$

Donde:

R=velocidad de producción de CH₄ (mL CH₄ d⁻¹)

24= factor de conversión de horas a días

FC= factor de conversión de mL CH₄ a g DQO (mL CH₄ g DQO⁻¹) (Tabla 4.5)

MSSV= masa de lodo en botella serológica (g SSV)

Tabla 4.5 Factor de conversión para cálculos de AME (Cisneros *et al.*, 2003)

Temperatura de la prueba	CH ₄ seco (mL CH ₄ g DQO ⁻¹)	CH ₄ húmedo
10	363	367
15	369	376
20	376	385
25	382	394
30	388	405
35	395	418
40	401	433
45	408	450
50	414	471

4.4.3. AME en lodo anaerobio proveniente del digestor piloto con diferentes concentraciones de tilosina

Se evaluó la AME a diferentes concentraciones de tilosina (Tabla 4.6) con lodo anaerobio proveniente del digestor piloto que trata agua residual de la industria porcina sin separación (fracción sólida y líquida) con el fin de comparar los resultados con los obtenidos por Shimada *et al.*, (2008). Estos autores encontraron que para lodo granular proveniente de un reactor UASB, que trata agua residual de la industria cervecera, altas concentraciones de tilosina (167 mg L⁻¹) inhiben la producción de metano, mientras que bajas concentraciones del antibiótico (1.687 mg L⁻¹) no inhiben su producción.

Tabla 4.6 Concentraciones de tilosina adicionadas en la prueba de AME con lodo anaerobio proveniente del digestor piloto

Concentración de tilosina (mg L ⁻¹)		
0.0	0.01	0.05
0.1	0.5	1
5	10	30
50	100	400
1000		

La tilosina utilizada durante la experimentación fue tartrato de tilosina grado reactivo, misma que es utilizada como promotor del crecimiento en animales. La prueba se siguió durante 28 d para determinar la producción de metano.

4.5. Aclimatación de biomasa a la tilosina

De acuerdo a los resultados de la etapa anterior se seleccionó la concentración de 0.01 mg L^{-1} de tilosina para comenzar a aclimatar biomasa (proveniente del digestor anaerobio escala piloto) al antibiótico. Esta concentración se seleccionó porque no afectó de forma drástica a los microorganismos anaerobios.

Para realizar esta actividad se utilizaron 4 reactores plásticos de 4.5 L (0.0045 m^3) de volumen útil (Figura 4.6) que fueron operados con diferentes TRH, a una temperatura constante de 30°C (en un cuarto caliente) y con agitación orbital. Los reactores fueron alimentados con agua residual de la industria porcina sin separación (fase sólida y fase líquida). El agua residual fue recolectada una vez por semana durante toda la experimentación y almacenada a 4°C para prevenir su degradación. El agua residual porcina fue temperada previamente a su alimentación en el digestor por aproximadamente 2 h. Una vez estabilizado el sistema a remociones de DQO superiores al 60%, se realizaron incrementos progresivos de la concentración de tilosina hasta la concentración máxima encontrada en aguas residuales (0.065 mg L^{-1} (determinada en el presente trabajo)). Uno de los reactores (R4) funcionó como testigo (sin adición de tilosina).



Figura 4.6 Reactores anaerobios utilizados en la etapa de aclimatación de biomasa a la tilosina

Los reactores fueron inoculados con 10% de lodo proveniente del digestor anaerobio escala piloto, se calculó la adición inicial de tilosina a fin de obtener una concentración de 0.01 mg L^{-1} . La alimentación de los reactores se realizó diariamente mediante una sedimentación, retiro del sobrenadante y reposición del mismo a fin de mantener los TRH deseados.

En la Tabla 4.7 se presenta un resumen de los TRH y concentración de tilosina aplicados a los cuatro reactores durante la etapa de aclimatación. Los reactores fueron operados inicialmente con los mismos TRH evaluados para el digestor escala piloto; sin embargo, de

acuerdo a los resultados de eficiencia de remoción de DQO obtenidos se decidió disminuir los mismos a partir del día de operación 88 y hasta el final de la experimentación.

Tabla 4.7 Cambios realizados durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina

Etapa	Reactor Día de operación	R1		R2		R3		R4		
		[TYL] (mg L ⁻¹)	TRH (d)	[TYL] (mg L ⁻¹)	TRH (d)	[TYL] (mg L ⁻¹)	TRH (d)	[TYL] (mg L ⁻¹)	TRH (d)	
1	1-22	0.01	30	0.01	40	0.01	60	0	30	
2	23-87	0.05		0.05		0.05				
3	88-130	0.05	15	0.05	20	0.05	25			15
4	131-229	0.065		0.065		0.065				

Los parámetros de seguimiento de los reactores anaerobios utilizados para la aclimatación de la biomasa a la tilosina se presentan en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8 Monitoreo del sistema (aclimatación de biomasa a la tilosina)

Parámetro	Frecuencia	Técnica
pH	1 vez por semana	Potenciométrico
Temperatura	1 vez por semana	Termopar
Conductividad	1 vez por semana	Electrodo
DQOt y DQOs	1 vez por semana	APHA, 2012
ST y STV	1 vez por semana	APHA, 2012
N-NH ₄	1 vez por semana	APHA, 2012

Se realizaron pruebas de AME una vez estabilizado el sistema a la concentración de tilosina en evaluación siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.4.1.

4.5.1. Análisis de varianza

Se realizó un análisis de varianza ANOVA unidireccional con el software estadístico Minitab 15. Los valores analizados corresponden a los resultados de materia orgánica y sólidos obtenidos para los cuatro reactores en los dos diferentes TRH (30, 40, 60 y 15, 20, 25 d) con el objetivo de determinar la variación de las remociones respecto al TRH.

4.6. Implementación y validación de un método cromatográfico para la determinación de tilosina

Se implementó y validó una técnica analítica por medio de cromatografía de líquidos para la detección y cuantificación de tilosina en agua residual porcina. La problemática de la

detección del antibiótico en este tipo de aguas es su elevada concentración de sólidos por lo que se desarrolló una metodología para la limpieza de la muestra y extracción del antibiótico.

4.6.1. Reactivos

La tilosina (pureza 99.8%) fue obtenida de Sigma (Steinheim, Alemania). Los solventes y reactivos utilizados fueron grado plaguicida y HPLC. El metanol y el acetato de amonio fueron obtenidos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), el acetonitrilo fue obtenido de Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA).

4.6.2. Cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento (HPLC)

La detección del antibiótico se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento (HPLC) en las instalaciones de la Universidad Politécnica del Estado de Morelos (UPEMOR) gracias a una colaboración con el departamento de Ingeniería en Tecnología Ambiental.

El HPLC utilizado fue Perkin Elmer Serie 200 en fase reversa con detector de UV/Vis de onda variable equipado con una bomba binaria (Figura 4.7). La columna utilizada es Waters Atlantis dC18 (4.6x250 mm, 5 μm de tamaño de partícula). Se inyectaron 20 μL de muestra al cromatógrafo de líquidos mediante una microjeringa de 50 μL para asegurar el volumen adecuado. La fase móvil consistió en acetonitrilo/acetato de amonio 20 mM (35:65, v/v) con un flujo constante de 1.0 mL min^{-1} (Hu *et al.*, 2008).

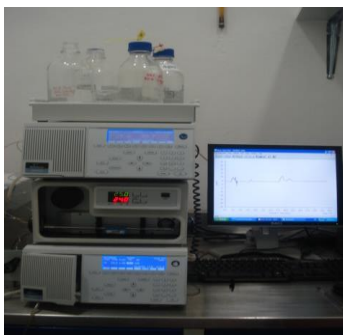


Figura 4.7 Cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento

Se realizaron diferentes pruebas modificando la temperatura del horno de la columna, el pH y la longitud de onda con el objeto de determinar las mejores condiciones de operación del cromatógrafo con el fin de obtener una señal de respuesta y separación del compuesto más definidas, partiendo de lo reportado por Hu *et al.*, (2008). Se realizó también una prueba en un equipo de refracción para garantizar que el pico encontrado en el cromatograma correspondiera a la tilosina A y no a otro compuesto.

4.6.3. Estrategia para la detección del antibiótico

Para la detección y cuantificación del antibiótico, se realizó un análisis cuantitativo con soluciones sintéticas con el objetivo de identificar el tiempo de retención de la tilosina en el cromatógrafo. A continuación se muestra la estrategia para la detección de la tilosina en el orden de magnitud de microgramos.

- 1) Detección del compuesto a altas concentraciones (mg) para la determinación del tiempo de retención.
- 2) Variación de las condiciones de operación (pH, temperatura, longitud de onda) del cromatógrafo de líquidos
- 3) Detección del compuesto en μg

4.6.4. Validación del método cromatográfico para la detección de tilosina por medio de HPLC con muestras sintéticas

El objetivo de la validación del método es evaluar el proceso para determinar la aptitud del sistema de medición y proporcionar datos confiables.

La linealidad del método se realizó de acuerdo a la prueba de desempeño del sistema de aseguramiento de calidad del Instituto Mexicano de Tecnología del agua (IMTA, 2004). Una vez seleccionadas las mejores condiciones de operación del equipo se trazó una curva de calibración de cinco puntos en un intervalo de concentración de 1 hasta $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (lo que representa concentraciones reales de 1 a $50 \mu\text{g L}^{-1}$, puesto que las muestras son concentradas, es decir, pasan por un proceso de limpieza y recuperación de los analitos disminuyendo su volumen de 1 L a 1 mL (ver apartados 4.6.5.1 y 4.6.5.2)).

4.6.4.1. Límite de detección (LD)

Para el cálculo del límite de detección se prepararon seis blancos y cuatro muestras sintéticas de forma independiente de una concentración igual a la más baja de la curva de calibración, se analizaron las muestras y se obtienen las concentraciones de los blancos y de las muestras sintéticas. El cálculo del LD se obtiene mediante la Ecuación 4.2.

$$\text{Ecuación 4.2 } LD = B + ts$$

Donde:

B=promedio de los resultados de los blancos

t=valor de t-student a un 95% de confianza y n- grados de libertad

s=desviación estándar de las cuatro muestras sintéticas

4.6.4.2. Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación se calcula con la Ecuación 4.3.

$$\text{Ecuación 4.3 } LC = 10s + B$$

Donde:

B=promedio de la concentración de los blancos

s=desviación estándar de las cuatro muestras sintéticas

4.6.4.3. Precisión del método

La determinación de la precisión del método se mide como el coeficiente de variación (CV), para ello se prepararon tres muestras sintéticas de forma independiente (con las mismas concentraciones de las del límite de detección) y se midió su concentración. La precisión del método se calcula con la Ecuación 4.4.

$$\text{Ecuación 4.4 } \%R = \frac{\text{concentración.cuantificada}}{\text{concentración.teórica}} \times 100$$

Se calculan el promedio de los porcentajes de recuperación y la desviación estándar. El CV se calcula con la Ecuación 4.5.

$$\text{Ecuación 4.5 } \%R = \frac{s}{R} \times 100$$

Donde:

R=valor promedio de los %R (porcentajes de recuperación) de las muestras sintéticas

s=desviación estándar de los %R de las muestras sintéticas

4.6.4.4. Exactitud del método

La exactitud del método se calcula con la siguiente fórmula a partir de los datos generados para calcular la precisión (Ecuación 4.6).

$$\text{Ecuación 4.6 } \textit{Exactitud} = \frac{\text{concentración.cuantificada.promedio}}{\text{concentración.real}} \times 100$$

4.6.5. Validación del método cromatográfico para la detección de tilosina por medio de HPLC con muestras reales

A diferencia de la validación del método cromatográfico con muestras sintéticas, la validación del método con muestras reales es mucho más compleja debido a la elevada

concentración de sólidos, por lo cual se implementó un sistema de limpieza para las muestras tanto en fase líquida como en fase sólida, el cual se detalla a continuación.

4.6.5.1. Limpieza de la muestra en fase líquida

El tratamiento de la muestra en fase líquida se basó inicialmente en el desarrollado por Watkinson *et al.*, (2009) quienes filtraron las muestras únicamente a través de filtros de 0.22 μ m, sin embargo, en el presente estudio se encontró que con ese tamaño de poro el tiempo de filtración era de 1 h por cada 2 mL de muestra. Por ello, se realizaron ensayos con diferentes filtros (diferentes tamaños de poro) a fin de encontrar el tren de filtración adecuado para la remoción de los sólidos de la muestra en el menor tiempo. El tren de filtración obtenido después de varias pruebas (Figura 4.8) y los tiempos requeridos para el filtrado de muestras de agua residual porcina real para la extracción de tilosina se muestran en la Tabla 4.9.

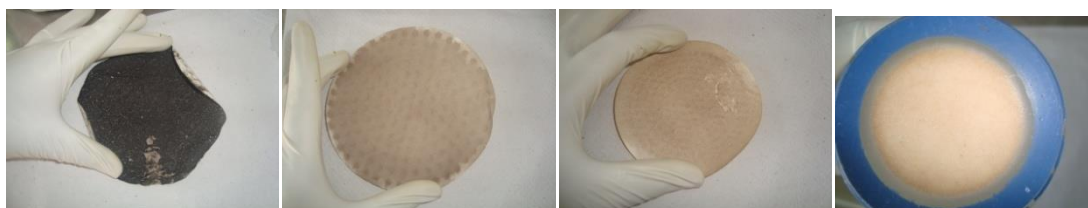


Figura 4.8 Fotografías de los filtros utilizados después de filtrar la muestra de agua residual porcina

Tabla 4.9 Tren de filtración para la limpieza de la fase líquida de agua residual porcina

Tamaño de poro (μ m)	Ø filtro (cm)	Volumen filtrado (mL)	Tiempo de filtrado (min)
20-25	12.5	100	60
10	12.5	100	60
8	12.5	50	10
2.5	9	50	10
1.2	2.4	20	10
0.45	4.7	10	15

Una vez filtrada la muestra, ésta fue acidificada a un pH de 3.0 con ácido sulfúrico (H₂SO₄), posteriormente se hizo pasar el líquido por cartuchos HLB de 200 mg SPE (extracción en fase sólida por sus siglas en inglés) con un flujo de 2-3 mL min⁻¹ utilizando un manifold a vacío, los cartuchos fueron previamente acondicionados con 5 mL de acetonitrilo y 5 mL de solvente de lavado (acetonitrilo:agua destilada 85:15, v/v) y enjuagados con 5 mL de agua grado HPLC a una velocidad de 1 mL min⁻¹. Una vez que se

hizo pasar la muestra por el cartucho y la tilosina fue retenida dentro de él, los cartuchos son lavados con 3 mL de metanol al 5% y secados a vacío por 5 min, posteriormente son eluidos con 2 mL de metanol. A la muestra obtenida de los cartuchos se le agregan 500 μL de agua grado HPLC y posteriormente es sometida a una reducción en un baño de agua a 45°C bajo una corriente de nitrógeno a fin de obtener una muestra de 1 mL. Se determina su concentración de tilosina en el HPLC.

4.6.5.2. Limpieza de la muestra en fase sólida

El procedimiento utilizado para la extracción de la tilosina absorbida en la biomasa y/o sólidos se realizó con una modificación del método desarrollado por De Liguoro *et al.*, (2003). Para ello se tomaron muestras de los sólidos del agua sedimentada, las cuales se pusieron en cápsulas de porcelana a peso constante. Las cápsulas con la muestra se secan a 103-105°C y se determinan los sólidos totales (biomasa seca). Posteriormente se toma 1 g de biomasa seca y se agita con 1 mL de buffer de fosfato (0.1 mol L⁻¹ NaH₂PO₄, pH=2.5) y 2 mL de metanol, posteriormente es sonicado por 10 min y centrifugado a 3,000 rpm por 10 min para finalmente recolectar el sobrenadante. Este procedimiento se realizó por triplicado y se adicionaron 14 mL de agua destilada. Posteriormente el analito es detectado por HPLC.

4.6.5.3. Linealidad del método

Para observar la linealidad de la tilosina en el tratamiento de la muestra, se trazó una curva de calibración de ocho puntos en un rango de concentración teórica en la fase líquida y sólida (5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Esta prueba consistió en realizar todo el procedimiento general de limpieza de la muestra mediante soluciones sintéticas y reales. Con los resultados de la curva se calcula la desviación estándar y la repetibilidad (CV).

De los resultados obtenidos se dedujo estadísticamente la confiabilidad de los métodos propuestos para la detección y cuantificación del antibiótico.

Para el cálculo de los límites de confianza (LCON) se utiliza la Ecuación 4.7.

$$\text{Ecuación 4.7 } LC = R \pm \left(t_{n-1,95} \left(\frac{s}{n} \right) \right)$$

Donde:

R=valor promedio de las recuperaciones

s=desviación estándar

n=número de datos

t=valor de t-student para n-1 datos y una confianza del 95%

4.6.5.3.1. Muestra sintética

Se realizó la limpieza de la muestra sintética en fase líquida de una solución sintética de tilosina (tilosina en agua deionizada) para contabilizar la pérdida de tilosina a través de los diferentes filtros utilizados para su limpieza.

4.6.5.3.2. Muestra real líquida enriquecida

Se realizó la limpieza de la muestra en fase líquida de un agua residual porcina real enriquecida con diferentes concentraciones de tilosina, el agua residual utilizada proviene de la etapa de engorda de una granja porcina.

4.6.5.3.3. Muestra sólida

Se colocaron 100 mL de lodos (biomasa fresca) provenientes de la purga del digestor anaerobio escala piloto en matraces Erlenmeyer de 1 L, a cada matraz se adicionaron 700 mL de agua deionizada y diferentes concentraciones de tilosina (5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), se dejó en agitación por 48 h para que el antibiótico fuera absorbido y se tomó el sobrenadante (500 mL) al cual se le realizó el tratamiento de la muestra en fase líquida para determinar el porcentaje de tilosina en la fase líquida y por diferencia determinar el porcentaje de tilosina que debió ser adsorbido en la biomasa. Posteriormente se tomó la biomasa y se extrajo la tilosina de acuerdo al método descrito para el tratamiento de la muestra en fase sólida, determinando su concentración.

4.7. Determinación de tilosina en agua residual porcina

Se determinó la concentración de tilosina en agua residual porcina mediante la técnica analítica validada utilizando HPLC-UV/Vis.

Las muestras de agua residual porcina fueron tomadas en diferentes etapas de crecimiento de la granja tales como maternidad, destete y engorda. La granja Tenayuca tiene una población de 5,000 cabezas de ganado porcino y se encuentra localizada en Jojutla, Morelos. Las muestras simples fueron tomadas el 15 de Noviembre de 2011 y las muestras compuestas (8 horas de duración del muestreo) el 13 de marzo de 2012. Las muestras fueron tomadas en el canal de aguas residuales de cada etapa de la granja. Las muestras se recolectaron en botellas plásticas de 500 mL y se mantuvieron a 4°C para su transportación y posterior análisis. Las muestras fueron almacenadas en botellas ámbar a 4°C para su limpieza y extracción de la tilosina. La detección de la tilosina en las muestras simples se realizó solo en la fase líquida, mientras que en las muestras compuestas la detección se hizo tanto en la fase sólida como en la fase líquida siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.6.5.1 y 4.6.5.2.

4.8. Arranque y operación de tres digestores anaerobios con presencia de tilosina

Se operaron tres digestores anaerobios con 15, 20 y 25 d de TRH, respectivamente con adición controlada de tilosina. Los digestores anaerobios mantienen la misma configuración del digestor piloto pero escalado a un volumen total de 63 L y un volumen útil de 55 L (0.055 m³). El mezclado de los sistemas se realizó por medio de una recirculación automática de 1 min cada seis horas y su alimentación consistió de agua residual de la industria porcina (sin separación de sólidos) enriquecida con el antibiótico tilosina a una concentración determinada. El agua residual fue recolectada una vez por semana durante toda la experimentación y almacenada a 4°C para prevenir su degradación. El agua residual porcina fue temperada previamente a su alimentación a los digestores por aproximadamente una hora.

Los tres digestores anaerobios utilizados fueron de fibra de vidrio, herméticamente sellados y operados a una temperatura constante de 30°C por medio de una chaqueta de calentamiento. La forma de operación de los digestores se detalla a continuación. La bomba sumergible que se encuentra en un recipiente herméticamente sellado junto al digestor encendía automáticamente durante un minuto cada seis horas para proporcionar el mezclado del sistema por medio de recirculación. El influente fue alimentado por gravedad (manualmente) por medio de las válvulas conectadas hacia la tubería de recirculación una vez al día. La muestra del efluente se tomó cinco horas y media después de la recirculación para permitir una mejor sedimentación del agua, una vez realizada la toma de muestra del efluente se realiza la alimentación. El sistema de captación de biogás se conectó de forma manual a la parte superior del digestor por medio de una bolsa para muestreo de gases. La Figura 4.9 muestra una fotografía de las partes de los digestores anaerobios utilizados y un esquema de los mismos.

Los digestores anaerobios fueron inoculados con biomasa proveniente de los reactores R2 y R3 utilizados durante la etapa de aclimatación de la biomasa (4.5 L que incluyen la mezcla de lodo y agua residual porcina). Debido a que la cantidad de inóculo aclimatado a la tilosina era menor a la que requerida para inocular los tres digestores (20% del volumen del digestor= 11 L para cada reactor), se realizó una mezcla con lodo proveniente del digestor anaerobio a escala piloto. En la Tabla 4.10 se presentan las mezclas realizadas.

Tabla 4.10 Inóculo utilizado en los digestores con tilosina

Digestor	TRH (d)	Inóculo	
		Lodo etapa de aclimatación ¹	Lodo anaerobio ²
D1	15	1 L de R2 + 1 L de R3	9 L
D2	20	2.7 L de R2	8.3 L
D3	25	2.6 L de R3	8.4 L

¹Proveniente de los reactores de la etapa de aclimatación de la biomasa a la tilosina (totalidad del reactor: biomasa y agua residual porcina). TRH R2= 20 d y TRH R3= 25 d.

²Proveniente de digestores con TRH de 15, 20 y 25 d sin adición de tilosina.

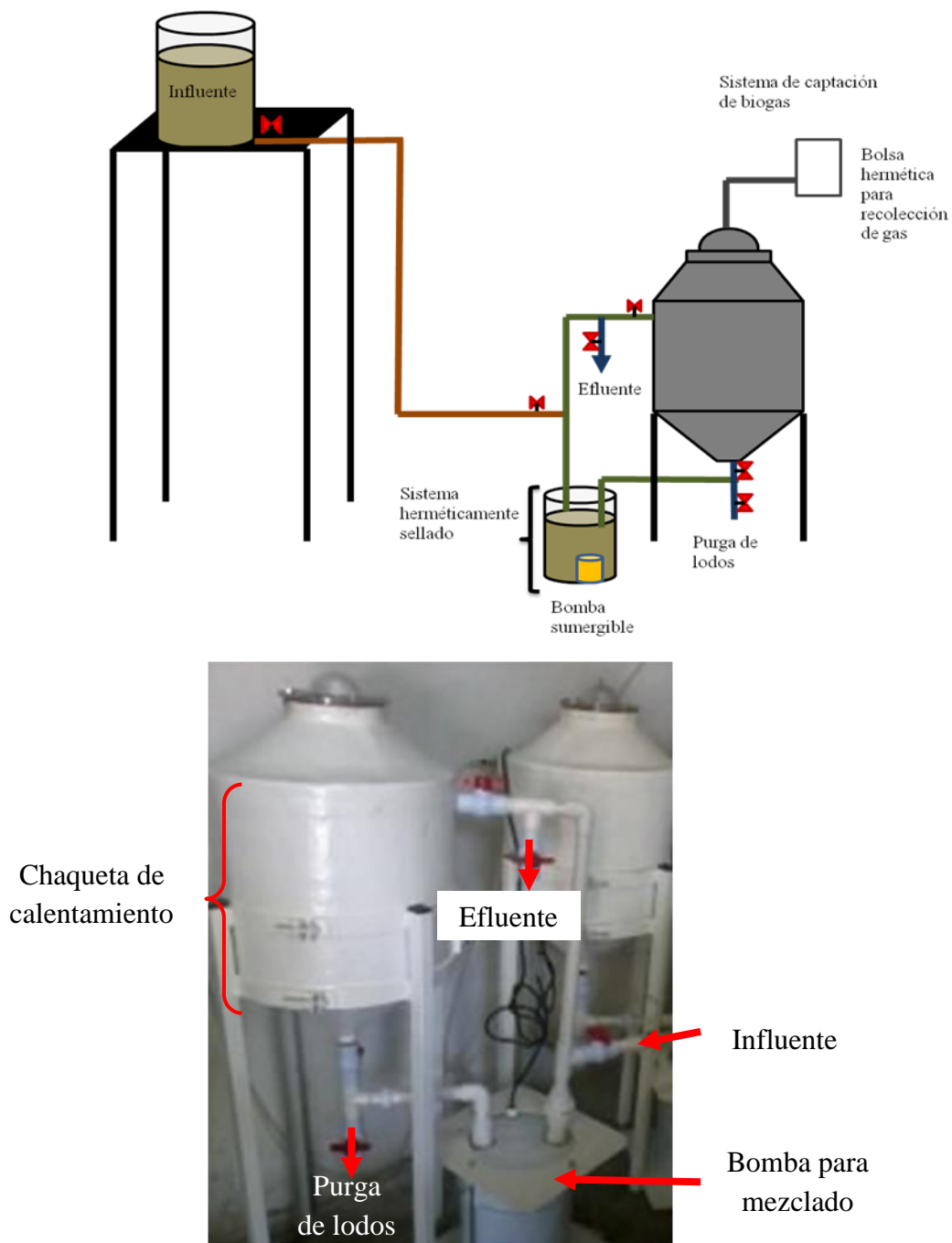


Figura 4.9 Fotografía y esquema de los digestores anaerobios utilizados

Una vez inoculados los digestores fueron operados durante cuatro etapas experimentales con adición de diferentes concentraciones de tilosina como se muestra en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11 Etapas experimentales evaluadas en la operación de los digestores anaerobios con presencia de tilosina

Etapa	[TYL] (mg L ⁻¹)	Periodo de operación (d)
Estabilización (E)	0.065	3-66
E1	0.065	67-184
E2	0.08	185-444
E3	1.92	445-500

La primera etapa experimental (E) corresponde al periodo de estabilización de los digestores, lo que permitió el desarrollo de biomasa aclimatada a la tilosina y la adaptación de la misma a las nuevas condiciones de operación. La primera (E1) y segunda etapa (E2) permitieron evaluar el impacto de la concentración de tilosina en la remoción de materia orgánica a las máximas concentraciones encontradas en el agua residual porcina en México. Por último la tercera etapa (E3) permitió observar el impacto del antibiótico a una alta concentración de tilosina, la cual fue determinada de acuerdo a los resultados obtenidos en el apartado 4.8.2. La tercera etapa experimental sólo fue evaluada para los digestores D1 y D3, debido a que el digestor D2 fue sacrificado para realizar las cinéticas de remoción de materia orgánica y, tilosina y producción de biogás.

Los parámetros de seguimiento de los digestores anaerobios con presencia de tilosina se muestran en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12 Monitoreo de los digestores anaerobios con presencia de tilosina

Parámetro	Frecuencia	Técnica
pH	1 vez por semana	Potenciométrico
Temperatura	1 vez por semana	Termopar
Conductividad	1 vez por semana	Electrodo
DQOt y DQOs	1 vez por semana	APHA, 2012
ST y SV	1 vez por semana	APHA, 2012
N-NH ₄	1 vez por semana	APHA, 2012
Biogás	1 vez por semana	Captura
Metano	1 vez por semana	Cromatografía de gases
Tilosina	2-4 veces en cada etapa experimental	Cromatografía de líquidos

La medición del biogás generado se realizó mediante almacenaje en bolsas herméticas para muestreo de gases (Tedlar de 10 L) y posterior medición del desalojo de la misma por medio de un flujómetro (Figura 4.10).



Figura 4.10 Fotografías de la toma de muestra del biogás

4.8.1. Método para la detección de metano

Se desarrolló un método para la detección y cuantificación de metano, para ello, se utilizó un cromatógrafo de gases SRI 8610 con detector de conductividad térmica (Figura 4.11). La columna utilizada fue Molecular Sieve 13X de 2.1 mm de diámetro interno, 6 ft de largo y malla 80/100. Se inyectaron 0.5 mL de muestra al cromatógrafo de gases mediante una microjeringa. El gas acarreador fue helio grado cromatográfico (Infra, México).

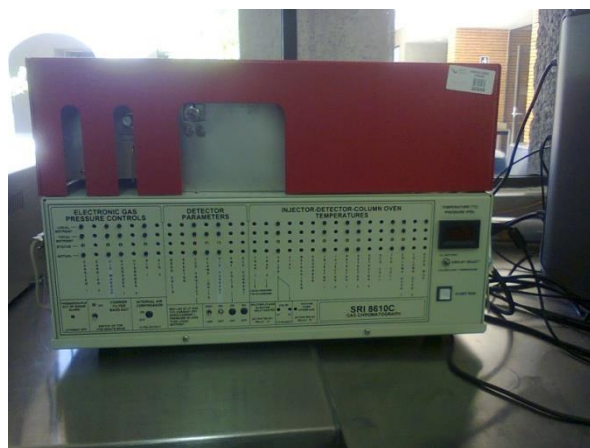


Figura 4.11 Cromatógrafo de gases SRI 8610

Se realizaron diferentes pruebas modificando la temperatura de la columna, la temperatura del inyector y el flujo del gas acarreador a fin de determinar las mejores condiciones del cromatógrafo de gases en cuanto a la respuesta en la señal y separación de los picos del

compuesto, partiendo de las condiciones del cromatograma proporcionado por el fabricante. El metano utilizado para las pruebas es un gas 100% puro (Praxair, México).

Las condiciones óptimas para el cromatógrafo de gases fueron: a) Tiempo de corrida: 5.5 min, b) Flujo del gas acarreador: 20 mL min⁻¹, c) Pico de metano: 3.8 min y d) Rampa de temperatura: Inicial a 50°C por 2 minutos y posteriormente incrementar 20°C por minuto hasta 120°C.

4.8.1.1. Curva de calibración del metano

Con las condiciones óptimas encontradas se realizó una curva de calibración de metano de 0.1 hasta 0.5 mL.

4.8.2. Determinación de concentración máxima de tilosina aplicada a los digestores anaerobios experimentales

Se determinó la concentración máxima de tilosina que sería aplicada a los digestores anaerobios con presencia de tilosina (última fase experimental, digestores D1 y D3) mediante una prueba de AME con biomasa proveniente de los digestores D1, D2 y D3 el día de operación 395. Las concentraciones de tilosina adicionadas para la prueba fueron las mostradas en la Tabla 4.13.

Tabla 4.13 Concentraciones de tilosina adicionadas en la prueba de AME para los digestores anaerobios experimentales

Concentración de tilosina (mg L ⁻¹)
0.0
0.050
0.080
0.160
0.320
0.640

Las pruebas de AME se realizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.4.1.

4.8.3. Análisis de varianza

Se realizó un análisis de varianza ANOVA unidireccional con el software estadístico Minitab 15. Los valores analizados corresponden a los resultados de materia orgánica y

sólidos obtenidos para los tres digestores anaerobios en las diferentes etapas experimentales.

4.9. Cinéticas de remoción de materia orgánica y tilosina

Se realizaron las cinéticas de remoción de materia orgánica y tilosina como una variante de lo propuesto por Kolz *et al.*, (2005) y Moreno y Buitrón (2002). Se prepararon 3 series de 13 viales (frascos) de 500 mL con 90 mL de biomasa proveniente del digestor anaerobio D2 (operado con un TRH de 20 d). La cantidad de lodo corresponde al 20% del volumen útil del frasco y es similar a la cantidad inoculada en los digestores anaerobios con presencia de tilosina. El frasco mantiene un 10% de volumen libre (45 mL) para la fase gaseosa, tal como se realizó durante las pruebas de actividad metanogénica específica. A la primera serie de viales se les adicionaron 360 mL de agua residual porcina enriquecida con tilosina a fin de mantener una concentración del antibiótico de 0.080 mg L^{-1} , que corresponde a la etapa E3 de operación de los sistemas, a esta serie de viales se le denominó muestra. A la segunda serie de viales además de lo anterior, se les adicionó azida de sodio a una concentración de 50 g L^{-1} para inhibir la biodegradación, a esta serie de viales se le denominó control. A la tercera serie de viales únicamente se le adicionó inóculo y agua residual porcina. Todas las muestras se hicieron por duplicado. Los viales fueron preparados en una cámara de ambiente anaerobio marca COY con una mezcla de N_2 : CO_2 (70%:30%, v/v). Las botellas fueron selladas con tapa de hule y papel parafilm. Posteriormente las botellas fueron incubadas en un cuarto a temperatura constante de 30°C (similar a la de los digestores) y se mantuvieron en agitación continua a 100 rpm. Las botellas se sacrificaron cada tercer día durante 26 días con la finalidad de abarcar los TRH de los digestores experimentales (15, 20 y 25 d). A los viales sacrificados se les realizaron los análisis mostrados en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14 Monitoreo de las cinéticas de degradación de materia orgánica y tilosina

Análisis	Técnica	Punto de muestreo
DQOt	APHA, 2012	Sobrenadante
DQOs	APHA, 2012	Sobrenadante
Tilosina	Cromatografía de líquidos	Sobrenadante y biomasa

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Selección de un agua residual porcina típica

En la Tabla 5.1 se presentan los resultados de la caracterización físico-química de las aguas residuales de cinco granjas porcinas en la República Mexicana.

Se observa en la Tabla que todas las aguas analizadas presentan altas concentraciones de DQO, DBO₅, sólidos, nutrientes y coliformes fecales. Tales concentraciones rebasan los límites máximos permisibles de las normas mexicanas aplicables para este tipo de descargas. En general, las características físico-químicas del agua residual porcina son similares en los diferentes estados de la República, siendo la proveniente de la etapa de engorda la que presenta las mayores concentraciones de contaminantes tal como lo mencionan Garzón y Buelna (2014) para granjas medianas.

En las cinco granjas porcinas muestreadas, el contenido de SST se encuentra en un intervalo entre 940 y 40,500 mg L⁻¹ y de SSV entre 478 y 32,500 mg L⁻¹. La DQO varió entre 3,302-37,833 mg L⁻¹ y la DBO₅ entre 995-9,613 mg L⁻¹. Estos valores se encuentran dentro de los encontrados en otras investigaciones para México y otros países alrededor del mundo, donde se han reportado concentraciones en un intervalo entre 1,380-44,800 mg L⁻¹ de SST, 1,000-31,900 mg L⁻¹ de SSV, 3,336-85,700 mg L⁻¹ de DQO y 2,396-23,100 mg L⁻¹ de DBO₅ para aguas residuales porcinas (Tabla 5.2).

En cuanto a los nutrientes, se encontraron concentraciones de nitrógeno medidas como NTK en un intervalo entre 524 y 2,033 mg L⁻¹ y de N-NH₄⁺ en un intervalo entre 200 a 1,760 mg L⁻¹, mientras que para el fósforo las concentraciones están en el intervalo entre 27 a 180 mg L⁻¹ de PT. Comparando los resultados encontrados con los reportados en la bibliografía se observa que las concentraciones de nitrógeno presentes en aguas residuales porcinas en México son similares a las encontradas en otros países excepto Francia y Dinamarca para este tipo de aguas, ya que en estos países desarrollados se han encontrado concentraciones de más del doble de las reportadas en la presente investigación. Respecto a las concentraciones de fósforo, la bibliografía reporta concentraciones hasta diez veces mayores a las reportadas en México en países desarrollados tales como Dinamarca y Estados Unidos pero semejantes a las reportadas en países en vías de desarrollo (por ejemplo China).

La variación en las características del agua residual porcina en general, obedece a diferentes factores entre los que se encuentran principalmente el objetivo de crecimiento de la granja (maternidad, destete o producción de lechones, engorda o ciclo completo de crecimiento), la cantidad y calidad del alimento, las diferencias en el uso del agua (agua de lavado, agua para beber, agua para bañar a los animales) y el sitio de recolección de las muestras

analizadas, lo que provoca una concentración o dilución de las aguas residuales. Al respecto Garzón y Buelna (2014) concluyeron que el incremento en la concentración de materia orgánica de aguas residuales porcinas en un mismo proceso productivo se debe al tamaño de la granja y al uso eficiente del agua, siendo las menos contaminantes las granjas chicas de hasta 2,499 puercos (DQO entre 3,478 y 9,300 mg L⁻¹), seguidas de las granjas medianas con 2,500 a 7,999 puercos (DQO entre 19,344 y 38,544 mg L⁻¹) y las más contaminantes las granjas grandes con 8,000 o más puercos (DQO entre 34,310 y 40,498 mg L⁻¹), además en granjas de tamaño mediano la diferencia en las concentraciones de contaminantes radica en el proceso productivo, teniendo a la etapa de engorda como la de mayor concentración, seguida por la etapa de destete y por último la etapa de maternidad.

Los resultados encontrados en la caracterización de aguas residuales porcinas indican que las prácticas de manejo en México son similares a las de otros países desarrollados. Una vez realizado este análisis de la caracterización físico-química de las aguas residuales se seleccionó un agua residual porcina para el presente trabajo experimental.

La granja seleccionada para el estudio es una granja con capacidad para 5,000 cerdos, semitecnificada y de ciclo completo (tienen sus propios vientres y sementales, los lechones nacen en la granja y ahí mismo son criados y engordados hasta su envío al rastro). Los lechones reciben choques de antibióticos durante una semana antes de ser enviados a la etapa de engorda, en la cual, el único contacto que tienen los animales con los antibióticos es para el tratamiento de infecciones. Por lo anterior se espera que el agua residual proveniente de la etapa de engorda (etapa de mayor concentración de contaminantes) se encuentre libre de antibióticos y que en caso de encontrarse, la concentración de estos sea puntual.

De acuerdo a la información recopilada en campo, se encontró que en las granjas evaluadas, los choques de antibióticos incluyen compuestos tales como penicilina, gentamicina y principalmente tilosina.

Tabla 5.1 Resultado de la caracterización de agua residual porcina en diferentes partes de la República Mexicana

Muestra	SST (mg·L ⁻¹)	SSV (mg·L ⁻¹)	DQO (mg·L ⁻¹)	DBO ₅ (mg·L ⁻¹)	NTK (mg·L ⁻¹)	N-NH ₄ (mg·L ⁻¹)	N (NO ₃ +NO ₂) (mg·L ⁻¹)	P-Total (mg·L ⁻¹)	Coliformes Fecales (NMP/100 mL)
Puebla									
Engorda	40,500	32,500	35,497	4,700	1,666	890	0.1	97.6	4.30E+07
Maternidad	1,130	478	3,302	2,494	550	380	0.1	28.6	1.50E+07
Destete	16,357	13,000	37,833	4,200	1,345	440	0.1	79.5	2.10E+07
Morelos									
Engorda Granja 1	25,166	21,500	35,680	9,188	1,450	1,270	1.9	149	1.00E+08
Desarrollo	11,250	9,125	15,920	9,262	1,369	640	2.1	118.6	2.40E+07
Destete	6,250	5,187	9,240	7,238	673	500	2.3	72.2	4.60E+08
Engorda Granja 2	10,925	7,875	19,344	9,613	1,515	1,580	0.1	76.7	4.60E+04
Campeche									
Engorda	942.5	672	3,478	995	524	200	0.1	27.4	1.60E+06
Yucatán									
Engorda	15,041	11,791	25,205	8,459	2,033	1,760	0.6	180.1	9.20E+08

Tabla 5.2 Características de aguas residuales porcinas encontradas en otras investigaciones

Etapa de desarrollo	SST (mg·L ⁻¹)	SSV (mg·L ⁻¹)	ST (mg·L ⁻¹)	STV (mg·L ⁻¹)	DQO (mg·L ⁻¹)	DQOs (mg·L ⁻¹)	DBO ₅ (mg·L ⁻¹)	NTK (mg·L ⁻¹)	N-NH ₄ (mg·L ⁻¹)	P- Total (mg·L ⁻¹)	País	Referencia
Engorda	3,100	2,100	7,200	5,200	11,500	8,500		1,400	650		México	Vázquez, 2002
No se menciona			9,810	5,530	6,170			900	830		Italia	Campos <i>et al.</i> , 2008
No se menciona	9,700	6,100			18,000						Italia	Lallai <i>et al.</i> , 2002
No se menciona	12,010	9,230			19,140	6,800		2,060	1,165		Italia	Andreottola <i>et al.</i> , 1997
No se menciona	4,900					5,340		1,410	1,240		España	Bonmati <i>et al.</i> , 2001
Maternidad y destete			38,400	20,800	85,700				1,547	250	España	Rodríguez y Lomas, 2002
Ciclo completo			8,500	4,400	12,000						España	González-Fernández y García-Encina, 2009
No se menciona	1,970				15,462		9,320	2,080	1,776		Canadá	Garzón-Zúñiga <i>et al.</i> , 2005
No se menciona	16,000				13,000			2,300		650	Canadá	Buelna <i>et al.</i> , 2008
No se menciona	2,310	1,998	3,634	2,897	5,565	3,916	2,396	577	250	383	Canadá	Ra <i>et al.</i> , 2000
No se menciona					3,336			185	37	322	Bélgica	Meers <i>et al.</i> , 2006
No se menciona			48,000	36,000	70,000	26,000			4,800	1,600	Dinamarca	Karakashev <i>et al.</i> , 2008
No se menciona	1,380				5,417				995	152	China	Ben <i>et al.</i> , 2009
Engorda				2,830, 3,350							China	Tong <i>et al.</i> , 2009
No se menciona	2,800-4,400		3,600- 6,800		11,200-17,200						Cuba	Viñas <i>et al.</i> , 1996
Engorda					5,860-6,480		2,934- 4,827	1,210- 1,260	1,060- 1,220	53-71.6	Estados Unidos	Han <i>et al.</i> , 2008
Engorda					68,053	17,506	23,100		4,135	2,071	Estados Unidos	Zilles <i>et al.</i> , 2005
No se menciona	28,700-42,500	21,300- 31,900	37,500- 53,900		38,200-50,600	12,500- 21,800		3,500- 4,800	2,500- 3,300		Francia	Bousier <i>et al.</i> , 2005
No se menciona	37,900-44,800	24,700- 30,900	43,400- 54,500	27,100- 36,300	42,800-61,800	11,900- 19,600		3,500- 3,900	2,200- 2,500		Francia	Rajagopal <i>et al.</i> , 2010
Maternidad	6,800-7,200	5,500- 5,600	8,800- 12,000		7,200-11,800			730- 1,200		200	Francia	Prado <i>et al.</i> , 2009
Ciclo completo	15,000		18,300	14,700	18,300		5,300	1,100			Singapur	Taiganides, 1992
Ciclo completo	13,800						21,000	423		602	Chile	Massanes, 2005
No se menciona	2,000	1,000	700- 1,600	600- 1,500	8,000-20,000	7,000- 17,000					Rusia	Kalyuzhnyi <i>et al.</i> , 1999
No se menciona	2,125		3,373		5,134		3,376	231	206	147	Corea	Kornboonraksa <i>et al.</i> , 2009
No se menciona			23,885	16,310	45,350				1,910		Corea	Chae <i>et al.</i> , 2008

En resumen, se seleccionó el agua residual proveniente de la etapa de engorda para ser utilizada en las siguientes etapas experimentales, debido a que 1) cumple con las características de un agua residual porcina típica como son altas concentraciones de materia orgánica y nutrientes, 2) ausencia de antibióticos o concentración mínima de ellos, lo cual permite adicionar de forma controlada la tilosina y c) la cercanía con el lugar de estudio para transportar muestras reales y utilizar agua “fresca” durante la experimentación.

