



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO
TECNOLOGICO EN ELECTROQUIMICA**

T E S I S

**“Remoción de amoxicilina y triclosán utilizando poblaciones
microbianas aisladas de lodos activados de una planta de
tratamiento de aguas residuales”**

P R E S E N T A

I.A. Roberto Hernández Posadas

A S E S O R

Dra. María Yolanda Reyes Vidal

Posgrado Interinstitucional de Ciencia y Tecnología
Especializada en:
Ingeniería Ambiental

ÍNDICE

1.- RESUMEN	11
2. INTRODUCCION	13
3.- JUSTIFICACION.....	15
4.- HIPÓTESIS.....	16
5.- OBJETIVO	17
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	17
6.-MARCO TEORICO	18
6.1 CONTAMINANTES EMERGENTES (CE)	18
6.1.1 TIPOS DE CONTAMINANTES EMERGENTES.....	19
6.2 AMOXICILINA	27
6.3 TRICLOSAN	31
6.4 DISTRIBUCIÓN DE LOS CONTAMINANTES EMERGENTES EN EL AMBIENTE.....	37
6.5 PROBLEMÁTICA DE LAS PTARS CONVENCIONALES	39
6.6 TRATAMIENTOS PARA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES	40
6.6.1 TRATAMIENTOS FISICOQUÍMICOS.....	41
6.6.2 PROCESOS AVANZADOS.....	42
6.6.3 TRATAMIENTOS COMBINADOS.....	43
6.6.4 PROCESOS BIOLÓGICOS.....	44
6.7 CONTAMINANTES EMERGENTES Y LOS MICROORGANISMOS.....	45
7.- MARCO METODOLOGICO	49
8.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
9. CONCLUSIÓN.....	80
10. PERSPECTIVAS	81
11.REFERENCIAS.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de amoxicilina.....	27
Figura 2. Estructura química del triclosán.	31
Figura 3 . Cromatogramas obtenidos antes de la optimización de condiciones cromatográficas. Amoxicilina (A) y triclosán (B).	55
Figura 4. Cromatogramas finales, después de la optimización de condiciones cromatográficas. Amoxicilina (A) y triclosán (B).	56
Figura 7. Degradación de amoxicilina (25 mg/l) en dos condiciones de incubación a) 150 rpm y 30°C y b) 0 rpm y 30°C.	57
Figura 8. Controles experimentales. Buffer de fosfatos (pH = 7) suplementado con extracto de levadura al 0.1% y caldo nutritivo al 0.1% con una concentración de 25 mg/L de amoxicilina sin inocular en dos condiciones de 8a) 150 rpm a 30 °C (8a) y 0 rpm a 30°C (8b).	59
Figura 9 Crecimiento de las poblaciones microbianas aisladas de una PTAR en presencia de amoxicilina, con un medio soporte de buffer de fosfatos suplementado con extracto de levadura y caldo nutritivo al 0.1 % en dos condiciones de cultivo, a) 150 rpm a 30°C y b) 0 rpm a 30°C.....	63
Figura 10. Controles experimentales de cinéticas de crecimiento de las poblaciones microbianas aisladas de una PTAR, con un medio soporte de buffer de fosfatos suplementado con extracto de levadura y caldo nutritivo al 0.1 % en dos condiciones de cultivo, a) 150 rpm a 30°C y b) 0 rpm a 30°C sin amoxicilina.	64
Figura 11. Fases de degradación y crecimiento en presencia de amoxicilina (25 mg/L) en condiciones de agitación.	65
Figura 12. Fases de degradación y crecimiento en presencia de amoxicilina (25 mg/L) en condiciones estáticas.	66
Figura 13. Degradación de triclosán (10 mg/L) en dos condiciones de incubación, a) 150 rpm a 30°C y b) 0 rpm a 30°C.	67
Figura 14. Controles experimentales: Buffer de fosfatos pH 7 suplementado con extracto de levadura al 0.1 % y caldo nutritivo al 0.1 % con una concentración de 10 mg/L de triclosán sin inocular en dos condiciones 8a) 150 rpm, 30 °C y 8b) 0 rpm, 30°C.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 15. Experimentos de crecimiento microbiano: Buffer de fosfatos pH 7 suplementado con extracto de levadura al 0.1 % y caldo nutritivo al 0.1 % con una concentración de 10 mg/L e inoculado con poblaciones microbianas aisladas de una PTAR.	71
Figura 16. Controles experimentales de crecimiento microbiano: Buffer de fosfatos pH 7 suplementado con extracto de levadura al 0.1 % y caldo nutritivo al 0.1 % con una concentración de 10 mg/L sin inocular.....	72
Figura 17. Fases de degradación y crecimiento en presencia de triclosán (10 mg/l) en condiciones de agitación.	73
Figura 18. Fases de degradación y crecimiento en presencia de triclosán (10 mg/L) en condiciones estáticas.	74
Figura 19. Resultados obtenidos de la cuantificación de amoxicilina después del lavado celular.	76
Figura 20. Cuantificación de amoxicilina después de la ruptura celular.	77
Figura 21. Cuantificación de triclosán después del lavado celular.	78
Figura 22. Cuantificación de amoxicilina después de la ruptura celular.	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de triclosán.....	33
Tabla 2. Clasificación y uso de diversos contaminantes emergentes (Gil y col., 2012; Luo y col., 2014; Patiño y col., 2014).....	38
Tabla 3. Presencia de contaminantes emergentes en distintas matrices y su rango de detección en PTARs.....	39
Tabla 4. Condiciones experimentales para analizar la biorremediación de los CE.....	52
Tabla 5. Condiciones control para analizar la biorremediación de los CE.....	52
Tabla 6. Comparación de la degradación de amoxicilina en diferentes sistemas biológicos.....	61
Tabla 7. Comparación de la degradación de triclosán en diferentes sistemas biológicos.....	70



CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Dr. Luis Antonio Ortiz Frade
Director de Posgrado
PICYT – CIDETEQ
Querétaro

Los abajo firmantes, miembros del comité tutorial del alumno ROBERTO HERNÁNDEZ POSADAS, una vez leída y revisada la Tesis **“REMOCION DE AMOXICILINA Y TRICLOSÁN UTILIZANDO POBLACIONES MICROBIANAS AISLADAS DE LODOS ACTIVADOS DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUAL”**, aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología con especialidad en INGENIERIA AMBIENTAL durante el Examen de Grado correspondiente.

Y para que así conste, firmó la presente el 29 día del mes de septiembre del año 2022.

Dra. Erika Bustos Bustos

Dr. Francisco Javier Bacame Valenzuela

Dr. Luis Alberto Arellano García



CIENCIA Y TECNOLOGIA


Dr. Luis Antonio Ortiz Frade
Director de Posgrado
PICYT – CIDETEQ
Querétaro

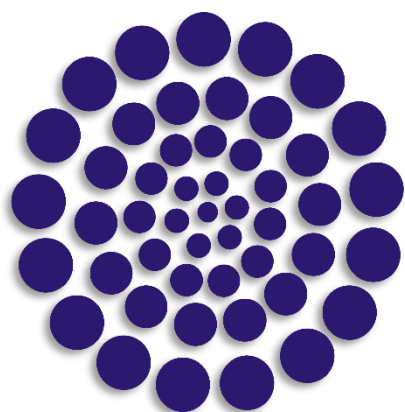
Los abajo firmantes, miembros del Jurado de Examen del alumno ROBERTO HERNÁNDEZ POSADAS, una vez leída y revisada la Tesis **“REMOCIÓN DE AMOXICILINA Y TRICLOSÁN UTILIZANDO POBLACIONES MICROBIANAS AISLADAS DE LODOS ACTIVADOS DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUAL”**, aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología con especialidad en INGENIERIA AMBIENTAL durante el Examen de Grado correspondiente.

Y para que así conste, firmó la presente el 04 día del mes de octubre del año 2022.


Dr. Fabricio Espejel Ayala
Presidente


Dra. Beatriz Lilia España Sánchez
Secretario


Dr. Francisco Javier Bacame Valenzuela
Vocal Suplente



CONACYT



c i d e t e q

Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación
y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica S.C.
(CIDETEQ) bajo la dirección de la Dra. María Yolanda
Reyes Vidal.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto No. 102967 "Estudio de la incidencia, persistencia y actividad antimicrobiana en la degradación de los contaminantes emergentes en sistemas de tratamiento de agua residual doméstica en México", del Fondo Ciencia de Frontera 2019 - CONACYT

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada y por el financiamiento a través del proyecto No. 102967 "Estudio de la incidencia, persistencia y actividad antimicrobiana en la degradación de los contaminantes emergentes en sistemas de tratamiento de agua residual doméstica en México", del Fondo Ciencia de Frontera 2019 – CONACYT.

A CIDETEQ por permitirme el acceso a sus instalaciones, laboratorios, y equipos.

A la Dra. Ma. Yolanda Reyes Vidal por brindarme la oportunidad de unirme a su equipo de trabajo, por su paciencia, consejos, amistad y su apoyo incondicional.

Al Dr. Francisco Javier Bacame Valenzuela por su valiosos consejos y palabras de apoyo en mi transcurso de mi formación académica y por su amistad.

A mi comité tutorial por brindarme su apoyo en el transcurso de la elaboración de esta tesis (Dr. Francisco Javier Bacame, Dra. Erika Bustos Bustos, Dr. Luis Alberto Arellano y Dr. Jesus Bernardino).

DEDICATORIA

A mi Mamá, a mi papá, a mi abuelita, a mis hermanos y a mi tío, por estar conmigo en todo momento a pesar de la distancia, por apoyarme en cada instante, por alentarme a seguir adelante, por enseñarme a que ningún sueño es imposible.

A la Dra. Yolanda y el Dr. Javier, por creer en mí, por apoyarme, motivarme y alentarme a dar lo mejor de mí cada día, por compartirme su conocimiento, por sus consejos, por brindarme su valiosa amistad y por ser un ejemplo a seguir para mí.

A mi novia Pamela, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por creer en mí, por recordarme cada día que todo es posible, por estar cuando mas lo necesito, por apoyarme a ser mejor persona cada día y por hacerme feliz.

A mis amigos Mayra, Arnold y Alberto, por su valiosa amistad y su apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, por hacer más ameno y bonito mis días en CIDETEQ.

A Pelitos, Calvin, Mao, Cobi, Fifi y Totoro, por alegrar mis días y de las personas que más quiero.

1.- RESUMEN

La contaminación del agua causada por contaminantes emergentes como la amoxicilina y el triclosán representa un problema ambiental debido a los efectos adversos que causan en la salud humana. Estos efectos pueden presentarse desde concentraciones pequeñas del contaminante, en el orden de ppm o ppb, lo que puede dificultar su detección y degradación. Las metodologías actuales empleadas para la detección de compuestos emergentes y para el tratamiento de aguas residuales resultan ser insuficientes para este tipo de compuestos. Es por ello, que se hace necesario desarrollar diversas alternativas que permitan su detección y posible degradación.

En este trabajo se estandarizaron métodos de cromatografía de líquidos para la detección de amoxicilina y triclosán, así como un tratamiento de biorremediación donde se utilizaron poblaciones microbianas aisladas de lodos obtenidos de dos digestores (aerobio y anaerobio) de una planta de tratamiento de aguas residuales. La degradación de los compuestos emergentes: amoxicilina y triclosán se realizó en medios suplementados con extracto de levadura y caldo nutritivo, en condiciones de 150 rpm a 30 °C para las poblaciones bacterianas aisladas del digestor aerobio y a 30 °C en condiciones estáticas para las poblaciones bacterianas aisladas del digestor anaerobio. Los resultados obtenidos mostraron que la degradación de amoxicilina fue del 100 % en 6-7 horas de cultivo y para triclosán alrededor de 70% en 24 horas.

ABSTRACT

Water contamination caused by emerging pollutants such as amoxicillin and triclosan represents an environmental problem due to the adverse effects that these compounds cause in human health. The effects can occur in low concentrations of the contaminant, in the order of ppm or ppb, which produce problems in detection and degradation process. The current methodologies used for the detection of emerging compounds and for the treatment of wastewater turn out to be insufficient. Then it is necessary to develop various alternatives that allow its detection and possible degradation.

In this work, liquid chromatography methods for the detection of amoxicillin and triclosan were standardized, as well as a bioremediation treatment. This treatment use microbial populations isolated from sludge obtained from two digesters (aerobic and anaerobic) of a wastewater treatment plant. The degradation of the emerging compounds: amoxicillin and triclosan was carried out two mediums. The culture mediums were supplemented with yeast extract or nutrient broth, under conditions of 150 rpm at 30 °C for the bacterial populations isolated from the aerobic digester and at 30 °C under static conditions for the bacterial populations isolated from the anaerobic digester. The results obtained showed that the degradation of amoxicillin was 100% in 6-7 hours of culture and for triclosan approximately 70%, in 24 hours.