5.2. Arranque y operación de un digester anaerobio a escala piloto para la obtención de biomasa aclimatada al agua residual porcina

Se arrancó un digester anaerobio a escala piloto (con las características descritas en el apartado 4.3 de la metodología) para el tratamiento de aguas residuales de la industria porcina provenientes de la etapa de engorda, con la finalidad de: 1) tener un referente del comportamiento de los digestores anaerobios de líquidos y sólidos (dalys (Garzón-Zúñiga y Buelna, 2014)) y 2) obtener una fuente de biomasa aclimatada a este tipo de aguas (residuales porcinas) que a su vez sería aclimatada a diferentes concentraciones de antibiótico y con ello disminuir el periodo de arranque de los digestores experimentales de la etapa final de la presente investigación, los cuales, estarán alimentados con agua residual porcina enriquecida con el antibiótico tilosina. Los digestores dalys se han implementado en México desde hace algunos años para alentar a los productores porcinos a darle tratamiento a sus residuos para recuperar el biogás a través de la participación en los denominados “bonos de carbono”, sin embargo, a nivel bibliográfico no se han reportado resultados de la eficiencia de estos sistemas. Los resultados de la operación del reactor testigo se detallan a continuación.

5.2.1. Comportamiento de los parámetros de campo

El digester anaerobio a escala piloto se mantuvo a una temperatura de 30°C por medio de una chaqueta de calentamiento. Sin embargo, debido al volumen del mismo no fue posible mantener uniforme la temperatura en todas las zonas del digester, puesto que al no haber una agitación o mezcla, generalmente las zonas más calientes eran solo las cercanas a las paredes del sistema. De cualquier forma se mantuvieron temperaturas en el rango mesofílico entre 20 y 35°C (analizadas en el efluente de forma instantánea al tomar la muestra) durante los tres TRH estudiados (30, 40 y 60 d), mientras que las temperaturas del influente oscilaron generalmente entre 20 y 25°C. En la gráfica de la Figura 5.1 inciso a) se observa el comportamiento de la temperatura en el digester escala piloto. El influente promedio presentó una temperatura de 24.3 ± 1.6 , 21.6 ± 2.4 y 22.6 ± 1.9 °C y el efluente de 28.6 ± 2.4 , 29.1 ± 2.3 y 27.4 ± 2.7 °C para el TRH de 30, 40 y 60 d, respectivamente, lo que indica que el sistema operó en un rango mesofílico óptimo para la metanogénesis. Se puede observar que a pesar de no tener un calentamiento homogéneo dentro del digester durante las tres etapas experimentales se logra incrementar la temperatura del influente (que

corresponde a la temperatura ambiente a la sombra) de 4 a 8°C aproximadamente, lo que representa un incremento en la tasa de crecimiento específico de los microorganismos presentes en el digestor y a su vez un incremento en la tasa de remoción de materia orgánica al trabajar con temperaturas superiores a la temperatura ambiente. Los digestores anaerobios de líquidos y sólidos (dalys) instalados en la República Mexicana operan a condiciones ambientales normales; sin embargo, al estar localizados en terrenos a cielo abierto y situarse en zonas calurosas (la mayoría de ellos), la temperatura mínima que se mantiene dentro de los mismos es cercana a los 30°C (AgCert, 2006), por lo tanto con las temperaturas alcanzadas en el digestor a escala piloto se logró emular esta temperatura de operación.

El pH en el digestor se mantuvo en valores entre 6.1 y 8.0 para el influente, lo que permite las condiciones adecuadas para que se lleve a cabo la metanogénesis (Malina y Pohland, 1992) y para el efluente los valores se mantuvieron en un intervalo entre 7.2 y 8.6 durante los tres TRH analizados (Figura 5.1 inciso b). Los valores promedio de pH encontrados en el influente para el TRH de 30, 40 y 60 d fueron 7.1 ± 0.4 , 6.7 ± 0.2 y 7.1 ± 0.5 , respectivamente, los cuales son similares a los reportados en bibliografía para aguas residuales porcinas (Vázquez, 2002; Viñas *et al.*, 1996; Massanes, 2005). Los valores de pH promedio obtenidos en el efluente fueron superiores a los del influente con valores promedio de pH de 7.8 ± 0.2 , 7.7 ± 0.1 y 7.9 ± 0.2 para el TRH de 30, 40 y 60 d. El incremento en los valores de pH en el efluente indica que el sistema trabajó en el rango neutrófilo (6-8.5), óptimo para microorganismos anaerobios y similares a los encontrados por Vázquez (2002) y Ben *et al.*, (2009) para digestores anaerobios cuyos valores de pH fueron en un intervalo entre 6.7 y 8.6.

En el inciso c) de la Figura 5.1 se presenta la gráfica del comportamiento de la conductividad en el digestor escala piloto. Durante los TRH de 30 y 40 d, se presentó mayor estabilidad en los valores de la conductividad para el efluente del digestor, sin embargo con un TRH de 60 d se observa que los valores son más variables, probablemente por las variaciones de la alcalinidad, la cual es contabilizada también como conductividad (iones carbonatos y bicarbonatos), y que permitieron mantener el pH constante. A pesar de ello, los valores en el efluente del digestor se mantuvieron ligeramente por arriba de los valores obtenidos para el influente, teniendo en los tres TRH valores de conductividad en un intervalo entre 3 y 20 mS cm^{-1} para el influente y efluente. Los valores promedio de conductividad fueron 9.2 ± 2.3 , 10.5 ± 1.5 y 9.5 ± 1.6 mS cm^{-1} para el influente y 12.0 ± 1.4 , 14.0 ± 1.3 y 13.1 ± 2.6 mS cm^{-1} para el efluente, respectivamente para el TRH de 30, 40 y 60 d. El incremento en los valores de conductividad en el efluente son resultado del incremento en la concentración de iones tales como los de carbonato y bicarbonato generados durante la degradación anaerobia y que proporcionan la alcalinidad en el sistema.

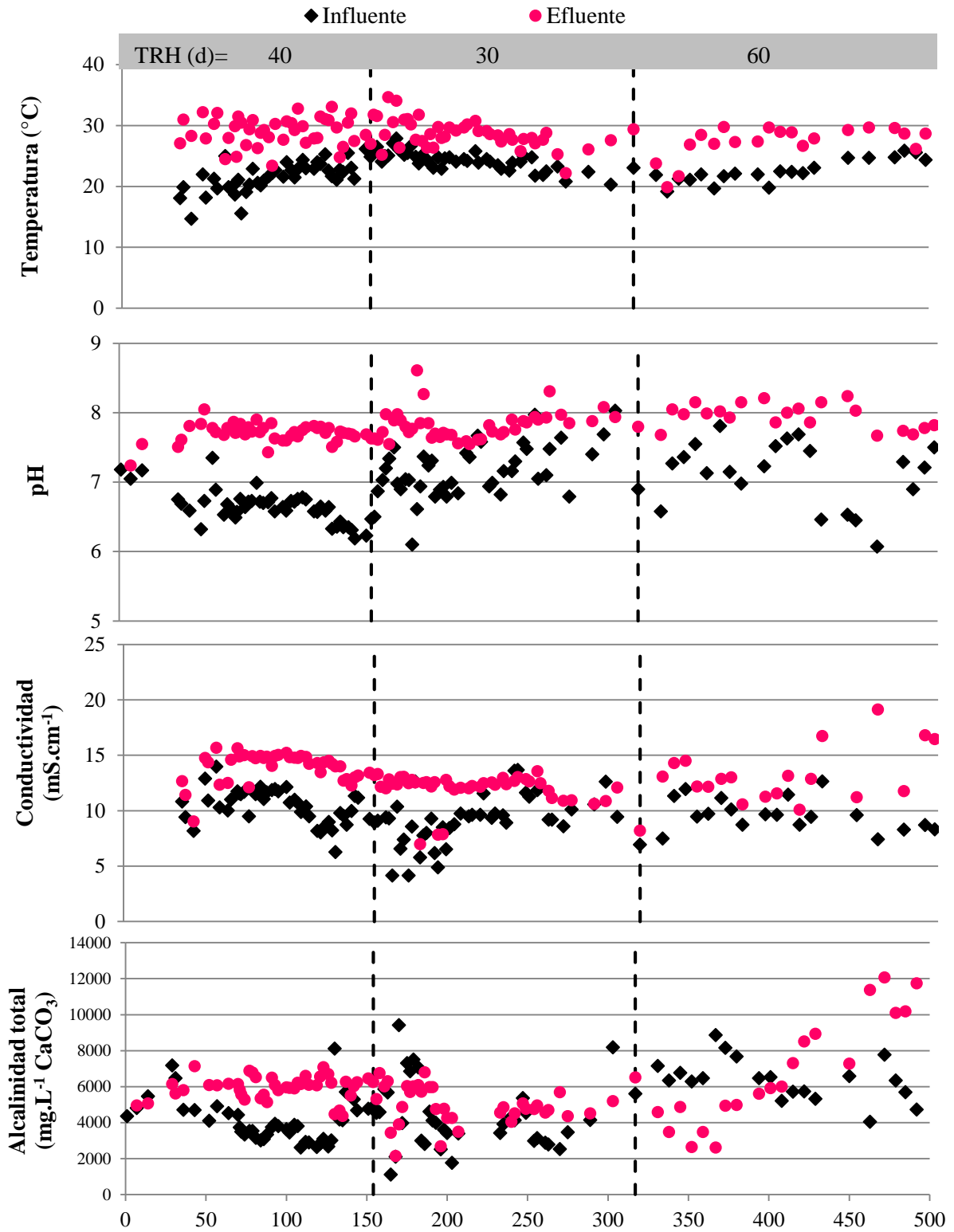


Figura 5.1 Parámetros de campo del digester anaerobio a escala piloto: a) temperatura, b) pH, c) conductividad y d) alcalinidad

Los resultados de alcalinidad total obtenidos para el digester escala piloto se presentan en el inciso d de la Figura 5.1. Durante los TRH de 30 y 40 d se presentó mayor estabilidad en el sistema que en el TRH de 60 d. Durante la operación del digester se puede observar que cuando se realiza el cambio de TRH, los sistemas se desestabilizan y después de un periodo igual al TRH aplicado comienzan a estabilizarse, siendo más notorio en la etapa con un TRH de 60 d. Durante los dos primeros periodos experimentales se presentó un ligero incremento en la alcalinidad total en el efluente, con concentraciones promedios de $4,330 \pm 1,854$ y $4,982 \pm 1,062$ $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$ en el influente y de $4,138 \pm 1,224$ y $5,960 \pm 650$ $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$ en el efluente para los TRH de 30 y 40 d, respectivamente. Estos valores son comparables a los reportados por Metcalf y Eddy (2003) para procesos de digestión anaerobia de lodos (2000 a 3000 $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$), ya que la concentración de materia orgánica y sólidos en aguas residuales porcinas es elevada.

En cuanto a la etapa con un TRH de 60 d, se observa que al inicio de la misma, el efluente disminuye su concentración de iones carbonato y después de 60 d (pasado un tiempo de residencia completo) el sistema se estabiliza y comienza a incrementar nuevamente su capacidad buffer, lo cual se verifica con los datos de conductividad que muestran un incremento hacia el final del último periodo experimental y una ligera disminución en el pH. En cuanto al influente no se presentaron variaciones notorias, manteniendo concentraciones en un intervalo entre 4,000 y 10,000 $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$ durante esta etapa, mientras que el efluente presentó concentraciones en un intervalo entre 2,000 y 12,000 $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$. Las concentraciones promedio de alcalinidad para el TRH de 60 d fueron 6,363 y 6,824 $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$ para el influente y efluente, respectivamente. Los resultados anteriores muestran que el agua residual porcina tiene la capacidad buffer necesaria (entre 2,000 y 5,000 $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$ de acuerdo con Metcalf y Eddy, 2003) para mantener las condiciones ideales para que se lleve a cabo la digestión anaerobia.

5.2.2. Comportamiento de la materia orgánica

En las gráficas de la Figura 5.2 se muestran los resultados de materia orgánica total, materia orgánica soluble y por porcentajes de remoción de materia orgánica obtenidos para el digester anaerobio a escala piloto.

La concentración de materia orgánica de las aguas residuales porcinas es muy variable entre las etapas del proceso productivo, sin embargo sus componentes son muy semejantes entre sí, ya que todas contienen excretas y residuos de alimentos de los animales. Dentro de cada etapa del proceso productivo se lleva a cabo un ciclo de crecimiento, que consiste en la entrada de los animales a las naves, crecimiento de los cerdos (alimentación, lavado de naves, aseo de animales), vaciado de naves (traslado a la siguiente etapa de crecimiento o al rastro) y lavado de naves, lo que implica que la concentración de las aguas residuales

generadas en una misma etapa no siempre sea la misma. Lo anterior puede explicar las variaciones tan grandes obtenidas durante toda la experimentación en cuanto a la concentración de materia orgánica total en el influente (entre 8,000 y 55,000 mg L⁻¹ para la DQO total y entre 4,000 y 30,000 mg L⁻¹ para la DQO soluble) la cual repercute en el porcentaje de remoción de materia orgánica, que es muy variable. Sin embargo, se obtienen concentraciones estables en el efluente generalmente menores a 10,000 mg L⁻¹ de DQOt y 5,000 mg L⁻¹ de DQOs durante los tres tiempos de residencia hidráulica utilizados. Estos resultados muestran la capacidad del digester anaerobio tipo dalys de amortiguar las variaciones en el influente estabilizando el efluente. Sin embargo, las concentraciones de materia orgánica son aún muy elevadas por lo que se requiere un tratamiento de pulimento para cumplir con la normativa aplicable a las granjas porcinas.

Se observa en las gráficas que los valores en el influente oscilaron en un intervalo entre 8,000 y 55,000 mg L⁻¹ para la DQO total y entre 4,000 y 30,000 mg L⁻¹ para la DQO soluble, mientras que las remociones oscilaron entre 31 y 93% para DQO total y entre 27 y 88% para DQO soluble. Durante el inicio de la experimentación y en cada cambio de TRH se presentó un incremento en la concentración de DQO total y soluble en el influente, la cual incrementó la DQO en el efluente aproximadamente un tiempo de residencia (correspondiente a su etapa de experimentación), posteriormente se presentó una estabilización del sistema con porcentajes de remoción superiores al 70% para la DQOt y 60% para la DQOs. Se observa que durante el TRH más corto (30 d) la remoción de materia orgánica es más variable que en el TRH más largo (60 d) y que en el TRH de 40 d (intermedio) los porcentajes de remoción tanto de DQOt como soluble tienden a incrementarse desde un 20 hasta un 80% una vez que el sistema se ha estabilizado.

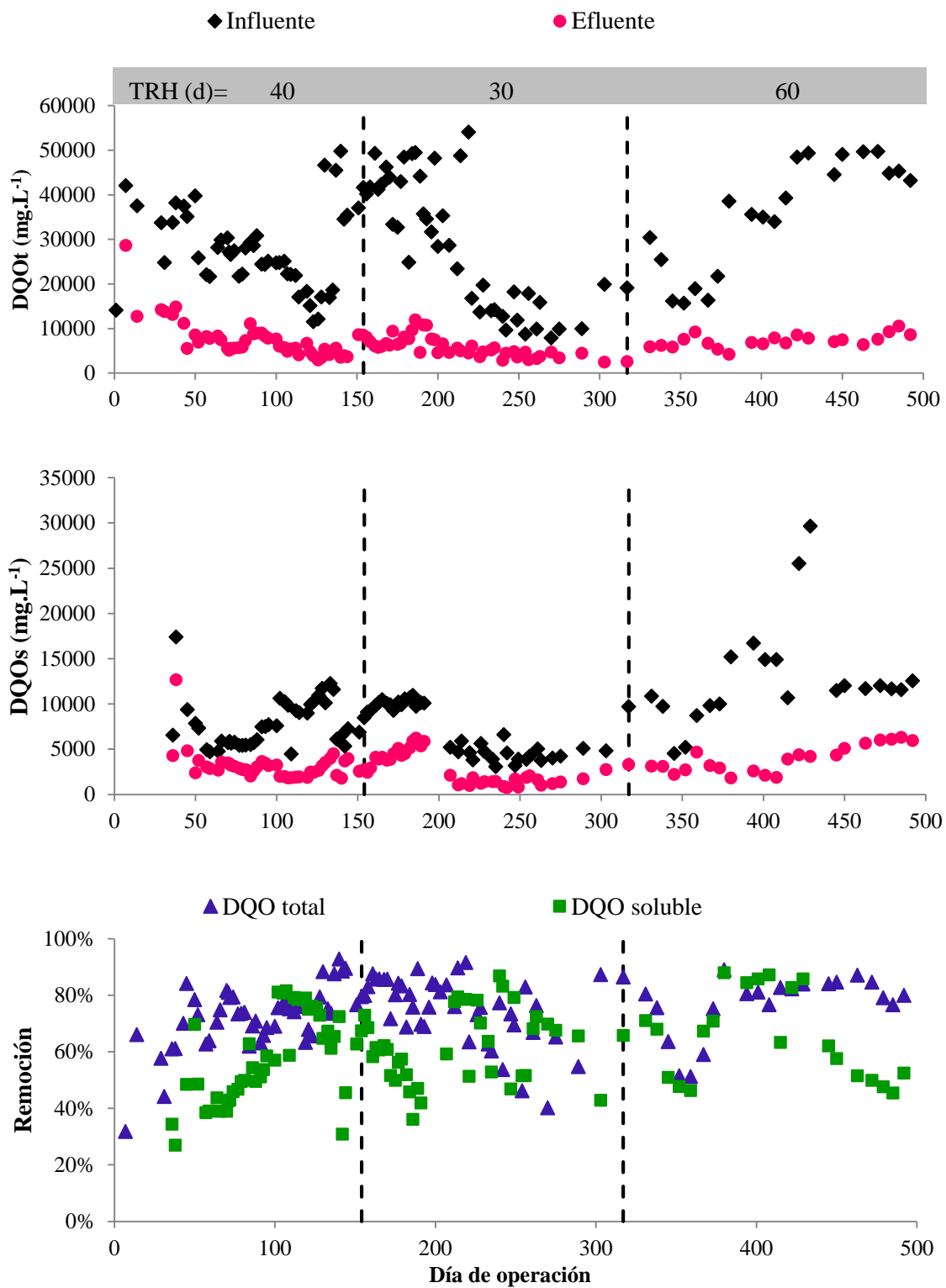


Figura 5.2 Comportamiento de la materia orgánica en el digester anaerobio a escala piloto

En la Tabla 5.3 se presentan los valores promedio de materia orgánica total y soluble obtenidos durante la experimentación con el digestor escala piloto. Durante el periodo en el que el digestor operó con un TRH de 60 d, el agua residual porcina presentó mayor concentración de materia orgánica con valores promedio de $35,049 \pm 12,505$ y $12,694 \pm 5,648$ mg L^{-1} para DQOt y soluble, respectivamente, mientras que en el periodo de tiempo en el que se aplicaron los otros dos TRH (30 y 40 d) la concentración de contaminantes del agua residual fue menor y más parecida entre sí, presentando valores de DQO total y soluble de $29,601 \pm 14,808$ y $6,949 \pm 2,830$ mg L^{-1} para el TRH de 30 d y de $27,681 \pm 9,013$ y $7,796 \pm 2,683$ mg L^{-1} para el TRH de 40 d. Sin embargo, a pesar de que las concentraciones de materia orgánica fueron mayores para el TRH de 60 d, la carga orgánica fue menor y por lo tanto las remociones obtenidas fueron mayores ($77 \pm 11\%$ para DQO t y $65 \pm 15\%$ para DQOs) y más estables aunque no muy distantes de las obtenidas en los otros dos TRH (75 ± 12 y $62 \pm 13\%$ para el TRH de 30 d y 72 ± 11 y $57 \pm 16\%$ para el TRH de 40 d, para la DQO total y soluble, respectivamente). A un TRH de 30 y 40 d, las cargas orgánicas volumétricas (COV) se encuentran en un intervalo más amplio (de 0.3 a 1.2 $\text{kg DQO m}^3 \text{d}^{-1}$ para el TRH de 40 d y de 0 a 1.8 $\text{kg DQO m}^3 \text{d}^{-1}$ para el TRH de 30 d) que para el TRH de 60 d (0.27 a 0.83 $\text{kg DQO m}^3 \text{d}^{-1}$). Sin embargo, a pesar de las variaciones tan amplias en la COV, las remociones se mantienen estables (Figura 5.3). De acuerdo al análisis de varianza realizado ANOVA con 95% de confianza y 2 grados de libertad (Anexo III, inciso A) se obtuvo una P de 0.186 y 0.103, para DQO total y soluble, lo que indica que la hipótesis nula es aceptada y por lo tanto no existen diferencias entre los tratamientos, es decir las remociones obtenidas en los TRH de 30, 40 y 60 d son estadísticamente similares, lo que significa la posibilidad de reducir el tamaño de un reactor o incrementar su caudal en tratamiento sin disminuir las eficiencias de remoción.

Tabla 5.3 Valores promedio de materia orgánica obtenidos en el digestor piloto

TRH (d)	COV aplicada ($\text{kg DQO m}^3 \text{d}^{-1}$)	DQOt ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		DQOs ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		Remoción (%)	
		Influente	Efluente	Influente	Efluente	DQOt	DQOs
30	0.96 ± 0.51	$29,601 \pm 14,808$	$6,016 \pm 2,256$	$6,949 \pm 2,830$	$2,776 \pm 1,694$	75 ± 12	62 ± 13
40	0.69 ± 0.23	$27,681 \pm 9,013$	$7,628 \pm 4,342$	$7,796 \pm 2,683$	$3,177 \pm 1,696$	72 ± 11	57 ± 16
60	0.59 ± 0.23	$35,049 \pm 12,505$	$7,077 \pm 1,752$	$12,694 \pm 5,648$	$3,900 \pm 1,474$	77 ± 11	65 ± 15

Los porcentajes de remoción encontrados son similares a los reportados para reactores UASB alimentados solamente con la fracción líquida de un agua residual de la industria porcina (Viñas *et al.*, 1996; Kalyuzhnyi *et al.*, 1999) con TRH de 1 a 4 d y COV de 3.8 a 12 $\text{kg DQO m}^3 \text{d}^{-1}$ y superiores a los reportados para digestores anaerobios tipo CSTR (24-42% remoción DQOt y 25-88% remoción DQOs) operados con temperaturas superiores

(37-55°C) a la utilizada en la presente experimentación y alimentados con agua residual porcina cribada con TRH de 0.5 a 15 d (Karakashev *et al.*, 2008; Rajagopal *et al.*, 2010).

En cuanto a las cargas orgánicas aplicadas, los resultados de remoción son ligeramente menores a los obtenidos por Prado *et al.*, (2009) con el sistema BIOSEP ® cuyo principal sistema de remoción es un reactor de membrana con el que se obtuvieron remociones de materia orgánica del 90% con la fracción líquida de un agua residual porcina previamente digerida, centrifugada y diluida. Esta diferencia se atribuye a la presencia de elevadas concentraciones de sólidos en el caso del digestor anaerobio ya que no existe separación de las fracciones sólida y líquida pues se tratan en conjunto, lo cual dificultaría la operación de un sistema de membranas por el tamponamiento que esto representa y por lo cual únicamente se trata la fracción líquida con concentraciones de sólidos menores.

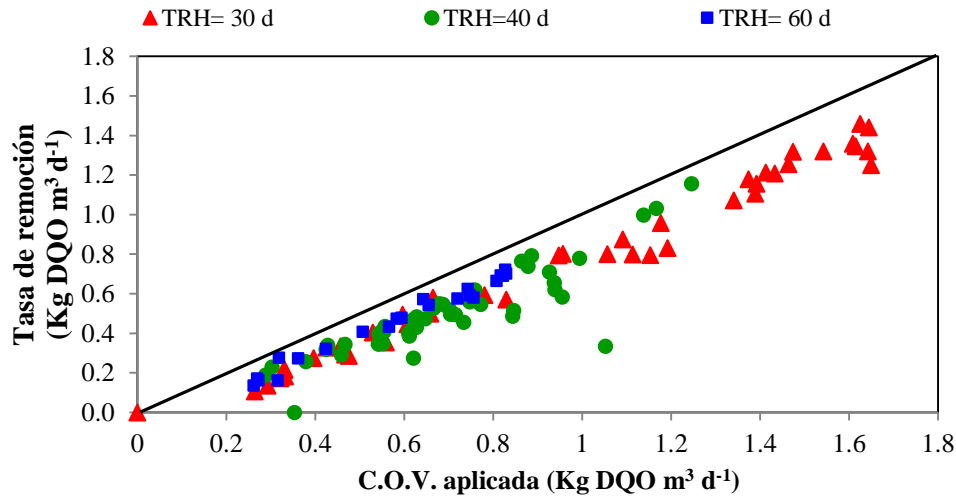


Figura 5.3 Carga orgánica aplicada y su tasa de remoción en el digestor anaerobio a escala piloto

5.2.3. Comportamiento de los sólidos

Al igual que la concentración de materia orgánica, la concentración de sólidos suspendidos y totales en el influente del digestor anaerobio escala piloto fue muy variable en los tres tiempos de residencia utilizados con valores en un intervalo de 5,000 a 80,000 mg L⁻¹ para SST y de 4,000 a 60,000 mg L⁻¹ para SSV. En general, las remociones de sólidos suspendidos y sólidos volátiles fueron variables a lo largo de los tres periodos experimentales, fluctuando la mayor parte del tiempo en un intervalo entre 60 y 80% de remoción para el TRH de 30, 40 y 60 d, siendo el TRH más largo el más estable (Figura 5.4). En los gráficos se observa de forma clara que al cambiar de etapa experimental y pasar de un TRH de 30 d a uno de 60 d se presentó un desequilibrio notorio y una disminución en

la remoción de los sólidos tanto suspendidos como totales. Al igual que con la materia orgánica, se observa que este desequilibrio dura aproximadamente un TRH y es resultado del incremento en la concentración de sólidos en el influente.

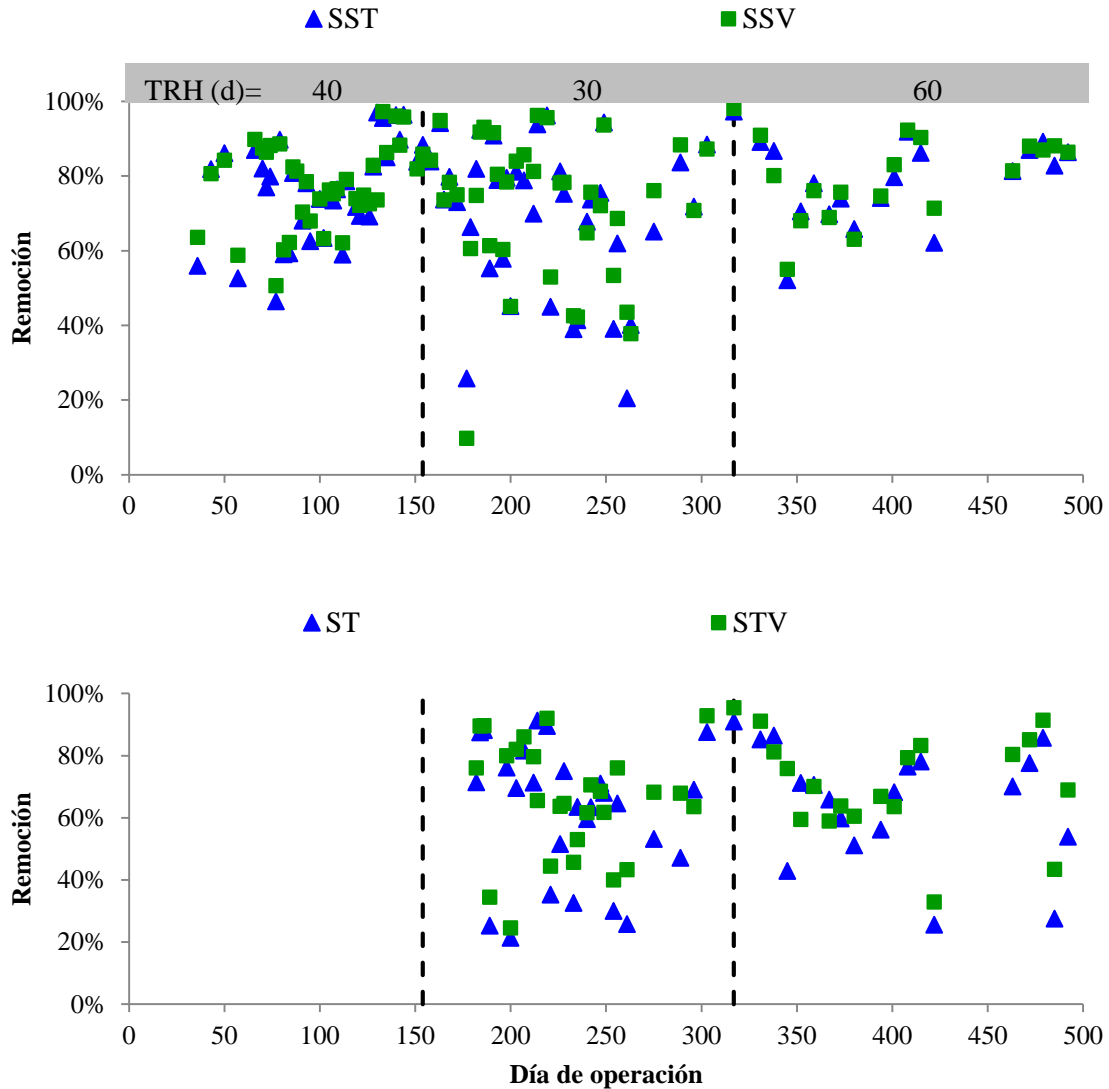


Figura 5.4 Remoción de sólidos en el digestor anaerobio a escala piloto

Los valores promedio de sólidos suspendidos y sólidos totales obtenidos para los tres tiempos de residencia se muestran en la Tabla 5.4. Se observa que la mayor concentración de sólidos en el influente se presentó en el TRH de 60 d con valores promedio de $20,591 \pm 14,941 \text{ mg L}^{-1}$ de SST, $16,034 \pm 12,805 \text{ mg L}^{-1}$ de SSV, $23 \pm 14 \text{ g L}^{-1}$ de ST y $17 \pm 12 \text{ g L}^{-1}$ de SV. Sin embargo, las cargas de sólidos aplicadas para el TRH de 60 d fueron

menores que para los TRH de 30 y 40 d (0.30 ± 0.26 , 0.23 ± 0.22 , 0.33 ± 0.25 y 0.25 ± 0.20 g L⁻¹.d⁻¹, para SST, SSV, ST y STV, respectivamente, Figura 5.5). Los porcentajes de remoción obtenidos durante el TRH de 60 d (79 ± 11 y $80\pm 11\%$ para los SST y SSV, y de 65 ± 19 y $71\pm 16\%$ para los ST y SV, respectivamente) fueron superiores a los obtenidos para el TRH de 30 y 40 d. Para el TRH de 30 d se encontraron las remociones más bajas (20 ± 20 , 72 ± 19 , 62 ± 22 y $66\pm 18\%$ para los SST, SSV, ST y SV, respectivamente). Sin embargo, las cargas de sólidos aplicadas se encontraron en un intervalo más amplio (0.53 ± 0.55 , 0.41 ± 0.43 , 0.41 ± 0.59 y 0.31 ± 0.45 g L⁻¹.d⁻¹, para SST, SSV, ST y STV, respectivamente) que con los TRH de 40 y 60 d. Este comportamiento fue similar al reportado para la carga orgánica. A pesar de estas diferencias en las remociones se encontró con el análisis de varianza (ANOVA con 95% de confianza y 2 grados de libertad, ANEXO I, inciso A) que no existe diferencia significativa en las remociones de sólidos con los diferentes TRH, probablemente por la capacidad de los digestores anaerobios de amortiguar los choques de elevadas concentraciones de contaminantes y porque las cargas de sólidos aplicadas en los tres TRH son muy similares.

Tabla 5.4 Valores promedio del comportamiento de los sólidos en el digestor piloto

TRH (d)	Influyente				Remoción (%)			
	SST (mg L ⁻¹)	SSV (mg L ⁻¹)	ST (g L ⁻¹)	STV (g L ⁻¹)	SST	SSV	ST	STV
30	17,892±16,390	13,781±12,740	20±19	15±14	70±20	72±19	62±22	66±18
40	13,244±14,524	8,938±7,303	-	-	76±13	77±11	-	-
60	20,591±14,941	16,034±12,805	23±14	17±12	79±11	80±11	65±19	71±16

Los resultados obtenidos en la presente experimentación en cuanto a la remoción de sólidos superan los valores reportados en la literatura para los digestores anaerobios de lodos de baja tasa (entre 40 y hasta el 70%, Malina y Pohland, 1992; Metcalf y Eddy, 2003) y son similares a los reportados por Chao (2008) quien utilizó un biodigestor de bolsa plástica para el tratamiento de aguas residuales porcinas y obtuvo remociones de sólidos totales del 74%. Los resultados de remoción de sólidos son menores a los obtenidos por López (2010), quien reporta remociones promedio del 91% en un biodigestor que opera con un TRH de 10 d y que es alimentado de forma similar al de la presente experimentación (con agua residual porcina sin separación), con concentraciones promedio de SST en el influente de 3,300 mg L⁻¹ (0.33 g SST L⁻¹ d⁻¹). Finalmente, a pesar de que la eficiencia de remoción de los sólidos para este tipo de digestores (dalys) presentó muy buenos resultados en comparación con otras tecnologías anaerobias similares, es evidente que el efluente debe recibir un tratamiento adicional para cumplir con las normativas mexicanas.

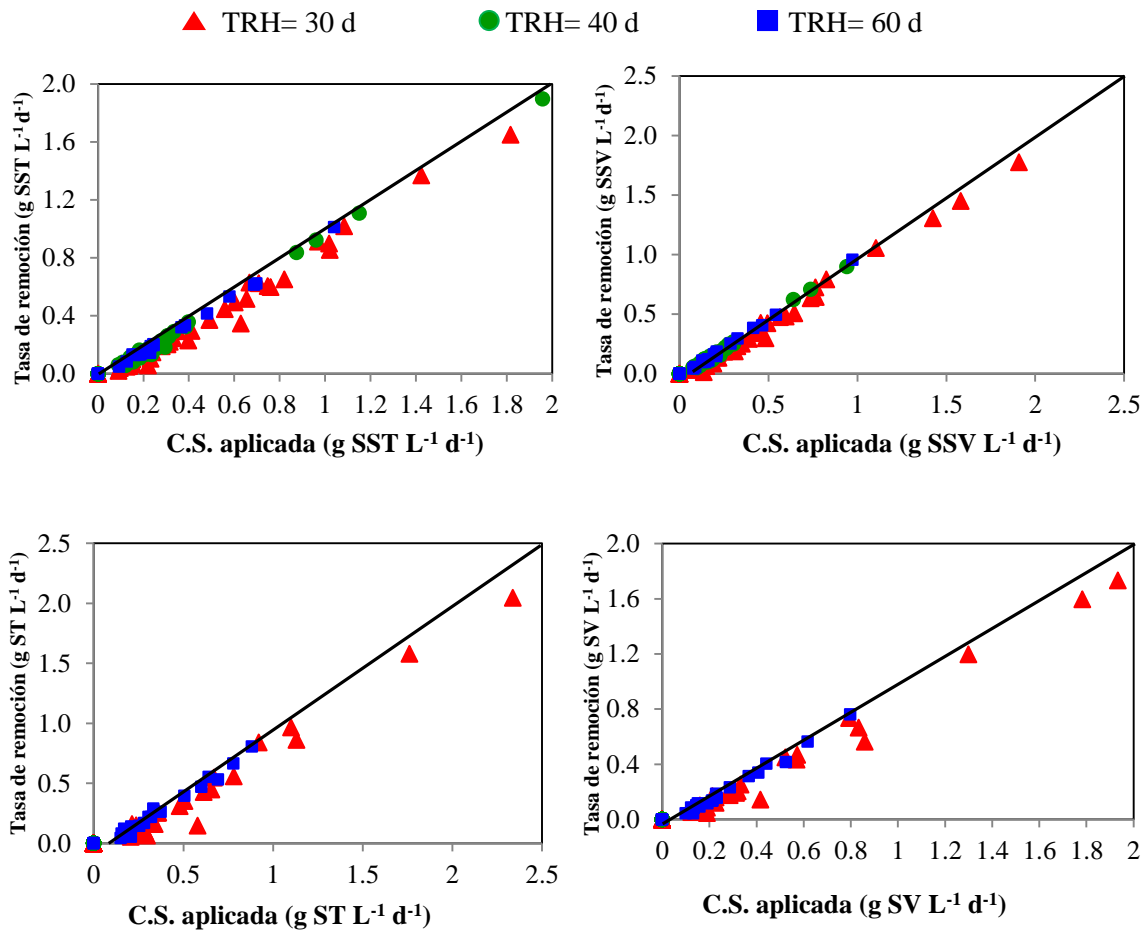


Figura 5.5 Carga de sólidos aplicada y su tasa de remoción en el digester anaerobio a escala piloto

5.2.4. Comportamiento del $N-NH_4^+$

En la gráfica de la Figura 5.6 se presenta el comportamiento del nitrógeno amoniacal. Se observa que durante los tres TRH la concentración del $N-NH_4^+$ es ligeramente mayor en el efluente ($1,455 \pm 271$, $1,532 \pm 229$ y $1,663 \pm 349$ mg L⁻¹) que en el influente ($1,245 \pm 259$, $1,355 \pm 194$ y $1,212 \pm 254$ mg L⁻¹), respectivamente para el TRH de 30, 40 y 60 d. Este incremento en la concentración de $N-NH_4^+$ es similar al reportado por Bonmati y Flotats (2002) en un digester anaerobio para el tratamiento de agua residual porcina con un incremento en la concentración de nitrógeno amoniacal del 8% en el efluente. El incremento en la concentración de nitrógeno amoniacal puede ser explicado por el proceso de amonificación (Garzón-Zúñiga *et al.*, 2005) o hidrólisis de los grupos amino, aminoácidos y todos los compuestos orgánicos con contenido de nitrógeno que al ser deaminados producen un incremento en el contenido de nitrógeno amoniacal (Gerardi y Chairman, 1994).