2. INTRODUCCIÓN

La contaminación es uno de los problemas ambientales más importantes que afectan a nuestro mundo y es el resultado de la introducción de cualquier sustancia al medioambiente en cantidad tal que cause efectos adversos en el hombre, en los animales, vegetales o materiales expuestos a dosis que sobre pasen los niveles aceptables en la naturaleza. La contaminación puede surgir a partir de ciertas manifestaciones de la naturaleza (fuentes naturales) o bien debido a los diferentes procesos productivos del hombre (fuentes antropogénicas) que conforman las actividades de la vida diaria. El agua es uno de los recursos naturales más importantes debido a su utilidad, por lo cual existe una preocupación mundial de primer orden con respecto a su disponibilidad, conservación y preservación. Las fuentes que generan contaminación de origen antropogénico más importantes son: industriales, comerciales, agrícolas y domésticas.

Entre los diferentes tipos de contaminantes se encuentran los contaminantes emergentes, cuyo estudio aparece entre las líneas de atención prioritarias de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Arbeláez Salazar, 2016). Los contaminantes emergentes engloban una gran variedad de compuestos que incluyen retardadores de llama, hormonas y otros compuestos disruptores endocrinos, productos farmacéuticos y de cuidado personal, subproductos de desinfección, aditivos y agentes industriales, antisépticos, compuestos organometálicos, nanomateriales, pesticidas polares, compuestos perfluorados, y algunos metabolitos de ciertos organismos como algas y cianobacterias. La contaminación del recurso hídrico causada por antimicrobianos tales como antibióticos y productos de cuidado personal son de gran relevancia ya que se han encontrado en diversos efluentes de agua, tales como aguas residuales, agua de origen superficial, agua subterránea, entre otras fuentes. Esta situación representa un problema ambiental y social debido a los efectos adversos tales como bioacumulación, biomagnificación, alteraciones endocrinas, pueden llegar a generar resistencia a organismos a los que son expuestos, entre otros, aún en

concentraciones pequeñas, del orden de partes por millón (ppm) o partes por billón (ppb).

Por lo anterior, las tecnologías actuales empleadas para la detección y tratamiento de aguas residuales requieren de más alternativas disponibles para este tipo de compuestos clasificados como contaminantes emergentes. Se han podido identificar algunos microorganismos capaces de degradar este tipo de compuestos mediante asimilación. Algunos de los compuestos antimicrobianos y farmacéuticos degradados y los microorganismos capaces de su degradación son: amoxicilina (*Brevundimonas naejangsanensis*, *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* y *Bacillus cereus*), ibuprofeno (*Klebsiella oxytoca*) e irbesartán (*Papiliotrema terrestris*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaneae*, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. michiganensis*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus terreus*). Ante esta problemática es de gran relevancia estudiar la relación de los microorganismos con los contaminantes emergentes, en específico para amoxicilina y triclosán, por su importancia en el consumo excesivo de los mismos y por sus riesgos ambientales. Los resultados obtenidos proporcionarán poblaciones microbianas útiles en la degradación de dichos contaminantes.

3.- JUSTIFICACIÓN

Las actividades antropogénicas modernas incluyen el uso indiscriminado de productos que permiten satisfacer sus necesidades de bienestar, como aquellos productos farmacéuticos y de cuidado personal (Pharmaceutical and Personal Care Products, PPcPs). Estos productos son vertidos a las aguas domésticas, acumulándose por largos periodos en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs), llevando a procesos de bioacumulación en los lodos residuales y de contacto con las poblaciones de microorganismos establecidas. Se conoce que algunos géneros de microorganismos como *Rhodococcus*, *Aspergillus*, *Planococcus*, *Planctomyces*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Trametes*, *Phanerochaete*, entre otras, generan procesos de adaptación para la degradación de compuestos PPcPs. La presencia de PPcPs en las plantas de tratamiento, tanto en el influente como efluente ha persistido, reportando estos compuestos con mayor frecuencia en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Estos datos dejan en evidencia la baja eficiencia de eliminación de estos, mediante tratamientos convencionales y, por tanto, se tiene la necesidad de proponer tratamientos efectivos. La información permitirá proponer alguna población microbiana capaz de degradar amoxicilina y triclosán como tratamiento de estos contaminantes emergentes.

4.- HIPÓTESIS

Las poblaciones microbianas con diferente metabolismo (aerobio y anaerobio) que fueron aisladas de los lodos presentes en los reactores aerobio y anaerobio de una planta de tratamiento de agua residual serán capaces de remediar el efluente que contiene contaminantes emergentes como amoxicilina y triclosán mediante un proceso de degradación.

5.- OBJETIVO

Estudiar la remoción de amoxicilina y triclosán utilizando poblaciones microbianas con diferentes metabolismo, aerobio y anaerobio, aisladas de los lodos activados de una *Planta de Tratamiento de Aguas Residuales*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar una metodología por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de amoxicilina y triclosán.
- Aislar poblaciones microbianas (aerobias y anaerobias) de una PTAR utilizando medios de cultivos suplementados con extracto de levadura y caldo nutritivo.
- Analizar la cinética de degradación de amoxicilina y triclosán en presencia de las poblaciones, aerobias y anaerobias, aisladas previamente.

6.-MARCO TEORICO

6.1 CONTAMINANTES EMERGENTES (CE)

Los contaminantes emergentes son sustancias químicas de origen natural o sintético que se caracterizan por su persistencia, su tendencia a la bioacumulación, que no son monitoreados por sistemas ambientales y representan un riesgo para la salud y el ecosistema, estas sustancias no se encuentran reguladas y por esto han captado el interés de la comunidad científica en estos últimos años. La disposición final de la mayoría de los contaminantes ambientales se origina o provienen de fuentes naturales y antrópicas como las industrias, granjas de ganado, campos agrícolas, hospitales, hogares y las descargas de aguas residuales municipales, con una contribución creciente de las actividades agrícolas y pecuarias, son los cuerpos de agua (Msigala y col., 2017; Evans y col., 2019). La creciente contaminación de estos ecosistemas puede asociarse a los contaminantes prioritarios con efectos conocidos y generalmente legislados tales como los hidrocarburos aromáticos, plaguicidas organoclorados, bifenilos policlorados, entre otros. Junto a los contaminantes prioritarios debe considerarse una familia amplia de contaminantes conocidos como emergentes, tal como son los productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, hormonas, drogas de abuso, compuestos químicos industriales, pesticidas de nueva generación y los microplásticos. Se denominan emergentes porque a pesar de que se conocía su presencia en el medio, sus efectos a la salud humana y la vida silvestre eran desconocidos y no existen pautas establecidas para el monitoreo ambiental (Wilkinson y col., 2017). Aunque no están regulados, existen algunos intentos en la UE y América del Norte para crear una lista de prioridades y reducir su liberación al medio ambiente, lo que se relaciona también con posibilidades analíticas para su detección (Taheran y col., 2018; Sousa y col., 2019).

La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan estar constantemente en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente (Barcelo y López, 2007). Se ha establecido que estos

compuestos entran en el ambiente a través de algunas fuentes y vías, tales como aguas residuales de tipo doméstico e industrial (Fent y col., 2006), de los residuos de las plantas de tratamiento (Kolpin y col., 2002), de los efluentes hospitalarios (Kummerer, 2001), de las actividades agrícolas y ganaderas (Watanabe y col., 2010) y de los tanques sépticos, los cuales contienen un gran número de componentes orgánicos específicos y CE, que se producen a diferentes concentraciones en las aguas superficiales, cuyos criterios de calidad ambiental aún no se han podido especificar (Kastelan y col., 2007) y las plantas de tratamiento convencionales de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos; motivo de preocupación científica y para las entidades ambientales reguladoras (Eggen y col., 2010).

Los contaminantes emergentes han captado el interés de la comunidad científica en los últimos años, debido al daño potencial que pueden ocasionar al medio acuático y su eliminación incompleta en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de última generación (Mousel y col., 2017). En ellas si bien se reducen las concentraciones de algunos CEs no se llega a su mineralización. Aunado a ello, la remoción de estos microcontaminantes en aguas residuales puede no correlacionarse con la reducción de su toxicidad, debido a la formación de productos de su transformación con efectos más tóxicos que ellos (Maya y col., 2018).

6.1.1 TIPOS DE CONTAMINANTES EMERGENTES

Retardantes de llama bromados

La prevención de incendios en la industria ha disminuido gracias a la aplicación de retardantes de llama químicos en muchos productos industriales, utilizados en los últimos años. Los retardantes de llama bromados (BFRs) son compuestos empleados como aditivos o reactivos en una amplia variedad de polímeros - espumas de poliestireno, poliestireno de elevado impacto y resinas de epoxi. También se utiliza en una gran variedad de productos de consumo, como puede ser el material electrónico y los materiales de construcción. En la actualidad se

producen de 20-25 clases de BFRs, siendo tres de ellas las más importantes: Tetrabromobisfenol A, Hexabromociclododecano y Difenil-éteres polibrominados (Wit, 2002).

Aunque aportan en prevenir incendios, salvar vidas, prevenir daños, reducir costo económico por incendios (Birnbaum y col., 2004), los retardantes de llama, así como muchos otros productos químicos, no son eliminados totalmente en las plantas de tratamiento de agua, por lo tanto, aportan a la contaminación por compuestos emergentes en esta matriz.

Estos productos se han encontrado en una gran variedad de muestras tanto humanas y animales, así como medioambientales. Aunque no está completamente demostrado, existen serios indicios sobre sus posibles efectos adversos, como disrupción endocrina y cáncer. Es por ello que se ha motivado la aplicación del principio de precaución y medidas legislativas para su control por lo complicado análisis, ya que existen un gran número de congéneres con diferentes estructuras y propiedades (Barceló y López de Alda, 2008).

Parafinas cloradas

Las parafinas cloradas (CPs) son formulaciones industriales formadas por mezclas extremadamente complejas de alcanos de cadena lineal policlorados (PCAs), con un número de átomos de carbono entre 10 y 30 y un contenido en cloro entre el 30-70 % de su masa. Estos compuestos no tienen un origen natural conocido, siendo solubles en agua y con una fuerte tendencia a adsorberse en sedimentos, suelen encontrarse en aguas, en la materia particulada (Kenne y Ahlborg, 1996).

La mayor peligrosidad se encuentra en las parafinas cloradas de cadena corta y un contenido en cloro de un 60%, ya que están catalogadas como posibles carcinógenos humanos (Barceló y López de Alda, 2008). Su análisis y determinación presenta grandes dificultades debido a la complejidad de las mezclas y a la escasez de patrones individuales.

Pesticidas polares

Los pesticidas son sustancias o mezclas de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar las plagas. Debido a la regulación de la cual han sido objeto, se han estudiado durante décadas y, en consecuencia, se tiene un razonable conocimiento sobre su presencia y destino en el medio acuático. En los últimos años la preocupación en torno a estos productos se centra en los metabolitos, productos de degradación, que han sido en su mayor parte ignorados hasta la fecha y que se ha visto que pueden ser más tóxicos que los compuestos a partir de los cuales se generan (Sinclair y col., 2003). Los estudios han demostrado que los metabolitos de plaguicidas a menudo se detectan en aguas subterráneas en concentraciones más altas en comparación con los compuestos precursores (Kolpin y col., 1998). Actualmente se conocen alrededor de 16 millones de pesticidas diferentes y cada año se sintetizan, aproximadamente, 250000 nuevos compuestos. Aunque los pesticidas se regularon hace décadas, el problema radica en sus productos de degradación la mayoría de ellos polares, prácticamente ignorados hasta la actualidad, pero que pueden resultar más tóxicos incluso que los productos de partida.

Estos compuestos se emplean para el control de plagas tanto en agricultura como en industria, clasificándose en: herbicidas (hierbas), insecticidas (insectos), fungicidas (hongos y mohos), rodenticidas (roedores), molusquicidas (moluscos). La estructura química de los pesticidas es muy diversa, siendo los grupos más importantes los siguientes (Biziuk y col., 1996):

- Carbamatos: eficaces herbicidas, insecticidas y fungicidas, son altamente biodegradables. El carbaril y la carbenzima son de los más empleados.
- Cloroacetanilidas: pre-herbicidas para controlar la proliferación de la maleza. El metaloclor fue uno de los primeros pesticidas que se detectó en las aguas subterráneas y superficiales.
- Clorofenoxiácidos: herbicidas para uso agrícola, en las actividades forestales y de control de la maleza, tienden a absorberse en el suelo. Ejemplos más comunes de este tipo de compuestos son bentazona y triclopyr.

- Organoclorados: insecticidas agrícolas, altamente persistentes en el medioambiente, son hidrófobos, tienen muy baja solubilidad y son conocidos por su alta toxicidad. Los compuestos de este tipo que se encuentran más frecuentemente en el agua son el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil) etano (DDT), la dieldrina, el lindano y el metoxicloro.
- Organofosforados: insecticidas que actúan como neurotóxicos.
- Piretroide: insecticidas, son hidrofóbicos y pueden ser persistentes en el medioambiente.
- Triazinas: herbicidas selectivos. Algunos ejemplos de triazinas son la cianazina, la atrazina, y la simazina. Estos dos últimos son persistentes y solubles en agua. (Geerdink RB y col., 2002).

Compuestos perfluorados

Los compuestos perfluorados (PFCs) son un grupo de sustancias químicas con una cadena hidrofóbica lineal de carbonos completamente fluorados, unida a diversos grupos hidrofílicos (Fromme y col, 2009).

Los compuestos perfluorados (PFCs, perfluoroalkyl compounds) constituyen una amplia familia de contaminantes de origen antrópico. Estas sustancias son muy estables, tienen una gran resistencia térmica, química y biológica. Están compuestos por una cadena perfluorocarbonada con propiedades hidrofóbicas y oleofílicas, y en un extremo poseen un grupo funcional con carga (carboxilo o sulfonato), el cual es hidrofílico. Esta combinación única de carácter hidrófobo y oleóphobo permite que estas sustancias puedan repeler el agua y la grasa. Por estas propiedades, se utilizan en multitud de productos industriales, como cosméticos, productos textiles, revestimientos antiadherentes e impermeabilizantes, productos quitamanchas, productos de limpieza, fitosanitarios, etc. (Corsini y col., 2014).

Drogas

Las drogas ilícitas y sus metabolitos son un gran grupo de contaminantes emergentes. Ellas entran a la red de aguas residuales como drogas inalteradas y/o sus metabolitos activos por excreción humana, saliva, y sudor, después del consumo ilegal o por la eliminación accidental o deliberada de los laboratorios clandestinos de drogas (Gonzales-Mariño, 2012). La disminución de la concentración, en los efluentes de aguas residuales y superficiales, depende de las tecnologías utilizadas en los distintos procesos de aguas residuales en las plantas de tratamiento; además, la eficiencia de remoción del tratamiento depende de la carga y la naturaleza molecular de los fármacos y sus metabolitos (Zuccato y col., 2008).

Las concentraciones de estos en el agua bajan de acuerdo con los días y horas; en las noches las concentraciones bajan, mientras en los fines de semana se ven incrementadas (Gerrity y col., 2011). La determinación de su concentración en el ambiente es una herramienta indirecta para estimar los niveles de consumo en la comunidad y evaluar el potencial impacto ecotoxicológico. Aunque las concentraciones de las diferentes drogas y sus metabolitos en las aguas superficiales se encuentran en el rango de nanogramos por litro, sus posibles efectos sobre la fauna y la salud humana no se pueden descartar, especialmente en las poblaciones vulnerables (Valcarcel y col., 2012).

En los últimos años las drogas ilícitas han destacado como contaminantes emergentes de interés. Los diversos tratamientos realizados en las plantas depuradoras son ineficientes para la recuperación de estos compuestos. Los estudios realizados para detectar las drogas de abuso en las aguas son relativamente escasos, centrándose estos trabajos en la cocaína, estimulantes anfetamínicos, opiáceos y cannabis. (Petrovic y col., 2003)

Fármacos y productos de higiene personal

Los productos farmacéuticos y de higiene personal (PPcPs) son un amplio grupo de compuestos químicos empleados en el cuidado de la salud humana y animal.

Fármacos

Los residuos farmacéuticos son de interés considerable como contaminantes emergentes debido a su relativa estabilidad. Estos contaminantes farmacéuticos son difíciles de digerir completamente y excretados a través de heces y orina (alta estabilidad) (Yan y col., 2017). Según estudios, el 90% de los compuestos farmacéuticamente activos ingresaron a agua doméstica por excreción (Pomati y col., 2006). Estos metabolitos pueden entrar al medio ambiente a través del tratamiento de aguas residuales debido a su tratamiento ineficaz.

Factores como la demanda, la frecuencia de administración, la automedicación, el consumo ilícito de drogas y los procesos fisiológicos determinan la carga y la persistencia de principios activos en aguas (Halling-Sorensen, 1998); un caso particular se reporta en Alemania donde cientos de toneladas de principios activos farmacéuticos de alta demanda fueron incorporados al ambiente (Ellis, 2006). De igual forma, los sistemas hospitalarios incorporan antimicrobianos al agua, promoviendo la generación de microorganismos resistentes y alteraciones en la actividad enzimática de la microbiota, lo cual interrumpe los procesos de biodegradación propia de materia orgánica en los cuerpos de agua (Baquero y col., 2008). Sin embargo, poco se conoce de los efectos crónicos de fármacos en el ambiente, aunque algunos ensayos ecotoxicológicos alertan del gran problema.

El control de los productos farmacéuticos es muy complejo; su origen no radica en las industrias dedicadas a su producción, que se encuentran perfectamente reguladas y controladas, si no, en el uso por parte de las personas, que vierten constantemente fármacos y restos de estos, haciendo que sea algo casi imposible de controlar (Barceló & López de Alda, 2008).

Moléculas como carbamazepina, atenolol, metoprolol, trimetoprim y diclofenaco solo han sido removidas en un 10% por las plantas de tratamiento de aguas residuales, mientras que compuestos como carbamazepina se removieron solo el 7% y el 96% de propranolol en agua (Ternes, 1998). Finalmente, en Alemania hay reportes de concentraciones de clofibrato mayores a 70 ng/L en agua (Stumpf, 1996), aunque en otros casos hay evaluaciones que muestran toxicidad de

carbamazepina, de gemfibrozilo y de fluoxetina, y reportan concentraciones efectivas 50 (EC₅₀) inferiores a 81 µg/mL, 1.18 µg/mL y 24 µg/mL, respectivamente (Ferrari, 2003).

Los fármacos más prescritos en medicina son los analgésicos/antiinflamatorios, tales como ibuprofeno, diclofenaco, y los antiepilépticos, sin olvidarse que el uso de productos farmacéuticos en veterinaria, agricultura, ganadería y avicultura ha ido en aumento en los últimos años. Los grupos farmacéuticos que se consideran actualmente más peligrosos son:

- Antibióticos: Son muy persistentes, pueden llegar a provocar resistencia microbiana y pueden ser bioacumulados en los organismos.
- Citostáticos: Presentan propiedades carcinogénicas, mutagénicas o embriogénicas, siendo al igual que el caso anterior no eliminados en las depuradoras.
- Estrógenos: Pueden producir feminización, hermafroditismo y disminución de la fertilidad (Díaz-Cruz y col., 2003)

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades redujo en gran medida estos compuestos en agua potable. Estudios recientes demostraron que los productos farmacéuticos están ampliamente detectados en agua del grifo, agua superficial y agua subterránea en diferentes países. Es una situación muy alarmante que se detecten más de 100 compuestos farmacéuticos por encima de su límite de detección en los países desarrollados como EE.UU. y países europeos, así como se detectan más 30 compuestos en Asia-Pacífico, América Latina, Europa occidental, Estados del Caribe y Europa oriental (Aus der Beek y col., 2016). Algunas agencias de salud han detectado estos productos como riesgosos para la salud anunciando su toxicidad estrogénica y crónica relacionados con estos compuestos y, aun así, tenemos conocimientos insuficientes para superar estas consecuencias (Liu y col., 2015).

Los diversos procesos de tratamiento actuales se utilizan para tratar los residuos de antibióticos en aguas residuales. Algunos métodos comunes, como la adsorción involucrada con procesos inducidos por ultrasonido, tratamientos foto catalíticos y

coagulación, la degradación catalítica, los métodos biológicos y la electrocoagulación son empleados para la eliminación de estos contaminantes farmacéuticos (Xu y col., 2011; Carlos y col., 2011; Morales-Torres y col., 2013).

Productos de cuidado personal

Una gran variedad de contaminantes se origina en nuestro hogar, materiales y productos de cuidado personal como conservantes (parabencenos: éster que contiene un grupo alquilo o bencilo del ácido parahidroxibenzoico), desinfectante (Triclosán, TCS), agentes antifúngicos, fragancias (almizcles), repelentes de insectos (N, N-dietil-meta-toluamida, DEET), reguladores de lípidos, hormonas sintéticas, champús, esteroides, protector solar (4-metil-bencilidene-alcanfor), analgésicos y materiales cosméticos (Pal y col., 2014). Entre ellos, los parabenos se utilizan principalmente como conservante en los alimentos, medicamentos y cosméticos con una concentración de 30 g/L a 20 g/L.

En segundo lugar, el bactericida más común utilizado en productos para el cuidado de la salud, como pasta de dientes, champús, jabones, enjuagues bucales, lociones para el cuidado de la piel, cosméticos y desodorantes es el TCS. En tercer lugar, DEET es el compuesto más común en la fabricación del repelente de insectos. En cuanto, los jabones, detergentes y desodorantes con fragancia contienen una cantidad de almizcles como almizcles nitro (almizcle cetona, almizcle xileno), que contiene muchos productos orgánicos biodegradables y no biodegradables contaminantes. Por último, muchos filtros UV, los cuales se utilizan en cosmética y lociones de protección solar para proteger la piel de la luz solar son en su mayoría benzofenona y derivados de 2,4-dihidroxibenzofenona orgánicos (Campanha y col., 2015).

Estos materiales de cuidado personal contienen una gran cantidad de sustancias activas e inertes, que entran en agua subterránea, agua superficial y agua potable después de los desechos. Una de estas rutas es cuando se realizan las mezclas de estos contaminantes con fuentes de agua a través de un proceso de lixiviación. Este tipo de contaminantes se encuentra principalmente en zonas urbanas (Margot y col.,

2015). La mayoría de los productos de cuidado personal son diseñados para uso externo y lavado sin ningún cambio químico en su estructura y propiedades (Yan y col., 2015; Rippy y col., 2016).

6.2 AMOXICILINA

La amoxicilina es un antibiótico semisintético bactericida de amplio espectro amino penicilina que inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana (Iannacone y Alvariño, 2009), utilizado principalmente en medicina humana y veterinaria, para tratar infecciones urinarias, sinusitis, otitis e infecciones de vías respiratorias inferiores (Katzung y col., 2016) producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Trovó y col., 2011), perteneciente a la clase de antibióticos β -lactámicos (Junget al., 2012) y su fórmula química se presenta en la Figura 1. Debido al alto uso de este medicamento, se considera como uno de los fármacos de mayor consumo a nivel global para el año 2017 según la popularidad de antibióticos mundial, ya que se obtiene fácilmente en farmacias. Es un fármaco que no se recomienda usar en dosis mayores de 0.75 a 1.5 g/día para adultos y de 0.6 a 1.2 g/día para niños (Katzung y col., 2016) debido a que la comunidad microbiana puede presentar inmunidad a su efecto en el cuerpo humano. La amoxicilina está disponible en comprimidos masticables de 125, 200, 250 y 400 mg; comprimidos de 500 y 875 mg; cápsulas de 250 y 500 mg; polvo para reconstituir una solución de 50, 125, 200, 250 y 400 mg/mL (Katzung y col., 2016).

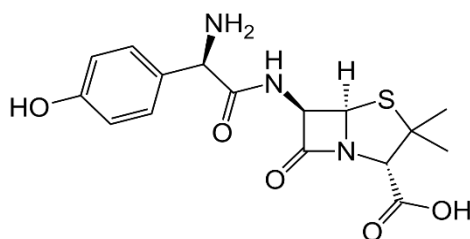


Figura 1. Estructura química de amoxicilina.

Metabolismo

La amoxicilina pertenece a un grupo de fármacos que se excretan predominantemente en forma no metabolizada y esto podría presentar un riesgo crónico en el medio acuático (Jung y col., 2012). Su excreción en la orina es del 43 al 75% sin metabolizar, y alrededor de un 20% se metaboliza y excreta como ácido amoxicilóico y amoxicilina dicetopiperazina (Hirte y col., 2016), con referencia de creatinina de 100 mL/min/70 kg, para una disponibilidad oral del 93% en el cuerpo humano (Katzung y col., 2016). Su acción depende de su capacidad para alcanzar y unirse a las proteínas que ligan penicilinas localizadas en la membrana interna de la pared celular bacteriana (Iannacone y Alvaríño, 2009).

Propiedades fisicoquímicas

Es un polvo cristalino blanco o casi blanco, poco soluble en agua y en alcohol, prácticamente insoluble en cloroformo, éter y aceites grasos. La amoxicilina trihidratada es soluble en disoluciones diluidas de ácidos y de hidróxidos alcalinos. Aproximadamente, 1.15 g de amoxicilina trihidratada equivale a 1 g de amoxicilina, con peso molecular de 365.41 g/mol. El contenido en agua oscila entre el 11.5% y el 14.5%. Una disolución en agua al 0.2% presenta un pH comprendido entre 3.5 y 5.5 (Homem y Santos, 2011).

Ocurrencia y eliminación

En los últimos años, se ha investigado la presencia de antibióticos en matrices ambientales. El uso de antibióticos en medicina veterinaria y humana fue entre 100,000 y 200,000 toneladas/año, y esto resultó en un aumento de la contaminación del agua con dichos contaminantes farmacéuticos (CF). Estos CF son descargados continuamente como compuestos parentales o metabolitos/productos de degradación (Homem y Santos, 2011).

El primer caso reportado de contaminación de aguas superficiales por antibióticos tuvo lugar en Inglaterra hacia el año de 1982, cuando los investigadores detectaron

una concentración de 1 µg/L en un río. Sin embargo, se detectan en mayores concentraciones en efluentes de hospitales, en aguas residuales municipales y en aguas superficiales, marinas y subterráneas (Homem y Santos, 2011).