Por otro lado, Liu y Sung (2002) determinaron un valor de 200 mg L^{-1} como una concentración segura de nitrógeno amoniacal, puesto que a concentraciones mayores a esta se observa un efecto tóxico sobre la digestión anaerobia. Sin embargo, Procházka *et al.*, (2012) encontraron que altas concentraciones de nitrógeno y altos pH (7.5-8.5) incrementan la capacidad buffer del sistema y contribuyen positivamente a la estabilidad de reactores anaerobios y a su resistencia contra sobrecargas de materia orgánica. Por lo tanto, en el digester anaerobio evaluado es probable que la estabilidad del pH en el efluente de la granja y las altas concentraciones de materia orgánica no permitieran que las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal inhibieran el funcionamiento del sistema. Estas altas concentraciones de N encontradas en el efluente del digester concuerdan con los resultados presentados por Garzón-Zúñiga y Buelna (2014) quienes en sistemas de este tipo a escala real encontraron concentraciones de NTK de 774 y 1674 mg L^{-1} en digestores tipo dalys. Finalmente es necesario resaltar que un efluente con estas concentraciones de nitrógeno requiere forzosamente de un tratamiento adicional para poder ser vertido en los cuerpos de agua.

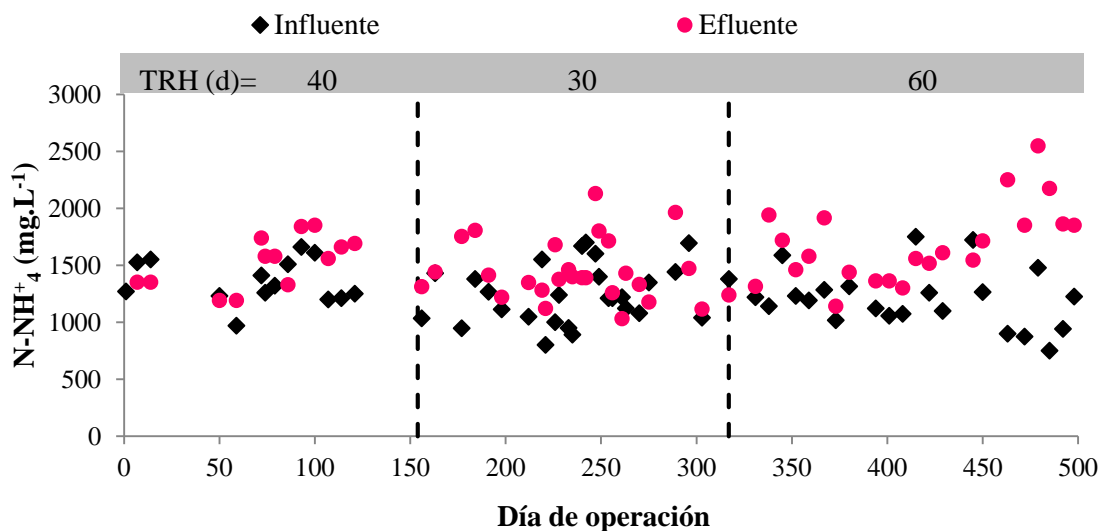


Figura 5.6 Comportamiento del nitrógeno amoniacal en el digester anaerobio a escala piloto

Una vez transcurridas las etapas experimentales del digester escala piloto se obtuvo lodo anaerobio aclimatado al agua residual porcina para continuar con las siguientes etapas experimentales específicamente las pruebas de inhibición de la AME y la aclimatación de la biomasa a la tilosina.

5.3. Pruebas de Actividad metanogénica específica (AME) con tilosina

El inóculo utilizado para las pruebas de AME proviene del digestor anaerobio a escala piloto en la fase de operación de 30 d de TRH. De acuerdo a la caracterización del inóculo se realizaron los cálculos de las cantidades que debían adicionarse a cada botella serológica para obtener un volumen de 54 mL permitiendo un 10% del volumen del frasco para la fase gaseosa y manteniendo la relación descrita por Souto *et al.*, (2010) para los micronutrientes, macronutrientes, inóculo, solución de acetato de sodio y F/M o S/X. (Tabla 5.5).

Tabla 5.5 Cantidades de reactivos e inóculo y características del lodo anaerobio proveniente del digestor testigo utilizado en la prueba de AME.

Parámetro	Unidades	Valor
ST	g L ⁻¹	80.7
STV	g L ⁻¹	45.2
SST	g L ⁻¹	71.5
SSV	g L ⁻¹	41.0
Inóculo	mL	4.9
Macronutrientes	mL	4.9
Micronutrientes	mL	0.05
Solución de acetato de sodio	mL	44.17

Los resultados de las pruebas de AME se muestran en la Figura 5.7. Se puede observar claramente en las gráficas que la presencia de tilosina inhibe la generación de metano aún a concentraciones tan pequeñas como 0.01 mg L⁻¹ y que después de 28 días de seguimiento las muestras con concentraciones superiores a 0.5 mg L⁻¹ prácticamente no producen metano. También se observa, en la misma gráfica de producción de metano acumulado, que después de 21 días de medición, el lodo sin adición de antibiótico ha generado ya el 100% del metano esperado (776 mL), mientras que el resto de las muestras presenta producciones de metano menores. Tomado como un 100% de generación de metano el volumen generado por la muestra sin adición de antibiótico, todas las concentraciones presentaron un porcentaje de inhibición de la metanogénesis superior al 97% excepto para las concentraciones más bajas (0.01, 0.05 y 0.1 mg L⁻¹) en las que se obtuvo una inhibición del 49 al 87%. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Shimada *et al.*, (2008) para concentraciones tales como 167 mg L⁻¹ en reactores SBR, sin embargo para concentraciones menores a 16.7 mg L⁻¹ los resultados son diferentes a lo reportado por Shimada *et al.*, (2008), Angenent *et al.*, (2008) y Poels *et al.*, (1984) quienes mencionan que no existe inhibición por la presencia del antibiótico en sistemas de digestión anaerobia. Esta diferencia se debe a que los resultados reportados por estos autores pertenecen a la generación de metano en digestores anaerobios en operación y no a pruebas específicas de actividad metanogénica. El único experimento que fue evaluado en discontinuo

corresponde al realizado por Stone *et al.*, (2009) quienes encontraron que no existe inhibición de la metanogénesis a una concentración de tilosina de 1.1 mg L^{-1} , sin embargo, los resultados se reportan solamente a un tiempo de 216 d. Este periodo tan largo de experimentación permitió que la biomasa se adaptara a la presencia de tilosina pues se reportó una desaparición de la misma después de 216 d, lo que probablemente repercutió en una aclimatación de la biomasa al antibiótico.

En cuanto al valor de AME calculado para el lodo del digester piloto aclimatado al agua residual de la granja porcina sin adición de antibiótico, éste fue de $0.34 \text{ g CH}_4 \text{ g DQO g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$, valor que concuerda con los reportados por López *et al.*, (2004) para digestores anaerobios (0.02 a $0.2 \text{ g CH}_4 \text{ g DQO g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$), lo que indica que el lodo sin adición del antibiótico trabaja de forma adecuada. Por otro lado, para el lodo que ha tenido contacto con el antibiótico, con concentraciones entre 0.1 y $1,000 \text{ mg L}^{-1}$, se obtuvieron valores de AME entre 0.002 y $0.019 \text{ g CH}_4 \text{ g DQO g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$, valores menores a los mencionados anteriormente, lo que indica que la actividad metanogénica del lodo está siendo inhibida por la presencia del antibiótico. En el caso de concentraciones de tilosina de 0.01 y 0.05 mg L^{-1} se obtuvieron valores de AME de 0.155 y $0.068 \text{ g CH}_4 \text{ g DQO g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente, las cuales a pesar de encontrarse en un intervalo aceptable, son menores a la encontrada para el lodo sin antibiótico.

Los resultados anteriores van en el sentido de lo que mencionan Chelliapan *et al.*, (2011): “es imposible predecir el efecto de los antibióticos en sistemas de tratamiento anaerobio ya que cada sistema requiere una investigación específica”. Por lo tanto, las contradicciones encontradas respecto al efecto inhibitorio de la tilosina sobre la metanogénesis podrían atribuirse al tipo de biomasa utilizada, a la concentración de tilosina, a las condiciones de evaluación, al tipo de agua evaluada, a la configuración del reactor evaluado, a la combinación entre altas concentraciones de nitrógeno amoniacal y la presencia de tilosina (para el caso particular de este estudio), a la concentración de sólidos y al tipo de mezcla.

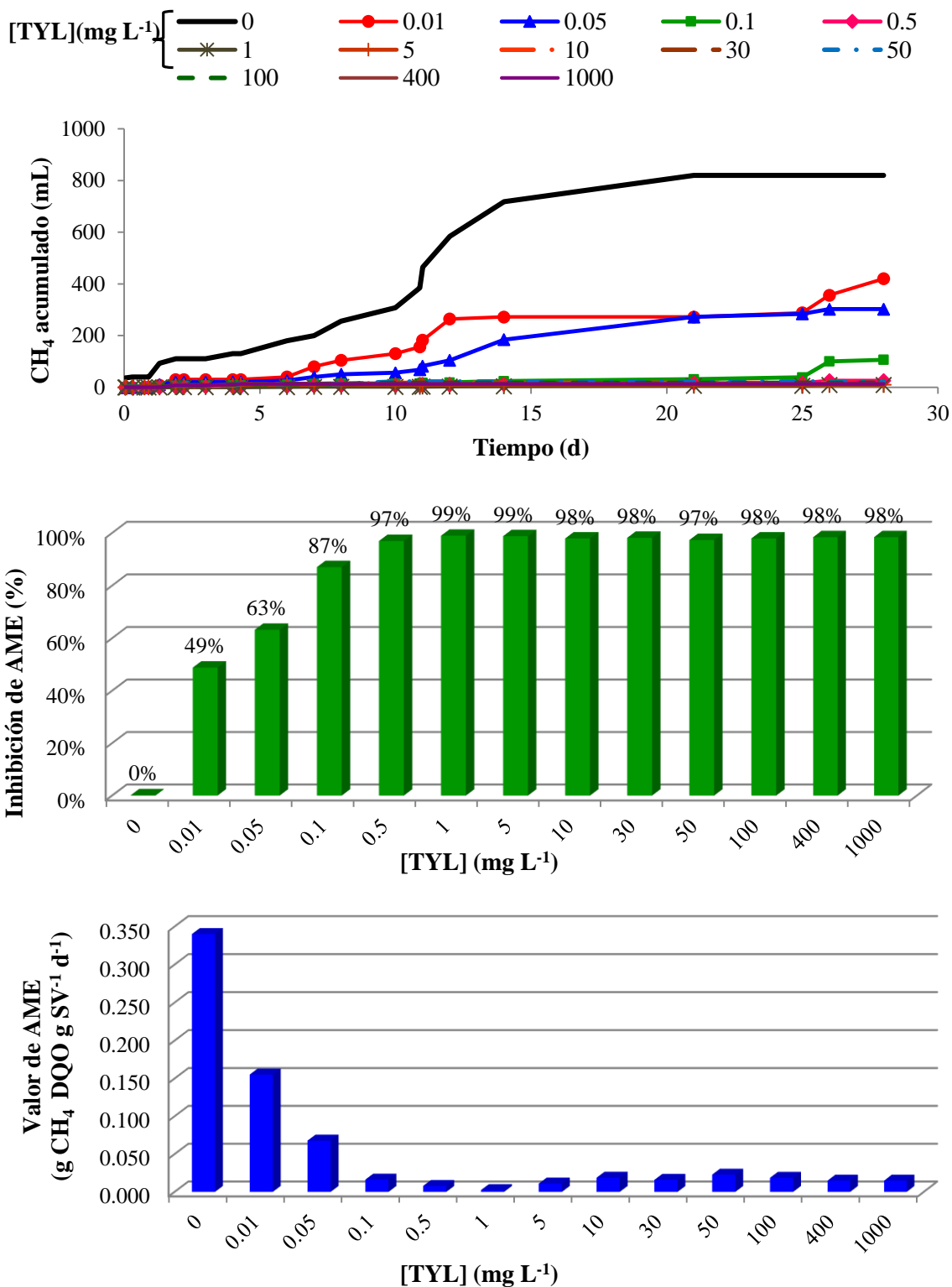


Figura 5.7 Resultados de las pruebas de AME con lodo anaerobio proveniente de un digester anaerobio con adición de tilosina

5.3.1. Afectación del desempeño de biomasa expuesta a la tilosina

Para verificar cual es la afectación que se presenta sobre la biomasa del sistema anaerobio una vez que ésta es expuesta a diferentes concentraciones de antibiótico, se realizó el siguiente experimento. Una vez finalizada la prueba de AME (después de 28 d) en la que se expuso a la biomasa a concentraciones de tilosina entre 0.01 y 1,000 mg L⁻¹ (descrita en el apartado 5.3) se realizó un seguimiento de la generación de metano con la biomasa del experimento anterior con la finalidad de verificar si ésta podía reactivarse en concentraciones menores de tilosina o si había perdido su capacidad metanogénica. Para ello, se dejaron sedimentar los frascos de la prueba anterior y se retiró el sobrenadante (51 mL), los frascos fueron llenados nuevamente con las mismas cantidades de fuente de carbono (acetato de sodio), macronutrientes y micronutrientes (Tabla 5.5, página 71) dentro de la cámara anaerobia y posteriormente sellados y puestos en incubación a 30°C con agitación continua para medir nuevamente la generación de metano por desplazamiento. Con esta metodología se diluyó la concentración de tilosina remanente en el volumen de lodo (3 mL), teniendo así para esta prueba concentraciones de tilosina entre 0.0006 y 55.6 mg L⁻¹. El experimento se siguió por 14 días (por triplicado) en los cuales se obtuvo el 100% de metano esperado para el blanco (lodo sin tilosina, Figura 5.8).

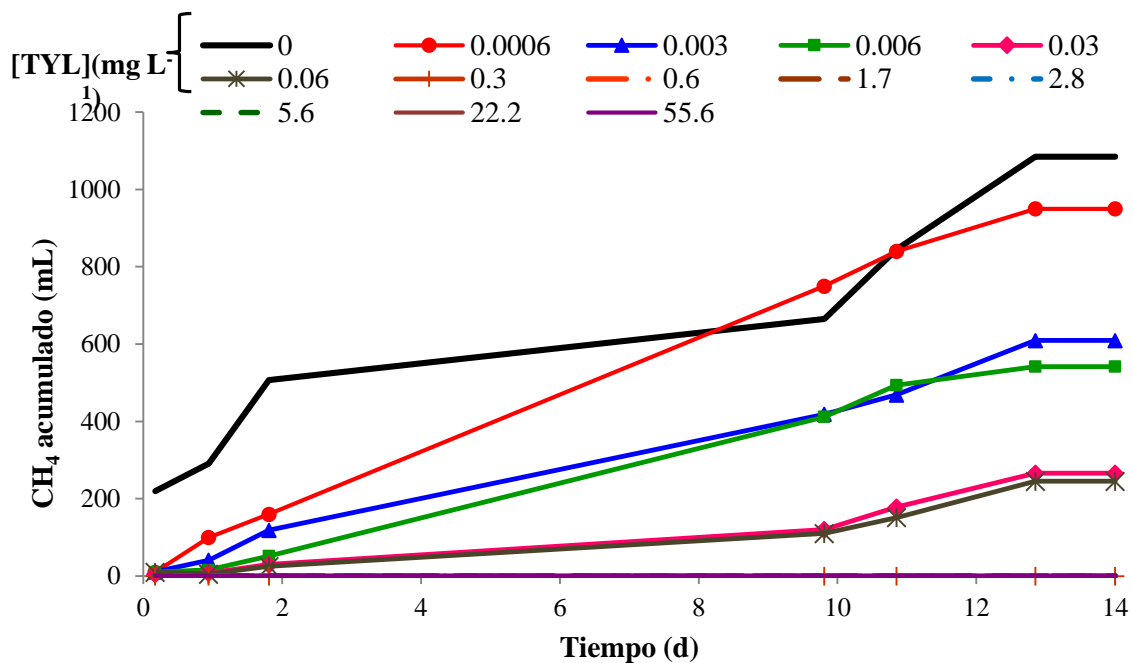


Figura 5.8 Resultados de la prueba de seguimiento de AME con biomasa sin adición de tilosina

Se puede observar en la gráfica que al adicionar nuevamente una fuente de carbono, en ninguno de los casos la biomasa se comporta como el blanco, incluso en presencia de las

menores concentraciones del antibiótico. Es decir, para todas las concentraciones de tilosina probadas se presentó una afectación sobre el desempeño de la biomasa. El grado de afectación se presentó más severo a medida que la concentración de tilosina a la que fue expuesta la biomasa en el experimento anterior aumentó. Así para las concentraciones de 0.0006, 0.003 y 0.006 mg L⁻¹ (concentraciones remanentes del experimento anterior de 0.01, 0.05 y 0.1 mg L⁻¹, respectivamente) la generación de metano fue del 88, 56 y 50%, respectivamente, mientras que para la biomasa expuesta a concentraciones remanentes de tilosina de 0.03 y 0.06 mg L⁻¹ (0.5 y 1.0 mg L⁻¹ del experimento anterior, respectivamente) la generación de metano solo fue del 25 y 23%, respectivamente. Finalmente, la biomasa expuesta a concentraciones de tilosina mayores a 0.3 mg L⁻¹ (remanente de 5 mg L⁻¹ de la prueba de AME anterior) perdió por completo la capacidad de generar metano. Probablemente la afectación se relacione con el número de microorganismos que han sobrevivido en presencia de las diferentes concentraciones de tilosina pues a pesar de la disminución en la concentración del antibiótico, no se logró obtener un 100% del volumen de metano esperado ya que éste es menor en las muestras que han tenido contacto con las mayores concentraciones de tilosina en el experimento anterior.

5.4. Aclimatación de biomasa a la tilosina

Cuando se lleva a cabo la degradación de compuestos tóxicos en reactores biológicos generalmente al inicio se pasa por un período en donde no existe una transformación de dicho compuesto, este intervalo de tiempo se llama periodo de aclimatación, adaptación o periodo de retraso. La aclimatación es una selección y multiplicación de microorganismos especializados que después de un determinado tiempo de adaptación (horas, días o meses, dependiendo de la biomasa y del compuesto tóxico a tratar) son capaces de biodegradar, cometabolizar o solamente sobrevivir a la presencia del compuesto en cuestión.

Los periodos de aclimatación han sido reportados para muchos compuestos en el suelo, agua y sedimentos. Entre los compuestos que han sido utilizados para aclimatar a una biomasa encontramos herbicidas, insecticidas, fungicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc. (Lozano, 2010). La fase de aclimatación es considerada muy importante para la biodegradación de los compuestos tóxicos, debido a que después de que se presenta, la velocidad con la que el compuesto se metaboliza es más rápida.

En la presente investigación se requería obtener biomasa aclimatada a la tilosina para realizar la última etapa experimental. Para esta aclimatación se utilizaron y evaluaron cuatro reactores anaerobios de 5 L que tratan agua residual de la industria porcina. En tres de los reactores el agua residual porcina fue enriquecida con el antibiótico (tilosina), cuya concentración fue incrementada progresivamente de acuerdo a lo planteado con el apartado 4.5 de la metodología. El cuarto reactor operó como blanco sin adición de tilosina. Cada

reactor con tilosina operó con un TRH diferente (R1= 30 d, R2= 40 d y R3=60 d) y el blanco (R4) con un TRH de 30 d.

Las características de la biomasa proveniente del digestor escala piloto utilizada para inocular los reactores de la etapa de aclimatación a la tilosina se presentan en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6 Caracterización de la biomasa utilizada para inocular los reactores en la etapa de aclimatación a la tilosina

Parámetro	Valor
pH	7.85
Temperatura (°C)	33
Conductividad (mS cm ⁻¹)	9.15
ST (g L ⁻¹)	107.2
SV (g L ⁻¹)	51.8
SST (mg L ⁻¹)	106,550
SSV (mg L ⁻¹)	49,650

Los resultados obtenidos durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina se detallan a continuación.

5.4.1. Comportamiento de los parámetros de campo

En las gráficas de la Figura 5.9 se presentan los resultados del pH y conductividad obtenidos durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina.

El pH del efluente de los reactores anaerobios fue ligeramente mayor al pH del influente, durante toda la experimentación. El pH en el influente se mantuvo con valores en un intervalo entre 6.1 y 7.7 y el del efluente en un intervalo entre 7.6 y 9.2 en los cuatro reactores durante toda la experimentación. Los valores promedio de pH en el influente fueron 6.8 ± 0.03 , 7.4 ± 0.3 , 6.6 ± 0.5 y 7.1 ± 0.4 para la etapa 1, 2, 3 y 4, respectivamente, los cuales son similares a los encontrados en el agua residual porcina utilizada para alimentar el digestor escala piloto. Los valores promedio de pH obtenidos en los efluentes durante la etapa 1 ([TYL]=0.01 mg L⁻¹, TRH 30 (R1), 40 (R2) y 60 d (R3); TRH 30 d (R4) sin tilosina) fueron 8.3 ± 0.4 para el reactor R1 y 8.4 ± 0.5 para los reactores R2, R3 y R4. Durante la etapa 2 ([TYL]=0.05 mg L⁻¹, TRH 30 (R1), 40 (R2) y 60 d (R3); TRH 30 d (R4) sin tilosina) los valores de pH promedio del efluente fueron 8.3 ± 0.4 para los reactores R1, R2 y R3 y 8.4 ± 0.4 para el reactor R4. Durante la etapa 3 ([TYL]=0.05 mg L⁻¹, TRH 15 (R1), 20 (R2) y 25 d (R3); TRH 15 d (R4) sin tilosina) los valores promedio de pH del efluente fueron 7.8 ± 0.2 para los reactores R1 y R4, 7.9 ± 0.1 para el reactor R2 y 8.2 ± 0.3 para el reactor R3. Por último para la etapa 4 ([TYL]=0.065 mg L⁻¹, TRH 15 (R1), 20 (R2) y 25 d

(R3); TRH 15 d (R4) sin tilosina) los valores promedio de pH del efluente fueron 8.3 ± 0.2 , 8.3 ± 0.2 , 8.4 ± 0.2 y 8.2 ± 0.1 , para el reactor R1, R2, R3 y R4, respectivamente. En general los valores promedio de pH fueron muy similares entre los reactores durante cada etapa experimental, observándose una clara disminución del mismo al disminuir los TRH en la etapa 3, sin embargo una vez estabilizados los reactores a los nuevos valores de TRH, el pH retoma valores entre 8.3 y 8.4. No se observaron diferencias del pH de los reactores con tilosina con respecto al digestor testigo (R4). Comparando los resultados de pH en los efluentes de los reactores con respecto al digestor escala piloto, se observa que los pH encontrados durante la aclimatación de la tilosina son mayores a los del digestor, los cuales fueron de 7.8 ± 0.2 , 7.7 ± 0.1 y 7.9 ± 0.2 para el TRH de 30, 40 y 60 d. Este incremento en los valores del pH no puede ser atribuido a la presencia del antibiótico puesto que el incremento también se presentó en el reactor testigo (R4). Esto más bien indicaría que el incremento se debe a la temperatura de operación que es más constante, a la forma de agitación (puntual en el digestor escala piloto y orbital en la aclimatación) y a las variaciones en el influente.

Los resultados de conductividad muestran variaciones tanto en el influente como en los efluentes de los cuatro reactores con valores entre 5 y 9.3 mS cm^{-1} durante las cuatro etapas experimentales. La etapa 4 fue la más estable para los reactores en cuanto a la conductividad presentando valores promedio en el influente de $7.0\pm 0.8 \text{ mS cm}^{-1}$ y en el efluente de 7.8 ± 0.6 , 7.9 ± 0.7 , 8.0 ± 0.7 y $8.1\pm 0.5 \text{ mS cm}^{-1}$ para el reactor R1, R2, R3 y R4, respectivamente. Los valores obtenidos durante los TRH de 30, 40 y 60 d para los cuatro reactores durante la etapa de aclimatación de la biomasa fueron menores en un 40% a los obtenidos en la operación del digestor escala piloto.

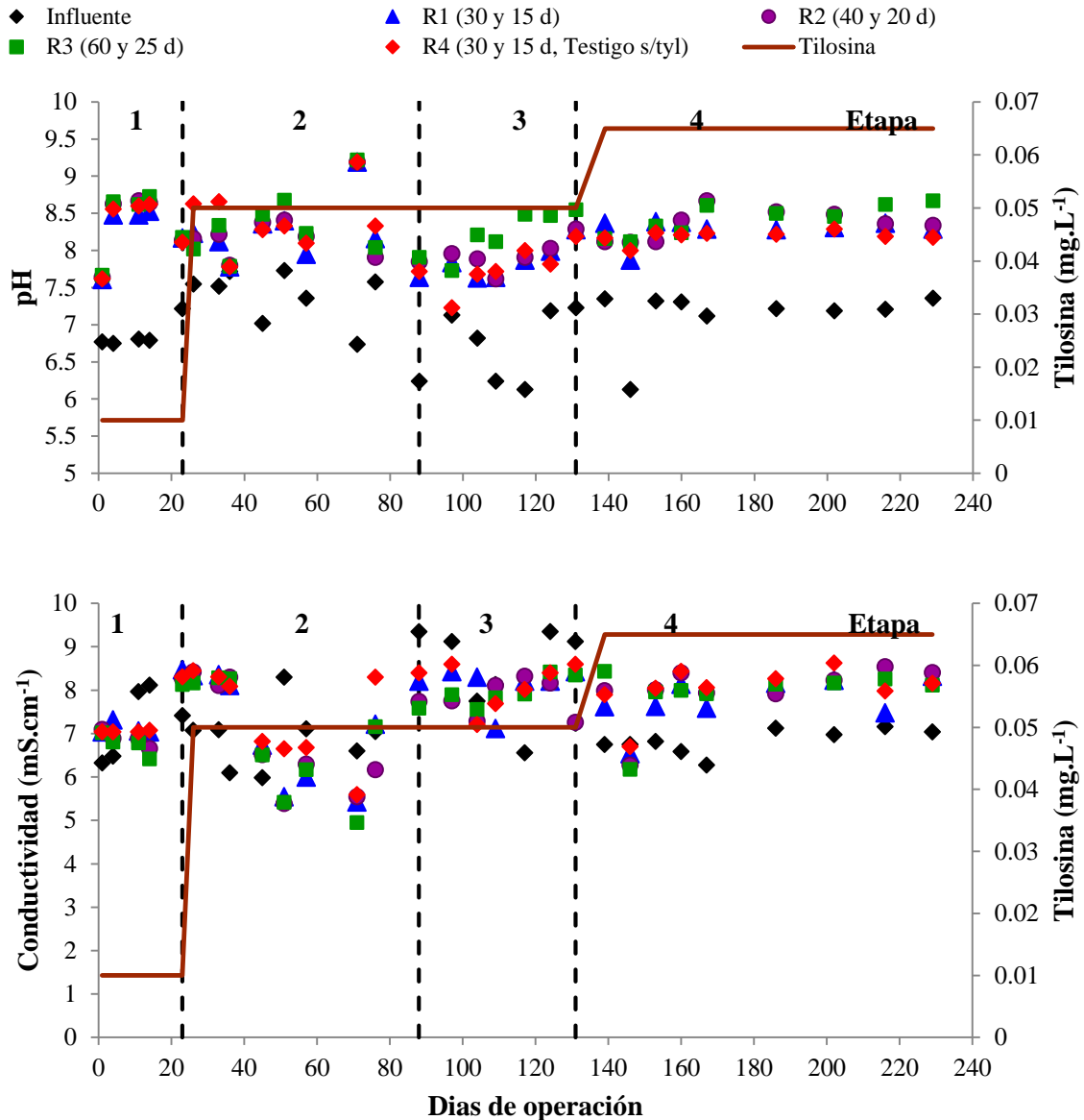


Figura 5.9 Parámetros de campo de los reactores anaerobios durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina: pH y conductividad

5.4.2. Comportamiento de la materia orgánica

En las gráficas de la Figura 5.10 se presenta el comportamiento de la materia orgánica total y soluble en los reactores anaerobios durante la aclimatación de la biomasa. El agua residual porcina cruda (influyente) fluctuó en concentraciones entre 11,000 y 23,000 mg L⁻¹ de DQOt y entre 4,000 y 18,000 mg L⁻¹ de DQOs, los valores son similares a los obtenidos durante la operación del digestor piloto y propios de aguas residuales porcinas. Sin embargo, a diferencia del digestor piloto, las concentraciones del influente fueron más

estables, debido a un cambio en la forma de recolección de la muestra, puesto que durante la etapa de operación del digestor piloto la recolección del agua residual se hacía directamente en el canal de desagüe de las naves de cerdos sin ningún tipo de tratamiento y a partir de la etapa de aclimatación la recolección se realizó con un cribado previo por medio de una malla de 1 cm de diámetro de tamaño de poro, lo que eliminó componentes del agua tales como gusanos, pedazos de madera, restos grandes de comida, que impactaban directamente la concentración de materia orgánica.

Durante las cuatro etapas experimentales la DQO_t del efluente se mantuvo en un intervalo de valores entre 2,000 y 12,500 mg L⁻¹ en los cuatro reactores anaerobios. Se observa que la concentración de DQOs en el influente durante la etapa 3 y 4 fue el doble que durante la etapa 1 y 2. A pesar de este cambio, la concentración en el efluente se mantuvo con valores en un intervalo entre 1,300 y 11,300 mg L⁻¹ para los cuatro reactores anaerobios. Cuando se llevó a cabo el cambio en el TRH (etapa 3), el sistema se desestabilizó aproximadamente durante el tiempo que dura un TRH para cada reactor, lo que repercutió en una disminución de la remoción de materia orgánica tanto total como soluble. Sin embargo, una vez pasado un TRH, los sistemas se estabilizaron, obteniendo concentraciones de materia orgánica ligeramente mayores a las de la etapa 1 y 2 con COV más elevadas (el doble de las de aplicadas en la etapa 1 y 2) durante las etapas 3 y 4. La disminución en el TRH en los cuatro reactores (R1 y R4 de 30 a 15 d, R2 de 40 a 20 d y R3 de 60 a 25 d) a partir de la etapa 3 no impactó de forma negativa la eficiencia de los sistemas.

En cuanto al incremento en la concentración de tilosina se observa una desestabilización del sistema en cada cambio, la cual dura un TRH aproximadamente, una vez transcurrido este tiempo, la biomasa logra aclimatarse a la nueva concentración de tilosina alcanzando nuevamente remociones superiores al 60%.

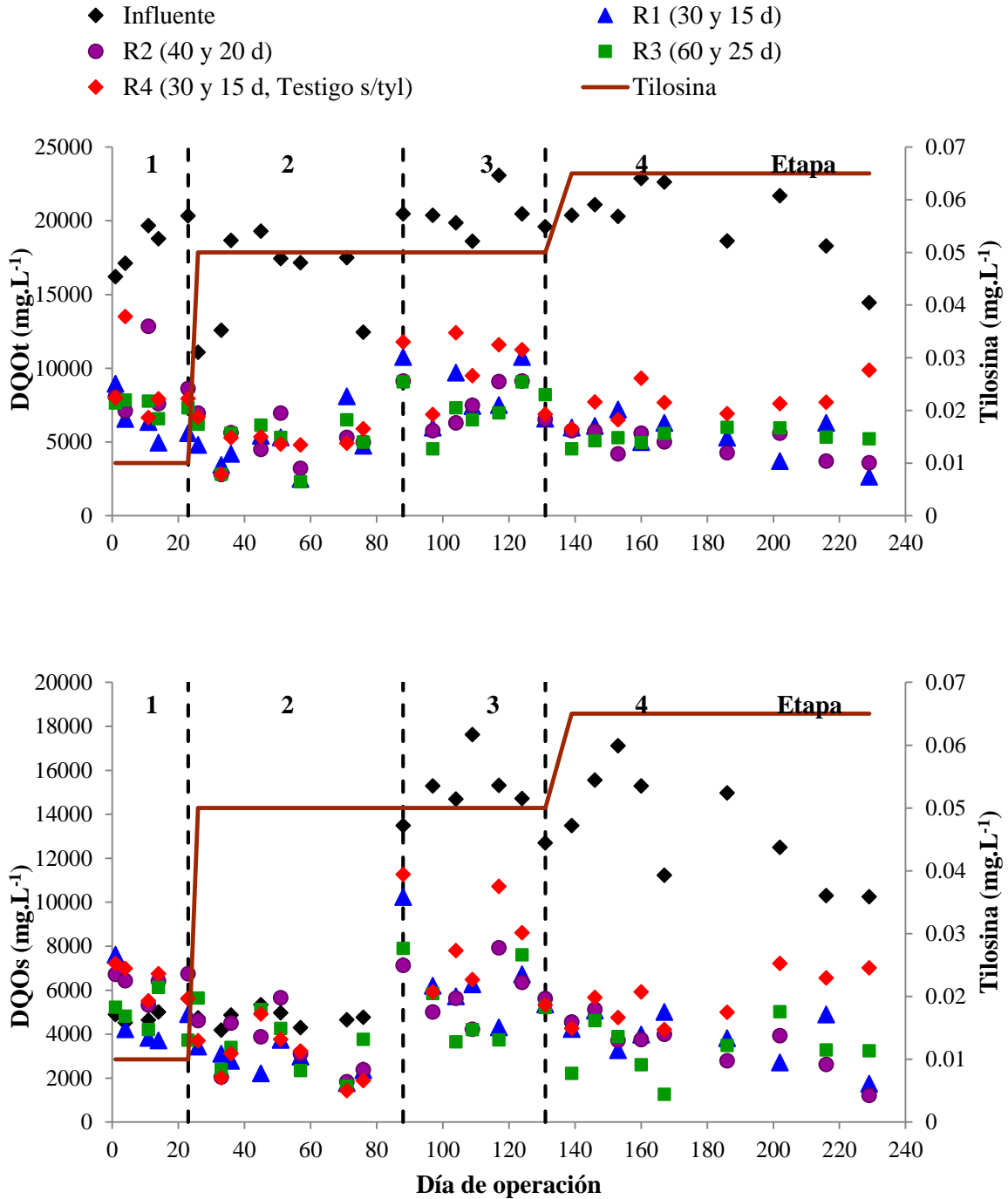


Figura 5.10 Comportamiento de la materia orgánica en los reactores anaerobios durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina

En la Tabla 5.7 se presentan los valores promedio obtenidos en la remoción de materia orgánica total y soluble en los reactores anaerobios. Durante la etapa 1 el reactor R1 operado con un TRH de 30 d presentó una mayor remoción tanto de materia orgánica total como soluble ($62\pm 10\%$ y $-1\pm 37\%$) comparada con los otros tres reactores (51 ± 11 y -31 ± 12 (R2); 58 ± 6 y -7 ± 13 (R3); 49 ± 20 y -39 ± 15 (R4)) respectivamente para la DQOt y DQOs. Estos resultados indican que el menor TRH utilizado (30 d) favoreció la remoción de materia orgánica a pesar de tener una carga orgánica más elevada (0.60 ± 0.05 kg DQO $m^{-3} d^{-1}$) que los otros tres reactores (R2= 0.45; R3= 0.30 y R4= 0.60 kg DQO $m^{-3} d^{-1}$), lo cual probablemente fue resultado del inóculo utilizado, el cual estaba aclimatado a operar con un TRH de 30 d y al comenzar la etapa de aclimatación el R1 y el R4 continuaron operando con este TRH. A pesar de la adición de tilosina a una concentración de 0.01 mg L^{-1} en la etapa 1 y de que ésta concentración había mostrado ser inhibitoria de la metanogénesis en un 49% en biomasa proveniente del digestor escala piloto, los resultados mostraron que en cuanto a la remoción de materia orgánica, la presencia de esta concentración de tilosina afectó menos el desempeño de los reactores que el cambio en la operación de los mismos, esto es el tamaño (de 481 L de volumen a 5 L) y el tipo de agitación (de puntual a orbital continua), puesto que el reactor que funcionó como testigo (sin tilosina) presentó bajas remociones (49 ± 20 y -39 ± 15 % para DQOt y DQOs, respectivamente).

Durante la etapa 2 las COV aplicadas se mantuvieron en un rango entre 0.27 y 0.54 kg DQO $m^{-3} d^{-1}$. A pesar del incremento en la concentración de tilosina (0.05 mg L^{-1}) el comportamiento de remoción de la materia orgánica tanto total como soluble fue más estable y con porcentajes de remoción superiores a los de la etapa 1. Los valores promedios de remoción para la DQOt fueron de 69 ± 10 , 66 ± 14 y $67\pm 12\%$ y para la DQOs de 37 ± 17 , 21 ± 29 y $26\pm 25\%$, respectivamente para los reactores R1, R2 y R3 (reactores con tilosina). En esta etapa fue nuevamente el reactor R1 el que obtuvo los mayores porcentajes de remoción con $69\pm 10\%$ para la DQOt y $37\pm 17\%$ para la DQOs, muy similares a los resultados del reactor testigo R4 (remoción DQOt de $66\pm 12\%$ y de DQOs de $33\pm 24\%$), lo que indica que la concentración de 0.05 mg L^{-1} de tilosina no afectó negativamente la remoción de materia orgánica y que la biomasa se había adaptado a las nuevas condiciones de operación. Por otra parte en esta etapa las eficiencias de remoción entre los tres reactores operados con diferentes TRH fueron muy similares, como se muestra en la Tabla 5.7; pero aún más, el análisis estadístico (ANOVA con 95% de confianza y 3 grados de libertad, Anexo III, inciso B) arrojó un valor de $P= 0.917$ que significa que el efecto del tratamiento por el TRH es el mismo o que no existen diferencias significativas en la eficiencia de remoción de materia orgánica entre los tres reactores con los diferentes TRH.

Con base en estos resultados en los que se probó que no había diferencia en la eficiencia de remoción de materia orgánica al aplicar TRH entre 30 y 60 d, se decidió disminuir el TRH a valores de 15, 20 y 25 d, respectivamente para los reactores R1, R2 y R3. Para dar

seguimiento al reactor testigo, también se disminuyó su TRH a 25 d. Este cambio tendría el efecto de una disminución del tamaño del reactor y por lo tanto una ventaja económica de implantación de esta tecnología cuando se aplica a escala real.

En la Tabla 5.7 también se puede observar que al disminuir el TRH (etapa 3) se presentó una disminución en la eficiencia de remoción tanto de materia orgánica total como soluble resultado de la desestabilización del sistema por el consiguiente incremento, a más del doble, de la carga orgánica en los cuatro reactores anaerobios. Sin embargo, la disminución en la eficiencia de remoción no fue muy severa obteniéndose valores promedio de remoción de DQOt de 57 ± 10 , 62 ± 7 , 64 ± 8 y $48\pm 10\%$ para el R1, R2, R3 y R4, respectivamente y de DQOs de 56 ± 17 , 60 ± 11 , 63 ± 15 y $43\pm 18\%$ para el R1, R2, R3 y R4, respectivamente. Se observa que una vez más y contrario a lo esperado, el reactor que resultó más afectado fue el R4 (testigo). Una posible explicación sería porque la biomasa de los reactores con tilosina está constituida por microorganismos especializados, (aclimatados a compuestos tóxicos como la tilosina) que a diferencia de los que se encuentran en el reactor R4 pudieran no ser severamente afectados por la presencia de compuestos inhibitorios del agua residual porcina tales como los metales, otros antibióticos u otros compuestos. Al realizar el análisis estadístico (ANOVA con 95% de confianza y 3 grados de libertad, Anexo III, inciso B) para este periodo experimental se encontró que tampoco hubo diferencias significativas entre la eficiencia de remoción de los reactores R1, R2 y R3, sin embargo, el R4 fue significativamente diferente.

En la 4ª etapa de la aclimatación, al aplicar una concentración de tilosina de 0.065 mg L^{-1} se observó que los porcentajes de remoción de materia orgánica fueron los más altos obtenidos (DQOt de 72 ± 6 , 75 ± 4 , $71\pm 6\%$, para los reactores R1, R2 y R3, respectivamente). Sorprendentemente una vez más el reactor que presentó las menores eficiencias fue el reactor testigo R4 sin tilosina ($66\pm 12\%$). El análisis de varianza mostró que el TRH no influyó en la remoción de materia orgánica durante esta etapa experimental. Sin embargo, al realizar un análisis estadístico (ANOVA con 95% de confianza y 3 grados de libertad) de la eficiencia de remoción de materia orgánica entre las etapas de experimentación de cada reactor (diferentes concentraciones de tilosina) se obtuvieron valores de P de 0.023, 0.002 y 0.097 (valores mayores a 0.05 rechazan la hipótesis nula, por lo tanto los tratamientos son diferentes), lo que significa que la concentración de tilosina si tiene efecto sobre la remoción de materia orgánica durante las cuatro etapas experimentales en los tres reactores. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, al aumentar la concentración de tilosina en cada etapa se va obteniendo una mejor eficiencia de remoción de materia orgánica. Esto podría explicarse mediante una protooperación o cooperación entre los microorganismos en presencia de la tilosina.