La acumulación y persistencia de amoxicilina en el medio acuático ha generado preocupación, pero puede ser de efecto nocivo, debido a su alta tasa de excreción y en referencia con su vida media hidrolítica de 9 días (pH 7.5, 25 °C), se ha llegado a detectar amoxicilina en aguas residuales sin tratar, efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y aguas superficiales (Hirte y col., 2016), por su uso prioritario en tratamientos bacterianos en medicina humana y veterinaria. La amoxicilina contiene un anillo aromático, la escisión de este anillo es el principal medio para que se realice la degradación de este compuesto, los componentes que se encuentran unidos al anillo (COOH y OH) promueven la hidroxilación y aumentan la degradación biológica (Musson y col., 2010).

Cuando hay eliminación de antibióticos β-lactámicos se dan a conocer tres mecanismos para que se logre: 1) ruptura rápida de su anillo por medio de un proceso de reducción, 2) adsorción de la amoxicilina en productos de corrosión de hierro y 3) secuestro de amoxicilina con el fin de precipitar hierro (Ghauch y col., 2009). En China, en aguas residuales provenientes de fincas de cerdos, se reportaron concentraciones de amoxicilina de 48 ng/L. Estas concentraciones pueden tener efectos negativos en el proceso de aguas residuales de la finca (Jianping y col., 2012), además de causar efectos negativos al ambiente acuático. En un estudio realizado por María y col. (2009) se presentó una evaluación de riesgos ambientales para los antibióticos intravenosos más utilizados en la Unidad de Cuidados Intensivos de un hospital de Curitiba, Brasil, en el cual los valores de las tasas de eliminación, en una PTAR, estuvieron relacionados con un sistema de lodo activado. Además, se tuvo en cuenta la relación Concentración Ambiental Prevista/Concentración Prevista Sin Efecto (PEC/PNEC, por sus siglas en inglés) que se utiliza para establecer el riesgo ambiental asociado con las emisiones de los compuestos farmacéuticos en las aguas residuales del hospital. Los rangos de clasificación son: valores entre 0.01 y 0.1 (riesgo bajo), entre 0.1 y 1 (riesgo medio), y valores ≥ 1 (riesgo alto) (Hernando y col., 2006). La aparición de β-lactámicos no

se ha tenido en cuenta para estudios frecuentes, a pesar de que estos representan el mayor consumo de antibióticos en todo el mundo. No se tiene clara su presencia si no se encuentran en el medio acuático de manera significativa debido a la posible escisión del anillo β -lactámico o si se debe a las posibles deficiencias analíticas y dificultades. En un estudio, se detectaron β -lactámicos en un rango inferior a $\mu\text{g/L}$ en el efluente de un hospital y de una planta de tratamiento municipal de aguas residuales, considerándose como concentraciones bajas para este tipo de antibiótico (Kümmerer, 2009).

Ecotoxicidad de los antibióticos

Entre 1999 y 2000, el Servicio Geológico de los Estados Unidos llevó a cabo la primera investigación a nivel nacional, en ese país, sobre la aparición de compuestos farmacéuticos, hormonas y otros contaminantes orgánicos en 139 corrientes de agua ubicadas en 30 estados de la nación norteamericana. Se enfocó en un total de 95 contaminantes, entre los cuales se destacaron los antibacterianos (Colón, 2010). Entre los antibacterianos con mayor reporte en los cuerpos de agua están las tetraciclinas, los aminoglucósidos, los macrólidos, los betalactámicos y la vancomicina (Jiménez, 2011).

Los antibacterianos constituyen uno de los grupos de compuestos farmacéuticos que se han encontrado en lagos y corrientes a través del mundo, la presencia de estos compuestos en el ambiente ha aumentado la toxicidad de los organismos acuáticos y la presencia de especies de bacterias con resistencia antibiótica (Ramos y Pellón, 2006). El problema de la resistencia a los antibacterianos es ecológico y nunca se había visto que los organismos infecciosos fueran resistentes a tan alto número de antibacterianos (Márquez, 2008). La aplicación indiscriminada y el uso irracional de antibacterianos ha provocado que estos se encuentren en cantidades cada vez mayores en el medio ambiente, amplificando las consecuencias ecológicas y poniendo en peligro la salud del hombre.

6.3 TRICLOSAN

Es uno de los contaminantes emergentes más detectados en aguas residuales. Triclosán (TCS) es un agente antimicrobiano ampliamente utilizado en productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP). El uso extensivo de TCS en PPCP ha aumentado en las últimas décadas y su considerable producción y consumo están causando efectos adversos en el medio ambiente y los seres humanos. Por definición, el triclosán es un antimicrobiano cuya composición es (TCS; 5-cloro-2-[2,4-diclorofenoxi]-fenol), cuya estructura se muestra en la Figura 2.

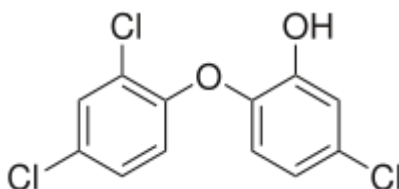


Figura 2. Estructura química del triclosán.

Este compuesto es conocido comercialmente como Irgasan DP 300, Irgasan PG60, Irgacare MP, Irgacare CF100, IrgacideLP10; Cloxifenolum, Irgagard B1000, Lexol 300, Ster-Zac (Céline y col., 2002; Greyshock y Vikesland, 2006; Singer y col., 2002, SCCS, 2010), es un compuesto lipofílico y fenólico (Allmyr y col., 2006), tiene un peso molecular de 289.6 g/mol, y un pKa de 8.1 (Orvos y col., 2002). Debido a dichas características, el TCS, es generalmente usado en muchos productos de cuidado personal (por ejemplo, pastas de dientes, jabones, desodorantes, champúes y cosméticos) y productos de consumo (por ejemplo, utensilios de cocina y calzado) (Zhang y Huang, 2003). Además, es ampliamente aplicado en textiles, plásticos, polímeros, fibras y los dispositivos de implantes médicos, debido a su actividad microbiana (Chen y col., 2008). La concentración del triclosán en los productos de cuidado personal es típicamente de 0.1–0.3%

La dispersión de este compuesto en el ambiente ha generado una creciente preocupación, ya que su presencia podría favorecer el desarrollo de

microorganismos resistentes a los antimicrobianos y causar efectos adversos sobre el ecosistema acuático (Lee y col., 2012), indicando que una exposición continua de la microbiota acuática a ciertas concentraciones, podría dar lugar a alteraciones imprevistas en la estructura de la comunidad microbiana (Suárez y col., 2007), ya que el triclosán puede inhibir el crecimiento de bacterias al bloquear la biosíntesis de lípidos, que es necesaria para la construcción de membranas celulares (Chen y col., 2015). Se han reportado efectos del triclosán sobre la fauna y flora a diferentes niveles tróficos (Puthiya y col., 2012). Las algas, organismos unicelulares y peces han sido los principales seres en los que se ha estudiado su toxicidad. Las algas unicelulares, particularmente las algas verdes y las cianobacterias, son del orden de 30 a 80 veces más sensibles a la exposición del TCS que otros organismos acuáticos. Se ha reportado que el crecimiento de estas algas es inhibido a concentraciones de TCS comprendidas entre 1.3 y 13 ng/mL en un tiempo de exposición de cuatro días, con una concentración media inhibitoria, conocida como IC50, de 4.7 ng/mL (Rodríguez, 2008). De igual manera durante estos estudios se reportó que el mayor efecto tóxico se produjo sobre la especie *Scenedesmus subspicatus*, dado que este organismo es capaz de transformar químicamente el TCS en 2,4-diclorofenol, de mayor toxicidad que el compuesto de partida (Rodríguez, 2008).

En los estudios de toxicidad sobre vertebrados acuáticos, los peces han sido muy estudiados, en los cuales se han reportado efectos de la exposición del TCS sobre las crías de la trucha arcoíris, las cuales presentaron una disminución de su supervivencia cuando fueron expuestas durante un periodo de 35 a 61 días a niveles de TCS del orden de 71.3 ng/mL, sin que hubiese diferencia de longitud y peso con respecto a las muestras control. Sin embargo, en este estudio manifestaron malformaciones en la mandíbula, curvatura de la espina dorsal, inactividad y natación errática, factores que afectan negativamente la supervivencia de la especie (Rodríguez, 2008). Los factores anteriores han impulsado la eliminación de este compuesto de las aguas residuales; sin embargo, el mecanismo real de eliminación del triclosán en sistemas de tratamiento no está totalmente elucidado todavía, y los

productos de degradación son raramente identificados en estos estudios (Puthiya y col., 2012).

Propiedades fisicoquímicas

El triclosán es un clorofenol cuya fórmula química y su estructura molecular son similares a las sustancias químicas más tóxicas de la tierra y durante su manufactura podría producir dioxinas, y se relaciona además con PBCs, que se sospechan como cancerígenos (Poblete, 2007). La generación de policlorodibenzoparadioxinas (PCCDDS), conocidos como dioxinas, es una familia de moléculas que contienen en su estructura dos anillos aromáticos y varios átomos de cloro. Se conocen 209 congéneres, los congéneres con más de cuatro átomos de cloro presentan puntos de fusión mayores a 200°C. Las dioxinas generalmente se descomponen alrededor de los 700°C (Quesada y col., 2008).

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de triclosán.

Nombre comercial	Triclosán Irgasan DP300R
Nombre químico	2,4,4-tricloro-2-hidroxifenil éter
Forma física	Polvo cristalino
Color	Blanco
Olor	Ligeramente aromático
Solubilidad en agua (0.01 g/L) a 20°C	Poco soluble
Punto de fusión	55-60°C
Peso molecular	289.6 g/L

Metabolismo

El amplio uso del triclosán en la vida cotidiana ha causado su distribución ubicua en el medio ambiente. Simultáneamente, la degradación este compuesto tiene lugar en diferentes sitios, como en las PTAR. Las actividades de degradación ocurren a través de diferentes formas, como absorción física, reacciones químicas y biodegradación. Las investigaciones sobre la aparición y el destino del triclosán han encontrado que alrededor del 15% del mismo es absorbido por los lodos en las PTAR y otro 6% se libera en el agua receptora natural (Singer y col., 2002). El coeficiente de partición octanol-agua relativamente alto del triclosán puede conducir a su fácil absorción en los sedimentos de los arroyos, lagos o ríos cuando las aguas residuales tratadas se dispersan en el medio ambiente.

El triclosán puede experimentar muchas reacciones químicas para reducir su concentración. En condiciones de laboratorio, se descubrió que este compuesto se descompone fácilmente cuando se esteriliza en autoclave. Algunos estudios han demostrado que el triclosán se puede fotodegradar. Cuando proyectamos luz solar o luz ultravioleta sobre la superficie del agua que contiene triclosán, hasta el 12% del compuesto disuelto se convertirá en dioxina (Singer y col., 2002). Durante el tratamiento del agua potable, el TCS reaccionará con el cloro libre para formar dos éteres difenílicos hidroxilados tetra y pentaclorados, 2,4-diclorofenol, así como cantidades significativas de 2,4,6-triclorofenol. El triclosán puede oxidarse rápidamente por los óxidos de manganeso δMnO_2 y MnOOH (Zhang y Huang, 2003). Se sugirió que este proceso de oxidación podría ser significativo en las condiciones en las que no se produzca la transformación biológica.

En comparación con las degradaciones químicas y físicas, la biodegradación de dicho compuesto es el método más eficaz y completo para eliminarlo de los entornos naturales. Se han informado datos experimentales sobre la eficiencia promedio de su eliminación en plantas de tratamiento de aguas residuales en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, alcanzando hasta el 79% (Singer y col., 2002). Los degradadores de triclosán se han estudiado en condiciones de laboratorio. Se encontró que un consorcio bacteriano, enriquecido a partir de lodos activados provenientes de una PTAR, podía degradar el 35% del total de triclosán marcado con ^{14}C , en 13 días desde una concentración inicial de 500 mg/L. El análisis de las

poblaciones presentes en dicho consorcio mostró que un aislado *Sphingomonas* sp. RD1 está relacionado con la degradación parcial del compuesto en un medio complejo a través del cometabolismo (Ha y col., 2001). En otros estudios, se encontró que dos bacterias del suelo, *Pseudomonas putida* y *Alcaligenes xylosoxidans*, tenían altos niveles de resistencia al triclosán y podían usar el mismo como única fuente de carbono para su eliminación en medios sólidos (Meade y col., 2001). También se ha reportado que los hongos, *Trametes versicolor* y *Pycnoporus cinnabarinus*, podían degradar el triclosán. *T. versicolor* metabolizó TCS produciendo tres metabolitos, 2-O-(2,4,4'-triclorodifenil éter)- β -D-xilopiranosido, 2-O-(2,4,4'-triclorodifenil éter)- β -D-glucopiranosido y 2,4-diclorofenol, mientras que *P. cinnabarinus* convirtió el triclosán en 2,4,4'-tricloro-2'-metoxidifenil éter y el conjugado de glucósido conocido de *T. versicolor*. Los conjugados mostraron una actividad citotóxica y microbicida claramente más baja que la del triclosán (Hundt y col., 2000).

Ecotoxicidad de triclosán

Aunque el triclosán es un clorofenol, una clase de sustancias químicas que se sospecha causan cáncer en humanos, ha sido tratado como relativamente no tóxico para humanos y otros mamíferos durante mucho tiempo (Bhargava y Leonard, 1996). Sin embargo, algunos informes han sugerido que está registrado como pesticida y la EPA (Environmental Protection Agency) le otorga altos puntajes como agente de riesgo humano y de riesgo ambiental (Jackson, 2004).

El triclosán puede causar dermatitis de contacto fotoalérgica (PACD, por sus siglas en inglés), que ocurre cuando una parte de la piel expuesta a este compuesto y también está expuesta a la luz solar. La PACD puede causar síntomas de eccematosa erupción, generalmente en la cara, el cuello, el dorso de las manos y en el área expuesta al sol (Durbize y col., 2003). La dosis letal que mata al 50 por ciento de una población de animales de prueba (LD50) dérmica para ratas es de 5000 mg/kg, mientras que la LD50 oral para ratas es 4500-5000 mg/kg, para ratones es de 4000 mg/kg, y para perros es superior a 5000 mg/kg (Triclosán, Hoja de Datos

de Seguridad del Material, CNCCC). Datos que comparan el EC50 de triclosán (efectivo concentración de un compuesto dado que reduce el efecto especificado a la mitad de la respuesta original) con fenol y cobre indican que el triclosán es el más tóxico, mientras que el fenol es el menos tóxico (Neumegen y col., 2004). Además, este compuesto es lipofílico y puede bioacumularse en los tejidos grasos.

Las preocupaciones sobre la interferencia con el metabolismo de la hormona tiroidea del cuerpo llevaron a un estudio que encontró que el triclosán tenía un efecto hipotérmico marcado, en general, causando un efecto depresor no específico sobre el sistema nervioso central de ratones (Miller y col., 1983). Aunque la estructura química del triclosán se parece mucho a ciertos estrógenos, un estudio sobre una especie japonesa de pescado no demuestra efectos estrogénicos. Sin embargo, presenta leves efectos androgénicos, provocando cambios en la longitud de las aletas y la proporción de sexos (Foran y col., 2000).

Efectos ambientales

Más del 95% de los usos del triclosán se encuentran en productos de consumo que se desechan en desagües residenciales (Reiss y col., 2002). Dado que las plantas de tratamiento de aguas residuales no lo pueden eliminar por completo del agua, el triclosán se distribuye ampliamente en diferentes ambientes tales como arroyos, lagos, ríos, aguas superficiales y sedimentos. Investigaciones han encontrado que este compuesto es muy estable durante mucho tiempo. Ha dado lugar a la absorción y bioacumulación en organismos acuáticos e incluso en el pecho humano (Adolfsson-Erici y col., 2002). Un estudio en cuerpos de agua en Suiza también encontró niveles bajos de metilo triclosán (Lindstrom y col., 2002).

El triclosán puede tener efectos perjudiciales en los ecosistemas acuáticos, por ejemplo, en un experimento marino de crecimiento de algas con diferentes concentraciones de triclosán, se encontró que puede impedir el crecimiento de algas, y cuanto mayor sea la concentración de triclosán, más lento el crecimiento de las algas. Porque las algas son los primeros productores en los ecosistemas acuáticos, los altos niveles de triclosán vertidos en el medio ambiente pueden

causar la posible destrucción del equilibrio de los ecosistemas acuáticos (Orvos y col., 2002). Los riesgos son especialmente altos en aguas abajo de las aguas residuales de plantas de tratamiento (Reiss y col., 2002).

Debido a su naturaleza lipofílica y resistencia a la degradación, el triclosán en cursos de agua ha producido algunos efectos tóxicos para los organismos acuáticos. Se ha encontrado que el triclosán es altamente tóxico para los peces medaka japoneses en sus primeras etapas de vida y puede ser un disruptor endocrino débil. Otro trabajo demostró que al aumentar la cantidad de triclosán no solo impide el crecimiento de la artemia, sino que la inhibe por completo (Ishibashi y col., 2004).

6.4 DISTRIBUCIÓN DE LOS CONTAMINANTES EMERGENTES EN EL AMBIENTE

Los denominados contaminantes emergentes han provocado creciente preocupación, principalmente debido a que sus descargas en el ambiente no están reguladas por normas oficiales y al escaso conocimiento que se tiene sobre su destino y efectos (Torres Maroño, 2015). La principal vía de distribución de los contaminantes en el ambiente empieza en las plantas de tratamiento de aguas residuales, las cuales desempeñan un papel muy importante en la dispersión de los microcontaminantes, pudiendo ser detectados en aguas superficiales, subterráneas, océanos y suelos (Balakrishna y col., 2017). En el caso de los productos farmacéuticos, las principales vías de contaminación al agua son a través de la excreción humana, la eliminación de los productos no utilizados o caducos, y el uso amplio que se le da en la ganadería, donde son dispuestos inevitablemente en el drenaje de las ciudades o municipios. Así, los compuestos farmacéuticos no pueden ser completamente metabolizados o eliminados por los animales y humanos, siendo excretados a través de heces u orina, hasta en un 75% (Chen y col., 2018). Por ejemplo, los PPCP's y sus metabolitos han sido encontrados en excretas de humanos y animales hasta en un 90% del compuesto original (Balakrishna y col., 2017). Otros compuestos como los metales pesados se pueden

encontrar tanto en suelos, mantos de aguas, plantas y animales, en los que generan bioacumulación (Imperato y col., 2003).

En general, los CE introducidos al drenaje a través de las aguas residuales, y principalmente en las grandes ciudades, son transportados por la red de alcantarillado hasta llegar, en el mejor de los casos, a plantas de tratamiento de agua residual. En las PTARs se les aplican los procesos convencionales de remoción de contaminantes, pero la mayoría de los CE no se logran remover o su degradación no es suficiente para eliminarlos y permanecen en los efluentes de las mismas plantas. Posteriormente y dependiendo de la calidad del agua residual tratada, se le puede dar distintos usos como para el riego, pero en la mayoría de los casos llegan a cuerpos superficiales de agua como ríos o lagos (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación y uso de diversos contaminantes emergentes (Gil y col., 2012; Luo y col., 2014; Patiño y col., 2014).

Categoría	Clase	Ejemplos	Usos	Medio de exposición
Pesticidas y Plaguicidas	Organoclorados Organofosforados Piretroides Carbamatos Bipridilos Botánicos	DDT, Aldrín, Endrín Paratión, Diazinon, Malation Resmetrina, Aletrina, Decametrina Aldicarb, Carbofuran, Carbaril Paraquat, Diquat Nicotina Anhídrido arsenoso,	Insecticida Herbicidas Plaguicida	Descargas domésticas, Lixiviación de suelos, Descargas de la agricultura.
Aditivos Industriales	Retardantes Bromados y fosfatados Parafinas cloradas Compuestos perfluorados Surfactantes Aditivos alimenticios	Tetrabromobisfenol A, Hexabromociclododecano y Difenil-éteres polibrominados FPCP's Sulfonato de perfluorooctano, Perfluorooctanoato Alquilfenolpolietoxilado Alcanfor, Mentol, Triacetina, Citrato de trietilo	Se usa en recubrimientos de material electrónico Retardantes, plastificantes, selladores Antiadherentes, compuestos para cabello Papel, detergentes, lubricantes, etc. Estabilizantes de espumas, saborizantes, antioxidantes	Desechos domésticos e industriales.
PPcPs	Analgésicos Antihipertensivos Antibióticos	Diclofenaco, Naproxeno, Ibuprofeno, Acetaminofén Atenolol, Metoprolol,	Médico y pecuario	Desechos hospitalarios, Pecuarios y

	Hormonas, Productos para el estilo de vida y Drogas Cuidado personal	Propranolol Ciprofloxacino, Tetraciclinas, Macrólidos Testosterona, Cortisona, Estradiol Cafeína, Nicotina, Cocaína, Cannabinoides Benzofenonas, Compuestos aromáticos lipofílicos, Alcoholes	Médico y recreativo	domésticos, Escorrentía de afluentes. Desechos Domésticos.
--	--	--	------------------------	--

6.5 PROBLEMÁTICA DE LAS PTARS CONVENCIONALES

Una característica común de los contaminantes emergentes es la recalcitrancia o persistencia a la degradación biológica natural o controlada. Después de su liberación en el sistema de alcantarillado, los CE pasan a través de la PTAR y entran en los sistemas de agua, donde una gran variedad de estos compuestos y sus metabolitos se han detectado, produciendo una mezcla compleja de compuestos que pueden tener efectos sinérgicos, algunos de estos compuestos son más bioactivos que su precursor (Rivera y col., 2013).

Debido a estos problemas se han realizado en los últimos años diversos intentos a través de estudios de investigación para establecer procesos de tratamiento de aguas residuales capaces de degradar a los contaminantes emergentes. A pesar de los avances logrados, en la actualidad quedan retos pendientes por resolver y alternativas por desarrollar para que los procesos de tratamiento garanticen la eliminación de estos compuestos en el agua, con el fin de reducir el potencial de riesgo en la salud (Rivera y col., 2013). Como podemos observar en la Tabla 3 se han reportado concentraciones de contaminantes emergentes en PTAR dando a relucir la ineficaz eliminación de estos compuestos.

Tabla 3. Presencia de contaminantes emergentes en distintas matrices y su rango de detección en PTARs.

Categoría	Clase	Compuesto	Rango de detección (ng/L)	Matriz	Referencia
Fármacos	Antibióticos	Sulfametoxazol	128-886	PTAR	Balakrishna y col., 2017; Ashton y col., 2004;
	Hormonas	Eritromicina	12	PTAR	
		Citalopram Estradiol	30 0-5	PTAR	

				Agua Superficial	Zuccato y col., 2000; Burkhardt-Holm, 2011; Oller, 2017; Hernando y col., 2005.
	Analgésicos y Antiflamatorios	Diclofenaco Ibuprofeno	834-4460 1200-2380	Agua Superficial PTAR	
	Antidrepresivos	Citalopram	7-31	Agua Superficial	
	Sedantes	Setralina Lorazepan Carbamazepina	2-40 46 26	PTAR PTAR PTAR	
Pesticidas	Organoclorados	Aldrín α -BCH	100-280 112	Rios Rios	Lans y col., 2008; Barbosa y col., 2018; Burkhardt-Holm, 2011; Munz y col., 2017; Sousa y col., 2017.
	Herbicidas	Atrazina	2000	Aguas Superficiales	
	Insecticida Organofosforados	Diazinon Diclorvos Clorpirifós	130 30000 3000	Rios Rios Rios	
	Triazinas	Simazina	2500	Rios	
Productos para el cuidado personal	Filtros UV	Oxibezona Benzofenona	5-85 39-60	PTAR PTAR	Balakrishna y col., 2017.
Metales Pesados	-	Cobre Cromo	6-280 2-73	Suelo Suelo	Imperato y col., 2003.
Químicos Industriales	Surfactantes	Nonifenol	800	Agua Superficial	Burkhardt-Holm, 2011.
	Inhibidores de corrosión	Benzotrizol	230	Agua Superficial	
	Anti-Oxidantes	BHA	50	Agua Superficial	

6.6 TRATAMIENTOS PARA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES

Algunos contaminantes emergentes han sido considerados como disruptores endocrinos, varios de ellos son compuestos presentes en productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPcPs) y han sido detectados en distintas corrientes de agua (Wilkinson y col., 2017). En los últimos 15 años se han fabricado equipos analíticos sensibles que son capaces de detectar y cuantificar estos compuestos que están en concentraciones muy bajas (Li y col., 2008; Ben y col., 2009; Brausch y Rand, 2011). Los procesos convencionales de potabilización de aguas no están diseñados para remover todos los contaminantes emergentes, lo que indica que estos pueden llegar a ser consumidos por el hombre (Vulliet y col., 2009; Sodré, 2010). Por este motivo,

ha sido necesario implementar nuevas tecnologías de tratamiento que permitan garantizar su remoción. La radiación ultravioleta, el carbón activado, la ozonización, los procesos de oxidación avanzada, la filtración por membranas y los tratamientos biológicos son tratamientos que pueden ser efectivos en la remoción de antibióticos y otros residuos farmacéuticos (Esplugas y col., 2007; Bolong y col., 2009; Luo y col., 2014).