Tabla 5.7 Valores promedio de materia orgánica obtenidos en los reactores anaerobios durante la etapa de aclimatación de la biomasa

Reactor	Etapa (TRH, [TYL]= mg L ⁻¹)	COV aplicada (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	DQO _t		DQO _s	
			Efluente (mg·L ⁻¹)	Remoción (%)	Efluente (mg·L ⁻¹)	Remoción (%)
1	1 (30, 0.01)	0.60±0.05	6,716±1,659	62±10	4,841±1,861	-1±37
	2 (30, 0.05)	0.54±0.11	4,916±1,565	69±10	3,031±935	37±17
	3 (15, 0.05)	1.37±0.10	8,702±2,000	57±10	6,572±1,976	56±17
	4 (15, 0.065)	1.33±0.17	5,520±1,399	72±6	4,007±1,162	69±11
2	1 (40, 0.01)	0.45±0.04	8,921±2,647	51±11	6,222±611	-31±12
	2 (40, 0.05)	0.41±0.08	5,455±1,866	66±14	3,859±1,684	21±29
	3 (20, 0.05)	1.02±0.07	7,833±1,529	62±7	6,042±1,372	60±11
	4 (20, 0.065)	1.00±0.12	5,016±1,005	75±4	3,729±1,281	72±9
3	1 (60, 0.01)	0.30±0.03	7,474±597	58±6	5,092±804	-7±13
	2 (60, 0.05)	0.27±0.06	5,255±1,671	67±12	3,588±1,316	26±25
	3 (25, 0.05)	0.82±0.06	7,260±1,712	64±8	5,493±1,928	63±15
	4 (25, 0.065)	0.80±0.10	5,631±1,009	71±6	3,485±1,255	73±10
4	1 (30, 0)	0.60±0.05	9,035±3,053	49±20	6,615±758	-39±15
	2 (30, 0)	0.54±0.11	5,410±1,412	66±12	3,297±1,395	33±24
	3 (15, 0.05)	1.37±0.10	10,580±2,058	48±10	8,464±2,180	43±18
	4 (15, 0)	1.33±0.17	7,625±1,211	61±11	5,590±1,079	56±14

Haciendo una comparación entre el comportamiento de remoción de materia orgánica entre el digester a escala piloto operado sin tilosina y los digestores utilizados para aclimatar la biomasa al antibiótico se puede decir que en general, la remoción fue menor en los reactores aclimatados a la tilosina, en las primeras etapas de la aclimatación, respecto al digester escala piloto, sin embargo, en la última etapa en la que se aplicó la mayor concentración de tilosina (0.065 mg L⁻¹) las eficiencias en los reactores con tilosina R1, R2 y R3 (72±6, 75±4 y 71±6, respectivamente) se acercan mucho a las del digester piloto, el

cual presentó las siguientes eficiencias: 72 ± 12 , 72 ± 11 y 77 ± 11 para los TRH de 30, 40 y 60 d, respectivamente. Por lo que se puede concluir que la biomasa se adaptó muy bien a la máxima concentración de tilosina aplicada a los reactores.

Por otra parte, al comparar el comportamiento y desempeño de los reactores R1, R2 y R3 con el reactor testigo R4, se observó que éste último presentó remociones menores, lo que probablemente pudiera indicar que el agua residual porcina contiene algún contaminante no medido que afectó negativamente a los microorganismos no aclimatados. Otra explicación para este comportamiento pudiera ser como menciona Ortiz (2013) que la disminución de la competencia por los nutrientes entre los microorganismos y/o la disminución de metabolitos microbianos provoquen que el antibiótico funcione como un promotor del crecimiento en los microorganismos especializados tal como el autor lo menciona para la microbiota intestinal de los cerdos.

En la Figura 5.11 se puede observar claramente que para los TRH de 30, 40 y 60 d las COV aplicadas (Etapa 1 y 2) son menores a las aplicadas para los TRH de 15, 20 y 25 d (Etapa 3 y 4) y que a medida que se incrementa la COV la tasa de remoción disminuye en los cuatro reactores, siendo el R4 el de mayor afectación negativa por el incremento de la carga orgánica. Para el caso de las cargas menores a $1.0 \text{ kg DQO m}^3 \text{ d}^{-1}$ se observa que los reactores se comportan de forma similar. Para las cargas comprendidas entre 1.2 y $1.6 \text{ kg DQO m}^3 \text{ d}^{-1}$ la tasa de remoción del reactor R1 ($0.90\pm 0.18 \text{ kg DQO m}^3 \text{ d}^{-1}$) es ligeramente menor a la del R4 ($0.76\pm 0.19 \text{ kg DQO m}^3 \text{ d}^{-1}$).

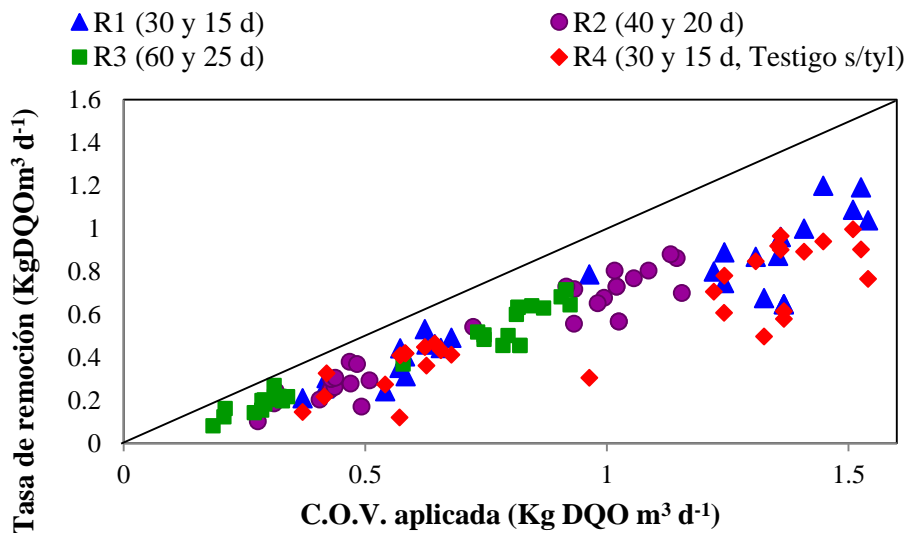


Figura 5.11 Carga orgánica aplicada y su tasa de remoción en los reactores anaerobios durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina

5.4.3. Comportamiento de los sólidos

En la gráfica de la Figura 5.12 se puede observar el comportamiento de los sólidos totales y volátiles durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina en los cuatro reactores. Durante las cuatro etapas experimentales el influente se mantuvo en valores en un intervalo entre 13 y 22 g L⁻¹ de ST y un intervalo entre 9 y 15 g L⁻¹ de SV, mientras que para los efluentes de los cuatro reactores los valores se mantuvieron entre 3 y 8 g L⁻¹ de ST y entre 1.5 y 6 g L⁻¹ de SV. Se observa que durante las cuatro etapas experimentales los efluentes de los reactores fueron muy estables lo que confirma que la biomasa se aclimató al cambio en el TRH y a la presencia del antibiótico.

Los porcentajes de remoción promedio de ST durante la etapa 1 fueron 69±3, 67±4, 66±2 y 63±8%, durante la etapa 2 fueron 72±7, 70±6, 70±6 y 67±8%, durante la etapa 3 fueron 71±6, 71±4, 68±8 y 67±5% y durante la etapa 4 fueron 67±3, 69±6, 70±5 y 66±6% para los reactores R1, R2, R3 y R4, respectivamente para cada etapa. Los porcentajes de remoción promedio de SV durante la etapa 1 fueron 75±5, 72±5, 71±3 y 67±9%, durante la etapa 2 fueron 78±7, 79±5, 76±6 y 74±8%, durante la etapa 3 fueron 69±5, 69±5, 67±9 y 65±5% y durante la etapa 4 fueron 66±8, 69±8, 68±6 y 58±8% para los reactores R1, R2, R3 y R4, respectivamente para cada etapa. Se observa que de forma similar a la remoción de materia orgánica, durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina, el reactor testigo R4 presentó eficiencias de remoción de sólidos ligeramente más bajas durante las 4 fases experimentales. Sin embargo, al realizar un análisis estadístico (ANOVA con 95% de confianza y 3 grados de libertad, Anexo III, inciso B) para comparar la eficiencia entre las remociones de los reactores con tilosina y del reactor testigo por efecto del TRH no se presentaron diferencias significativas. Las remociones de sólidos obtenidas durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina fueron mayores y más estables que las obtenidas para el digestor escala piloto probablemente por el cambio en la operación ya que en la etapa de aclimatación se mantuvo una temperatura más constante y una agitación continua.

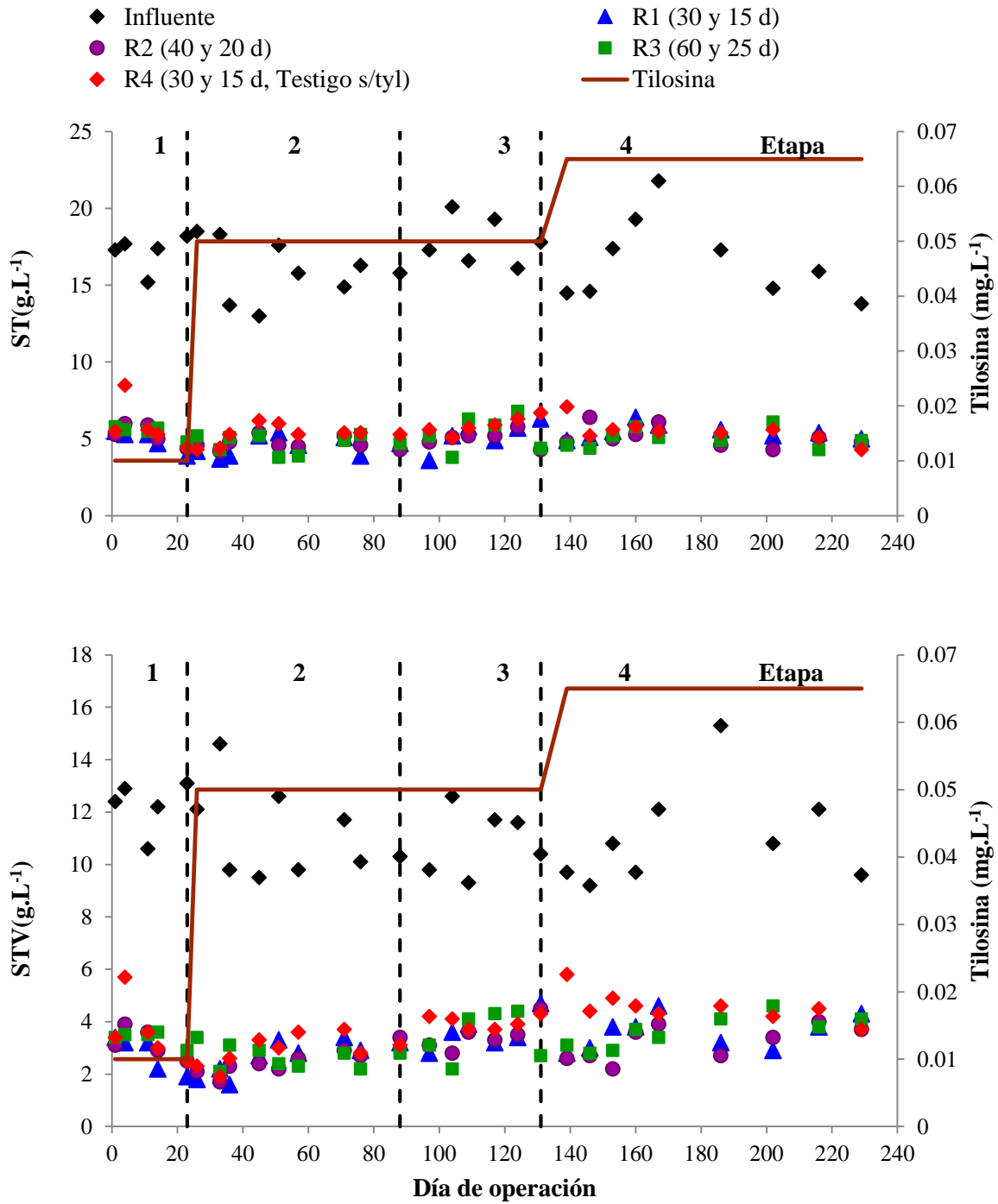


Figura 5.12 Comportamiento de los sólidos en los reactores anaerobios durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina

En lo que respecta a las cargas de sólidos (Figura 5.13) para los cuatro reactores se observó que a medida que las cargas van incrementándose como consecuencia de la disminución del

TRH la tasa de remoción va disminuyendo, lo que es de esperarse. Sin embargo, esto no se observó durante la operación del digester escala piloto en el cual a pesar de que se incrementó la carga de sólidos con valores hasta de $2.5 \text{ g ST L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $2 \text{ g SV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, las remociones se mantuvieron estables, mientras que en los reactores en los que se aclimató la biomasa las cargas fueron menores con valores hasta de $1.5 \text{ g ST L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $1.1 \text{ g SV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y las remociones disminuyeron. Por lo que se podría pensar que la presencia de la tilosina tuvo algún efecto negativo. Pero este comportamiento también se presentó en el reactor testigo R4, sin tilosina, por lo que una posible explicación sería que la carga orgánica volumétrica de los digestores en la etapa de aclimatación fue muy baja (C.O.V de 0.3 a $0.6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) para este tipo de sistemas considerados de alta carga por el tipo de agitación, temperatura y TRH aplicado durante esta etapa experimental (C.O.V ideal superior a $1.0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Metcalf y Eddy, 2003)).

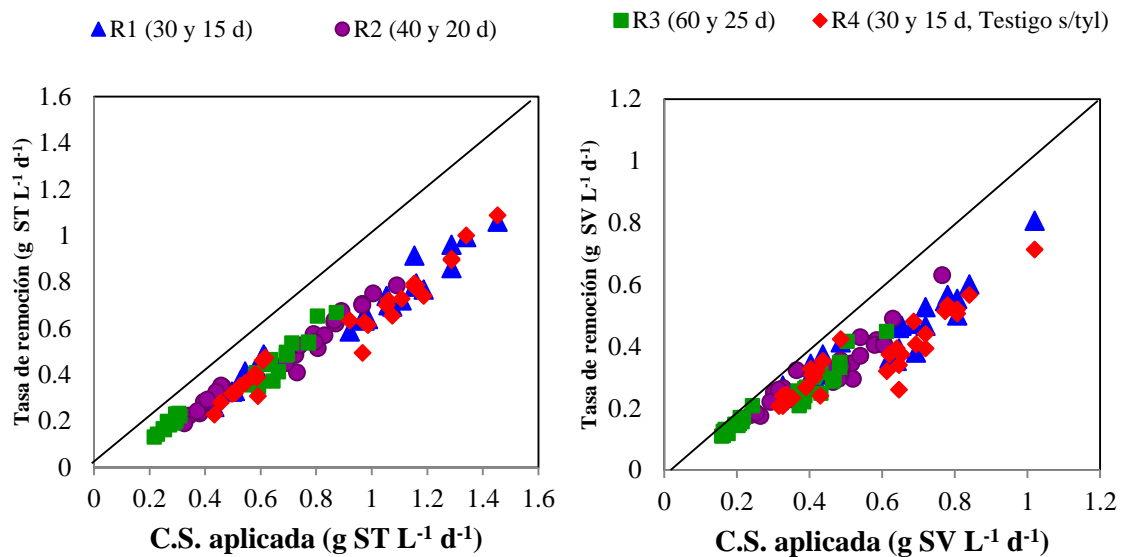


Figura 5.13 Carga de sólidos aplicada y su tasa de remoción en los reactores anaerobios durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina

5.4.4. Pruebas de AME

Tal y como fue explicado en la metodología, durante la etapa de aclimatación de la biomasa al antibiótico, se llevaron a cabo pruebas de actividad metanogénica en cada etapa experimental. Para las etapas 1 y 2 la prueba se realizó el día de operación 18 y 50, respectivamente con biomasa proveniente de los cuatro reactores experimentales a la concentración de tilosina correspondiente a la etapa experimental (0.01 y 0.05 mg L^{-1} , respectivamente), los resultados se presentan en la Figura 5.14. Se observa que en la primer etapa (0.01 mgL^{-1} tilosina, TRH= 30, 40 y 60 d) los reactores con presencia de tilosina

necesitan sólo 2 días para llevar a cabo la metanogénesis completa de la fuente de carbono adicionada, mientras que el reactor R4 tarda 10 días en producir el 100% de metano esperado, lo que respalda la teoría del funcionamiento de la tilosina como promotor de crecimiento a escala microbiológica, esto porque el antibiótico mejoraría la digestibilidad y absorción de nutrientes tal como lo hace dentro del intestino de los animales (Ortiz, 2013). Para la etapa 2 (0.05 mgL^{-1} tilosina, TRH= 30, 40 y 60 d) el reactor R1 y R3 nuevamente generan el 100% del metano en un lapso de 2 d, mientras que el R2 y el R4 tardan aproximadamente 5 d en generarlo. Este comportamiento para el R3 es el esperado puesto que la carga volumétrica de tilosina es menor. En el caso del reactor R1, probablemente el hecho de operar con las cargas orgánicas mayores comparadas con las de los otros reactores (0.54 ± 0.11 , 0.41 ± 0.08 y $0.27 \pm 0.06 \text{ kg DQO m}^{-3}\text{d}^{-1}$ para el R1, R2 y R3, respectivamente) haya favorecido la operación y buen funcionamiento del sistema, por lo que es de esperarse que genere más rápidamente el metano esperado.

Para la etapa 3 y 4 se decidió realizar las pruebas de AME solamente con la biomasa del reactor R1, pensando en que al tener el menor TRH y por lo tanto la mayor carga de materia orgánica y de tilosina, sería el reactor en el que se podía esperar mayor impacto negativo sobre el desempeño del digestor. Lo cual se comprobó con respecto a la materia orgánica ya que presentó los menores porcentajes de remoción de materia orgánica obtenidos en las etapas 3 y 4. Sin embargo, con respecto a la generación de metano no fue así. La prueba de AME se realizó con diferentes concentraciones de tilosina y no solo con la concentración de tilosina correspondiente a la etapa experimental como se realizó en las etapas 1 y 2, sino que a la biomasa aclimatada se aplicaron diferentes concentraciones menores y mayores a la del periodo de aclimatación con el fin de poder comparar el efecto negativo y la capacidad de adaptación de la biomasa al antibiótico tanto en biomasa aclimatada a una cierta concentración (0.05 y 0.065 mg L^{-1}) como en biomasa no aclimatada (obtenido en el apartado 5.3); los resultados se muestran en la Figura 5.15.

En la etapa 3 se continuó aplicando la misma concentración del antibiótico (0.05 mg L^{-1} tilosina) pero los TRH se redujeron de 30, 40 y 60 d a 15, 20 y 25 d, respectivamente para el R1, R2 y R3. Los resultados de la prueba de AME mostraron que la biomasa del reactor R1, aclimatada a 0.05 mg L^{-1} de tilosina, al no adicionarle tilosina (muestra con 0 mg L^{-1} de tilosina adicionada para la prueba) y cambiarle el TRH de 30 a 15 d si produjo el 100% del metano esperado en un lapso de 5 d, el cual fue menor al del resto de las muestras que estuvieron en presencia de tilosina. También se observó que la generación de metano alcanzó el 100% solo en aquellas muestras en las que se adicionó tilosina en una concentración mayor o igual a la concentración de la etapa de aclimatación en curso (0.05 mg L^{-1}), mientras que a concentraciones superiores la producción de metano se inhibió en un 33, 43 y 78% para la concentración de 0.075 , 0.01 y 0.15 mg L^{-1} de tilosina, respectivamente. A pesar de que aún se encontró inhibición para algunas concentraciones

de tilosina ésta fue menor a la encontrada para la biomasa del digester piloto (no aclimatada a la tilosina) en la cual se encontró una inhibición de superior al 44% para concentraciones iguales o superiores a 0.05 mg L^{-1} de tilosina.

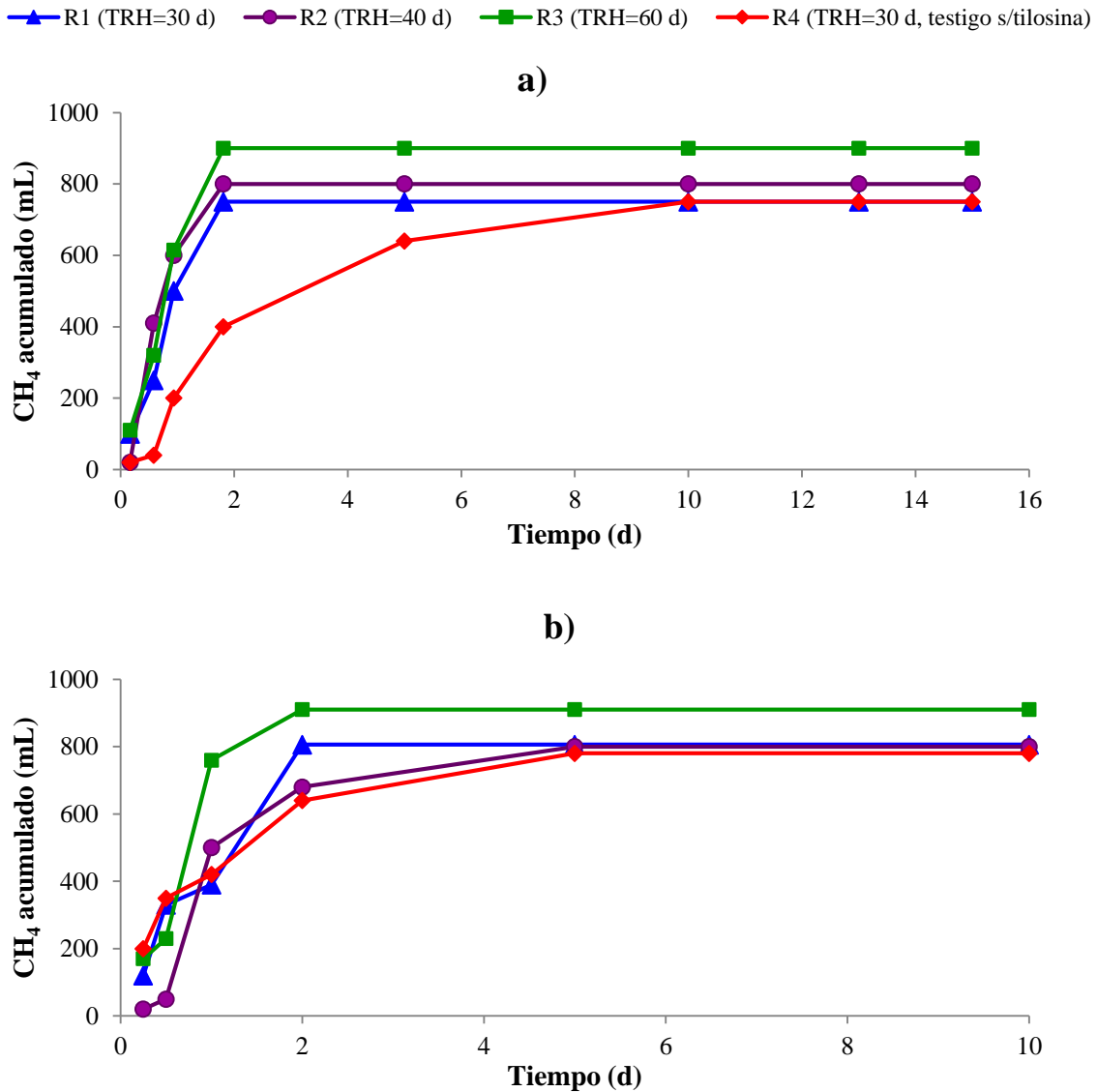


Figura 5.14 AME de los reactores anaerobios durante los TRH de 30, 40 y 60 d: a) biomasa aclimatada a 0.01 mg L^{-1} de tilosina y b) biomasa aclimatada a 0.05 mg L^{-1} de tilosina

En la etapa experimental 4 se mantuvieron los TRH en los reactores (TRH= 15, 20 y 25 d) y se aumentó la concentración de antibiótico (0.065 mg L^{-1} de tilosina). Bajo estas condiciones se observó un nuevo desplazamiento positivo de las curvas de generación de metano en las que se puede observar que la biomasa sin antibiótico alcanzó el 100% del

metano generado en un tiempo menor a 5 d, mientras que las muestras con la concentración de tilosina de las etapas anteriores (0.01 y 0.05 mg L⁻¹) alcanzaron el 100% de generación de metano en un tiempo de 8 y 11 d, respectivamente, mientras que las muestras con concentración mayor (0.075, 0.10 y 0.15 mg L⁻¹) no alcanzaron el 100% de generación de metano presentándose cierta inhibición pero con valores mucho menores (33 y 44% de inhibición) a los encontrados para la biomasa no aclimatada (87% de inhibición a una concentración de 0.1 mg L⁻¹ de tilosina, apartado 5.3).

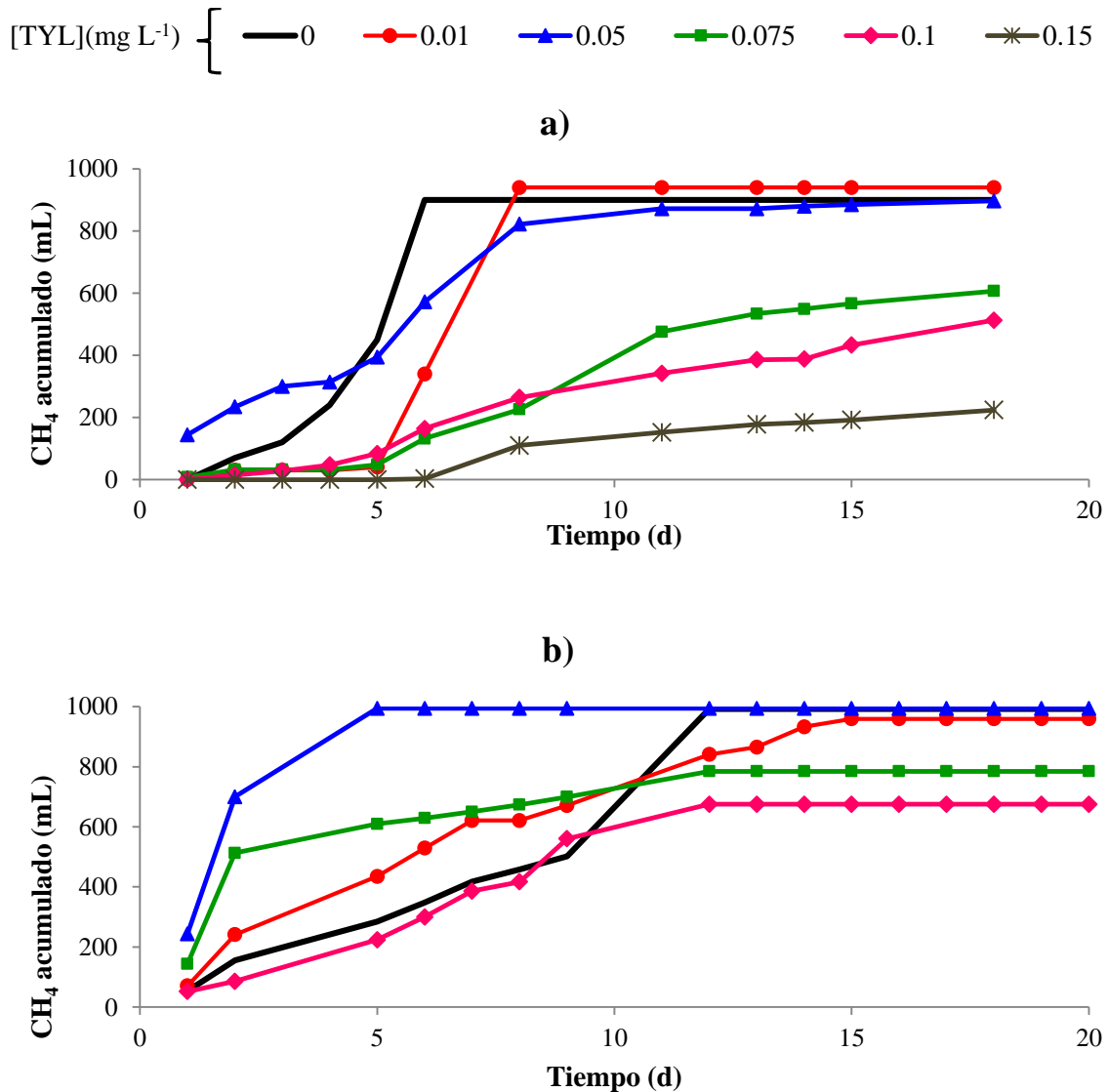


Figura 5.15 AME del reactor anaerobio R1 durante el TRH de 15 d: a) biomasa aclimatada a 0.05 mg L⁻¹ de tilosina y b) biomasa aclimatada a 0.065 mg L⁻¹ de tilosina

Los resultados obtenidos indican que la biomasa en la etapa 4 esta aclimatada a concentraciones de tilosina similares a las encontradas por Zilles *et al.*, (2005) y

Campagnolo *et al.*, (2002) en aguas residuales de granjas porcinas (0.002 a 40 mg L^{-1} de tilosina) y a las reportadas por Kolz *et al.*, (2005) en sistemas de tratamiento de aguas porcinas (0.4 mg L^{-1} de tilosina).

Además es probable que exista una relación más allá de la sola supervivencia de los microorganismos en presencia de la tilosina, ya que la actividad metanogénica fue más lenta en ausencia del antibiótico, mientras que en presencia del mismo se observó una mayor velocidad de la fase metanogénica del metabolismo anaerobio, lo que indica lo mencionado anteriormente, es decir, que el antibiótico funcione como promotor del crecimiento de ciertos microorganismos anaerobios tal como lo hace con la microbiota intestinal de los cerdos (Ortiz, 2013).

5.4.5. Comportamiento del N-NH_4^+

En la gráfica de la Figura 5.16 se presentan los valores promedios obtenidos durante las cuatro etapas experimentales de la aclimatación de biomasa a la tilosina. Las concentraciones de nitrógeno amoniacal tanto en el influente como en los efluentes de los cuatro reactores se mantuvieron en concentraciones entre 500 y $1,500 \text{ mg L}^{-1}$ durante las cuatro etapas experimentales.

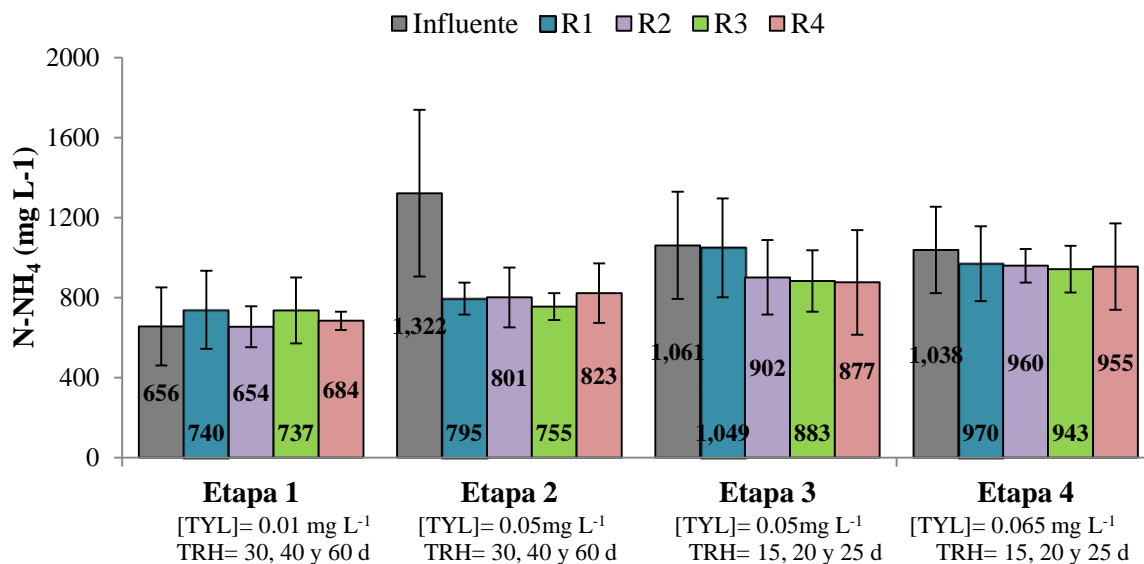


Figura 5.16 Valores promedios de nitrógeno amoniacal obtenidos en los reactores anaerobios durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina

En general, las concentraciones de nitrógeno amoniacal en los efluentes fueron muy similares a las del influente para todos los reactores, excepto en la etapa 2 en la que los

valores promedio de nitrógeno amoniacal en el influente son mayores a los de los efluentes, sin embargo este comportamiento no se mantuvo durante las dos etapas finales. Los valores de nitrógeno amoniacal más bajos se obtuvieron en la etapa 1 con valores promedio de 740 ± 196 , 654 ± 102 , 737 ± 165 y 684 ± 46 mg L⁻¹ para el reactor R1, R2, R3 y R4, respectivamente. Al igual que en la operación del digestor piloto las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal no inhibieron el funcionamiento de los reactores anaerobios.

5.5. Determinación de tilosina en agua residual porcina

La determinación de tilosina en agua residual porcina se realizó utilizando el método validado mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento desarrollado en el presente trabajo (ver ANEXO I).

La Tabla 5.8 muestra las concentraciones de tilosina encontradas en el agua residual porcina en las diferentes etapas de crecimiento de la granja evaluadas tanto para muestras puntuales como para muestras compuestas. No se reportan datos de la etapa de destete para la muestra compuesta debido a que durante varias ocasiones en que se visitó la granja para la toma de muestras hubo trabajos de mantenimiento y no había efluente de esta zona productiva. Las muestras puntuales fueron tomadas el 15 de Noviembre de 2011 y las muestras compuestas (8 horas de muestreo) el 13 de Marzo de 2012. Las muestras fueron tomadas en el canal de desagüe de cada etapa de crecimiento de la granja. Los resultados muestran la presencia de tilosina en agua residual porcina, siendo mayores las concentraciones de las muestras simples que de las muestras compuestas.

Tabla 5.8 Concentraciones de tilosina encontradas en agua residual porcina

Muestra	Concentración de tilosina (mg L ⁻¹)			
	Muestra simple Fase líquida	Muestra compuesta Fase sólida	Muestra compuesta Fase líquida	Total
Maternidad	0.056	0.0206	0.0118	0.0324
Destete	0.072	-	-	-
Engorda	0.0086	0.0178	0.0024	0.0202

Las concentraciones de tilosina en las muestras simples fueron 0.056, 0.072 y 0.0086 mg L⁻¹ para maternidad, destete y engorda, respectivamente, mientras que las concentraciones de tilosina en las muestras compuestas para la fase líquida fue de 0.0118 y 0.0024 mg L⁻¹ para maternidad y engorda, respectivamente. Las concentraciones detectadas en las muestras simples fueron más grandes que las detectadas en las muestras compuestas.

La concentración de tilosina detectada en la fase sólida fue 0.0206 mg L⁻¹ para maternidad y 0.0178 mg L⁻¹ para engorda. Como puede observarse la mayor parte del antibiótico es retenido en la fase sólida de las muestras, lo cual difiere de lo encontrado en los porcentajes de recuperación (ANEXO I inciso 0 donde se encontró sólo un 49% en la fase sólida, esto debido probablemente al tiempo de procesamiento de las muestras que permitió que el antibiótico se adsorbiera en una mayor proporción en los sólidos en el agua residual porcina evaluada. Los valores obtenidos en la muestra compuesta probablemente se deban al afecto de dilución del antibiótico ya que no existe un tanque de homogeneización dentro de la granja y la concentración del antibiótico puede variar de acuerdo a las actividades de la granja, tales como la limpieza de las naves, la entrada y salida de los cerdos a las diferentes etapas de producción de la granja.

En general, las concentraciones de tilosina encontradas en el agua residual porcina evaluada son más elevadas que las reportadas en la literatura para agua superficial (0.000002-0.070), sedimento (0.012-0.013 mg L⁻¹), agua residual municipal (0.00004-0.00018 mg L⁻¹) y agua residual porcina (0.002 mg L⁻¹) (Yang *et al.*, 2006; Dolliver y Gupta, 2008; Tagiri-Endo *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010, Ok *et al.*, 2011 y Zilles *et al.*, 2005).

5.6. Arranque y operación de tres digestores anaerobios con presencia de tilosina

5.6.1. Operación de digestores anaerobios con presencia de tilosina

Se operaron tres digestores anaerobios con diferentes TRH 15, 20 y 25 d para el tratamiento de agua residual porcina enriquecida con tilosina con el fin de evaluar el impacto del antibiótico sobre la remoción de materia orgánica y sobre la eficiencia general del tratamiento. Los TRH aplicados durante esta etapa experimental corresponden a los mejores obtenidos en las etapas previas. Se seleccionaron diferentes TRH para verificar la hipótesis del presente trabajo en la que se plantea que la carga volumétrica de tilosina aplicada disminuye la probabilidad de un efecto inhibitorio en la biomasa permitiendo una remoción de materia orgánica eficiente.

Los digestores experimentales fueron operados bajo tres diferentes concentraciones de tilosina:

- 1) [TYL]= 0.065 mg L⁻¹, aplicada en la etapa de estabilización (E) y en la etapa E1. Esta concentración corresponde a la máxima aplicada en la etapa de aclimatación de la biomasa al antibiótico.
- 2) [TYL]= 0.080 mg L⁻¹, aplicada en la etapa E2. Esta concentración corresponde a la máxima encontrada en aguas residuales porcinas en la presente investigación.
- 3) [TYL]= 1.92 mg L⁻¹, aplicada en la etapa E3. Esta concentración fue determinada mediante pruebas de AME con biomasa de los tres digestores anaerobios

aclimatados a una concentración de tilosina de 0.080 mg L^{-1} . Esta concentración es veinticuatro veces la concentración de la etapa anterior.

Los digestores experimentales fueron inoculados con biomasa aclimatada al antibiótico. Los resultados se describen a continuación.

5.6.1.1. Determinación de la concentración máxima de tilosina a aplicar en los digestores anaerobios experimentales

Se realizó la prueba de AME a la biomasa de los tres digestores anaerobios aclimatados a una concentración de tilosina de 0.080 mg L^{-1} (Etapa de operación E2, día de operación 400). La prueba de AME se realizó con concentraciones de antibiótico de 0 (blanco sin tilosina), 0.080 , 0.160 , 0.320 y 0.64 mg L^{-1} de tilosina con la finalidad de obtener una concentración máxima inhibitoria de la actividad metanogénica para el lodo, la cual sería aplicada en la última etapa experimental de los digestores con tilosina para evaluar el comportamiento de los sistemas con un choque elevado de antibiótico. Los resultados se muestran en Figura 5.17. Se observa en las tres gráficas un comportamiento muy variable de la producción de metano respecto a la concentración de tilosina.

Se observa que la biomasa del digestor D1 en ausencia del antibiótico produce el 100% de metano esperado en un tiempo menor (3 d) que en presencia del mismo, lo cual indica una cierta inhibición de la producción de metano, ya que aún a la concentración a la que ya se ha aclimatado la biomasa (0.080 mg L^{-1}) toma más tiempo producir el 100% de metano, sin embargo, se observa que a la mayor concentración de tilosina adicionada (0.64 mg L^{-1}) la producción del 100% de metano se lleva a cabo en 10 d, este comportamiento es similar al encontrado en las pruebas de AME de los reactores con biomasa aclimatada, en los cuales la producción de metano fue mayor a mayores concentraciones de tilosina.

En el digestor D2 se encontró que tanto el lodo sin presencia de antibiótico como el lodo con una concentración de tilosina de 0.080 mg L^{-1} (aclimatado a esta concentración) generan el 100% de metano en un lapso de 3 d, mientras que el lodo que tiene una concentración de tilosina de 0.160 mg L^{-1} lo genera en 1 d. A las mayores concentraciones de tilosina adicionadas el metano esperado se produce en un tiempo de 18 d.

En el digestor D3 la producción del 100% de metano esperado se lleva a cabo en un lapso de 1 d a una concentración de 0.320 mg L^{-1} de tilosina, mientras que para la concentración de 0.64 mg L^{-1} de tilosina, la producción máxima de metano se lleva a cabo en 13 d.