6.6.1 TRATAMIENTOS FISICOQUÍMICOS.

Existen diferentes tratamientos fisicoquímicos como coagulación, flotación y cloración utilizados para eliminar contaminantes emergentes en aguas residuales. En un estudio realizado a nivel laboratorio integrando diversos tratamientos (coagulación/flotación, suavización con cal, ozonación, cloración y adsorción con carbón activado granular (CAG)) se analizó la eliminación de 30 diferentes compuestos farmacéuticos, aunque no se obtuvo una eliminación significativa (Westerhoff y col., 2005). Estos resultados concuerdan con Adams y col. (2002), donde compuestos farmacéuticos (carbadox, sulfadimetoxina, trimetoprim) no fueron eliminados utilizando coagulantes como sulfato de aluminio y sulfato férrico. De igual manera en otros estudios, la coagulación resultó ineficiente para la eliminación de diclofenaco, carbazepina, ibuprofeno y ketoprofeno (Petrovic y col., 2003; Vieno y col., 2006).

Por otro lado, los procesos de oxidación por ozono y cloración resultan ser una buena alternativa, sin embargo, al reaccionar con diferentes compuestos químicos se pueden generar subproductos de efectos desconocidos. Estos procesos se recomiendan para una baja carga de carbono orgánico disuelto ya que este parámetro representa una fuerte influencia en el proceso (Huber y col., 2006). Los procesos de oxidación por ozono se caracterizan por el ataque directo de ozono sobre los compuestos y/o indirectamente por la generación de radicales hidroxilos (OH), los cuales se caracterizan por un gran potencial de oxidación lo que representa una buena alternativa para el tratamiento de contaminantes (Trujillo y col., 2010). Aunque los sólidos suspendidos (SS) incrementan la demanda de

ozono, la influencia en general es menor, ya que, en un tratamiento dado, una dosis de 5 mg/L es suficiente para altas concentraciones de SS (Huber y col., 2005).

6.6.2 PROCESOS AVANZADOS.

En los últimos años se han estudiado sistemas de membrana ya sea biológicos o no biológicos (osmosis inversa, ultrafiltración y nanofiltración) y procesos de oxidación avanzada. Estos sistemas son considerados como los más apropiados para eliminar concentraciones traza de contaminantes emergentes. Entre los procesos que se han empleado para eliminar diversos tipos de CE, los procesos de oxidación avanzada, los cuales generan radicales hidroxilos en cantidades suficientes para ser capaces de oxidar la mayoría de los compuestos químicos complejos presentes en aguas residuales. Entre estos procesos se incluyen la cavitación (generada tanto por medios de irradiación ultrasónica como por medio de constricciones del fluido empleando válvulas, orificios o salidas venturi, entre otros), la oxidación fotocatalítica (usando radiación UV o luz solar en la presencia de catalizadores semiconductores) y química de Fenton (usando reacciones entre iones Fe y peróxido de hidrógeno) (Gogate y Pandit, 2004).

Se reportan estudios de oxidación avanzada, que usan una combinación de ozono con otros agentes oxidantes (radiación UV, peróxido de hidrógeno, TiO_2) para mejorar la degradación de productos farmacéuticos polares y metabolitos (Petrovic y col., 2003). Entre los métodos de oxidación avanzada, la fotocátalisis heterogénea es la más estudiada. Este proceso utiliza fotocátalisis nanoestructurada para maximizar la generación de fotones y reactivos. Este proceso tiene ventajas tales como el bajo precio y la estabilidad química de la mayoría de los fotocatalizadores utilizados (Rodrigo-Prieto, 2012).

Por otro lado, se han utilizado procesos de oxidación avanzada como ozono con peróxido de hidrogeno ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$) para tratar ibuprofeno y diclofenaco, aquí se logró la eliminación del 90% de estos compuestos (Zwiener y col., 2000). También carbamazepina fue eliminada por completo por un sistema solar combinado con fotocátalisis y $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ y O_3 (Andreozzi y col., 2002). De igual manera se ha

utilizado O_3 con UV para tratar fragancias, metabolitos reguladores líquidos, bloqueadores y estrógenos (Ternes y col., 2003). Los procesos avanzados son una opción para el tratamiento de contaminantes emergentes, sin embargo, la desventaja se presenta en cuanto a un alto costo comparado con los procesos biológicos, sin embargo, el uso de un proceso avanzado utilizándolo como pre-tratamiento o post-tratamiento puede mejorar la biodegradabilidad de aguas residuales o lograr una casi completa eliminación, respectivamente (Gogate y Pandit, 2004).

6.6.3 TRATAMIENTOS COMBINADOS.

Se han realizado diversas investigaciones que contemplan la combinación de procesos de oxidación con biológicos, resaltando su gran potencial ante el problema del tratamiento de aguas contaminadas difíciles de descontaminar por procesos convencionales fisicoquímicos/biológicos y con el prometedor objetivo de reutilizar esa agua y contribuir con el medioambiente (Gogate y Pandit, 2004; Mantzavinos y Psillakis, 2004). Para el tratamiento de remoción de penicilina se ha implementado ozonación y perozonación ($O_3 + H_2O_2$) a diferentes concentraciones antes de someter el efluente a un tratamiento biológico de lodos activados, el resultado de esta investigación ha sido la eliminación del 83% de DQO no biodegradable (Arsla y col., 2004). De igual manera se realizó un tratamiento satisfactorio de sustancias estrógenas en un proceso combinado de ozonación y reactor de lecho móvil después de haberse sometido a un tratamiento convencional de lodos activados (Gunnarsson y col., 2009). Para el tratamiento de un común precursor farmacéutico como es el α -metilfenilglicina se ha utilizado el proceso de foto-fenton adicionado con H_2O_2 como pre-tratamiento a un reactor de biomasa inmovilizada lográndose eliminar hasta el 95% del carbono orgánico total, del cual el 33% corresponde al sistema de oxidación avanzada y el 62% al tratamiento biológico. En este mismo sistema combinado también se estudió la eliminación de ácido nalidíxico (perteneciente al grupo de los Quinolonas) lográndolo eliminar totalmente en tan solo 190 minutos (Sirtori y col., 2009). La degradación de 4-clorofenol a una

concentración inicial de 400 mg/l se realizó en un sistema de fotocátalisis heterogénea utilizando TiO_2 en suspensión como pre-tratamiento a un sistema biológico anaerobio de lodos activados. Al final del tratamiento combinado se logró una completa mineralización del contaminante (Goel y col., 2010). Una mezcla de cinco plaguicidas: metomil, dimetoato, oxamil, cimoxalin y pirimetanil fue mineralizada en un sistema combinado de oxidación avanzada y un proceso biológico. Se utilizó un sistema solar de oxidación por fotocátalisis con TiO_2 y fotofenton en reactores compuestos para alcanzar la biodegradabilidad de un agua residual en un reactor de biomasa inmovilizada (IBR), aquí se logró una mineralización de más del 90% de cada pesticida y una completa nitrificación (Oller y col., 2007).

6.6.4 PROCESOS BIOLÓGICOS

También están los métodos de biorremediación, los cuales son tecnologías sostenibles que tiene la capacidad de reducir la carga de contaminantes en suelos y agua, empleando organismos biológicos (algas, microorganismos, etc.) (Beevi, 2020). Estos procesos se refieren a la tecnología que aprovecha las virtudes de las plantas de tratamiento de aguas residuales y de los organismos microscópicos que se encuentran en estas, para la eliminación, reducción, acumulación y degradación de contaminantes en suelos y aguas (Chaker y col., 2017). Los procesos biológicos se han descrito como la tecnología más viable en el tratamiento de aguas residuales, sin embargo, sólo producen una eliminación parcial de contaminantes emergentes, los cuales en la mayoría son descargados a los efluentes de dichas plantas de tratamiento.

Los tratamientos convencionales como sistemas de lodos activados o filtros biológicos percoladores pueden rápidamente convertir diversos compuestos orgánicos en biomasa que posteriormente, por medio de clarificadores, serán separados. Sin embargo, no sucede lo mismo con moléculas como las pertenecientes a los contaminantes emergentes. En el agua residual de una planta de tratamiento en Suiza se encontraron compuestos como diclofenaco, naproxeno

y carbamazepina, que fueron removidos con una eficiencia de eliminación del 69, 45 y 7%, respectivamente (Tixier y col., 2003). También se realizó la degradación de plaguicidas (isoproturon, terbutilazina, mecoprop y metamitrona) a nivel laboratorio, donde se alcanzó un 98.9% de eliminación, pero con un largo tiempo de adaptación de los lodos activados. En una planta de tratamiento de aguas residuales convencional, el hallazgo de estos compuestos representa una desventaja ya que la utilización de plaguicidas es realizada durante un corto periodo y cuando el lodo activado recibe una carga de estos contaminantes no se encuentra aclimatado para una eliminación satisfactoria (Nitscheke y col., 1999). Tras un largo período de aclimatación (alrededor de 4 meses) se observó a nivel de laboratorio en reactores batch, la eliminación del plaguicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético donde se obtuvo prácticamente una completa eliminación (>99%) (Mangat y col., 1999). En otro estudio se estimó que cerca del 60-65% de compuestos nonilfenólicos, que contenía un efluente de una planta de tratamiento de agua, no sufrían transformación y fueron descargados al medio ambiente, donde el 19% representaban a derivados caboxilatados, 11% a nonilfenol etoxilado lipofílico y nonilfenol dietoxilado el 25% de nonilfenol y 8% como nonilfenol etoxilado (Ahel y col., 1994).

6.7 CONTAMINANTES EMERGENTES Y LOS MICROORGANISMOS

Debido a su alta diversidad metabólica, los microorganismos son capaces de vivir en una gran variedad de hábitats naturales, lo cual les permite aprovecharse de cualquier nicho ecológico. Además, debido a la intensa competitividad existente en el medio ambiente, han diseñado estrategias para sobrevivir como, por ejemplo, el metabolizar de forma más rápida los nutrientes que los demás microorganismos, así como producir ácidos, antibióticos u otras sustancias que inhiban el crecimiento de los otros. En ambientes no competitivos con condiciones extremas de temperatura, salinidad o acidez, los microorganismos necesitan características fisiológicas especiales que les permiten vivir (Iranzo y col., 2001).

La biorremediación de zonas contaminadas se basa en estas inmensas capacidades metabólicas del mundo microbiano, que les permiten transformar

contaminantes orgánicos que han sido fabricados por los humanos, en compuestos inofensivos o al menos, en otros menos peligrosos. Este proceso se lleva a cabo por los microorganismos autóctonos, principalmente bacterias, del medio afectado. Estas utilizan su potencial enzimático para mineralizar (biodegradar completamente hasta CO₂) los compuestos orgánicos o bien simplemente degradarlos hasta productos intermedios, ya sea en un ambiente aerobio o anaerobio. En otras ocasiones las transformaciones co-metabólicas llevadas a cabo por enzimas que metabolizan simultáneamente otros compuestos como fuente de carbono son las responsables de la biodegradación (Sánchez y Gallego, 2005; Hua y col., 2010; Masciandaro y col., 2013).

En cualquier caso, los procesos suelen tener lugar mediante una gran variedad de interacciones biogeoquímicas entre los componentes del suelo, el agua, los microorganismos y los contaminantes. La capacidad intrínseca de asimilación de un medio depende de las habilidades metabólicas de los microorganismos nativos, del tipo de contaminante y lógicamente de la geoquímica y la hidrogeología en la zona (Gallego y col., 2006). A pesar de ello, las condiciones ambientales locales podrían ser desfavorables para los microorganismos. En algunos casos, la comunidad microbiana que está presente de forma natural en una zona contaminada no muestra el apropiado potencial metabólico para la degradación y la completa mineralización de la sustancia en moléculas más pequeñas y estables (Fantroussi y Agathos, 2005; Festa y col., 2016). Existen microorganismos resistentes a contaminantes emergentes que usan por ejemplo los PPCPs como fuente de carbono y energía, permitiendo de esta manera una degradación eficaz y amable con el medio ambiente. Lin y col. (2015) demostraron que dos cepas de *Pseudomonas sp* aisladas de lodos activados de aguas residuales de plantas de tratamiento son capaces de eliminar 75% de cefalexina en 12 horas. Domaradzka y col. (2015) reportaron que *Planococcus sp.* presenta la habilidad de degradar 75.14±1.71 de naproxeno a una concentración inicial de 6 mg/L en presencia de glucosa como fuente adicional de carbón.

Grenni y col. (2014), Wojcieszynska y col. (2014) y Marco-Urrea y col. (2010) demostraron que *Beta-proteobacterias* y *Planctomycetes*; *Stenotrophomonas*

maltophilia KB 2 y *Trametes versicolor*, respectivamente, tienen la habilidad para degradar naproxeno. Rodarte-Morales y col. (2012) sugieren que el hongo *Phanerochaete chrysosporium* es útil para degradar completamente diclofenaco e ibuprofeno bajo diferentes condiciones de aireación. Otros resultados muestran que es necesario incrementar y fortalecer los estudios que involucren a comunidades degradadoras de PPCPs utilizando diferentes mezclas y a concentraciones variadas que es como verdaderamente se encuentran en el medio ambiente (Wu y col., 2015).

Un enfoque prometedor es la estrategia de cosustrato, donde se proporciona un cosustrato fácil de biodegradar para los microbios en el sistema de biotratamiento. La estrategia de cosustrato se ha aplicado con éxito en mejorar la biodegradación de múltiples contaminantes orgánicos refractarios, como benculfurón, tricloroetileno, bifenol (Heidari y col., 2017) y tetrabromobifenol A (Fan y col., 2017). Los investigadores han verificado que la disponibilidad de co-sustrato acelera las reacciones de oxigenación y regula al alza la expresión de enzimas funcionales, acelerando la biodegradación y mineralización de compuestos refractarios (Tang y col., 2015). Además, un cosustrato como donante de electrones promovió crecimiento de la biomasa proporcionando una fuente de carbono y energía (Kim y col., 2014).

También se han encontrado factores como la población microbiana, la biodisponibilidad de los compuestos diana y los fenómenos co-metabólicos, afectan la biodegradación de algunos microcontaminantes. La aclimatación de la biomasa favoreció la biodegradación de diclofenaco, diazepam y estrógenos (Carballa y col., 2006), lo que indica que la abundancia de microorganismos degradadores de microcontaminantes es un factor crucial para su eliminación en los digestores. Según Shin y col. (2010), la biodisponibilidad deficiente puede llevar a una biodegradación limitada de algunos éteres de bifenilo polibromados (PBDE) en digestores, una observación consistente con resultados previos mostró que hay una concentración umbral, por debajo de la cual no puede tener lugar el proceso de deshalogenación (Cho y col., 2003). Por otro lado, la biodegradación en digestores se observó sólo a bajas concentraciones, posiblemente debido a la inhibición

causada a los microorganismos en concentraciones más altas de estos compuestos (Angelidaki y col., 2004). La coexistencia de una fuente de carbono fácilmente biodegradable mejoró la degradación anaeróbica de NP (Chang y col., 2005) debido a la estimulación del metabolismo general. También se han informado resultados similares para otros grupos de microcontaminantes (Barret y col., 2010a). Finalmente, las propiedades fisicoquímicas de los compuestos objetivo, así como las características del lodo (Paterakis y col., 2012) también parecen desempeñar un papel importante en la biodegradación anaeróbica, lo que afecta la biodisponibilidad de los microcontaminantes y la accesibilidad de carbono fácilmente biodegradable a los microorganismos (Barret y col.,2012)

7.- MARCO METODOLOGICO

Compuestos emergentes

Se eligieron amoxicilina y triclosán como compuestos para analizar su biorremediación mediante poblaciones microbianas aisladas de muestras de lodos. Estos compuestos son representativos del grupo de farmacéuticos y agentes en productos de cuidado personal, respectivamente. La amoxicilina usada fue grado analítico (Sigma Aldrich, A8523-5G), pureza > 95%. El triclosán utilizado fue grado reactivo del proveedor DPS mexicana, con una pureza reportada por el proveedor > 97%. Esta pureza fue confirmada mediante cromatografía de líquidos usando como compuesto de referencia, triclosán grado Pharmaceutical Secondary Standard – Certified Reference Material (Sigma Aldrich, PHR1338).

Aislamiento y mantenimientos de poblaciones microbianas

Las poblaciones microbianas utilizadas fueron aisladas de los lodos presentes en dos digestores que forman parte de proceso de tratamiento de aguas residuales instalado en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S. C. (CIDETEQ), dentro de la Unidad Sanfandila. Se tomó una muestra (1 L) de lodos del digestor aerobio y otra muestra (1 L) de lodos presentes en el digestor anaerobio. Se midió el pH de ambas muestras, que fueron mantenidas a 4°C hasta su procesamiento.

El mantenimiento de las poblaciones se realizó mediante resiembras sucesivas en dos medios de cultivo líquidos diferentes, en condiciones aerobias y anaerobias. El medio líquido 1 (ML1) fue medio Luria Bertani, con una composición de 15 g/L de peptona de caseína, 10 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl. El medio líquido 2 (ML2) fue caldo nutritivo (37 g/L del preparado, marca BIOXON). Los medios de cultivo 1 y 2 fueron esterilizados en autoclave, a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, fueron inoculados con poblaciones del digestor aerobio y mantenidos a 30°C, 150 rpm. Los medios de cultivo 1 y 2 inoculados con poblaciones del digestor anaerobio fueron mantenidos a 30°C, en condiciones

estáticas. Cada 72 h se llevaron a cabo resiembras del cultivo de mantenimiento en medios de cultivo frescos.

Para la obtención de los inóculos usados en cada experimento de biorremediación de CE, se llevó a crecimiento 1 mL de los cultivos de mantenimiento usando los mismos medios ML1 y ML2 frescos, esterilizados en autoclave. Las condiciones de cultivo de los inóculos fueron 30°C y 150 rpm para poblaciones aerobias y 30°C - sin agitación para poblaciones anaerobias, ambos durante 24 h.

Análisis cromatográfico

Se estandarizó una técnica cromatográfica que permitiera el análisis de la concentración de amoxicilina y triclosán. La fase móvil A fue ácido fórmico (0.1 %) y la fase móvil B fue acetonitrilo. Se realizaron variaciones en la proporción de las fases móviles desde 80:20 hasta 92:8. Se inició con un flujo de 0.5 ml/min haciendo variaciones hasta 0.2 mL/min, que junto con la proporción de solventes en la mezcla de fases móviles permitieran obtener separaciones de los compuestos analizados para su correcta cuantificación e identificación. Se obtuvieron curvas estándar para cada compuesto (amoxicilina y triclosán) usando compuestos de referencia, con una concentración inicial en la solución stock de 100 mg/L y haciendo al menos 8 diluciones seriadas. Cada dilución fue analizada por duplicado y los valores de concentración obtenidos fueron ajustados para obtener la ecuación modelo y el valor de ajuste (R^2).

Todos los análisis cromatográficos fueron llevados a cabo en un equipo de UPLC ("Ultra Performance Liquid Chromatographic", UPLC, Waters) acoplado a bomba cuaternaria y auto-muestreador refrigerado. La columna utilizada fue una ACQUITY UPLC BEH C18 Columna, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm. El equipo usado tiene un horno para columnas que fue mantenido a 30°C. El volumen de inyección fue de 10 µL. Los compuestos seleccionados muestran espectros de absorción a $\lambda = 230$ y 280, para amoxicilina y triclosán, respectivamente, por lo que se usó un detector de arreglo de diodos, que permitiera analizar las muestras en un rango de detección de 200-400 nm. Los datos cromatográficos fueron obtenidos y procesados mediante el software Empower3 (Waters).

Análisis de la biorremediación de los CE en cultivos líquidos

Los medios líquidos utilizados fueron preparados usando como medio base una solución de buffer de fosfatos pH = 7 (39% de solución monobásica y 61% de solución dibásica, aforada a 200 mL). La solución monobásica incluye fosfato de sodio monobásico 0.2 M. La solución dibásica incluye fosfato de sodio dibásico 0.2 M. Cada medio líquido fue suplementado con 0.1% de extracto de levadura (BIOXON) y 0.1% de caldo nutritivo (BIOXON). Se usaron 200 mL de cada medio de cultivo en matraces de 1 L. Cada medio fue esterilizado en autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Los medios estériles fueron inoculados con 1 mL de cultivo (inoculo) preparado previamente (24 h) de acuerdo con lo descrito en la sección 6.2.

Los CE para evaluar fueron adicionados en los medios de cultivo estériles, dentro de una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad, desde una solución stock, de la que se tomaron 4 mL para cada matraz. La concentración inicial de amoxicilina fue de 25 mg/L y para triclosán fue de 10 mg/L. Además, se evaluaron concentraciones de 50 y 30 mg/L para amoxicilina y de 30 y 20 mg/L de triclosán, para determinar las máximas concentraciones soportadas sin efecto negativo para las poblaciones microbianas.

Las condiciones analizadas para el proceso de biorremediación fueron 30°C y 150 rpm para el crecimiento de poblaciones aerobias, mientras que fueron de 30°C sin agitación, y con adición de gas nitrógeno (10 min) para el cultivo de las poblaciones anaerobias. Los experimentos se dejaron desarrollar hasta alcanzar una disminución en la concentración inicial del 100% para amoxicilina y del 70% para triclosán. Se tomaron muestras (2 mL) a las 2, 4, 5, 6 y 7 h del inicio del experimento para medir la concentración del CE presente mediante cromatografía de líquidos. Las muestras para analizar mediante UPLC fueron centrifugadas y filtradas usando una membrana de nylon (0.2 µm). Se determinó la biomasa presente mediante medición de la densidad óptica del caldo de cultivo (600 nm) en un espectrofotómetro Thermo scientific Genesys 10s UV-Vis Spectrophotometer. Las condiciones evaluadas para la biorremediación de los CE seleccionados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones experimentales para analizar la biorremediación de los CE.

Medio De Cultivo	Inoculo	Código	RPM	Temperatura	Amoxicilina	Triclosán
Buffer de fostatos con 1 % Extracto de levadura	Poblaciones aerobias	A1 BF+EL	150	30	25 mg/L	10 mg/L
Buffer de fostatos con 1 % Caldo nutritivo	Poblaciones Aerobias	A2 BF+CN	150	30	25 mg/L	10 mg/L
Buffer de fostatos con 1 % Extracto de levadura	Poblaciones anaerobias	E1 BF+EL	0	30	25 mg/L	10 mg/L
Buffer de fostatos con 1 % Caldo nutritivo	Poblaciones anaerobias	E2 BF+CN	0	30	25 mg/L	10 mg/L

Como experimentos control se utilizaron medios de cultivo sin inocular con las poblaciones aisladas, pero con la adición de cada CE seleccionado que permitiera evaluar la degradación de los CE debido a las condiciones experimentales. También se usaron como cultivos control, medios de cultivo sin la adición de los CE pero que si fueron inoculados con las poblaciones microbianas para evaluar el crecimiento de los microorganismos sin la presencia del CE. Todos los experimentos control se mantuvieron bajo las mismas condiciones experimentales. Estas condiciones control se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones control para analizar la biorremediación de los CE.

Condiciones experimentales control						
Medio De Cultivo	Inoculo	Código	RPM	Temperatura	Amoxicilina	Triclosan
Buffer de fostatos con 1 % Extracto de levadura	Poblaciones aerobias	A3 BF+EL	150	30	0	0
Buffer de fostatos con 1 % Caldo nutritivo	Poblaciones aerobias	A4 BF+CN	150	30	0	0
Buffer de fostatos con 1 % Extracto de levadura	Sin inoculo	A5 BF+EL	150	30	25 mg/L	10 mg/L

Buffer de fostatos con 1 % Extracto de levadura	Sin inculo	A6 BF+CN	150	30	25 mg/L	10 mg/L
Buffer de fostatos con 1 % Extracto de levadura	Poblaciones anaerobias	E3 BF+EL	0	30	0	0
Buffer de fostatos con 1 % Caldo nutritivo	Poblaciones anaerobias	E4 BF+CN	0	30	0	0
Buffer de fostatos con 1 % Extracto de levadura	Sin inculo	E5 BF+EL	0	30	25 mg/L	10 mg/L
Buffer de fostatos con 1 % Caldo nutritivo	Sin inculo	E6 BF+CN	0	30	25 mg/L	10 mg/L

Análisis de la concentración intracelular de los CE

De acuerdo con los resultados previos y bajo las condiciones de cultivo donde se alcanzó la mayor remoción del CE, se prepararon medios de cultivo (50 mL) usando una solución de buffer de fosfatos (pH = 7) suplementada con 0.1% de caldo nutritivo. Este medio de cultivo fue inoculado como se describe en 6.2. Después de 12 h de cultivo (condiciones aerobias o anaerobias) se tomó una muestra (1 mL) para cuantificar la concentración del CE. Si la concentración del CE disminuyó al menos en un 75% entonces se detuvo el experimento.

El caldo de cultivo obtenido fue centrifugado (5000 rpm, 10 minutos, 25°C). Se tomó 1 mL del sobrenadante, se filtró en membrana de nylon (0.2 µm) para cuantificar la concentración del CE mediante UPLC. La pastilla celular obtenida fue resuspendida en 20 mL de buffer de potasio (10 mM), para agitación en un vortex durante 10 minutos. Esta solución fue centrifugada (5000 rpm, 10 minutos, 25°C). Finalmente, se cuantificó la concentración de los CE en el sobrenadante obtenido. Este proceso fue repetido 3 veces.

El paquete celular obtenido al final fue resuspendido en 20 mL de buffer de fosfatos (pH = 7), y sometido a un tren de tratamientos físicos que incluyó: a) proceso térmico de congelación (-10°C) de las soluciones con células resuspendidas y posteriormente calentamiento a 70°C, este proceso se repitió 2 veces; b) la solución

con células resuspendidas se llevó a sonicación (vibración) durante 30 minutos, en un equipo Brandson 1800; después, c) se realizó una ruptura celular (15 minutos) usando perlas de vidrio colocadas en la solución de células resuspendidas. Finalmente, la solución obtenida fue centrifugada durante 20 minutos a 7000 rpm para separar el sobrenadante y cuantificar la concentración presente de cada CE mediante UPLC.