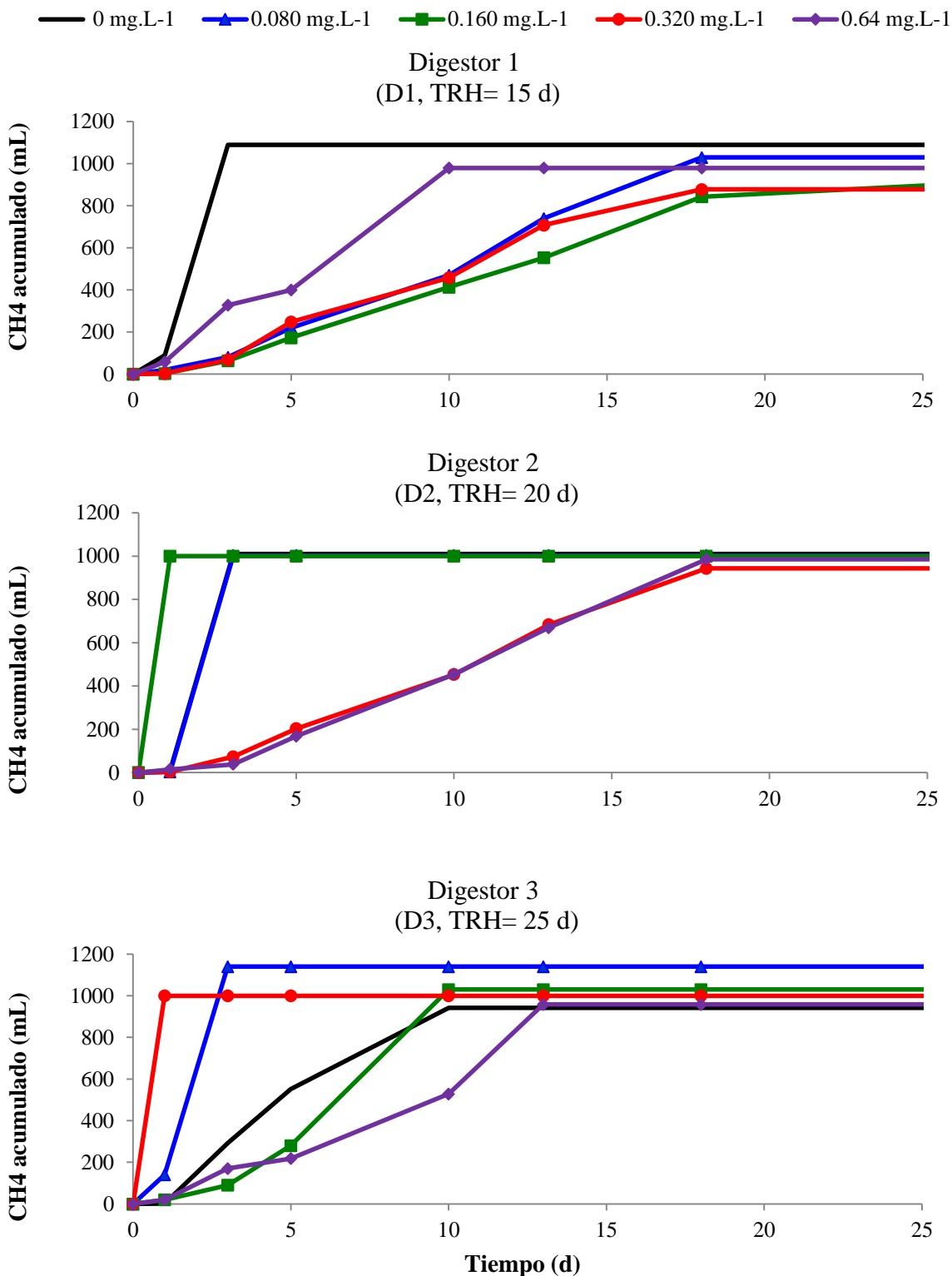


Figura 5.17 Prueba de AME a diferentes concentraciones de tilosina en lodo proveniente de los digestores anaerobios experimentales

En los tres digestores anaerobios se observa que la generación de metano es del 100% para todas las concentraciones de tilosina sin embargo, la velocidad de generación del metano es muy variable.

Los resultados concuerdan con lo encontrado en las pruebas de AME del digestor anaerobio con adición de tilosina y con lo mencionado por Chelliapan *et al.*, (2011) “que el efecto de la tilosina es muy variable en los sistemas de tratamiento anaerobio”. Sin embargo, estas variaciones encontradas pudieran ser explicadas por diferentes razones: 1) el TRH que significa que los microorganismos de cada digestor trabajan en una fase diferente de la curva de crecimiento microbiano y 2) la aclimatación al antibiótico permitió la utilización de la tilosina como promotor del crecimiento en algunos microorganismos, ya que en ausencia de él, el metabolismo celular se volvería más lento.

5.6.1.2. Comportamiento de los parámetros de campo

Los digestores anaerobios utilizados operaron con una temperatura de 30°C, la cual se encuentra en el rango de temperatura óptima (25-35°C) para llevar a cabo las reacciones metabólicas de los microorganismos presentes y proveer un tratamiento más estable.

En las gráficas de la Figura 5.18 se muestra el comportamiento del pH y la conductividad de los digestores anaerobios experimentales. En cuanto a los resultados de pH, éste se mantuvo en un intervalo de valores de 6 a 7.7 para el influente y de 7.4 y 8 en los efluentes de los tres digestores durante las etapas E ([TYL= 0.065 mg L⁻¹, estabilización), E1 ([TYL= 0.065 mg L⁻¹) y E2 ([TYL= 0.08 mg L⁻¹). Los efluentes de los digestores durante la etapa E y E1 se mantuvieron estables. Durante la E3 ([TYL= 1.92 mg L⁻¹) el D1 (TRH= 15 d) presentó una tendencia a disminuir su pH hasta valores de 6.5 posiblemente por acumulación de AGV, lo que indica que las altas concentraciones de tilosina afectan a las bacterias metanogénicas en este digestor puesto que no se lleva a cabo el ciclo metabólico completo. El D3 (TRH= 25 d) se mantuvo dentro del mismo intervalo de pH (7.4-8.0) durante la etapa E3, posiblemente por el efecto del TRH que disminuye la carga volumétrica de tilosina, lo que permite que los choques de antibiótico no sean tan severos.

En lo que respecta a la conductividad, durante todas las etapas experimentales la conductividad de los efluentes fue mayor a la de los influentes tal como sucedió durante la operación del digestor testigo. Los valores de conductividad promedio obtenidos para el influente fueron 8.3±1.3, 8.4±1.8, 8.4±0.7 y 8.7±1.1 mS cm⁻¹ para la etapa E, E1, E2 y E3, respectivamente. El efluente del digestor D1 presentó valores de conductividad promedio de 8.9±1.5, 9.2±2.1, 10.3±0.5 y 10±0.4 mS cm⁻¹ para la etapa E, E1, E2 y E3, respectivamente; el digestor D2 presentó valores promedio de conductividad de 9.1±1.5, 9.3±1.8 y 9.8±0.9 mS .cm⁻¹ para la etapa E, E1 y E2 (en la etapa E3 la biomasa fue

utilizada para las cinéticas de degradación), respectivamente y el digester D3 presentó valores de conductividad de 9.4 ± 1.3 , 10.2 ± 2.0 , 10.2 ± 0.6 y 9.0 ± 9.8 mS cm^{-1} para la etapa E, E1, E2 y E3, respectivamente. Se observa que en general la presencia de tilosina no afectó la conductividad de los digestores anaerobios aún a la máxima concentración administrada.

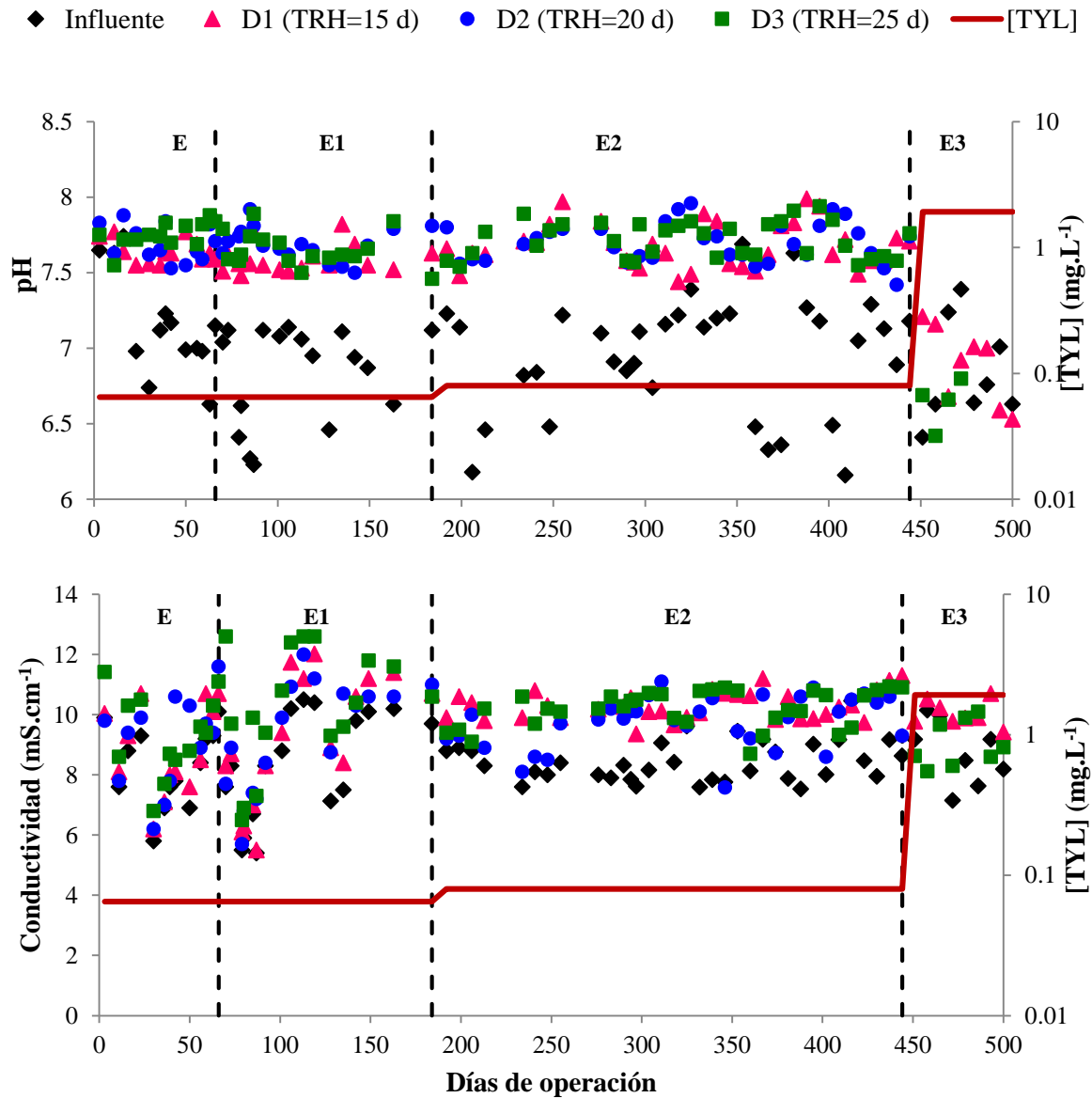


Figura 5.18 Comportamiento de parámetros de campo de los digestores anaerobios con presencia de tilosina

5.6.1.3. Comportamiento de la materia orgánica

En las gráficas de la Figura 5.19 se presenta el comportamiento de la materia orgánica en los tres digestores. Se observa que el influente osciló en concentraciones de 10,000 y

23,000 mg L⁻¹ de DQOt y entre 3,600 y 14,000 mg L⁻¹ de DQOs en los cuatro periodos experimentales, con concentraciones promedio de DQOt en el influente de 16,598±4,040, 17,432±2,326, 17,763±2,070 y 18,576±1,978 mg L⁻¹ y de DQOs de 8,931±2,487, 10,259±1,923, 7,729±2,395 y 7,873±1,450 mg L⁻¹ para la etapa E, E1, E2 y E3, respectivamente. Las concentraciones de DQO en el influente corresponden a las reportadas en otros estudios para agua residual porcina (Bousier *et al.*, 2005; Garzón-Zúñiga *et al.*, 2005; Kantawanichkul y Somprasert, 2005) con concentraciones en un intervalo entre 3,300 a 26,400 mg L⁻¹. Las variaciones en las concentraciones de materia orgánica del agua residual porcina se deben principalmente a la edad del animal, madurez fisiológica, cantidad y calidad del alimento consumido, cantidad de agua consumida, actividades de limpieza de las naves de cerdos y clima, entre otros factores.

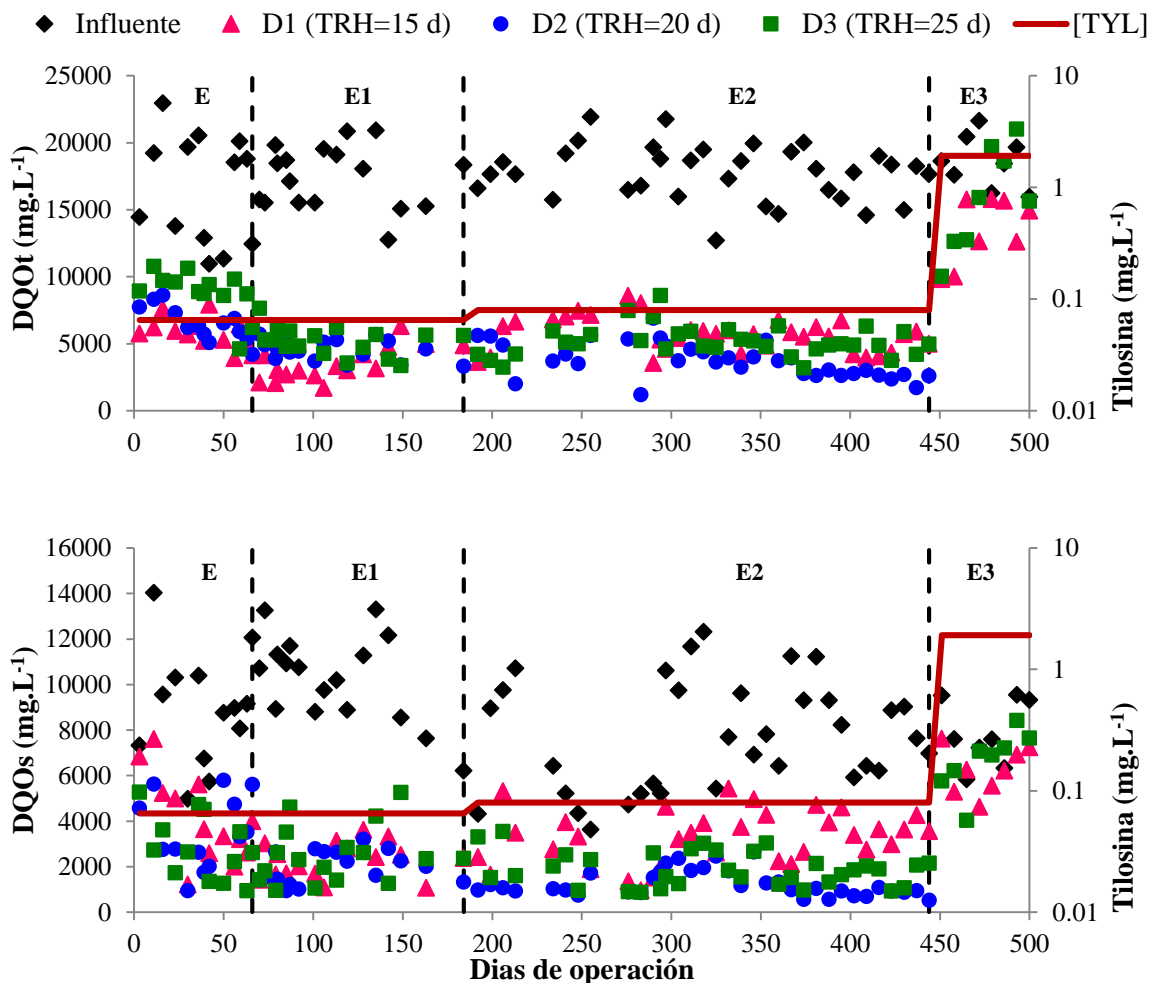


Figura 5.19 Comportamiento de la materia orgánica de los digestores anaerobios con presencia de tilosina

En cuanto a los efluentes de los tres digestores se observa un comportamiento similar entre ellos durante las cuatro etapas experimentales con mayor estabilidad en el efluente de los digestores D2 y D3 tanto para la materia orgánica total como para la soluble.

En la etapa de estabilización (E), las remociones de materia orgánica de los tres digestores fueron muy variables, sin embargo, las remociones promedio se mantuvieron por arriba del 44% en los tres digestores tanto para la DQO total como soluble. Esta etapa que duró 70 días en los que transcurrieron 4, 3 y 2.4 TRH para el D1, D2 y D3, respectivamente, permitió el tiempo suficiente para el crecimiento de la población microbiana (aclimatada a la tilosina) y la adaptación de la misma a las nuevas condiciones de operación (durante el periodo experimental de aclimatación de la biomasa al antibiótico la agitación fue continua y de forma orbital y durante esta etapa la agitación se realizó por medio de una recirculación durante un minuto cada seis horas).

Durante la etapa E1, las concentraciones de materia orgánica en el influente mantienen un comportamiento más estable con remociones promedio de DQOt de 79 ± 9 , 73 ± 6 y $70\pm 7\%$ mientras que para la DQOs se obtuvieron remociones de 78 ± 8 , 80 ± 8 y $75\pm 13\%$ para el digestor D1, D2 y D3, respectivamente (Tabla 5.9). Estas remociones son superiores (para el D1 y D2) y/o similares (para el D3) a las encontradas en la etapa de aclimatación a la tilosina (etapa 4, TRH=15, 20 y 25 d; [TYL]= 0.065 mg L^{-1}), lo cual indica que los microorganismos se adaptaron a sus nuevas condiciones de operación y mantienen las remociones de materia orgánica mientras la tilosina se encuentre en una concentración de 0.065 mg L^{-1} . A pesar de que los valores promedio de remoción son muy parecidos, el análisis estadístico (ANOVA con 95% de confianza y 2 grados de libertad, Anexo III, inciso C) mostró que en cuanto a la remoción de materia orgánica total el efecto del TRH es diferente para el D1 comparado con los otros dos, esto significa que los TRH mayores (20 y 25 d) permiten el tiempo suficiente para que se lleve a cabo la degradación de materia orgánica.

Para la siguiente etapa experimental, se incrementó la concentración del antibiótico a 0.80 mg L^{-1} , tomando en cuenta las concentraciones de tilosina más altas encontradas en agua residual porcina en el presente estudio (apartado 5.5). Los resultados promedio mostraron remociones de materia orgánica total de 68 ± 8 , 79 ± 7 y $70\pm 8\%$ y de materia orgánica soluble de 56 ± 16 , 82 ± 10 y $73\pm 15\%$ para el D1, D2 y D3, respectivamente. De acuerdo a los resultados del análisis de varianza (ANOVA con 95% de confianza y 2 grados de libertad, Anexo III, inciso C) para esta etapa experimental, se encontraron diferencias significativas en la eficiencia de remoción de acuerdo al TRH aplicado, teniendo al D1 y D3 con un comportamiento más parecido y al D2 significativamente diferente a los otros. En el caso del D1 la disminución en la eficiencia de remoción probablemente se deba la acumulación

de tilosina porque TRH es menor. En el caso del D3 probablemente los microorganismos estén operando en una fase del crecimiento bacteriano diferente a los otros dos TRH.

En general, las eficiencias de remoción de materia orgánica obtenidas durante las tres primeras etapas experimentales concuerdan con las reportadas en la literatura para aguas residuales porcinas en digestores anaerobios (sin presencia de inhibidores, como la tilosina) en las cuales se han encontrado remociones de materia orgánica en un rango entre 62 y 72% (Escalante y Alarcón, 2002; Massé *et al.*, 2000)

Tabla 5.9 Valores promedio de materia orgánica obtenidos en los digestores anaerobios con presencia de tilosina

Digestor	Etapa	COV aplicada (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	DQOt		DQOs	
			Efluente (mg·L ⁻¹)	Remoción (%)	Efluente (mg·L ⁻¹)	Remoción (%)
D1	E	1.11±0.27	5,802±1,162	63±13	4,067±1,894	55±19
	E1	1.16±0.16	3,574±1,259	79±9	2,217±799	78±8
	E2	1.18±0.14	5,674±1,257	68±8	3,273±1,157	56±16
	E3	1.24±0.13	13,406±2,521	27±17	6,218±1,025	20±15
D2	E	0.83±0.20	6,483±1,282	59±10	3,540±1,596	61±15
	E1	0.87±0.12	4,571±827	73±6	1,983±719	80±8
	E2	0.89±0.10	3,775±1,310	79±7	1,251±570	82±10
	E3	-	-	-	-	-
D3	E	0.66±0.16	8,825±1,693	44±16	2,856±1,398	65±20
	E1	0.70±0.09	5,218±1,084	70±7	2,506±1,260	75±13
	E2	0.71±0.08	5,171±1,146	70±8	1,896±752	73±15
	E3	0.74±0.08	15,793±3,838	14±24	6,659±1,337	14±17

La última etapa experimental (E3) solo fue evaluada para el D1 y el D3, puesto que la biomasa del D2 fue utilizada para la realización de las cinéticas de degradación de materia orgánica y el D2 fue desmontado. La concentración de tilosina adicionada para esta etapa experimental fue 24 veces la concentración utilizada en la E2, es decir, se pasó de 0.08 a 1.92 mg L⁻¹ de tilosina. Este salto tan grande en la concentración inicial fue determinado a partir de los resultados de inhibición de las pruebas de AME realizadas con la biomasa aclimatada a 0.080 mg L⁻¹ de tilosina proveniente de los digestores D1, D2 y D3, misma que fue expuesta a diferentes concentraciones de tilosina (0.08, 0.16, 0.32 y 0.64 mg L⁻¹). En esa ocasión no se encontró un efecto inhibitorio, solamente una disminución en la velocidad de producción de metano, por lo que se decidió evaluar la etapa E3 con el triple de la máxima concentración adicionada en estas pruebas de AME. Al aplicar la concentración de tilosina de 1.92 mg L⁻¹ se presentó una clara tendencia a la disminución en la remoción de materia orgánica total y soluble, con remociones promedio de DQOt de 27±17 y 14±24% para el D1 y D3, respectivamente, lo que indicó una inhibición de la

actividad de la biomasa. El análisis de varianza mostró que para esta etapa experimental el TRH no tuvo influencia en la eficiencia de remoción de materia orgánica. Los resultados mostraron que a pesar de utilizar biomasa aclimatada a la presencia de tilosina un incremento repentino de altas concentraciones del antibiótico (1.92 mg L^{-1}) disminuyen la eficiencia de digestores anaerobios para el tratamiento de agua residual porcina con 15 y 25 d de TRH.

En la Figura 5.20 se presentan las cargas orgánicas aplicadas durante la operación de los digestores anaerobios con presencia de tilosina. Las cargas orgánicas aplicadas variaron entre 0.4 y $1.6 \text{ kg DQO m}^3 \text{ d}^{-1}$ y fueron similares a las obtenidas en la operación del digestor escala piloto y en la etapa de aclimatación a la tilosina. Las tasas de remoción se mantuvieron constantes, siendo el D2 el que presentó una mayor estabilidad durante toda la experimentación con cargas orgánicas hasta de $1.1 \text{ kg DQO m}^3 \text{ d}^{-1}$. El digestor D1 trabajó con las cargas orgánicas más elevadas, sin embargo, su tasa de remoción fue muy variable.

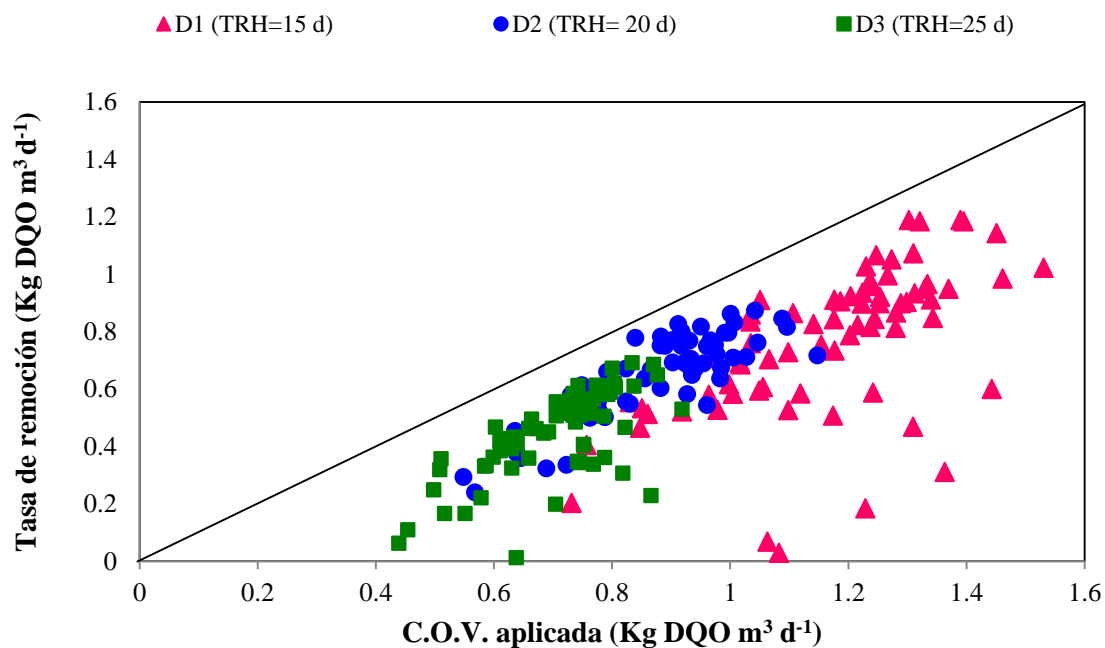


Figura 5.20 Carga orgánica aplicada y su tasa de remoción en los digestores anaerobios con presencia de tilosina

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza (ANOVA con 95% de confianza y 2 grados de libertad, Anexo III, inciso C) realizado para las remociones de materia orgánica total y soluble en cada digestor, se encontró que todos los sistemas se vieron afectados

directamente por la concentración de tilosina, siendo las etapas E1, E2 y E1 para el digestor D1, D2 y D3, respectivamente, las más significativas (mejores) estadísticamente.

Los resultados encontrados en la presente experimentación son contradictorios a los concluidos por otros investigadores, quienes han reportado que es improbable que el contenido de tilosina ($1.7\text{-}800\text{ mg L}^{-1}$) sea el mayor factor limitante del grado y la tasa de degradación de DQO en el tratamiento de agua residual por digestión anaerobia (Chelliapan *et al.*, 2006).

Por otra parte, los resultados de la presente experimentación apoyan la teoría de Stone *et al.*, (2009) quienes mencionan que después de un periodo de operación de 151 d en un sistema anaerobio con presencia de tilosina (1.1 mg L^{-1}) la DQOs en el efluente se incrementa debido a la formación de AGV, a la disminución en la tasa de consumo de materia orgánica soluble por poblaciones microbianas fermentativas y metanogénicas, a la inhibición de bacterias acetogénicas o bacterias metanogénicas acetoclásticas o a una combinación de todos estos procesos.

5.6.1.4. Comportamiento de los sólidos

Las agua residuales porcinas se caracterizan por contener una gran cantidad de sólidos con valores entre $2\text{ y }22\text{ g L}^{-1}$ (Bousier *et al.*, 2005; Garzón-Zúñiga *et al.*, 2005; Kantawanich y Somprasert, 2005).

Durante la operación de los digestores con presencia de tilosina las concentraciones tanto de sólidos totales como de sólidos volátiles en el influente fueron variables, debido a que se utilizó agua residual porcina real. Las concentraciones de ST en el influente se mantuvieron durante las cuatro etapas experimentales en un intervalo entre $11.6\text{ y }37.9\text{ g L}^{-1}$ y de SV en un intervalo entre $6.2\text{ y }27\text{ g L}^{-1}$, éstos valores concuerdan con los mencionados anteriormente para aguas residuales porcinas.

Los efluentes de los tres digestores se mantuvieron muy estables durante las tres primeras etapas experimentales en las que mantuvieron concentraciones en un intervalo entre $2.8\text{-}14.1$, $4.2\text{-}12$ y $4.3\text{-}17.7\text{ g L}^{-1}$ de ST y entre $1.6\text{-}8.3$, $1.7\text{-}6.8$ y $1.9\text{-}10\text{ g L}^{-1}$ de SV para el D1, D2 y D3, respectivamente. A partir del incremento de la concentración de tilosina a 1.92 g L^{-1} , se presentó una desestabilización en los digestores y un incremento en la concentración de sólidos con valores de ST entre $9.2\text{-}12.8$ y entre $9.8\text{-}13.5\text{ g L}^{-1}$ y de SV entre $3.2\text{-}8.3$ y entre $5.3\text{-}8.6\text{ g L}^{-1}$ para el D1 y D3, respectivamente.

En la Figura 5.21 se presentan las remociones de ST y SV durante la operación de los digestores anaerobios con presencia de tilosina y en la Tabla 5.10 se presentan los valores promedios obtenidos en cada etapa experimental. Se puede observar en las gráficas que los

porcentajes de remoción tanto para ST como SV se mantuvieron en un intervalo entre 40 y 80% para los tres digestores durante la mayor parte del tiempo, sin embargo, una vez que se incrementa la tilosina a 1.92 mg L^{-1} la remoción disminuye a valores en un intervalo entre 0 y 55%.

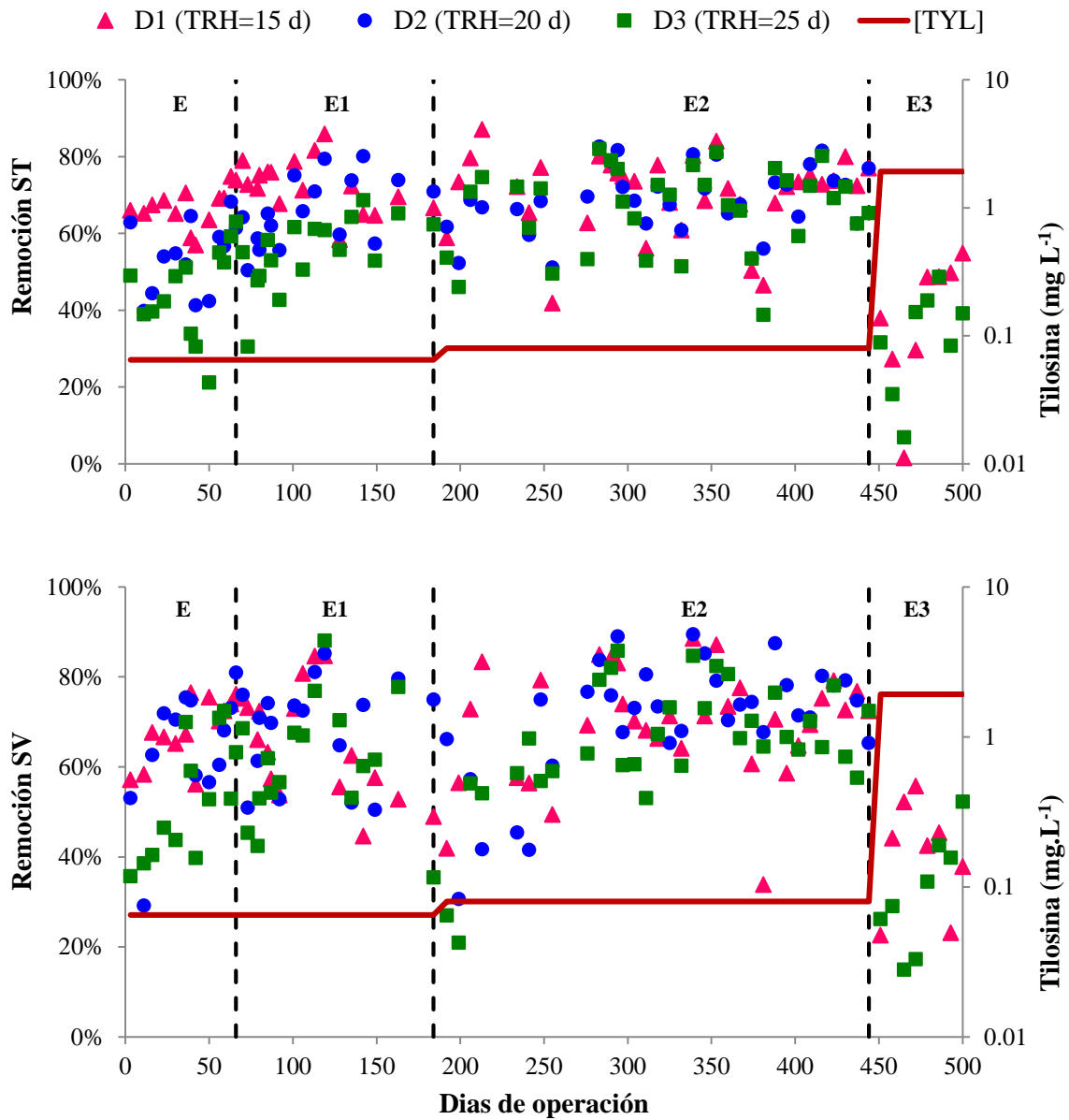


Figura 5.21 Remoción de ST y SV en los digestores anaerobios con presencia de tilosina

Durante la etapa de estabilización (E) se aplicaron las cargas de sólidos más bajas: 0.93 ± 0.14 , 0.70 ± 0.10 y $0.56 \pm 0.08 \text{ g ST L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para el digestor D1, D2 y D3,

respectivamente. Los promedios de remoción de ST fueron 67 ± 5 , 54 ± 9 y $45\pm 12\%$ y de SV 68 ± 7 , 64 ± 13 y $53\pm 13\%$ para el D1, D2 y D3, respectivamente.

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA con 95% de confianza y 2 grados de libertad, Anexo III, inciso C), durante la etapa E1 no se encontraron diferencias significativas en la remoción de SV, sin embargo se encontró que el TRH afectó directamente la remoción de sólidos totales. De acuerdo a los resultados de remoción de ST, se encontró que el D1 (TRH= 15 d) presentó el promedio de remoción más alto con un valor de $72\pm 7\%$. Los valores promedios de remoción de sólidos durante la etapa E1 fueron mayores a los de la etapa de estabilización (E) y similares a los obtenidos en la aclimatación de la biomasa a la tilosina.

Durante la etapa E2 las remociones de ST y SV fueron muy similares con valores promedio de ST de 71 ± 10 , 69 ± 9 y $66\pm 11\%$ y de SV de 70 ± 12 , 71 ± 14 y $65\pm 14\%$ para el digestor D1, D2 y D3, respectivamente. El análisis de varianza ($p=0.253$) demostró que no hubo diferencias significativas en la remoción de sólidos en los tres digestores experimentales.

En la etapa E3 se encontró que al igual que con la materia orgánica, la remoción de los sólidos en los dos digestores evaluados en esta etapa (D1 y D3) disminuye con el incremento en la concentración de tilosina.

Tabla 5.10 Valores promedio de sólidos obtenidos en los digestores anaerobios con presencia de tilosina

Digestor	Etapa	CS aplicada (g ST L ⁻¹ d ⁻¹)	ST		SV	
			Efluente (g L ⁻¹)	Remoción (%)	Efluente (g·L ⁻¹)	Remoción (%)
D1	E	0.93±0.14	4.54±0.48	67±5	3.55±0.55	68±7
	E1	1.15±0.23	4.66±1.25	72±7	4.04±1.13	65±12
	E2	1.35±0.41	5.65±1.85	71±10	3.34±1.17	70±12
	E3	1.15±0.17	10.45±1.24	37±18	5.84±1.59	40±12
D2	E	0.70±0.10	6.28±0.79	54±9	3.92±1.17	64±13
	E1	0.86±0.18	5.62±0.58	66±9	3.66±0.95	68±11
	E2	1.01±0.31	5.90±1.21	69±9	3.23±1.27	71±14
	E3	-	-	-	-	-
D3	E	0.56±0.08	7.46±0.87	45±12	5.19±1.10	53±13
	E1	0.69±0.14	7.46±0.76	55±9	4.52±1.32	61±14
	E2	0.81±0.24	6.39±2.14	66±11	3.84±1.41	65±14
	E3	0.69±0.10	11.46±1.36	32±14	6.50±1.04	32±13

En la Figura 5.22 se presenta el comportamiento de la carga de sólidos versus su eficiencia de remoción. Se observa que el D1 al tener un TRH menor trabaja con cargas de sólidos

más altas, desde 0.7 hasta 1.6 g ST L⁻¹ d⁻¹ y de 0.5 a 1.6 g SV L⁻¹ d⁻¹, y en consecuencia la eficiencia de remoción es menor en algunas cargas. Los digestores D2 y D3 mantienen una remoción de sólidos más estable con la mayor parte de las cargas concentradas en un intervalo entre 0.5 y 1.0 g SV L⁻¹ d⁻¹.

Las remociones de sólidos encontradas durante todas las etapas experimentales concuerdan con las encontradas en el digester testigo y los reactores en la etapa de aclimatación, y son similares a las reportadas para digestores anaerobios sin presencia de compuestos inhibitorios.

El análisis estadístico (ANOVA con 95% de confianza y 2 grados de libertad, Anexo III, inciso C) mostró que en cuanto a la remoción de sólidos, el digester D1 no se vio afectado por el cambio en las concentraciones de tilosina durante las tres primeras etapas experimentales (P=0.0). Sin embargo, durante la última etapa (incremento de tilosina a 1.92 mg L⁻¹) si se presentan diferencias significativas en la remoción de sólidos; el digester D1 se vio afectado por el incremento en la concentración del antibiótico (P=0.0) solamente en la remoción de ST durante la etapa E3 y el digester D3 se vio afectado por cada cambio en la concentración de tilosina durante toda la experimentación (P=0.0), siendo la etapa E3 la de mayor afectación.

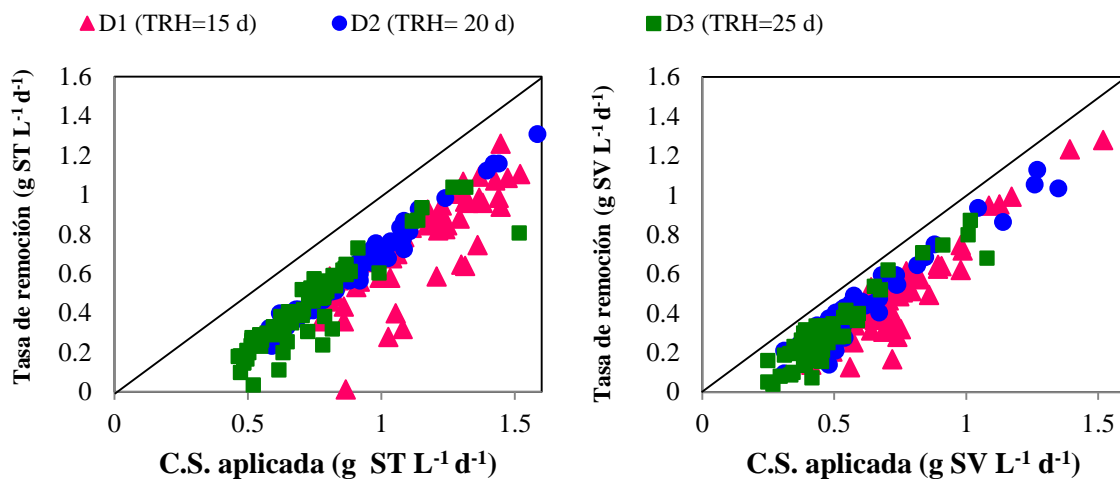


Figura 5.22 Carga de sólidos aplicada y su tasa de remoción en los digestores anaerobios con presencia de tilosina

5.6.1.5. Producción de biogás y metano

El principal producto de la descomposición anaerobia de la materia orgánica presente en el agua residual es el biogás, compuesto principalmente por metano y dióxido de carbono. Las aguas residuales con grandes concentraciones de materia orgánica producirían entonces una

gran cantidad de biogás por volumen de líquido tratado, tal es el caso del agua residual porcina. Sin embargo, la presencia de compuestos tóxicos e inhibitorios afectan directamente la producción de este gas. Algunos autores han encontrado que la tilosina inhibe la metanogénesis (Sanz *et al.*, 1996, Lotfin *et al.*, 2005; Stone *et al.*, 2009). Durante el presente trabajo de investigación, se ha demostrado que biomasa anaerobia sin aclimatar al antibiótico tilosina inhibe la metanogénesis en un 40% con concentraciones tan pequeñas como 0.01 mg L^{-1} y entre un 60 a 90% con concentraciones entre 0.05 y 0.1 mg L^{-1} , tales como las encontradas en agua residual porcina en México (determinadas en la presente investigación), mientras que biomasa que se ha aclimatado a concentraciones de 0.065 mg L^{-1} es inhibida en un 32% a una concentración de 0.1 mg L^{-1} del antibiótico.

En la Figura 5.23 se presenta la producción de biogás durante la operación de los digestores anaerobios con presencia de tilosina. El método desarrollado para la detección del metano se presenta en el ANEXO II. Durante toda la experimentación la producción de biogás fue muy variable, probablemente por el método utilizado para la captura del mismo, ya que las mediciones se realizaban manualmente y no en línea y sólo se analizaban volúmenes parciales (solo se acumulaba el volumen generado en un determinado intervalo de tiempo y no en continuo por 24 h). Sin embargo, los valores promedio de producción de biogás son similares a los obtenidos teóricamente mediante la DQO. Se observa claramente en la gráfica de valores promedios que en la etapa de estabilización la generación de biogás es menor, una vez que los digestores se han estabilizado, la producción de biogás se incrementa en la etapa E1 y ya para la etapa E2, la producción es mayor que en las etapas anteriores a pesar del incremento de tilosina a 0.080 mg L^{-1} . Para la etapa E3 el incremento tan grande en la concentración de tilosina afecta visiblemente a las bacterias metanogénicas, lo que provoca una disminución en la producción de biogás en esta etapa.

Durante la etapa de estabilización, la producción de biogás para los tres digestores fue menor a 30 L d^{-1} , con valores promedio de 17.8 ± 5.2 , 16 ± 5.2 y $15.8 \pm 7 \text{ L d}^{-1}$ para el D1, D2 y D3, respectivamente. Una vez que los sistemas se han estabilizado, la producción de biogás se incrementa obteniéndose valores promedio de producción para el D1 de $24.2 \pm 11 \text{ L d}^{-1}$, para el D2 de $20 \pm 9.6 \text{ L d}^{-1}$ y para el D3 de $18.2 \pm 12.8 \text{ L d}^{-1}$ durante la etapa E1. En la etapa E2 se obtuvieron valores de biogás en un intervalo entre 11 y 53 L d^{-1} para el D1, entre 2 y 71 L d^{-1} para el D2 y entre 8 y 54 L d^{-1} para el D3. Los valores promedio obtenidos durante la etapa de mayor producción de biogás E2 fueron 27.4 ± 11 , 30.7 ± 16.6 y $28 \pm 13 \text{ L d}^{-1}$ para el digestor D1, D2 y D3, respectivamente. Durante la etapa E3, se observa una clara disminución en la producción de biogás obteniendo valores promedio de producción de 18.6 ± 11.6 y $18.4 \pm 11 \text{ L d}^{-1}$ para el D1 y D3, respectivamente.

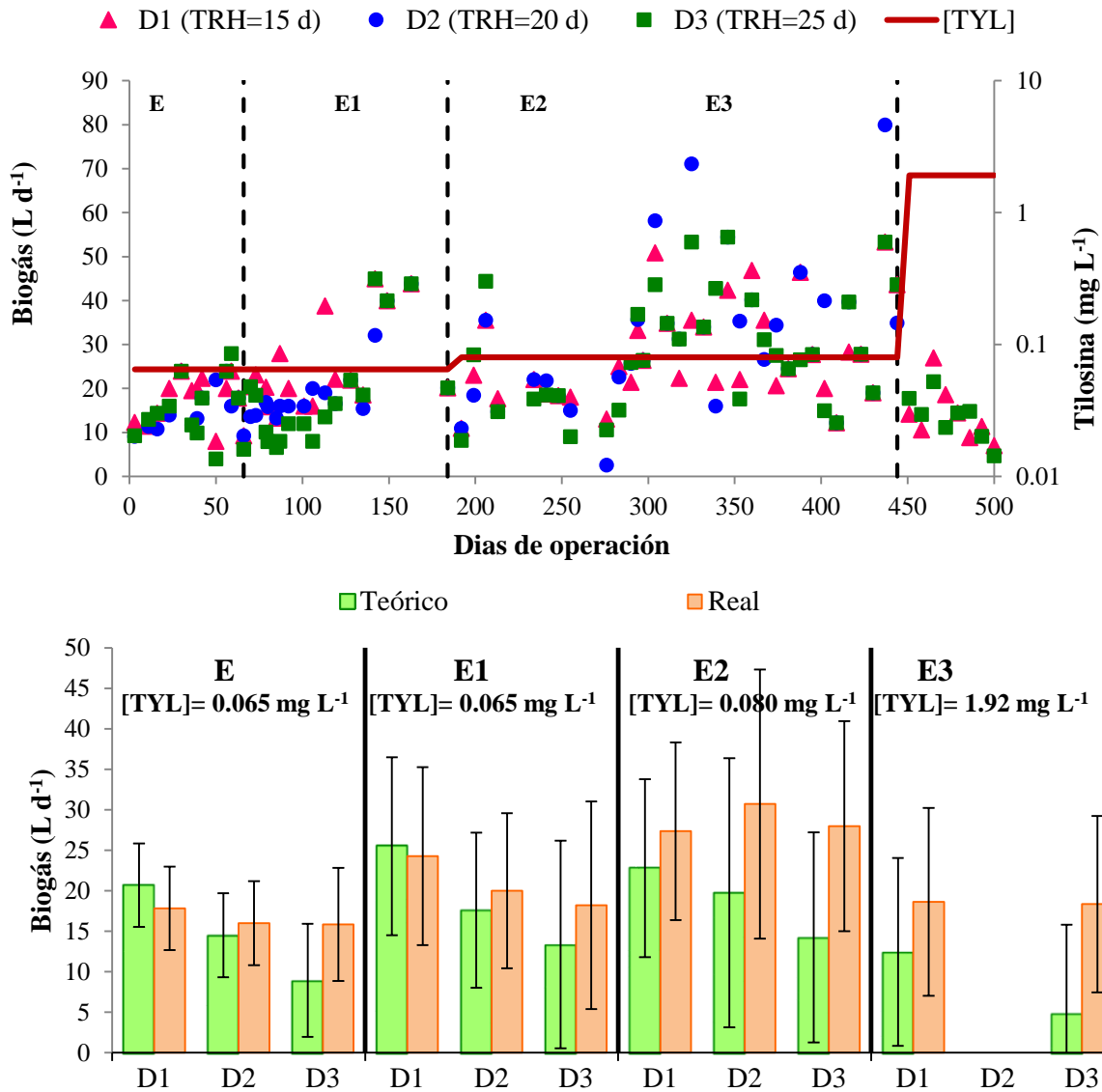


Figura 5.23 Producción de biogás en los digestores anaerobios con presencia de tilosina

Se realizaron muestreos esporádicos del contenido de metano en el biogás, la mayoría de ellos durante la etapa E2. En la Tabla 5.11 se presentan los valores promedio de producción de metano determinados durante la experimentación por medio de cromatografía de gases. En la etapa de estabilización se encontraron valores promedio de producción de metano de 12 ± 7 , 18 ± 10 y 15 ± 11 L d⁻¹ y en la etapa E1 de 10 ± 8 , 5 ± 1 y 5 ± 3 L d⁻¹ para el D1, D2 y D3, respectivamente, la diferencia entre estos valores se deben probablemente a la toma de muestra, pues en un principio ésta se realizaba durante diferentes periodos de tiempo a diferente hora del día. Para la etapa E2 donde las tomas de muestra fueron más frecuentes y se realizaron durante una hora a la misma hora cada día, la

producción de metano se incrementa, teniendo valores promedio de 20 ± 11 , 22 ± 17 y 20 ± 12 $L d^{-1}$, con porcentajes promedio de metano en el biogás de 71 ± 23 , 70 ± 20 y $75\pm 23\%$ para el D1, D2 y D3, respectivamente. Estas concentraciones de metano son superiores a las esperadas (65%) para sistemas anaerobios, según Metcalf y Eddy (2003), lo que indica que la concentración de tilosina en esta etapa experimental no afecta a las bacterias metanogénicas puesto que la biomasa se ha adaptado a la presencia del compuesto inhibidor.

Tabla 5.11 Producción de metano en los digestores anaerobios con presencia de tilosina

Digestor	Etapas	[TYL] ($mg L^{-1}$)	Biogás producido ($L d^{-1}$)	CH ₄ producido ($L d^{-1}$)	% de CH ₄ en biogás
D1	E	0.065	18 ± 5	12 ± 7	66 ± 19
	E1	0.065	24 ± 11	10 ± 8	40 ± 15
	E2	0.08	27 ± 11	20 ± 11	71 ± 23
	E3	1.92	19 ± 12	4 ± 2	22 ± 2
D2	E	0.065	16 ± 5	18 ± 10	96 ± 73
	E1	0.065	20 ± 10	5 ± 1	30 ± 5
	E2	0.08	31 ± 17	22 ± 17	70 ± 20
	E3	1.92	-	-	-
D3	E	0.065	16 ± 7	15 ± 11	76 ± 16
	E1	0.065	18 ± 13	5 ± 3	42 ± 20
	E2	0.08	28 ± 13	20 ± 12	75 ± 23
	E3	1.92	18 ± 11	4 ± 1	21 ± 1

Durante la etapa de mayor concentración de tilosina (E3), se observa que la producción tanto de biogás como de metano disminuye, obteniéndose porcentajes promedio de metano en el biogás de 22 ± 2 y $21\pm 1\%$ para el digestor D1 y D3, respectivamente, lo que indica una clara afectación de la producción tanto de biogás como de metano por la presencia de altas concentraciones de tilosina. De acuerdo a los resultados de remoción de materia orgánica y producción de biogás y metano, el digestor D3 fue el más afectado por el incremento en la concentración de tilosina, además de que ese digestor operó con cargas orgánicas (0.74 ± 0.08 $kg DQO m^{-3}d^{-1}$) menores a las recomendadas (1.0 a 5.0 $kg DQO m^{-3}d^{-1}$), mientras que el digestor D1 operó con cargas orgánicas dentro del rango óptimo (1.24 ± 0.13 $kg DQO m^{-3}d^{-1}$).

Los resultados obtenidos son contrarios a los reportados por Angenent *et al.*, (2008) quienes encontraron que residuos porcinos con una concentración de 1.6 $mg L^{-1}$ de tilosina no parecen tener un impacto negativo en su digestión ya que se observaron altas tasas de producción de metano y remoción de SV, y a los reportados por Massé *et al.*, (2000) y Poels *et al.*, (1984) con concentraciones de tilosina mayores a 16.7 $mg L^{-1}$. Sin embargo,

los resultados obtenidos son similares a los reportados por Lotfin *et al.*, (2005) quienes reportaron una disminución en la producción de metano después del incremento en la concentración de tilosina de 1 a 25 mg L⁻¹ en reactores anaerobios y a los reportados por Shimada *et al.*, (2008), quienes observaron la disminución en las tasas de producción de metano y propionato cuando se adicionó una concentración de 1.7 mg L⁻¹ de tilosina a reactores ASBR.

5.6.1.6. Comportamiento de la tilosina

En la Figura 5.24 se presenta el comportamiento de la tilosina en los digestores anaerobios. Durante todas las etapas experimentales la concentración de tilosina en el influente medida por cromatografía fue similar a la adicionada, lo que indica que el agua residual porcina cruda tenía un contenido de tilosina muy bajo o ausencia de la misma. En los tres digestores anaerobios se encontró que las concentraciones de tilosina en la biomasa fueron mayores a las encontradas en el efluente, producto de las propiedades físico-químicas del antibiótico que indican una fuerte sorción en los sólidos. Las concentraciones de tilosina en el efluente fueron menores a las del influente en los tres digestores durante las etapas evaluadas. Las concentraciones de tilosina más estables en el efluente fueron las encontradas en el digestor D2 con valores entre 0.002 y 0.004 mg L⁻¹ de tilosina durante la etapa E1 y E2, mientras que para el digestor D1 y D3 las concentraciones de tilosina se encontraron en un intervalo de concentraciones entre 0.003 y 0.11 mg L⁻¹ y entre 0.001 y 0.01 mg L⁻¹, respectivamente. La diferencia en los valores del efluente de los tres digestores puede ser resultado de aplicar una carga volumétrica de tilosina diferente a cada digestor como efecto de la variación del TRH utilizado en cada caso. Ya en la etapa E3 los valores en el efluente se mantienen similares a los reportados para la etapa E1 y E2 en los digestores D1 y D3, sin embargo, la concentración del antibiótico en la biomasa se incrementa hasta valores de 3.07 y 1.99 mg L⁻¹ de tilosina.

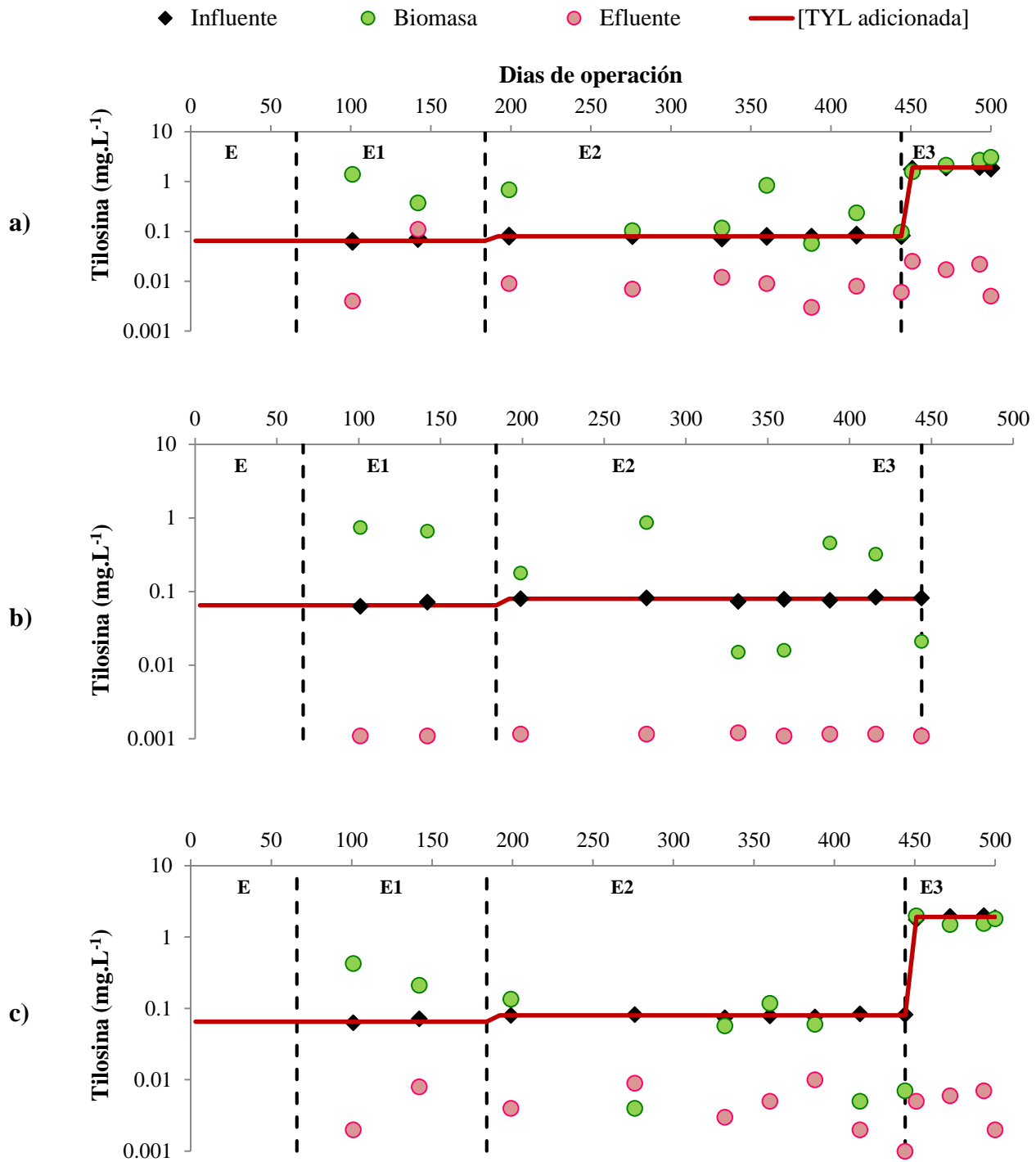


Figura 5.24 Comportamiento de la tilosina en los digestores experimentales: a) D1 (TRH= 15 d), b) D2 (TRH= 20 d) y c) D3 (TRH= 25 d)

En la Figura 5.25 se presentan las concentraciones promedio de tilosina en los digestores experimentales. Durante la etapa de estabilización no se evaluó la concentración de tilosina en los digestores. Durante la etapa E1 las concentraciones promedio de tilosina en el efluente fueron 0.057 ± 0.075 , 0.002 ± 0.00 y 0.005 ± 0.004 mg L⁻¹ (mg tilosina), mientras que las concentraciones en la biomasa fueron 0.885 ± 0.725 , 0.705 ± 0.059 y 0.319 ± 0.152 mg L⁻¹ de tilosina y 0.015 ± 0.003 , 0.011 ± 0.002 y 0.005 ± 0.005 mg tilosina g SV⁻¹ en el digestor D1, D2 y D3, respectivamente. Estos resultados muestran una clara absorción de la mayor parte de la concentración de tilosina en el lodo, siendo el D1 el de mayor carga de tilosina aplicada el que contiene la mayor concentración de tilosina por g de SV en los digestores. Sin embargo, posterior a la adsorción se presenta una degradación del antibiótico ya que no se observa acumulación progresiva del mismo en la biomasa (solamente al finalizar la etapa E se tendría una concentración de tilosina de 5 mg L⁻¹ si sólo hubiera adsorción y acumulación del antibiótico) ni incremento en la concentración de tilosina en el efluente. Se observa también que con el TRH de 20 d (D2) se presenta una mayor biodegradación del antibiótico.

En la etapa E2, a pesar del ligero incremento en la concentración de tilosina, se observa que la concentración promedio en el lodo en los tres digestores disminuye a 0.304 ± 0.32 , 0.268 ± 0.315 y 0.055 ± 0.054 mg L⁻¹ y 0.003 ± 0.003 , 0.005 ± 0.001 y 0.0009 ± 0.0003 mg tilosina g SV⁻¹ en el D1, D2 y D3, respectivamente, lo que representa remociones del antibiótico superiores al 91% (medidas a partir de la concentración de tilosina introducida a los digestores durante dicha etapa, es decir 7.41 mg L⁻¹) en los tres digestores, como resultado de la degradación del antibiótico por microorganismos especializados que se han reproducido dentro de los digestores a partir de la aclimatación de la biomasa. Al igual que en la etapa anterior se observa que el D3 que tiene la menor carga de tilosina aplicada presenta las concentraciones más bajas de tilosina por g SV. Además para los tres digestores la concentración de tilosina por g de SV es menor que en la etapa E1, probablemente porque la biomasa de los tres reactores este transformando más rápidamente el antibiótico.

Las concentraciones encontradas en los efluentes de los tres digestores son menores a las encontradas en agua residual porcina real en el presente trabajo, lo que indica que los sistemas están adaptados a la presencia del compuesto inhibitorio y que han desarrollado mecanismos para su remoción, de otro modo la acumulación del antibiótico se vería reflejada en concentraciones de tilosina mayores a las encontradas en el lodo anaerobio.

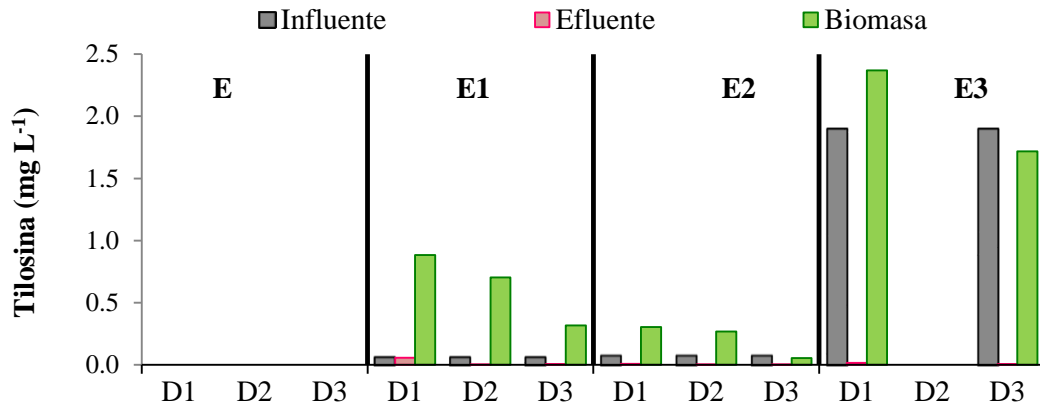


Figura 5.25 Valores promedio de concentración de tilosina en los digestores anaerobios experimentales

Durante la etapa E3 la concentración promedio de tilosina en el lodo de los digestores es similar a la adicionada, con concentraciones de 0.04 ± 0.003 y 0.04 ± 0.003 mg tilosina g SV⁻¹ en el D1 y D3, respectivamente, siendo ésta la etapa con las menores concentraciones de SV en la biomasa lo que indica que la concentración del antibiótico inhibe el proceso de degradación del mismo y el proceso de digestión anaerobia (ya que impacta directamente en la concentración de lodo en el sistema), tal como se encontró con la materia orgánica y producción el biogás.

Los resultados anteriores muestran que el mecanismo primario de desaparición de la tilosina es la fuerte sorción en el lodo, tal como lo reportó Kolz *et al.*, (2005) y la probable desaparición del antibiótico en los sistemas sea resultado de una biodegradación, tal como lo reportó Angenent *et al.*, (2008) en un reactor ASBR. La biodegradación encontrada podría ser resultado, como se mencionó anteriormente, de la adaptación de los microorganismos (etapa aclimatación de la biomasa) a la tilosina, lo que provoca que parte de ésta sea utilizada como promotor del crecimiento a nivel celular incrementando la capacidad de los microorganismos de degradar la materia orgánica mediante una mejora en la digestibilidad y adsorción de nutrientes, tal como sucede en el intestino de los animales (Ortiz, 2013).

5.6.1.7. Comportamiento del $N-NH_4^+$

En lo que respecta al nitrógeno amoniacal, la mayor parte de la experimentación las concentraciones fluctuaron entre 600 y 1,400 mg L⁻¹ tanto en el influente como en los efluentes, siendo el digestor D3 el más estable (Figura 5.26). Las concentraciones promedio de nitrógeno amoniacal en la etapa E fueron $1,243 \pm 146$, $1,265 \pm 146$, $1,312 \pm 138$ y $1,177 \pm 219$ mg L⁻¹ en el influente, D1, D2 y D3, respectivamente. Durante la etapa E1 las

concentraciones promedio fueron $1,015 \pm 91$, 871 ± 135 , $1,139 \pm 189$ y $1,181 \pm 159$ mg L^{-1} en el influente, D1, D2 y D3, respectivamente. Durante la etapa E2, las concentraciones disminuyeron tanto en el influente como en el efluente de los digestores a valores promedio de 988 ± 176 , 831 ± 188 , 876 ± 181 y 943 ± 149 mg L^{-1} en el influente, D1, D2 y D3, respectivamente. Durante la etapa E3 se observó un ligero incremento en la concentración de nitrógeno amoniacal en el efluente del digestor D3, sin embargo los valores promedio se mantuvieron en 930 ± 66 , 962 ± 79 y 1088 ± 137 mg L^{-1} en el influente, D1 y D3, respectivamente.

Las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal encontradas en los digestores con presencia de tilosina son similares a las encontradas en el digestor anaerobio escala piloto y en los reactores durante la aclimatación de la biomasa a la tilosina. Estas concentraciones de nitrógeno no inhibieron el proceso de digestión anaerobia, ya que se obtuvieron remociones de materia orgánica en la etapa E, E1 y E2 similares a las reportadas por otros autores para aguas residuales porcinas, tal como lo reporta Massé *et al.*, (2000). Lo anterior apoya los resultados reportados por Procházka *et al.*, (2012) quienes encontraron que las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal y alto pH incrementan la capacidad buffer del sistema y contribuyen a la estabilidad de reactores anaerobios.

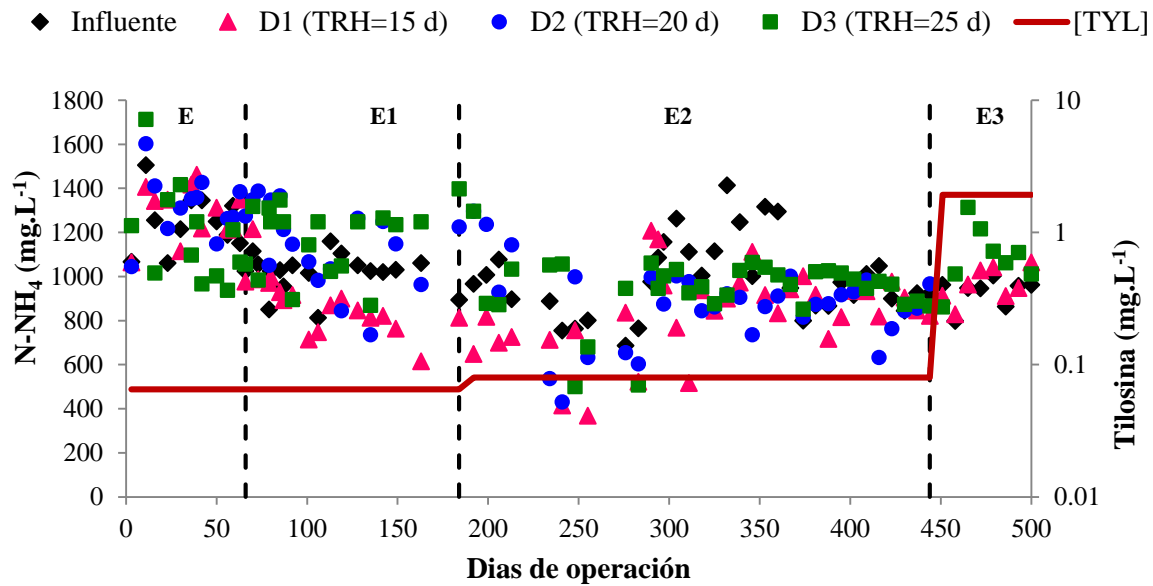


Figura 5.26 Comportamiento del nitrógeno amoniacal de los digestores anaerobios con presencia de tilosina

5.6.2. Cinéticas de remoción de materia orgánica y tilosina

5.6.2.1. Cinética de remoción

En la Figura 5.27 se muestran las cinéticas de remoción de materia orgánica y tilosina. La concentración inicial de materia orgánica medida como DQO fue de $16,723 \text{ mg L}^{-1}$ y de tilosina de 0.100 mg L^{-1} . La concentración de tilosina total fue mayor a la adicionada (0.080 mg L^{-1}) debido a que se encontró que la biomasa tenía un contenido inicial de 0.021 mg L^{-1} del antibiótico.

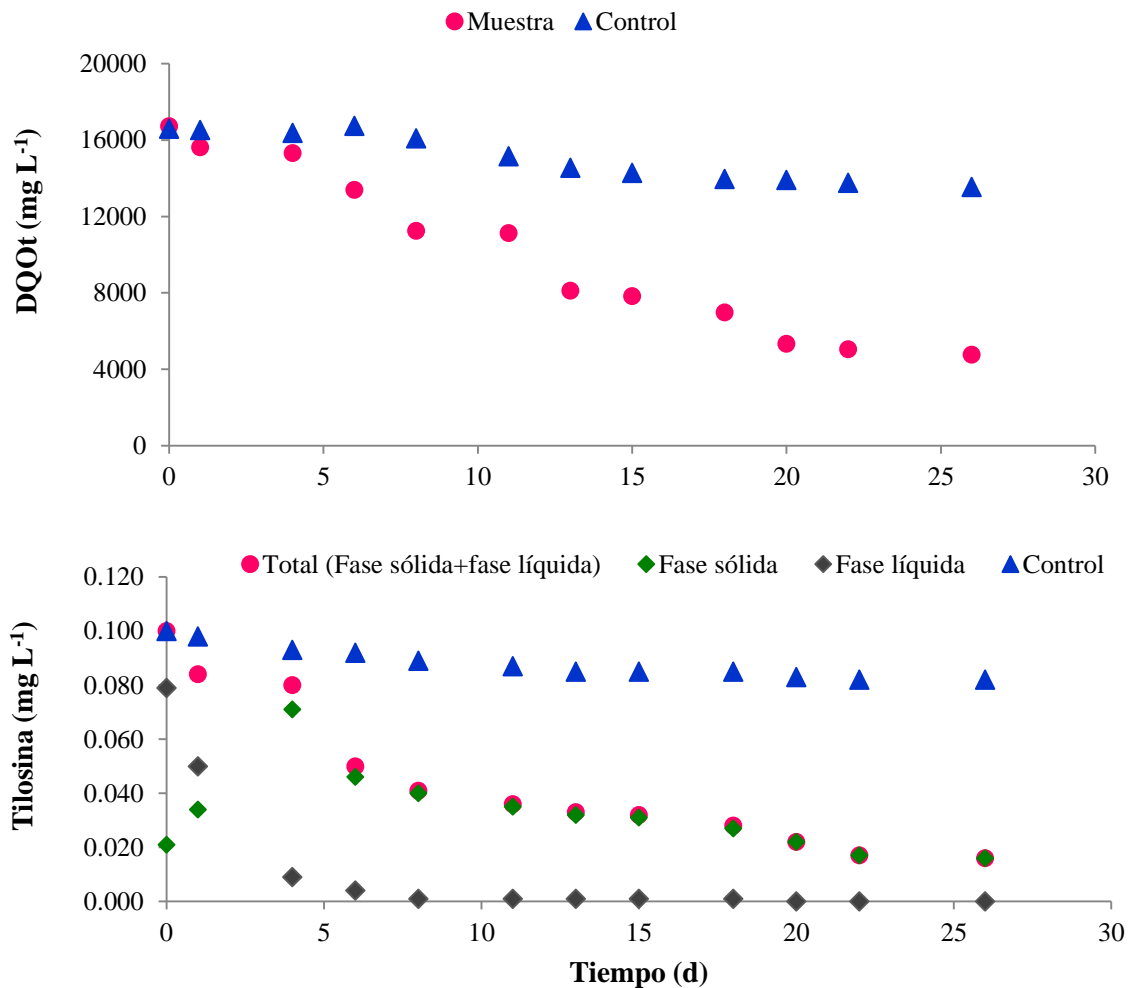


Figura 5.27 Remoción de materia orgánica y tilosina en pruebas en batch

Se observa que la mayor parte de remoción de materia orgánica se lleva a cabo por biodegradación, ya que la muestra control (a la que se le adicionó azida de sodio para inhibir la degradación por la presencia de microorganismos) solamente remueve el 18% de la DQO durante los 26 d que duró la experimentación. Se observa que la remoción del 53%

de la DQO se lleva a cabo los primeros 15 d, para el día 20 la remoción se incrementa a 68% y para el final de la experimentación (día 26) la remoción de DQO solo aumenta al 71%. Este comportamiento explicaría que las remociones fueran tan cercanas durante la etapa E2 de operación de los digestores para los tres TRH evaluados, sin embargo, la diferencia de 5 d entre el TRH de 15 a 20 d mejora notablemente la calidad del efluente hasta en un 15%, mientras que la misma diferencia en días (5 d) entre el TRH de 20 a 25 d solamente mejora la calidad en un 3%. Estos resultados confirman lo que se encontró en la evaluación de los tres digestores anaerobios, es decir, que el mejor TRH de digestores anaerobios para el tratamiento de agua residual porcina es de 20 d y que utilizar TRH más grandes no necesariamente implica una mejor calidad en el efluente.

En cuanto al comportamiento de la tilosina, se observa que la mayor parte de su remoción se lleva a cabo por biodegradación y que sólo el 18% se debe a la adsorción en los sólidos (control). De acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, la tilosina es fácilmente adsorbible en matrices sólidas ($\text{Log } K_{ow}=1.63-3.5$), lo que concuerda con el comportamiento obtenido en la evaluación de la cinética de degradación del antibiótico, puesto que la concentración de tilosina en la fase líquida disminuye rápidamente, mientras que en la fase sólida las concentraciones son mayores.

En la fase líquida la concentración inicial fue de 0.079 mg L^{-1} , la cual fue disminuyendo y a partir del día 8 se encontraron concentraciones menores o iguales a 0.001 mg L^{-1} . En la fase sólida, durante los primeros 4 d de evaluación, la concentración del antibiótico en el lodo fue incrementándose de 0.021 a 0.071 mg L^{-1} , lo que indica que el primer mecanismo de remoción del antibiótico es la adsorción en el lodo. A partir del quinto día de evaluación de las cinéticas, se observa que las concentraciones de la tilosina tienden a disminuir en la fase sólida alcanzando remociones del antibiótico de 68%, 78% y 84% el día 15, 20 y 26 de experimentación. Se observa que la diferencia en la remoción de tilosina entre un TRH de 15 a 20 d es del 4% y que la diferencia entre un TRH de 20 a 25 d es del 6%, siendo el TRH de 20 días el óptimo para la biodegradación tanto de materia orgánica como de tilosina.

5.6.2.2. Modelos cinéticos

La caracterización cinética de cualquier proceso biológico requiere determinar los parámetros cinéticos del modelo seleccionado para describirlo. No obstante, una vez seleccionado el modelo cinético, la obtención de la ecuación de diseño del sistema requiere la sustitución de la ecuación de velocidad en la expresión del balance de materia aplicable al reactor (Fernández, 2008). En este trabajo se consideró que el modelo de flujo del reactor es una mezcla completa por la forma en que se realizaron las cinéticas de degradación de materia orgánica (apartado 4.9).

Generalmente se ha asumido que el crecimiento de cultivos mezclados para el tratamiento en residuos orgánicos complejos debería ser similar al crecimiento de un cultivo puro. Por ello se ha utilizado comúnmente la ecuación de Monod para describir la digestión anaerobia y aerobia de materiales orgánicos complejos (Chen y Hashimoto, 1980). Sin embargo, debido a que la ecuación de Monod no predice la dependencia de la concentración de sustrato en el efluente sobre la concentración de sustrato en el influente, la ecuación de Monod es inadecuada para describir las cinéticas de reducción de sustrato de residuos orgánicos (Chen y Hashimoto, 1980).

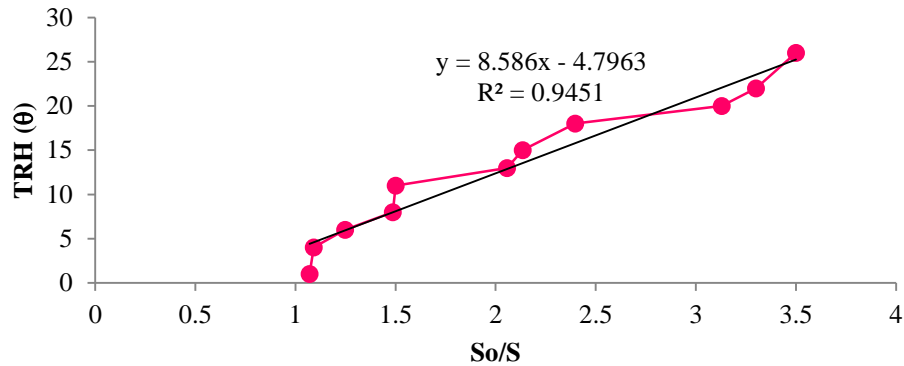
Morris (1976) concluyó que un método empírico (reacción de primer orden) era más adecuado para predecir los criterios de diseño y operacionales que la ecuación de Monod. Contois (1959) encontró que muchos de los datos cinéticos de Monod fueron obtenidos de experimentos en los cuales la tasa específica de crecimiento fue medida al inicio de los ciclos de crecimiento en cultivos batch con diferentes concentraciones de sustrato limitante y en los cuales la densidad de población inicial fue la misma de cultivo a cultivo. De acuerdo a Contois, las cinéticas de Monod presentan desviaciones relacionadas al tipo de mezcla, por lo que muestran errores al utilizar cultivos mezclados. Contois desarrolló un modelo cinético denominado de “Crecimiento logarítmico” aplicable tanto a cultivos en lote como continuos con mezcla.

Más tarde, Chen y Hashimoto (1980) investigaron la aplicabilidad del modelo de Contois para el tratamiento anaerobio de residuos orgánicos y en el cual incorporaron a dicho modelo el coeficiente refractario para contabilizar la proporción no biodegradable de los sustratos orgánicos en un digestor anaerobio. El modelo de Chen y Hashimoto establece que para residuos orgánicos tales como industriales, municipales y animales, es conveniente usar la concentración de DQO o de SV como un indicador de la concentración de sustrato, por lo cual este modelo es el más adecuado para evaluar las cinéticas de materia orgánica compleja.

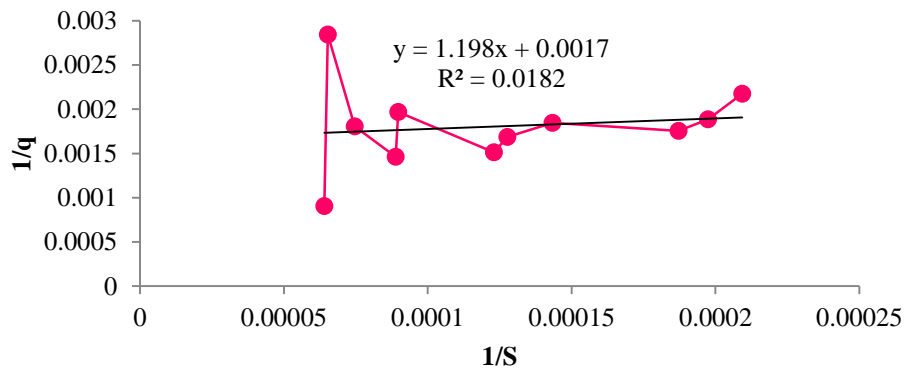
En este trabajo se aplicaron los modelos cinéticos tipo Monod, Primer Orden y Chen y Hashimoto para determinar el comportamiento cinético en la remoción de la DQO en presencia y ausencia de tilosina. En las Figura 5.28 y 5.29 se muestra el comportamiento gráfico de los modelos cinéticos utilizados con presencia y ausencia de tilosina, respectivamente.

Se observa que el sistema con presencia del antibiótico se ajustó tanto al modelo de primer orden como al modelo cinético de Chen y Hashimoto. Mientras que el sistema sin presencia de tilosina se ajustó al modelo cinético de primer orden, de Monod y de Chen y Hashimoto.

Cinética de Primer Orden



Cinética de Monod



Cinética de Chen y Hashimoto

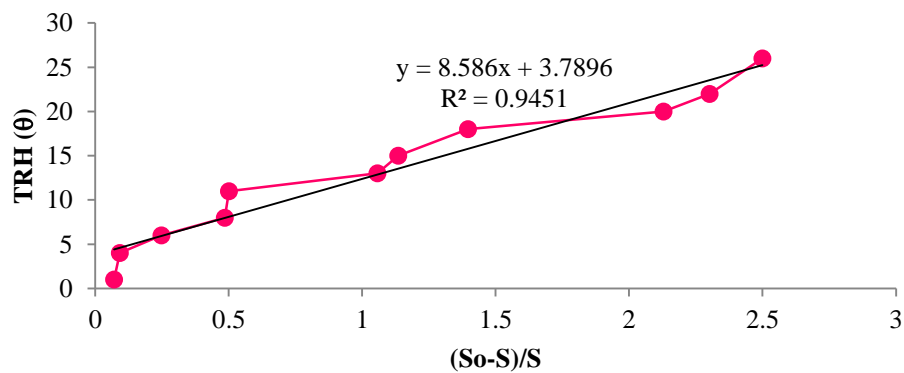
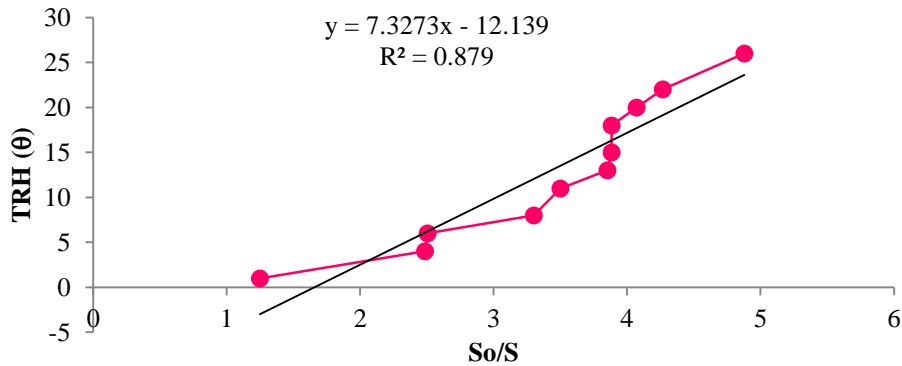
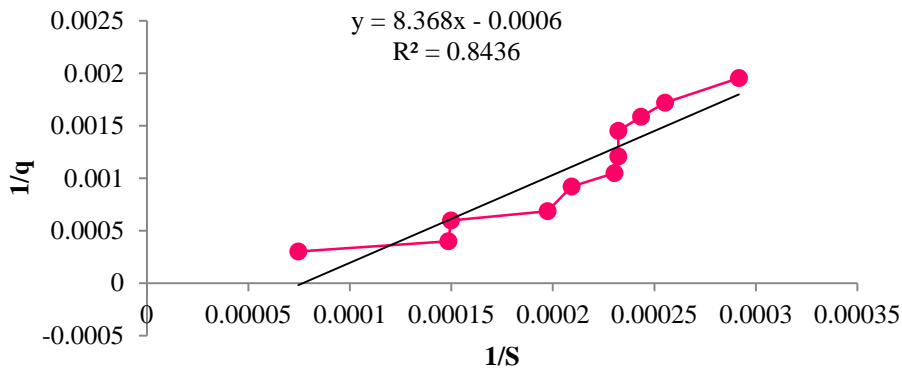


Figura 5.28 Linearización del modelo cinético de Primer Orden, Monod y Chen y Hashimoto por el método gráfico de Lineweaver-Burk para la remoción de materia orgánica con presencia de tilosina

Cinética de Primer Orden



Cinética de Monod



Cinética de Chen y Hashimoto

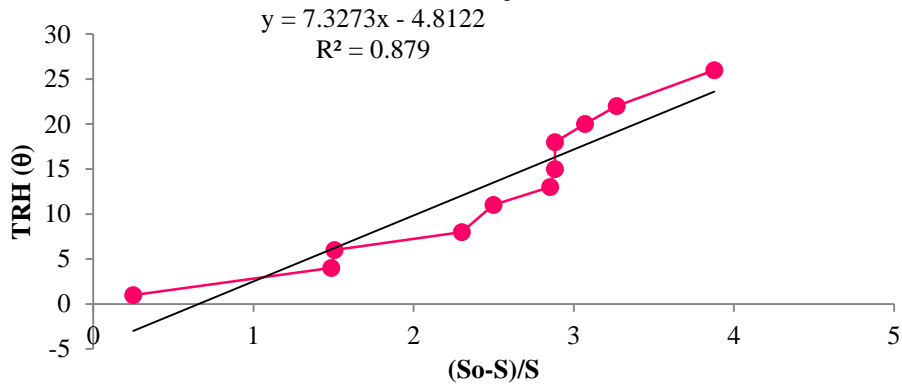


Figura 5.29 Linealización del modelo cinético de Primer Orden, Monod y Chen y Hashimoto por el método gráfico de Lineweaver-Burk para la remoción de materia orgánica sin presencia de tilosina

En la Tabla 5.12 se muestran los modelos cinéticos aplicados y sus resultados.

Tabla 5.12 Modelos cinéticos aplicados a los datos de consumo de sustrato medido en términos de DQO

Modelo cinético	Linealización para digestores anaerobios con mezcla	Ecuación de ajuste	R ²
Primer Orden $\mu = \frac{k \cdot S}{S_0 + S} - b$	$\theta = \frac{1}{k} \left(\frac{S_0}{S} \right) - \frac{1}{k}$	Con tilosina $y = 8.586x - 4.7963$	0.9451
		Sin tilosina $y = 7.3273x - 12.139$	0.879
Monod $\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S} - b$	$\theta = \frac{K_s}{\mu_{max}} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{\mu_{max}}$	Con tilosina $y = 1.198x + 0.0017$	0.0182
		Sin tilosina $y = 8.368x - 0.0006$	0.8436
Chen y Hashimoto $\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K S_0 + (1 - K) S} - b$	$\theta = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K}{\mu_{max}} \left(\frac{S_0 - S}{S} \right)$	Con tilosina $y = 8.586x + 3.7896$	0.9451
		Sin tilosina $y = 7.3273x - 4.8122$	0.879

μ : tasa específica de crecimiento

μ_{max} : tasa específica máxima de crecimiento de sustrato

S_0 y S : concentraciones del sustrato limitante en el influente y efluente del reactor

k : tasa específica máxima de uso de sustrato

b : tasa específica de decaimiento

θ : Tiempo de residencia hidráulico

K : constante cinética adimensional de Chen y Hashimoto

K_s : constante de saturación

Para la cinética de primer orden se observa que los datos obtenidos en las cinéticas de remoción de materia orgánica se ajustaron a ambos sistemas, con presencia y con ausencia de tilosina. Sustituyendo el valor de la constante cinética k ($k=0.1164$) para el sistema con tilosina en la ecuación linealizada y despejando S se obtiene la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

$$\text{Ecuación 5.1 } S = \frac{S_0}{\frac{\theta}{8.59} + 1}$$

Para el sistema sin presencia de tilosina el valor de k es 0.1365, por lo que despejando S se obtiene la Ecuación 5.3.

$$\text{Ecuación 5.2 } S = \frac{S_0}{\frac{\theta}{7.33} + 1}$$

De acuerdo a la Ecuación 5.1, se obtendrían remociones de DQO en un intervalo entre 69 y 77% con TRH en un intervalo entre 20 y 30 d para el sistema con presencia de tilosina. Para el sistema sin tilosina la Ecuación 5.2 indica que se obtendrían remociones en un intervalo entre 73 y 80% para un TRH en un intervalo entre 20 y 30 d. Lo que indica que para la cinética de primer orden, las remociones son ligeramente superiores en el sistema sin presencia del antibiótico. Para el caso de los dos sistemas, las ecuaciones también indican que a mayores TRH se obtienen remociones de materia orgánica mayores, sin embargo para TRH superiores a 50 d, la remoción ya no se incrementa de forma significativa.

En el caso de las cinéticas de Monod, como se mencionó anteriormente se utilizan generalmente para sustratos simples, por lo que los datos obtenidos con presencia y ausencia de tilosina para el tratamiento de agua residual porcina no se ajustaron a este modelo ya que en el caso del sistema con tilosina la r^2 es muy baja (0.0182) y en el sistema sin tilosina el signo de la variable b (corte en el eje de las ordenadas) de la ecuación de ajuste es incongruente con la ecuación de Monod.

Para la cinética de Chen y Hashimoto los datos solo se ajustaron al sistema con presencia de tilosina, ya que en el sistema sin tilosina el signo del valor de la ordenada en el corte resultó incongruente con la ecuación. Se obtuvo para el sistema con tilosina un grado de correlación de 0.9451. Por lo tanto, el valor de μ_{\max} fue de 0.264 y el valor de K de 2.27. Con los valores de μ_{\max} y K obtenidos de la ecuación de la línea recta en la ecuación linealizada de Chen y Hashimoto y despejando S se obtiene la Ecuación 5.3.

$$\text{Ecuación 5.3 } S = \frac{8.60 \cdot S_0}{\theta + 4.81}$$

De acuerdo con esta ecuación se obtendrían remociones de DQO superiores al 65% a partir de TRH de 20 d y remociones superiores a 81% con TRH de 40 d. Al igual que para la cinética de primer orden al incrementar el TRH la eficiencia de remoción de materia orgánica aumenta. Sin embargo, TRH superiores a 50 d (84% de remoción de DQO) no incrementan significativamente la remoción de materia orgánica.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con el objetivo planteado al inicio de la investigación se evaluó la influencia de la concentración de tilosina en un sistema anaerobio sobre la remoción de materia orgánica con diferentes tiempos de residencia hidráulica. Para ello, se evaluaron diferentes etapas experimentales, las conclusiones de cada una se detallan a continuación:

Se determinó que una biomasa que no ha tenido contacto con la tilosina, inhibe su producción de metano en un 49% a una concentración del antibiótico de 0.01 mg L^{-1} y a una concentración de 1000 mg L^{-1} de tilosina la metanogénesis se inhibe hasta en un 98%. Sin embargo, al aplicar una etapa de aclimatación de la biomasa a la tilosina el proceso metanogénico mejora lo cual sugiere que la biomasa desarrolla capacidades para metabolizarlo.

Las concentraciones de tilosina encontradas en agua residual porcina en muestras simples fueron 0.056 , 0.072 y 0.0086 mg L^{-1} para las etapas productivas de maternidad, destete y engorda, respectivamente. Mientras que las concentraciones de tilosina en las muestras compuestas fueron de 0.0118 y 0.0024 mg L^{-1} en la fase líquida y 0.0206 y 0.0178 mg L^{-1} en la fase sólida, para las etapas productivas de maternidad y engorda, respectivamente.

Se encontró que el mecanismo primario de remoción de tilosina en un digester tipo dalys es la sorción en el lodo anaerobio. Sin embargo, la mayor parte de la remoción del antibiótico se lleva a cabo posteriormente por biodegradación, siendo el TRH de 20 d el óptimo para la degradación tanto de materia orgánica como de antibiótico.

De acuerdo a las cinéticas de remoción de materia orgánica se encontró que en presencia de la tilosina la eficiencia de remoción se ajusta un modelo cinético de primer orden y al modelo de Chen y Hashimoto y que en ausencia de tilosina la eficiencia de remoción de materia orgánica se ajusta solamente al modelo cinético de primer Orden. Se determinó que un incremento en el TRH incrementa la remoción de materia orgánica en ambos sistemas, sin embargo, a TRH superiores a 50 d la eficiencia no se incrementa significativamente.

Se probó que al aumentar gradualmente la concentración de tilosina entre 0.065 y 0.080 mg L^{-1} , en digestores de 55 L, la biomasa se aclimató y se mantuvieron las eficiencias de remoción de ST (66-72%) y DQOt (68-79%), generación de biogás ($24\text{-}31 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$) y porcentaje de metano en el biogás (71-75%). Sin embargo, al incrementar la concentración de tilosina a un valor de 1.9 mg L^{-1} , las eficiencias de remoción de ST (32-37%), DQO (14-27%), generación de biogás ($18\text{-}19 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$) y porcentaje de metano en el biogás (21-22%) disminuyeron.

De acuerdo a las conclusiones anteriores, se acepta la hipótesis propuesta para el presente trabajo que menciona que al disminuir la carga volumétrica de tilosina aplicada (en función del TRH) en sistemas anaerobios tipo dalys disminuye el efecto inhibitorio en la biomasa permitiendo una remoción de materia orgánica eficiente.

7. RECOMENDACIONES

Evaluar un sistema de pulimento para encontrar el tren de tratamiento adecuado para la degradación de materia orgánica a fin de cumplir con la normativa existente.

Identificar los microorganismos especializados capaces de biodegradar la tilosina.

Evaluar un sistema de tratamiento complementario al digestor anaerobio que permita reducir la población de bacterias resistentes a la tilosina que pudieran estar presentes en el efluente del digestor.

Evaluar la resistencia bacteriana generada en los digestores anaerobios tipo dalys.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup F. y Carstensen B. (1998). Effect of tylosin used as a growth promoter on the occurrence of macrolide-resistant enterococci and staphylococci in pigs. *Microbial Drug resistance*. 4: 307-312.
- ACD, Advanced Chemistry Development. (1995). User's manual. Toronto, Ontario, Canadá.
- AgCert. (2006). AWMS methane recovery Project MX06-S-40, Puebla, México. UNFCCC Clean Development Mechanism Simplified Project Design Document for Small Scale Project Activity. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <http://cdm.unfccc.int/Projects/DB/TUEV-SUED1152289597.42/view>
- Alatrache A., Laoufi N., Pons M., Van Deik J. y Zahraa O. (2010). Tylosin abatement in water by photocatalytic process. *Water Science and Technology*. 62 (2): 435-441.
- Alder A., McArdell C., Golet E., Ibric S., Molnar E., Nipales N. y Giger W. (2001). Occurrence and fate of fluoroquinolone, macrolide and sulfonamide antibiotics during wastewater treatment and in ambient waters in Switzerland. *Pharmaceuticals and care products in the environment*. American Chemical Society. Vol. 791.
- Andreottola G., Bortone G. y Tilche A. (1997). Experimental validation of a simulation and design model for nitrogen removal in sequencing batch reactors. *Water Science and Technology*. 35 (1): 113-120.
- Andreozzi R., Canterino M., Marotta R. y Paxeus N. (2005). Antibiotic removal from wastewaters: the ozonation of amoxicillin. *Journal of Hazardous Materials*. 122: 243-250.
- Angenent L., Mau M., George U., Zahn J. y Raskin L. (2008). Effect of the presence of the antimicrobial tylosin in swine waste on anaerobic treatment. *Water Research*. 42: 2377-2384.
- Angulo F. J., Nargund V. N. y Chiller T. C. (2004). Evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and the antimicrobial resistance bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *Journal of Veterinary Medicine Series B*. 51: 374-379.
- APHA, American Public Health Association. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22th Edition. Washington, D.C.
- Ashton D., Hilton M. y Thomas K. (2004). Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment*. 333: 167-184.
- Bager F., Madsen M., Christensen J. y Aarestrup F. (1997). Avoparcin as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*. 31: 95-112.
- Bager A., Jensen J. y Krogh P. (2000). Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere*. 40: 751-757.
- Bang-Ce Y., Songyang L., Peng Z. y Xiao-Hong L. (2008). Simultaneous detection of sulfamethazine, streptomycin, and tylosin in milk by microplate-array based SMM-FIA. *Food Chemistry*. 106: 797-803.
- Bao Y., Zhou Q., Guan L. and Wang Y. (2009). Depletion of chlortetracycline during composting of aged and spiked manures. *Waste Management*. 29: 1416-1423.
- Batchelder A. R. (1982). Chlortetracycline and oxytetracycline effects on plant growth and development in soil systems. *Journal of Environmental Quality*. 11 (4): 675-678.
- Batt A., Bruce I. y Aga D. (2006). Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharge. *Environmental Pollution*. 142: 295-302.
- Becerril B. J. E. (2009). Contaminantes emergentes en el agua. *Revista Digital Universitaria*. UNAM. 10 (8). Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <http://www.ru.tic.unam.mx:8080/handle/DGTIC/60733>
- Belmonte M., Rodríguez D. C., Hsieh C. F., Pozo G. y Vidal G. (2008). Estudios preliminares de tratabilidad a un purín de cerdo. XXXI Congreso Interamericano AIDIS. Santiago de Chile. 12-15 Octubre. *Memorias del Congreso*.
- Ben W., Qiang Z., Pan X. y Chen M. (2009). Removal of veterinary antibiotics from sequencing batch reactor (SBR) pretreated swine wastewater by Fenton's reagent. *Water Research*. 43: 4392-4402.
- Blackwell P., Holten Lutzhoft H., Ma H., Halling-Sørensen B., Boxall A. y Kay P. (2004). Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. *Talanta*. 64: 1058-1064.

- Boleas S., Alonso C., Pro J., Fernández C., Carbonell G. y Tarazona J. V. (2005). Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organisms in a multispecies-soil system (MS.3) and influence of manure co-addition. *Journal of hazardous Materials*. 122 (3): 233-241.
- Bonmati A. y Flotats X. (2002). Pig slurry treatment strategy in a high livestock concentration area: anaerobic digestion as the key process. *Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion*. Mérida, Yucatán. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/unam7/pigslurry.pdf>
- Bonmati A., Flotats X., Mateu L. y Campos E. (2001). Study of thermal hydrolysis as a pretreatment to mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. *Water Science and Technology*. 44 (4): 109-116.
- Bousier H., Béline F. y Paul E. (2005). Piggery wastewater characterization for biological nitrogen removal process design. *Bioresource Technology*. 96: 351-358.
- Boxall A. B. A., Tiede K., Bryning G., Bevan R., Tam C. y Levy L. S. (2011). Desk-based study of current knowledge on veterinary medicines in drinking water and estimation of potential levels. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <http://dwi.defra.gov.uk/research/completed-research/reports/dwi70-2-235.pdf>
- Buelna G., Dubé R. y Turgeon N. (2008). Pig manure treatment by organic bed filtration. *Desalination*. 231 (1-3): 297-304.
- Butler A., Flint S. y Cundliffe E. (2001). Feedback control of polyketide metabolism during tylosin production. *Microbiology*. 147: 795-801.
- Calamari D., Zuccato E., Castiglioni S., Bagnati R. y Fanelli R. (2003). Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environmental Science and Technology*. 37 (7): 1241-1248.
- Campagnolo E. R., Johnson K. R., Karpati A., Rubin D. W., Meyer M. T., Esteban J. E., Currier R.W., Smith K., Thu K. M. y McGeehin M. (2002). Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *The Science of the Total Environment*. 299: 89-95.
- Campos E., Almirall M., Martínez-Almela J., Palatsi J. y Flotats X. (2008). Feasibility study of the anaerobic digestion of dewatered pig slurry by means of polyacrilamide. *Bioresource Technology*. 99: 387-395.
- Casewell M., Friis C., Marco E., McMullin P. y Phillips I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 159-161.
- Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R., Pomati F., Calamari D. y Zuccato E. (2006). Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environment Science and Technology*. 40 (1): 357-363.
- Chae K., Jang A., Yim S. y Yim I. (2008). The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. 99: 1-6.
- Chao R., Sosa R., Pérez A. y Cruz E. (2008). A study on pig wastewater treatment with low cost biodigesters. *Livestock research for Rural Development*. 20 (9).
- Chapin A., Rule A., Gibson K., Buckley T. y Schwab K. (2005). Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. *Environmental Health perspectives*. 113 (2): 137-142.
- Chelliapan S., Wilby T. y Sallis P. (2006). Performance of an up-flow anaerobic stage reactor (UASR) in the treatment of pharmaceutical wastewater containing macrolide antibiotics. *Water Research*. 40: 507-516.
- Chelliapan S., Wilby T., Sallis P. J. y Yuzir A. (2011). Tolerance of the antibiotic tylosin on treatment performance of an up-flow anaerobic stage reactor (UASR). *Water Science and Technology*. 63 (8): 1599-1606.
- Chen Y. R. y Hashimoto A. G. (1980). Substrate utilization kinetic model for biological treatment processes. *Biotechnology and Bioengineering*. 22: 2081-2095.
- Chénier M. y Juteau P. (2009). Fate of chlortetracycline- and tylosin- resistant bacteria in an aerobic thermophilic sequencing batch reactor treating swine waste. *Microbiology Ecology*. 58: 86-97.
- Cherlet M., De Baere S., Croubels S. y De Backer P. (2002). Quantitation of tylosin in swine tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 473: 167-175.
- Christian T., Schneider R., Färber H., Skutlarek D., Meyer M. y Goldbach. (2003). Determination of antibiotic residues in manure, soil and surface waters. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*. 31: 36-44.

- Cisneros O. M., Araluce S. R., Cabirol N., Morgan-Sagastume J. y Noyola R. A. (2003). Digestión anaerobia en dos etapas de lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/uruguay30/MX05132_Cisneros.pdf
- Civitareale C., Fiori M., Ballerini A. y Brambilla G. (2004). Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feedingstuffs with HPLC-UV/DAD at 1 ppm level. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 36: 317-325.
- Cocconcelli P. S., Cattivelli D. y Gazzola S. (2003). Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 88: 315-323.
- Contois D. E. (1959). Kinetics of bacterial growth: Relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures. *Journal of general Microbiology*. 21: 40-50.
- Cornick N. (2009). Tylosin and chlortetracycline decrease the duration of fecal shedding of *E. coli* 0157:H7 by swine. *Veterinary Microbiology*. 1873-2545.
- Costanzo S., Murby J. y Bates J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Boletine*. 51: 218-223.
- Dalrymple O., Yeh D. y Trotz M. (2007). Removing pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds from wastewater by photocatalysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 82 (2). 121-134.
- Daughton C.G. y Ternes T.A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. *Environmental Health Perspectives*. 6: 907-938.
- De Liguoro M., Anfossi P., Angeletti R. y Montesissa C. (1998). Determination of tylosin residues in pig tissues using high-performance liquid chromatography. *The Analyst*. 123: 1279-1282.
- De Liguoro M., Cibin V., Capolongo F., Halling-Sørensen B. y Montesissa C. (2003). Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere*. 52: 203-212.
- De Victorica A. J. y Galván G. M. (2005). Tratamiento y aprovechamiento de aguas residuales de granjas porcinas. Primera etapa. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: http://proyectos.iingen.unam.mx/Proyectos_2005_2006/07/7.2.5.pdf
- Diarra M., Malouin F. y Jacques M. (1999). Postantibiotic and physiological effects of tilmicosin, tylosin, and apramycin at subminimal and suprainhibitory concentrations on some swine and bovine respiratory tract pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 12: 229-237.
- Eguchi K., Nagase H., Ozawa M., Endoh Y. S., Goto K., Hirata K., Miyamoto K. y Yoshimura H. (2004). Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*. 57: 1733-1738.
- EPA, Environmental Protection Agency (2014). Contaminants of emerging concern. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <http://water.epa.gov/scitech/cec/>.
- Escalante E. V. y Alarcón H.D. (2002). Tratamiento de efluentes porcícolas en granjas de traspatio. Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. AIDIS. Memorias del Congreso. México, D. F. FEMISCA.1-7.
- Fernández G. L. (2008). Caracterización cinética de la degradación anaerobia termofílica seca de la forsu. Efecto de diferentes pretratamientos sobre la biodegradabilidad del residuo. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz. España.
- García M. J. (2007). Biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- Garzón-Zúñiga M. A., Lessard P., Aubry G. y Buelna G. (2005). Nitrogen elimination mechanisms in an organic media aerated biofilter treating pig manure. *Environmental Technology*. 26: 361-371.
- Garzón-Zúñiga M.A. y Buelna G. (2014). Caracterización de aguas residuales porcinas y su tratamiento por diferentes procesos en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 30 (1): 65-79.
- Gerardi M. y Chairman H. (1994). *Wastewater Biology: The Life Processes*. Ed. Water Environment Federation. 204 p.
- Gevers D., Masco L., Baert L., Huys G., Debevere J. y Swings J. (2003). Prevalence and diversity of tetracycline resistant lactic acid bacteria and their tet genes along the process line of fermented dry sausages. *Systematic and Applied Microbiology*. 26: 277-283.
- Gibbs S. G., Green C. F., Tarwater P. M. y Scarpino P. V. (2004). Airborne antibiotic resistant and nonresistant bacteria and fungi recovered from two swine herd confined animal feeding operations. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 1 (11): 699-706.

- Ginnivan M. (1982). The effect on aerobic waste treatment of supplementing pig diets with penicillin, chlortetracycline or copper. *Agricultural Wastes*. 4: 33-39.
- Goñi-Urriza M., Pineau L., Capdepuuy M., Roques C., Caumette P. and Quentin C. (2000). Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas spp* isolated from two European rivers. *Journal of Microbial Chemotherapy*. 46: 297-301.
- González-Fernández C. y García-Encina P. (2009). Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass and Bioenergy*. 33: 1065-1069.
- Götz A. y Smalla K. (1997). Manure enhances plasmid mobilization and survival of *Pseudomonas putida* introduced into field soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 1980-1986.
- Grote M., Vockel A., Schwarze D., Mehlich A. y Freitag M. (2004). Fate of antibiotics in food chain and environment originating from pig fattening (Part 1). *Fresenius Environmental Bulletin*. 13: 1216-1224.
- Groupe R. (1990). Antibióticos una temática siempre actual. Ed. Lerner. Bogota, Colombia.
- Guardabassi L., Wong D. y Dalsgaard A. (2002). The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water Research*. 36: 1955-1964.
- Gupta S., Singh A., Kumar K., Thompson A. y Thomas D. (2002). Antibiotic losses in runoff and drainage from manure-applied fields. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <http://water.usgs.gov/wrri/01grants/national/prog-compl-reports/2001MN1041G.pdf>
- Halling-Sørensen B. (2000). Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*. 40: 731-739.
- Halling-Sørensen B. (2001a). Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 40 (4): 451-460.
- Halling-Sørensen B., Jensen J., Tjornelund J. y Montforts M. (2001) Worstcase estimations of predicted environmental soil concentrations (PEC) of selected veterinary antibiotics and residues used in Danish agriculture. In Kümmerer K. Editor. *Pharmaceuticals in the environment*. Germany: Springer Verlag. Chapter 13. 171-182
- Halling-Sørensen B., Nielsen S., Lanzky P., Ingerslev F., Lützhof H. y Jørgensen S. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- a review. *Chemosphere*. 36: 357-394.
- Halling-Sørensen B., Sengeløv G., Ingerslev F. y Jensen L. B. (2003). Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazine, streptomycin, ciprofloxacin and olaquinox due to environmental processes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 44: 7-16.
- Hamil E. R. L., Haney M., McGuire J. y Stamper M. (1965). Antibiotics tylosin and desmycosin and derivatives thereof. Patente 3,178,341. United States Patent Office.
- Hamscher G., Sczesny S., Höper H. y Nau H. (2002). Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by High-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 74: 1509-1518.
- Han I., Congeevaram S. y Park J. (2009). Improved control of multiple-antibiotic-resistance-related microbial risk in swine manure wastes by autothermal thermophilic aerobic digestion. *Water Science and Technology*. 59: 267-271.
- Han Z., Wu X., Zhu J. y Chen Y. (2008). Oxidization-reduction potential and pH for optimization of nitrogen removal in a twice-fed sequencing batch reactor treating pig slurry. *Biosystems Engineering*. 99: 273-281.
- Heberer T., Reddersen K. y Mechlaki A. (2002). From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceuticals residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Science and Technology*. 46: 81-86.
- Hirsch R., Ternes T. A., Heberer K. y Kratz K. L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*. 225: 109-118.
- Holmstrom K., Graslund S., Wahlstrom A., Pongshompoo S., Bengtsson B. y Kautsky N. (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science and Technology*. 38: 255-266.
- Holten-Lützhof H. C., Halling-Sørensen B. y Jørgensen S. E. (1999). Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Arch. Of Environmental Contamination and Toxicology*. 36: 1-6.
- Hortwitz W. (1982). Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Analytical Chemistry*. 54 (1): 67A
- Hu D. y Coats J. (2007). Aerobic degradation and photolysis of tylosin in water and soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26 (5): 884-889.

- Hu D., Fulton B., Henderson K. y Coats J. (2008). Identification of tylosin photoreaction products and comparison of ELISA and HPLC methods for their detection in water. *Environmental Science and Technology*. 42: 2982-2987.
- Huang C.H., Renew J. E., Smeby K. L., Pinkston K. y Sedlak D. L. (2009). Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: http://www.ucowr.siu.edu/updates/pdfn/V120_A4.pdf
- Huycke M. M., Sahn D. F. y Gilmore M. S. (1998). Multiple-Drug Resistant Enterococci: The nature of the problem and agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases*. 4 (2): 239-249.
- Huys G. D'Haene K., Van Eldere J., Von Holy A. y Swings J. (2005). Molecular diversity and characterization of tetracycline-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a poultry processing plant. *Applied Environmental Microbiology*. 71: 574-579.
- IMTA, Instituto Mexicano de Tecnología del agua. (2004). Prueba de desempeño. Manual de Control de Calidad Analítico. Clave CAGC7-06.
- Ince O., Anderson G. K. y Kasapgil B. (1995). Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during start-up of an anaerobic digestion system. *Water Research*. 29 (1): 349-355.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2007). Así hicimos el VIII Censo agrícola, ganadero y forestal 2007. Aspectos metodológicos y principales resultados. *Revista del VIII Censo Agropecuario*.
- Ingerslev F. y Halling-Sørensen B. (2000). Biodegradability properties of sulfonamides in activated sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19: 2467-2473.
- Ingerslev F. y Halling-Sørensen B. (2001). Biodegradability of metronidazole, olaquinox and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil-manure slurries. *Ecotoxicology Environment Safety*. 48 (3): 311-320.
- INSP, Instituto Nacional de Salud Pública. (2010). Regulación y promoción para el uso adecuado de antibióticos en México. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: http://www.insp.mx/images/stories/Lineas/medicamentos/doc/acciones_antibioticos.pdf
- Jacobsen A. y Halling-Sørensen B. (2006). Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 384: 1164-1174.
- Jensen J., Henning K. P. y Sverdrup L. E. (2003). Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). *Chemosphere*. 50 (3): 437-443.
- JiaXiang H. (2003). Actuality and countermeasure to remaining antibiotics in raw milk. *Contemporary livestock and poultry breeding*. 8: 53-54.
- Jørgensen S. E. y Halling-Sørensen B. (2000). Drugs in the environment. *Chemosphere*. 40: 691-699.
- Kallaos J., Wheeler K., Wong C. y Zahller M. (2007). Pharmaceuticals in wastewater streams: Disposal practices and policy options in Santa Barbara. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <http://www.bren.ucsb.edu/research/documents/PharmaceuticalsBrief.pdf>
- Kalyuzhnyi S., Sklyar V., Fedorovich V., Kovalev A., Nozhevnikova A. y Klapwijk N. (1999). The development of biological methods for utilization and treatment of diluted manure streams. *Water Science and Technology*. 40 (1): 223-229.
- Kantawanichkul S. y Somprasert S. (2005). Using a compact combined constructed wetland system to treat agricultural wastewater with high nitrogen. *Water Science and Technology*. 51 (9): 47-53.
- Karakashev D., Schmidt J. E. y Angelidaki I. (2008). Innovative process scheme for removal of organic matter, phosphorus and nitrogen from pig manure. *Water Research*. 42: 4083-4090.
- Karthikeyan K. G. y Bleam W. F. (2003). DNR Project #163 Final Project Report; Wisconsin Department of Natural Resources; Wisconsin Department Agriculture, Trade and Consumer Protection: Wisconsin. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <http://www.dnr.state.wi.us/org/water/dwg/gw/research/reports/169.pdf>
- Kay P. y Boxall A. B. A. (2000). Environmental Risk Assessment of Veterinary Medicines in Slurry. SSLR Contract JF 6110Z, Cranfield University.
- Keatinge-Clay A. (2007). A tylosin ketoreductase reveals how chirality is determined in polyketides. *Chemistry and Biology*. 14: 898-908.
- Kim K., Owens G., Kwon S., So K., Lee D. y Ok Y. (2011). Occurrence and Environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. *Water Air and Soil Pollution*. 214: 163-174.

- Klavarioti M., Mantzavinos D. y Kassinos D. (2009). Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environmental International*. 35 (2): 402-417.
- Koike S., Krapac I. G., Oliver H. D., Yannarell A. C., Chee-Sanford J. C., Aminov R. I. y Mackie R. I. (2007). Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. *Applied Environmental Microbiology*. 73 (15): 4813-4823.
- Kolpin D., Furlong E., Meyer M., Thurman M., Zaugg S., Barber L. y Buxton H. (2002). Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology*. 36 (6): 1202-1211.
- Kolpin D., Skopec M., Meyer M., Furlong E. y Zaugg S. (2004). Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Science of the Total Environment*. 328: 119-130.
- Kolthoff I. y Sandell E. (1966). *Tratado de química analítica cuantitativa*. La Habana, Cuba. Edición Revolucionaria.
- Kolz A., Ong S. y Moorman T. (2005). Sorption of tylosin onto swine manure. *Chemosphere*. 60: 284-289.
- Kornboonraksa T., Lee H. S., Lee S. H. y Chiemchaisri C. (2009). Application of chemical precipitation and membrane bioreactor hybrid process for piggery wastewater treatment. *Bioresource Technology*. 100: 1963-1968.
- Kümmerer K. (2001). *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, fate, effects and risk*. 1st edition. Germany. 521 p.
- Lallai A., Mura G. y Onnis N. (2002). The effects of certain antibiotics on biogas production in the anaerobic digestion of pig waste slurry. *Bioresource Technology*. 82: 205-208.
- Langhammer J., Büning-Pfaue H., Winkelmann J. y Körner E. (1988). Chemotherapeutika-Rückstände und resistenzverhalten bei der bestandsbehandlung von sauen post partum. *Tierärztl umschau*. 43: 375-382.
- Levy S. (1992). *The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle*. Plenum, New York, U.S.A.
- Lindsey M., Meyer T. y Thurman E. (2001). Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 73: 4640-4646.
- Liu T. y Sung S. (2002). Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens *Water Science and Technology*. 45 (10): 113-120.
- Loke M. L., Tjørnelund J. y Halling-Sørensen B. (2002). Determination of the distribution coefficient (log Kd) of oxytetracycline, tylosin A, olaquinox and metronidazole in manure. *Chemosphere*. 48: 351-361.
- Loke M., Ingerslev F., Halling-Sørensen B. y Tjørnelund J. (2000). Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. *Chemosphere*. 70: 759-765.
- López M., Villa P. y Escobedo R. (2004). Estudio del comportamiento de reactores anaerobios de residuos sólidos a través de ensayos microbiológicos. *Revista CENIC. Centro Nacional de Investigaciones Científicas Cuba*. 179-183.
- López P. A. (2010). Valorización del estiércol de cerdo a través de la producción de biogás. Asociación colombiana de poricultores. Fondo Nacional de la Porcicultura. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <https://www.yumpu.com/es/document/view/12956991/valorizacion-del-estiercol-de-cerdo-a-traves-oiporc>
- López Q. Y. (2010). Efecto en el crecimiento de plantas de consumo humano al adicionar en la tierra tabletas caducas de amoxicilina y de ácido acetilsalicílico. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lotfin K. A., Henny C., Adams C. D., Surampali R. y Mormile M. R. (2005). Inhibition of microbial metabolism in anaerobic lagoons by selected sulfonamides, tetracyclines, lincomycin and tylosin tartrate. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24 (4): 782-788.
- Lozano V. N. (2010). Cuadernillo de nuevas tecnologías para el tratamiento biológico de efluentes industriales. Tecnológico de Estudios Superiores Oriente del Estado de México. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <http://www.tesoem.edu.mx/alumnos/cuadernillos/2010.023.pdf>
- Macauley J., Qiang Z., Adams C., Surampalli R. y Mormile M. (2006). Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone. *Water Research*. 40: 2017-2026.

- Malina J. y Pohland F. (1992). Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes. Water quality management library. Vol. 7. Ed. Technomic. Pennsylvania, U.S.A.
- Massanes S. J. A. (2005). Memoria del sistema de tratamiento de efluentes líquidos plantel El Peñon. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: [http://seia.sea.gob.cl/archivos/7dc_ANEXO A Memoria de tratamiento porcino EL PENON.doc](http://seia.sea.gob.cl/archivos/7dc_ANEXO_A_Memoria_de_tratamiento_porcino_EL_PENON.doc)
- Massé D., Lu D., Masse L. y Droste R. (2000). Effect of antibiotics on psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*. 75: 205-211.
- McFarland J., Berger C., Froshauer S., Hayashi S., Hecker S., Jaynes B., Jefson M., Kamicker B., Lipinski C., Lundy K., Reese C. y Vu C. (1997). Quantitative structure-activity relationships among macrolide antibacterial agents: in vitro and in vivo potency against *Pasteurella multocida*. *Journal of Medicinal Chemistry*. 40 (9): 1340-1346.
- McGeer A. (1998). Agricultural antibiotics and resistance in human pathogens: Villain or scapegoat? *Canadian Medical Association Journal*. 159 (9): 1119-1120.
- McHugh S., Carton M., Collins G. y O'Flaherty V. (2004). Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewaters at 16-37°C. *FEMS Microbiology Ecology*. 48: 369-378.
- Meers E., Rosseau D. P. L., Lesage E. Demeersseman E. y Tack F. (2006). Physico-chemical P removal from the liquid fraction of pig manure as an intermediary step in manure processing. *Water, Air, and Soil Pollution*. 169: 317-330.
- Mejía R. L. (2008). Validación de la técnica para la cuantificación de tilosina en un producto sólido. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Metcalf y Eddy. (2003). *Wastewater Engineering. Treatment and reuse*. Fourth edition. Ed. McGraw Hill. New York, U.S.A.
- Miao X., Bishay F., Chen M y Metcalfe C. (2004). Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environmental Science and Technology*. 38 (13): 3533-3541.
- Migliore L., Brambilla G., Casoria P., Civitareale C., Cozzolino S. y Gaudio L. (1996). Effect of sulphadimethoxine on barley (*Hordeum distichum* L., Poaceae, Liliopsida) in laboratory terrestrial models. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 60: 121-128.
- Migliore L., Brambilla G., Cozzolino S. y Gaudio L. (1995). Effects on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*). *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 52: 103-110.
- Mitchell S., Ullman J., Teel A., Watts R. y Frear C. (2013). The effects of the antibiotics ampicillin, florfenicol, sulfamethazine and tylosin on biogas production and their degradation efficiency during anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 149: 244-252.
- Moreno A. I. y Buitrón M. G. (2002). Influencia del origen del inóculo en la prueba de biodegradabilidad anaerobia. XIII Congreso Nacional de la Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. Memorias del Congreso.
- Morris G. R. (1976). Anaerobic fermentation of animal wastes: A kinetic and empirical design evaluation. Tesis de Maestría. Cornell University. U.S.A.
- Naddeo V., Meriç S., Kassinos D., Belgiorno V. y Guida M. (2009). Fate of pharmaceuticals in contaminated urban wastewater effluent under ultrasonic irradiation. *Water Research*. 43: 4019-4027.
- Navarrete P. J. (2012). Panorama Agroalimentario. Carne de Porcino, 2012. Dirección de Investigación económica y Sectorial. México.
- Nava-Urrego L. M., Gasperín-Sánchez R. y Durán_Moreno A. (2014). Comparación de un reactor de biomasa suspendida adherida para la biodegradación de compuestos tóxicos presentes en aguas residuales de refinerías de petróleo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 30: 101-112.
- NOAH. National Office of Animal Health. (2013). Compendium of Data Sheets for animal medicines. Consulta a redes Internacionales. Dirección electrónica: [http://www.noahcompendium.co.uk/Compendium-datasheets by AI/Active Ingredients/-24895.html](http://www.noahcompendium.co.uk/Compendium-datasheets_by_AI/Active_Ingredients/-24895.html)
- O'Neil M, Smith A. y Heckelman P. (2001). *The Merck Index*. 13th edition. Merck. Whitehouse Station. New Jersey, U.S.A.
- Ortiz M. R. (2013). Bases fisiológicas para el uso de antibióticos promotores de crecimiento y preventivo en enfermedades bacterianas intestinales. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <http://www.webveterinaria.com/virbac/news22/cerdos.pdf>

- Paesen J., Cypers W., Pauwels E., Roets J. y Hoogmartens J. (1995). Study of the stability of tylosin A in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 13: 1153-1159.
- Pei R., Cha J., Carlson K. y Pruden A. (2007). Response of antibiotic resistance genes (ARG) to biological treatment in dairy lagoon water. *Environmental Science and Technology*. 41: 5108-5113.
- Phillips I., Casewell M., Cox T., De Groot B., Friis C., Jones R., Nightingale C., Preston R. y Waddell J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 28-52.
- Poels J., Van Assche P. y Verstraete W. (1984). Effects of disinfectants and antibiotics on the anaerobic digestion of piggery waste. *Agricultural Wastes*. 9: 239-247.
- Prado N., Ochoa J. y Amrane A. (2009). Biodegradation and biosorption of tetracycline and tylosin antibiotics in activated sludge system. *Process Biochemistry*. 44:1302-1306.
- Prats C., Francesch R., Arboix M. y Pérez B. (2001). Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 766: 57-65.
- Procházka J., Máca J., Dolejs P., Jenicek P. y Dohányos M. (2012). Impact of ammonia nitrogen in overloaded anaerobic digestion. 12th World Congress on Anaerobic Digestion. *Memorias del Congreso*.
- Qiang Z. y Adams C. (2004). Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Research*. 38: 2874-2890.
- Ra C. S., Lo K. V., Shin J. S., Oh J. S. y Hong B. J. (2000). Biological nutrient removal with an internal organic carbon source in piggery wastewater treatment. *Water Research*. 34 (3): 965-973.
- Rabølle M. y Spliid N. (2000). Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere*. 40: 715-722.
- Rajagopal R., Rousseau P., Bernet N. y Béline F. (2010). Combined anaerobic and activated sludge anoxic/oxic treatment for piggery wastewater. 12th World Congress on Anaerobic Digestion. *Memories*. IWA-4934.
- Rajić A., McFall M., Deckert A., Reid-Smith R., Manninen K., Poppe C., Dewey C. y McEwen S. (2004). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from finishing swine and the environment of 60 Alberta swine farms. *Veterinary Microbiology*. 104: 189-196.
- Richter D., Dünbier U. Massmann G. y Pekdeger A. (2007). Quantitative determination of three sulfonamides in environmental water samples using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1157 (1-2): 115-121.
- Rivera H. A. (2011). Instrumentos de la política ambiental de importancia para la porcicultura Mexicana: Factibilidad y alternativas relevantes para su cumplimiento en el marco de las estrategias en material de cambio climático. Ensayo para obtener la especialidad en economía ambiental y ecológica. Universidad Nacional Autónoma de México. 61.
- Rizzo L., Meric S., Guida M., Kassinos D. y Belgiorno V. (2009). Heterogeneous photocatalytic degradation kinetics and detoxification of an urban wastewater treatment plant effluent contaminated with pharmaceuticals. *Water Research*. 43: 4070-4078.
- Rizzotti L., Simeoni D., Cocconcelli P., Gazzola S., Dellaglio F. y Torriani S. (2005). Contribution of enterococci to the spread of antibiotic resistance in the production chain of swine meat commodities. *Journal of Food Protection*. 68: 955-965.
- Rodriguez A. y Lomas J. (2002). Transition of particle size fractions in anaerobic digestion of the solid fraction of piggery manure. *Biomass and Bioenergy*. 23: 229-235.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2004). Manual de buenas prácticas de producción en granjas porcícolas. México. 87.
- Santos L. H., Araujo A. N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C. y Montenegro M. C. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*. 175: 45-95.
- Sanz J.L., Rodríguez N. y Amils R. (1996). The action of antibiotics on the anaerobic digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 46 (5-6):587-592.
- Sapkota A., Ojo K., Roberts M. y Schwab K. (2006). Antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Enterococcus* spp. and *Streptococcus* spp. Recovered from the indoor air of a large-scale swine-feeding operations. *Letters in Applied Microbiology*. 43: 534-540.
- Sarmah A. K., Meyer M. T. y Boxall A. B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*. 65: 725-759.

- Schlusener M.P., Bester K. y Spitteller M. (2003). Determination of antibiotics such as macrolide, ionophores and tiamulin in liquid manure by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 375: 942-947.
- Schwartz T., Kohnen W., Jansen B. y Obst U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS microbiology Ecology*. 43: 325-335.
- Sengelov G., Agero Y., Halling-Sorensen B., Baloda S., Andersen J. y Jensen L. (2003). Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International*. 28: 587-595.
- Seo Y., Choi J., Kim S., Min H. y Jung Y. (2007). Prioritizing environmental risks of veterinary antibiotics based on the use and the potential to reach environment. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*. 40 (1): 43-50.
- Shimada T., Zilles J., Morgenroth E. y Raskin L. (2008). Inhibitory effects of the macrolide antimicrobial tylosin on anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*. 101 (1): 73- 82.
- Simeoni D., Rizzotti L., Cocconcelli P., Gazzola S., Dellaglio F. y Torriani S. (2008). Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. *Food Microbiology*. 25: 196-201.
- Smalla K., Heuer H., Götz A., Niemeyer D., Krögerrecklenfort E. y Tietze E. (2000). Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of InQ-like plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4854-4862.
- Souto T., Aquino S., Silva S. y Chernicharo C. (2010). Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. *Biodegradation*. 21: 411-424.
- Stone J., Clay S., Zhu Z., Wong K., Porath L. y Spellman G. (2009). Effect of antimicrobial compounds tylosin and chlortetracycline during batch anaerobic swine manure digestion. *Water Research*. 43 (18): 4740-4750.
- Stratigopoulos G., Bate N. y Cundliffe E. (2004). Positive control of tylosin biosynthesis: pivotal role of TyIR. *Molecular Microbiology*. 54 (5): 1326-1334.
- Stukenberg J., Clark J., Sandino J. y Naydo W. (1992). Egg-Shaped digesters: from Germany to the U. S. *Water Environment and Technology*. 4 (4): 42-51.
- Sumano H. y Ocampo L. (1997). *Farmacología Veterinaria*. 2a. Edición. Ed. McGraw Hill Interamericana. México.
- Sumino H., Takahashi M., Yamaguchi T., Abe K., Araki N., Yamazaki S., Shimozaki S., Nagano A. y Nishio N. (2007). Feasibility study of a pilot-scale sewage treatment system combining an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) and an aerated fixed bed (AFB) reactor at ambient temperature. *Bioresource and Technology*. 98: 177-182.
- Tagiri-Endo M., Suzuki S., Nakamura T., Hatakeyama T. y Kawamukai K. (2009). Rapid determination of five antibiotic residues in swine wastewater by online solid-phase extraction- high performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 393: 1367-1375.
- Taiganides E. P. (1992). *Pig Waste Management and recycling. The Singapore experience*. Ed. International Development Research Centre. Canadá. 386.
- Thiele S. (2000). Adsorption of the antibiotic pharmaceutical compound sulfapyridine by a long-term differently fertilized loess Chernozem. *Journal of Plant Nutrition and soil science*. 163: 589-594.
- Thiele-Bruhn S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils- a review. *Journal of Plant Nutrition and soil science*. 166: 145-167.
- Thompson T., Noot D., Calvert J. y Pernal S. (2003). Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1020: 241-250.
- Thompson T., Pernal S., Noot D., Melathopoulos A. y Van den Heever J. (2007). Degradation of incurred tylosin to desmycosin- Implications for residue analysis of honey. *Analytica Chimica Acta*. 586: 304-311.
- Tong L., Li P. Wang Y. y Zhu K. (2009). Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere*. 74: 1090-1097.
- USDA, United States Department of Agriculture (2002). *Preventive Practices in Swine: Administration of Iron and Antibiotics*. U.S. Department of Agriculture: Fort Collins, Colorado.
- USDA, United States Department of Agriculture. (2009). *FDA Approved animal drug products*. Blacksburg, VA: Drug information Laboratory, Virginia/ Maryland Regional College of veterinary Medicine. Consulta

- a redes internacionales. Dirección electrónica:
http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cei/taf/emerginganimalhealthissues_files/antiresist.antibiose.pdf
- Vazquez B. E. (2002). Evaluación de un reactor anaerobio para el tratamiento de aguas residuales de granjas porcícolas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 172.
- Viñas A. M., Alvarez N. R. y García D. R. (1996). Tecnología para el tratamiento y aprovechamiento de residuales porcinos. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental;. Memorias del Congreso. México. 707-714.
- Watkinson A., Murby E., Kolpin D. y Costanzo S. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater t drinking water. *Science of the Total Environment*. 407: 2711-2723.
- Westergaard K., Müller A., Christensen S., Bloem J. y Sørensen S. (2001). Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 2061-2071.
- Wollenberger L., Halling-Sørensen B. y Kusk K. (2000). Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphia Magna*. *Chemosphere*. 40: 723-730.
- Yang S. y Carlson K. (2003). Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Research*. 37: 4645-4656.
- Ye Z. y Weinberg H. (2007). Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 79: 1135-1144.
- Yu L., Wensel P. C., Ma J. y Chen S. (2013). Mathematical modeling in anaerobic digestión (AD). *Bioremediation and Biodegradation*. Doi:10.4172/2155-6199.S4-003
- Zhang Y., Marrs C., Simon C. y Xi C. (2009). Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Science of the Total Environment*. 407: 3702-3706.
- Zilles J., Shimada T., Jindal A., Robert M. y Raskin L. (2005). Presence of macrolide-lincosamide-streptogramin B and tetracycline antimicrobials in swine waste treatment processes and amended soil. *Water Environment Research*. 77 (1): 57-62.
- Zuccato E., Castiglioni S. y Fanelli R. (2005). Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*. 122 (3): 205-209.
- Zweers-Zeilmaker W. M., Van Miert A. S., Horbach G. J. y Witkamp R. F. (1999). In vitro complex formation and inhibition of hepatic cytochrome P450 activity by different macrólidos and tiamulin in goats and cattle. *Research in Veterinary Science*. 66 (1):51-55.

ANEXO I IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TILOSINA

I.1 Identificación de la tilosina mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento

Como primera etapa de la estrategia de detección del compuesto seleccionado para este estudio se probaron las condiciones del cromatógrafo de líquidos reportadas en la literatura (Hu *et al.*, 2008). En la Tabla I.1 se muestran las condiciones de operación del cromatógrafo para la detección de los compuestos en altas concentraciones.

Tabla I.1 Condiciones iniciales del cromatógrafo

Condición	Valor
Temperatura del horno	25°C
Flujo de fase móvil	1.0 mL min ⁻¹
pH de fase móvil	6.0
Inyección	20 µL
Longitud de onda	290 nm
Tiempo de corrida	26 min

Se preparó una solución de tilosina la cual fue disuelta en metanol a una concentración de 5,000 µg mL⁻¹. Se puede observar en la Figura I.1 que no se encontró el pico de tilosina A, puesto que se esperaba en el minuto 26. Debido a la ausencia de respuesta (pico de tilosina) del cromatógrafo bajo estas condiciones, se optó por realizar las pruebas de estrategia de detección del antibiótico variando el pH de la muestra. Los picos detectados en la Figura, corresponden al frente de solvente y a los solventes utilizados, más no a la tilosina.

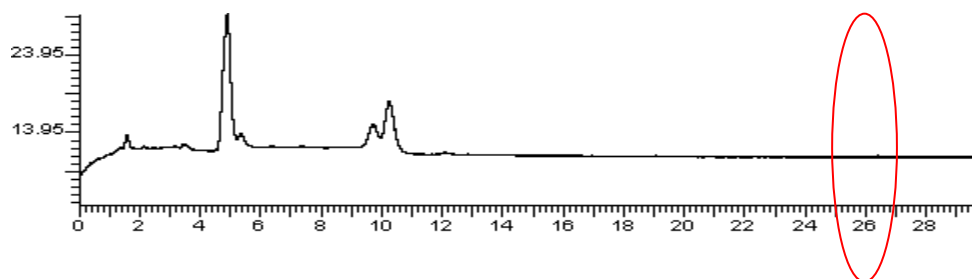


Figura I.1 Cromatograma de la tilosina con condiciones iniciales

Se realizaron pruebas de detección de tilosina a diferentes pH entre 6 y 8 con incrementos progresivos de 0.1, el cromatograma resultante se muestra en la Figura I.2.

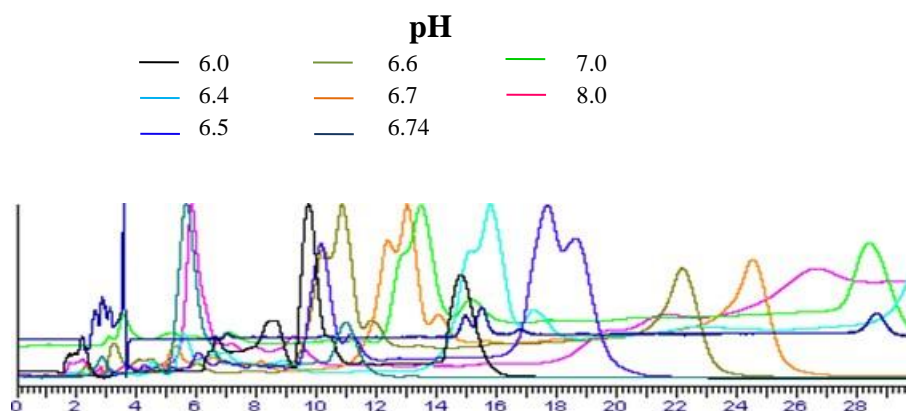


Figura I.2 Cromatograma de la tilosina a diferentes pH

Una vez encontrado el pH en el que se detectó el pico de tilosina a aproximadamente 28 min (cerca al mencionado por Hu *et al.*, 2008) se decidió variar la temperatura del horno del cromatógrafo desde 25°C hasta 40°C (Figura I.3) con incrementos progresivos de 1°C.

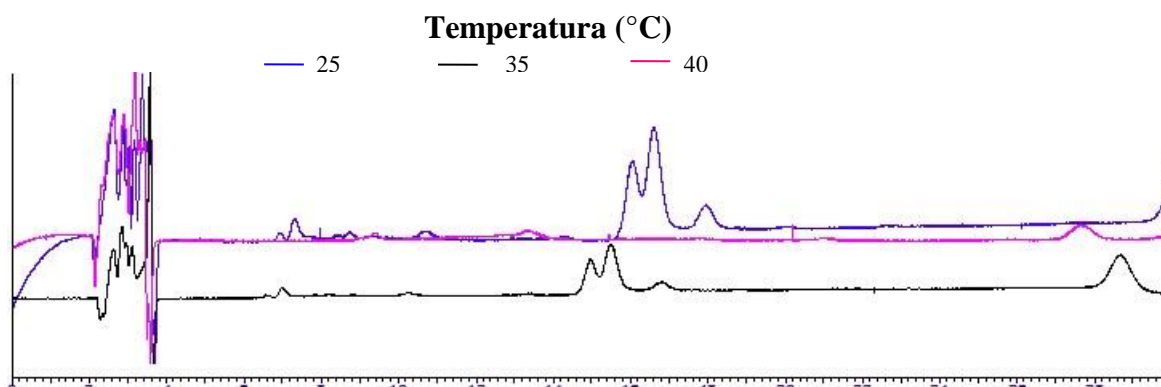


Figura I.3 Cromatograma de la tilosina a diferentes temperaturas

Seleccionada la temperatura adecuada, en la que se obtiene el pico de tilosina más definido, se realizaron pruebas para la longitud de onda pues reportan desde 280 hasta 290 nm en la literatura, por lo que se realizaron corridas de tilosina con incrementos de longitud de onda progresivos de 1 nm. El cromatograma de la tilosina a diferentes longitudes de onda de muestra en la Figura I.4. Se observa que conforme se fueron modificando las condiciones del cromatógrafo la resolución de los cromatogramas se incrementa.

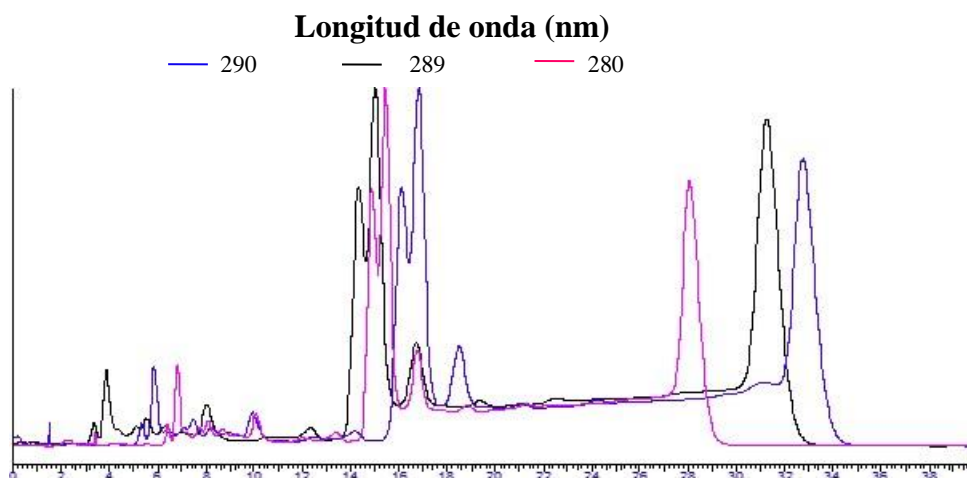


Figura I.4 Cromatograma de la tilosina a diferentes longitudes de onda

El tiempo de la corrida también fue cambiando de acuerdo a los resultados de las pruebas. Para confirmar que el pico obtenido en las pruebas fuera la tilosina A se utilizó un equipo de refracción para detectar el antibiótico a diferentes concentraciones (20 y $40 \mu\text{g mL}^{-1}$), los resultados se muestran en la Figura I.5.

Se puede observar que la longitud de onda adecuada a la que se encontró respuesta medida como pico de tilosina fue a 290 nm en ambas concentraciones, lo que significa que el cromatograma obtenido en el HPLC es correcto.

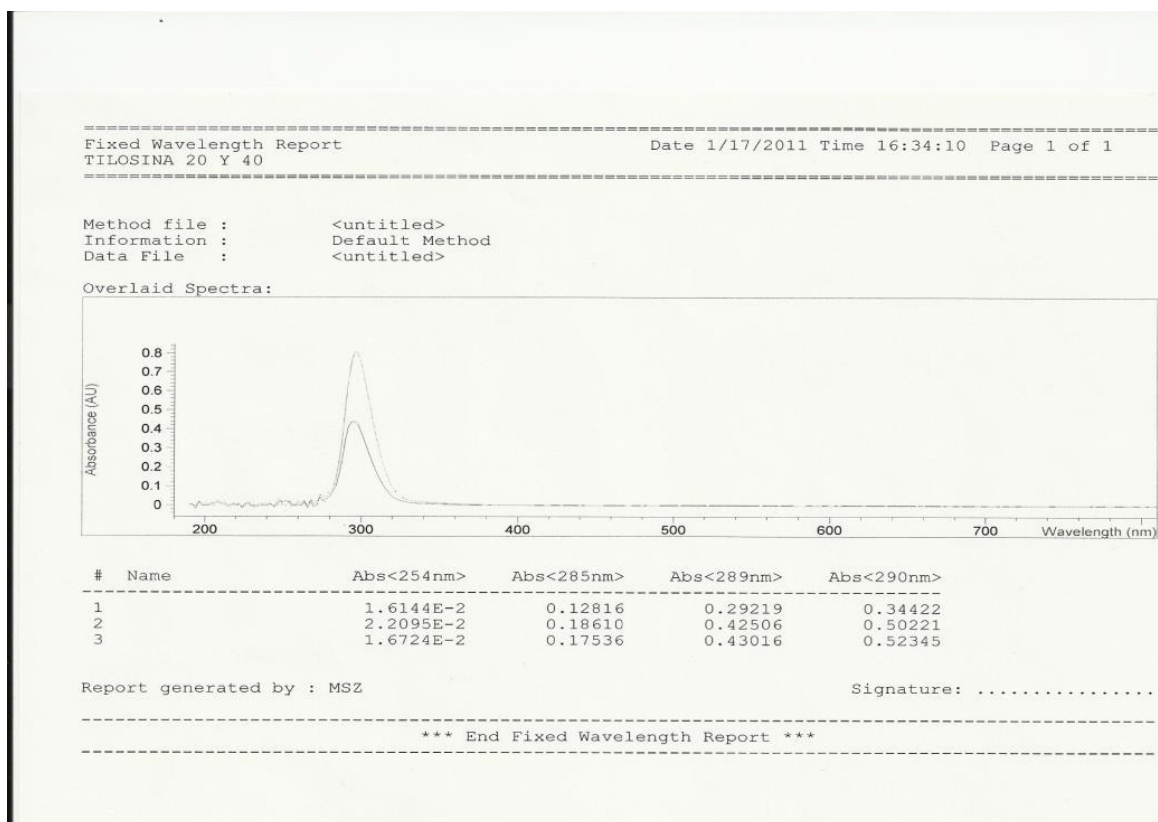


Figura I.5 Resultados del refractómetro a diferentes longitudes de onda

Una vez terminadas las pruebas y encontrando en cada paso (pH, temperatura, longitud de onda) las mejores condiciones en las que se encontraba el pico de tilosina más visible y delgado se determinó que los parámetros de operación óptimos para el cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento fueron los que se muestran en la Tabla I.2.

Tabla I.2 Condiciones óptimas del HPLC

Condición	Valor
Temperatura del horno	25°C
Flujo de fase móvil	1.0 mL min ⁻¹
pH de fase móvil	6.74
Inyección	20 µL
Longitud de onda	290 nm
Tiempo de corrida	40 min

Con los experimentos realizados se comprobó que el tiempo de retención de la tilosina A no fue 26 min como el encontrado por Hu *et al.*, (2008), sino 33.13 min con las condiciones óptimas determinadas.

I.2 Curva de calibración

Con las condiciones de operación óptimas se trazó la curva de calibración para la tilosina, la cual se muestra en la Figura I.6.

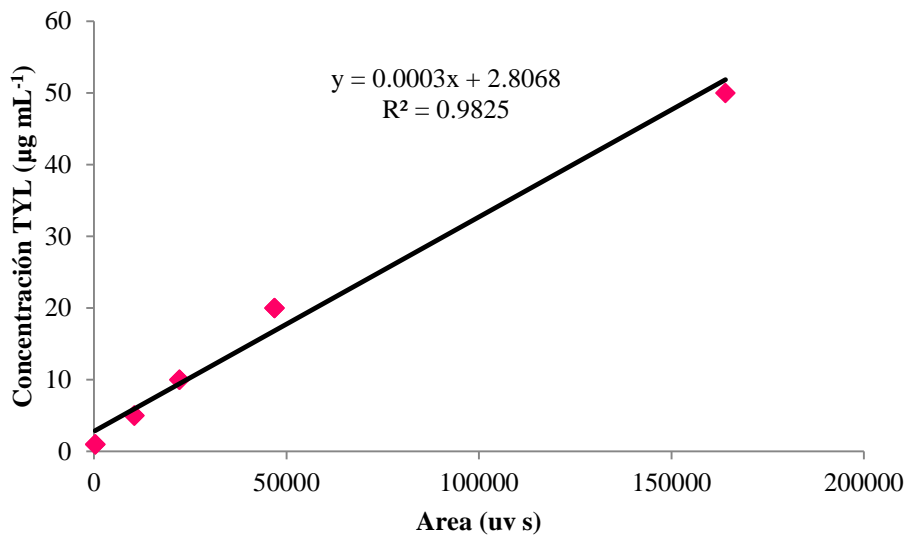


Figura I.6 Curva de calibración de la tilosina obtenida con el HPLC

I.3 Límite de detección

Los resultados de los blancos analizados en la prueba del límite de detección se muestran en la Tabla I.3.

Tabla I.3 Concentración de blancos para cálculo de LD

Área (uV s)	Concentración (µg mL ⁻¹)
6.47	2.808741
17.29	2.811987
25.1	2.81433
18.14	2.812242
26.13	2.814639
7.78	2.809134
Promedio	2.8118455
σ	0.002495747

Por lo tanto el límite de detección LD es 2.817718 µg mL⁻¹.

I.4 Límite de cuantificación

Los resultados obtenidos de concentración de tilosina en las muestras sintéticas se presentan en la Tabla I.4.

Tabla I.4 Concentración de muestras sintéticas para cálculo de LC

Área (uV s)	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
290.69	2.894007
284.2	2.89206
314.96	2.901288
326	2.9046
Promedio	2.89798875
σ	0.005932905

Por lo tanto el límite de cuantificación LC es $2.87117455 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Como se puede observar de los resultados anteriores, a pesar de que la curva de calibración de la tilosina se realizó a partir de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, los valores de detección y de cuantificación son mayores, por lo que a menores concentraciones que las de los límites los valores encontrados no son confiables estadísticamente.

I.5 Precisión del método

Los resultados de las muestras analizadas se presentan en la Tabla I.5.

Tabla I.5 Concentración de muestras para cálculo de CV

Concentración cuantificada($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentración teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%R
3.5642	2.817718	126.49243
2.5479	2.817718	90.424237
3.0124	2.817718	106.90921
Promedio	2.8118455	107.94196
σ	5.43896E-16	18.056262

Por lo tanto el coeficiente de variación CV es 16.7, superior al mencionado por las teorías de Kolthoff y Sandel (1966) y Hortwitz (1982), quienes mencionan que el valor mínimo del CV es 2%, mientras que el máximo es 16%. A pesar de ello, el coeficiente de variación obtenido indica que las concentraciones obtenidas fueron homogéneas (menores al 20%).

I.6 Exactitud del método

La exactitud del método se calculó a partir de los resultados anteriores y se obtuvo un valor de 107.9%, lo que indica que la concentración obtenida (valor analítico) es ligeramente mayor a la concentración real (valor verdadero, 100%) de las muestras analizadas.

I.7 Linealidad del método

I.7.1 Muestra sintética

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura I.7. Se observa que los porcentajes de recuperación de la tilosina varían entre 87 y 102%, teniendo el valor más bajo de recuperación a una concentración de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se obtuvo para las muestras sintéticas un porcentaje de recuperación de la tilosina del 97%, lo que indica que la pérdida de tilosina a través de los filtros utilizados para la limpieza de la muestra, es mínima (del 3%).

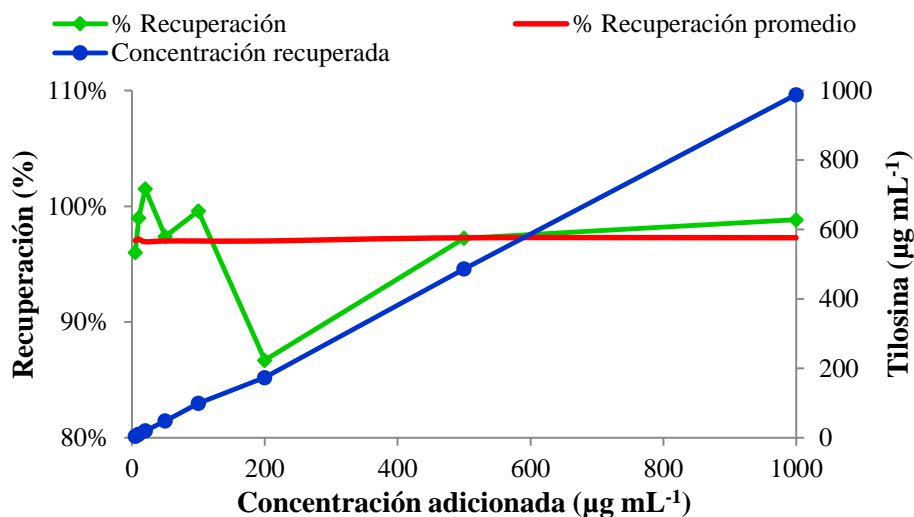


Figura I.7 Porcentajes de recuperación obtenidos en muestras sintéticas para la determinación de tilosina

I.7.2 Muestra real líquida enriquecida

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura I.8. Se observa en la gráfica que a la concentración más baja de tilosina adicionada ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) no se obtiene su recuperación, probablemente debido a que el antibiótico se adsorbió en la fase sólida (parte o su totalidad) por lo que el cromatógrafo no pudo contabilizar la concentración remanente en la fase líquida. En general, se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio de tilosina del 68%, esto probablemente es resultado de las propiedades fisicoquímicas del antibiótico que indican una fuerte adsorción en la fase sólida, por lo tanto la recuperación obtenida es baja.

Lo anterior indica que para poder contabilizar de forma adecuada la tilosina y obtener altos porcentajes de recuperación es indispensable analizar la fase sólida y líquida de una misma muestra.

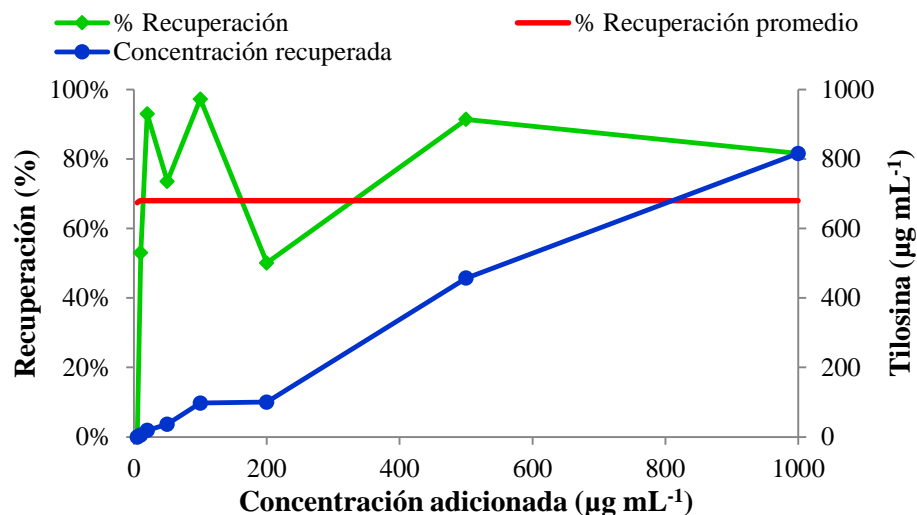


Figura I.8 Porcentajes de recuperación obtenidos en muestras reales en fase líquida para la determinación de tilosina

1.7.3 Muestra real enriquecida (fase sólida y líquida)

Se contabilizó la recuperación de la tilosina en una muestra de agua residual porcina real enriquecida con el antibiótico tanto en fase líquida como sólida, los resultados se muestran en la Figura I.9. Los porcentajes promedio de recuperación obtenidos en la fase sólida y líquida fueron 49 y 46% respectivamente, alcanzando en conjunto un porcentaje de recuperación del 95%, lo que indica una pérdida del 5% del antibiótico en cuanto a su determinación en agua residual porcina real. Los resultados anteriores indican que para obtener una adecuada cuantificación del antibiótico es necesario analizar tanto la fase sólida como la líquida, puesto que parte de la tilosina es absorbida en la biomasa.

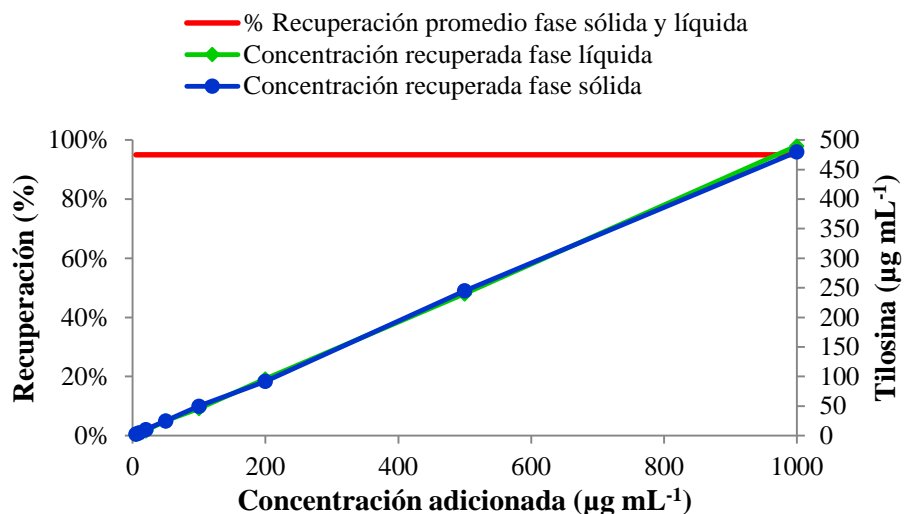


Figura I.9 Porcentajes de recuperación obtenidos en muestras reales en fase sólida y líquida para la determinación de tilosina

I.8 Límite de confianza

El límite de confianza obtenido a partir de los resultados de los gráficos de las recuperaciones se muestra en la Tabla I.6.

Tabla I.6 Cálculo del límite de confianza

Muestra	R	n	S	LCON (µg mL ⁻¹)
Muestra sintética	97	8	345.76	81.36
Muestra real líquida enriquecida	68	8	293.53	68.92
Muestra real enriquecida (fase sólida y líquida)	95	8	339.95	79.99

Con los resultados anteriores se obtuvo un límite de confianza promedio LC de 79.99 µg mL⁻¹ (0.0799 mg mL⁻¹) para la detección de tilosina en un agua residual porcina analizando tanto su fase sólida como líquida siguiendo la metodología de limpieza de la muestra señalada en los apartados 4.6.5.1 y 4.6.5.2. Esto significa que para valores superiores a 79.99 µg L⁻¹ de tilosina en un agua residual porcina, los resultados no son confiables.

ANEXO II MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE METANO

II.1 Identificación de metano mediante cromatografía de gases

Se probaron las condiciones proporcionadas por el cromatograma del fabricante, las cuales se muestran en la Tabla II.1 para la detección del metano.

Tabla II.1 Condiciones iniciales del cromatógrafo de gases

Parámetro	Valor
Tiempo de corrida (min)	37
Flujo del gas acarreador (mL. min ⁻¹)	20
Pico metano (min)	4.5
Rampa de temperatura	Inicial: 40°C mantener por 3 min Incrementar 20°C por min hasta 220°C Final: Mantener 220°C por 25 min.

Bajo las condiciones anteriores, se inyectaron muestras de biogás proveniente del digestor escala piloto para verificar los picos correspondientes a los diferentes compuestos presentes en el mismo. Se observa en la Figura II.1 que el metano tarda aproximadamente 37 min en detectarse completamente, por lo que se optó por variar el flujo del gas acarreador.

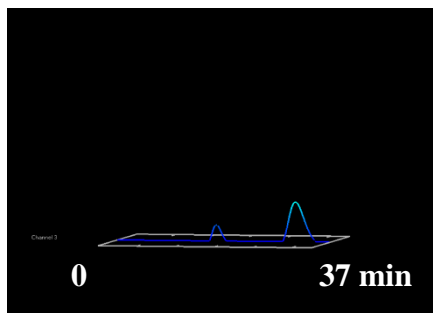


Figura II.1 Cromatograma del biogás en condiciones iniciales de la columna

Se realizaron diferentes pruebas con la finalidad de disminuir el tiempo de corrida de la muestra, variando el flujo del gas acarreador entre 8 y 20 mL min⁻¹ y la temperatura entre 30 y 240°C, el cromatograma resultante se muestra en la Figura II.2.

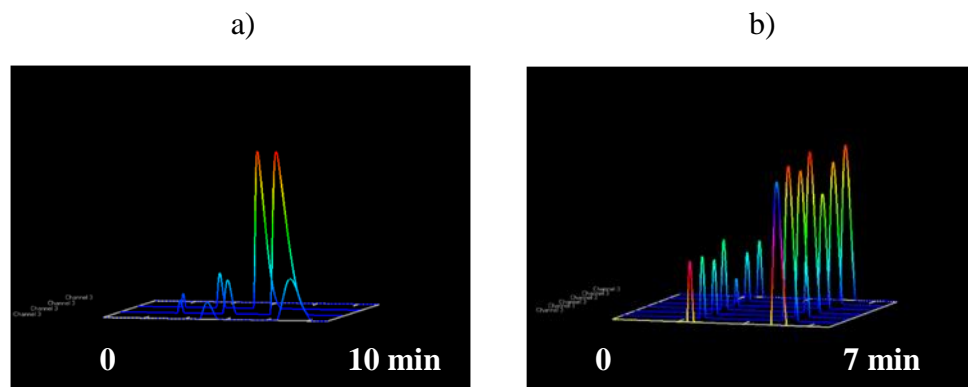


Figura II.2 Cromatograma del biogás: a) con diferentes flujos de gas acarreador y b) con diferentes rampas de temperatura

Una vez seleccionada la rampa de temperatura y el flujo del gas acarreador se continuaron las pruebas con la identificación de los picos, para ello se corrieron estándares de nitrógeno, dióxido de carbono, hidrógeno, aire y metano. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura II.3.

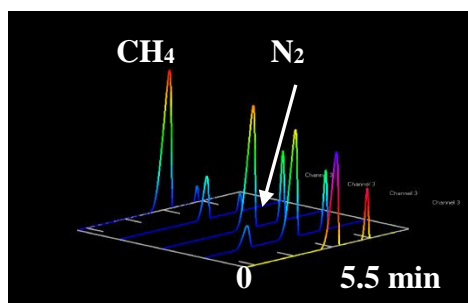


Figura II.3 Cromatogramas de identificación de picos

Una vez terminadas las pruebas se encontró que los parámetros de operación óptimos para el cromatógrafo de gases fueron las mostradas en la Tabla II.2.

Tabla II.2 Condiciones óptimas del cromatógrafo de gases

Parámetro	Valor
Tiempo de corrida (min)	5.5
Flujo del gas acarreador (mL min^{-1})	20
Pico metano (min)	3.8
Rampa de temperatura	Inicial: 50°C mantener por 2 min Incrementar $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta 120°C

Se observa en la Tabla que comparando las condiciones iniciales a las óptimas se pudo disminuir el tiempo de análisis a solo 5.5 min, lo cual se traduce en menor gasto de gas acarreador.

II.2 Curva de calibración del metano

Con las condiciones óptimas encontradas, se realizó una curva de calibración del metano desde 0.1 hasta 0.5 mL versus L CH₄. La curva de calibración obtenida se presenta en la Figura II.4.

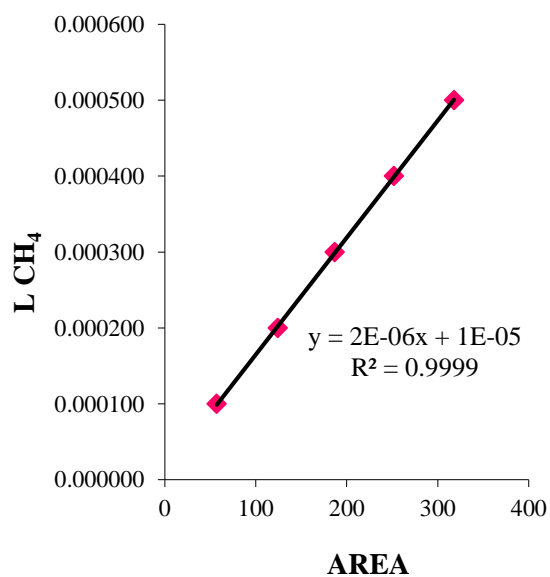


Figura II.4 Curva de calibración del metano

ANEXO III ANÁLISIS ESTADÍSTICO

III.1 Arranque y operación de un digestor anaerobio a escala piloto

Para todos los casos: H_0 = el efecto del tratamiento es el mismo. Si $P > 0.05$ H_0 se acepta.

Tabla III.1 Resumen de los resultados de ANOVA para el digestor anaerobio escala piloto

Parámetro	Tratamiento evaluado	P calculada	Resultado
DQOt	TRH (30, 40 y 60 d)	0.186	Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo
DQOt	TRH (30, 40 y 60 d)	0.103	Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo
SST	TRH (30, 40 y 60 d)	0.112	Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo
SSV	TRH (30, 40 y 60 d)	0.131	Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo
ST	TRH (30 y 60 d)	0.563	Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo
STV	TRH (30 y 60 d)	0.345	Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo

III.2 Aclimatación de biomasa a la tilosina

Para todos los casos: H_0 = el efecto del tratamiento es el mismo. Si $P > 0.05$ H_0 se acepta.

Tabla III.2 Resumen de los resultados de ANOVA para los reactores anaerobios en la etapa de aclimatación de biomasa a la tilosina

Parámetro	Tratamiento evaluado	P calculada	Resultado
DQOt	TRH	0.488	Etapa 1: Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo (R1=R2=R3=R4)
		0.917	Etapa 2: Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo (R1=R2=R3=R4)
		0.027	Etapa 3: Ho se rechaza, el efecto del TRH es diferente (R1=R2=R3; R1=R4)
		0.001	Etapa 4: Ho se rechaza, el efecto del TRH es diferente (R1=R2=R3)
	[TYL]	0.023	R1: Ho se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E1=E3; E1=E2=E4)
		0.02	R2: Ho se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E1=E3; E2=E3)
		0.097	R3: Ho se acepta, el efecto de la tilosina es el mismo (E1=E2=E3; E2=E3=E4)
		0.042	R4: Ho se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E2=E4; E1=E3=E4)
DQOs	TRH	0.086	Etapa 1: Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo (R1=R2=R3=R4)
		0.525	Etapa 2: Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo (R1=R2=R3=R4)
		0.168	Etapa 3: Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo (R1=R2=R3; R1=R2=R4)
		0.006	Etapa 4: Ho se rechaza, el efecto del TRH es diferente (R1=R2=R3)
	[TYL]	0.000	R1: Ho se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E2=E3; E3=E4)
		0.000	R2: Ho se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E3=E4)
		0.000	R3: Ho se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E3=E4)
		0.000	R4: Ho se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E2=E3; E3=E4)
ST	TRH	0.441	Etapa 1: Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo (R1=R2=R3=R4)
		0.500	Etapa 2: Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo (R1=R2=R3=R4)
		0.601	Etapa 3: Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo (R1=R2=R3=R4)
		0.251	Etapa 4: Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo (R1=R2=R3=R4)

III.3 Digestores anaerobios con presencia de tilosina

Para todos los casos: H_0 = el efecto del tratamiento es el mismo. Si $P > 0.05$ H_0 se acepta.

Tabla III.3 Resumen de los resultados de ANOVA para los digestores anaerobios con presencia de tilosina

Parámetro	Tratamiento evaluado	P calculada	Resultado
DQOt	TRH	0.002	Etapa E: H_0 se rechaza, el efecto del TRH es diferente (D1=D2)
		0.005	Etapa E1: H_0 se rechaza, el efecto del TRH es diferente (D2=D3)
		0.000	Etapa E2: H_0 se rechaza, el efecto del TRH es diferente (D1=D3)
		0.236	Etapa E3: H_0 se acepta, el efecto del TRH es el mismo
	[TYL]	0.000	D1: H_0 se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E=E2)
		0.000	D2: H_0 se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente
		0.000	D3: H_0 se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E1=E2)
DQOs	TRH	0.318	Etapa E: H_0 se acepta, el efecto del TRH es el mismo (D1=D2=D3)
		0.369	Etapa E1: H_0 se acepta, el efecto del TRH es el mismo (D1=D2=D3)
		0.000	Etapa E2: H_0 se rechaza, el efecto del TRH es diferente
		0.517	Etapa E3: H_0 se acepta, el efecto del TRH es el mismo
	[TYL]	0.000	D1: H_0 se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E=E2)
		0.000	D2: H_0 se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E1=E2)
		0.000	D3: H_0 se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E=E1=E2)
ST	TRH	0.000	Etapa E: H_0 se rechaza, el efecto del TRH es diferente
		0.000	Etapa E1: H_0 se rechaza, el efecto del TRH es diferente
		0.253	Etapa E2: H_0 se acepta, el efecto del TRH es el mismo
		0.527	Etapa E3: H_0 se acepta, el efecto del TRH es el mismo
	[TYL]	0.000	D1: H_0 se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E=E1=E2)
		0.000	D2: H_0 se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E1=E2)
		0.000	D3: H_0 se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente

Continuación			
Parámetro	Tratamiento evaluado	P calculada	Resultado
STV	TRH	0.006	Etapa E: Ho se rechaza, el efecto del TRH es diferente (D1=D2)
		0.240	Etapa E1: Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo
		0.230	Etapa E2: Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo
		0.201	Etapa E3: Ho se acepta, el efecto del TRH es el mismo
	[TYL]	0.000	D1: Ho se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E=E1=E2)
		0.342	D2: Ho se acepta, el efecto de la tilosina es el mismo
		0.000	D3: Ho se rechaza, el efecto de la tilosina es diferente (E=E1; E1=E2)