8.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis cromatográfico

De acuerdo con lo publicado por Martha y col. (2015), se podría cuantificar amoxicilina y triclosán usando como fases móviles buffer de fosfatos (fase móvil A) y acetonitrilo (fase móvil B), en una proporción 80:20. Sin embargo, al evaluar tales condiciones no se logró la definición de un perfil cromatográfico adecuado. Considerando una posible determinación mediante un detector de masas, se modificó la fase móvil A agregando ácido fórmico para ionizar los compuestos a evaluar. Así la fase móvil A fue considerada como ácido fórmico al 0.1%. Se consideró como proporción inicial de las fases móviles A:B la misma evaluada al inicio de la estandarización (80:20) y el flujo de trabajo de 0.5 mL/min. Sin embargo, tales condiciones no permitían obtener perfiles cromatográficos definidos para la identificación/cuantificación de los CE seleccionados (Figura 3). Por lo que se realizaron cambios en las proporciones de las fases móviles hasta llegar a 92:8 y un flujo de trabajo de 0.2 ml/min, para obtener picos definidos (Figura 4) que permitieron la identificación del compuesto y su cuantificación.

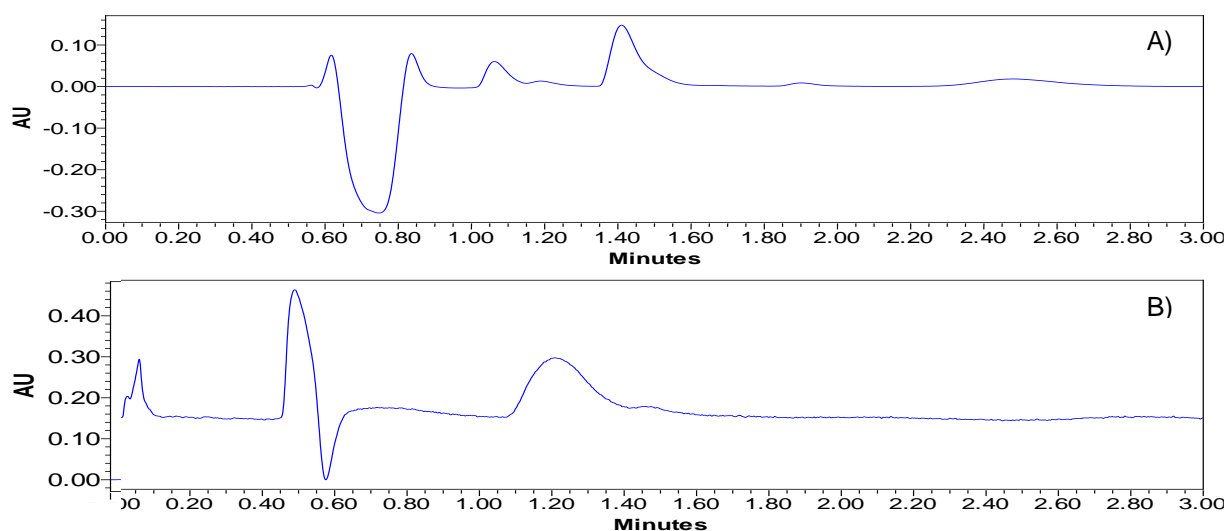


Figura 3 . Cromatogramas obtenidos antes de la optimización de condiciones cromatográficas. Amoxicilina (A) y triclosán (B).

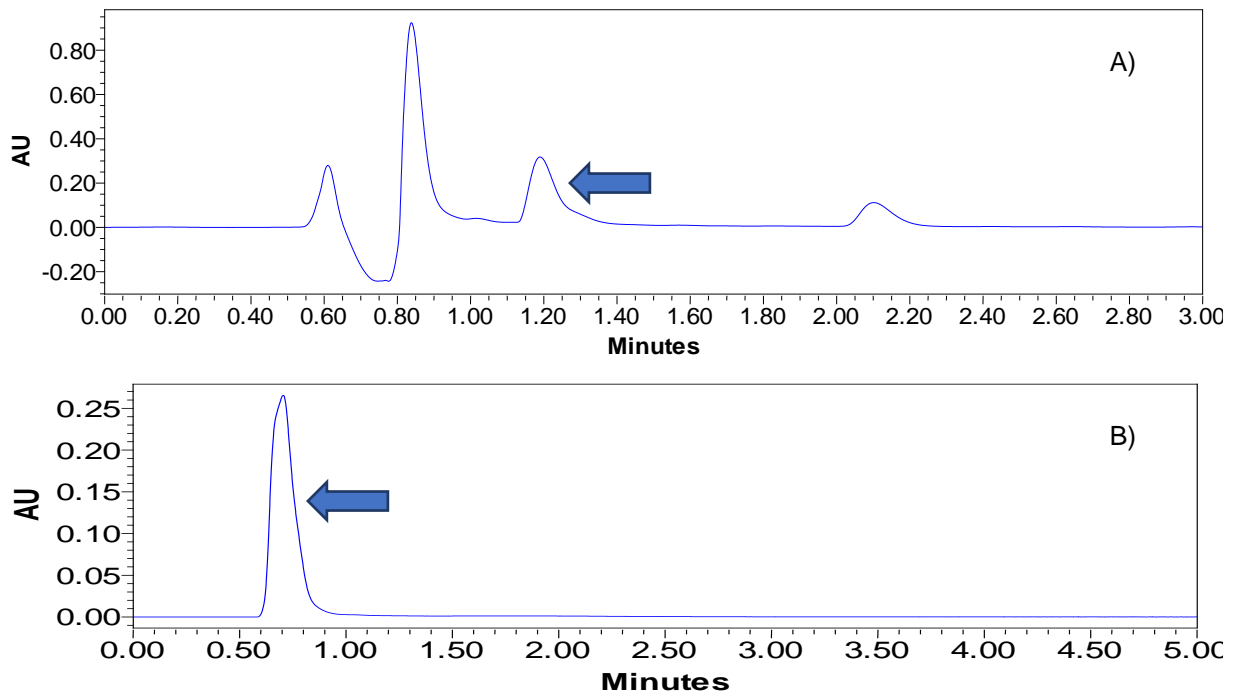


Figura 4. Cromatogramas finales, después de la optimización de condiciones cromatográficas. Amoxicilina (A) y triclosán (B).

Con tales condiciones cromatográficas de trabajo se realizaron curvas estándar para cada compuesto, que permitieran la cuantificación de la concentración de los CE durante los análisis de biorremediación usando poblaciones microbianas aisladas. La curva estándar para amoxicilina se presenta en la Figura 5 con un valor de $R^2 = 0.99$. mientras que la correspondiente a triclosan se presenta en la Figura 6 con un valor de $R^2 = 0.99$.

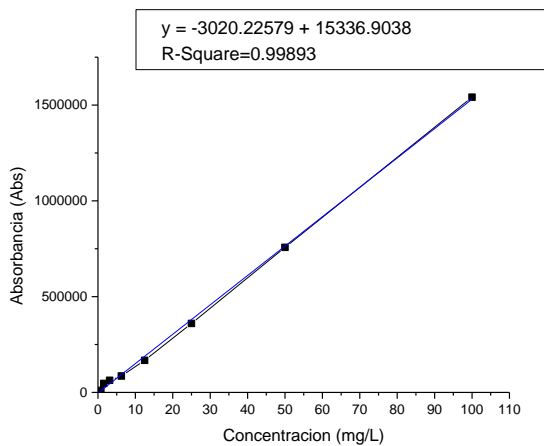


Figura 5. Curva de calibración de amoxicilina.

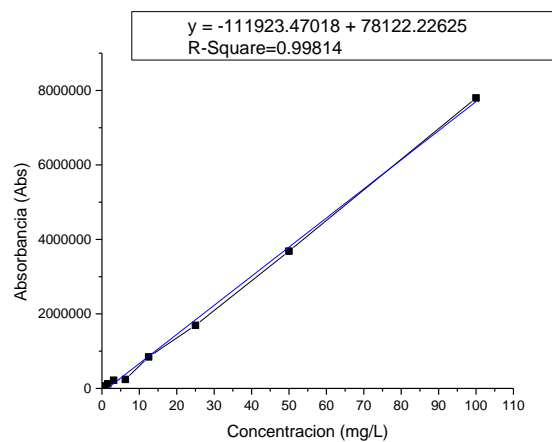


Figura 6. Curva de calibración de triclosán.

Análisis de la biorremediación de amoxicilina en cultivos líquidos

Actualmente se ha estudiado una amplia gama de sistemas biológicos capaces de eliminar antibióticos y productos de cuidado personal, los cuales han reportado eficiencias de eliminación alrededor del 10-90%, lo cual nos indica que los procesos de biodegradación que incluyen lodos activados son una estrategia eficiente en la eliminación de los CE (Xu y col., 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que la remoción del 100% de amoxicilina se alcanzó en 7 h, para ambos sistemas, con agitación y en condiciones estáticas. En la Figura 7a y 7b, se observan los cambios de la concentración inicial con respecto al tiempo, alcanzando una velocidad de degradación del compuesto de $v = 5.54$ mg/h para los cultivos que fueron agitados, mientras que en cultivos no agitados se obtuvo una $v = 0.83$ mg/h. Estas diferencias en la velocidad de remoción sugieren un comportamiento más eficiente de las poblaciones cultivadas en condiciones aerobias.

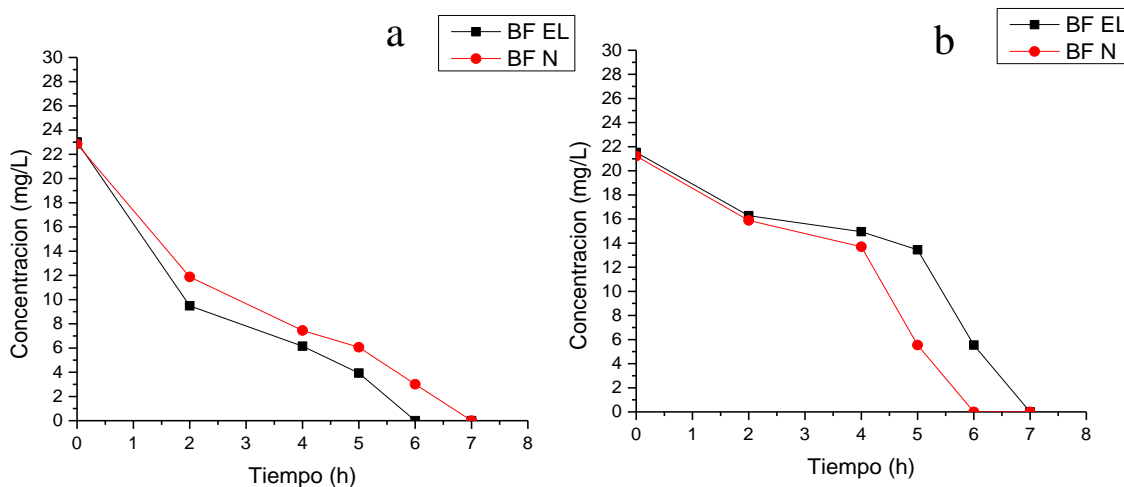


Figura 5. Degradación de amoxicilina (25 mg/l) en dos condiciones de incubación a) 150 rpm y 30°C y b) 0 rpm y 30°C.

De acuerdo con la metodología propuesta, se evaluaron concentraciones más altas que las usadas en los experimentos de biorremediación de los compuestos, para determinar que la concentración utilizada no tuviera efectos negativos sobre el crecimiento de las poblaciones. A concentraciones de 50 y 30 mg/L, no se obtuvo

crecimiento celular de las poblaciones. En los estudios relacionados con procesos biotecnológicos para el tratamiento de amoxicilina, se han usado concentraciones superiores, en un rango de 250 - 50 mg/L, con porcentajes de remoción máximo 50 - 20%. Las concentraciones usadas para estos experimentos donde el crecimiento celular no se ve afectado por los porcentajes de CE aplicados fueron, en el caso de amoxicilina de 25 mg/L. Estas concentraciones se utilizaron para los experimentos de biorremediación de estos compuestos.

Los sistemas de cultivo usados en este trabajo proponen el uso de un medio a base de sales (fosfato de sodio dibásico y monobásico). Estos medios salinos permiten obtener un medio isotónico para mantener la integridad de las células, además de proporcionar estabilidad en los valores de pH. Además, diversos autores han mencionado que el uso de co-sustrato o suplementación con sustratos simples facilitan la biodegradación, actuando como fuente de energía y donante de electrones, disponiendo sistemas que mejoran la biorremediación, biotransformación y/o mineralización de diversos contaminantes emergentes, como amoxicilina y triclosán (Zhang y col., 2021; Xiong y col., 2018, Wang y col., 2019; Ma y col., 2018).

En este trabajo, las dos fuentes de carbono, de alta disponibilidad, usadas como suplementos adicionados al medio salino base (fosfatos) fueron extracto de levadura (Bioxon) y caldo nutritivo (Bioxon). Ambos suplementos fueron adicionados al 0.1% para promover el acondicionamiento y crecimiento de las poblaciones microbianas aisladas de los lodos de una PTAR. Pruebas preliminares mostraron que en los experimentos control donde no se agregó el suplemento no se observó crecimiento celular en ninguna condición usando medio salino. Los resultados obtenidos que se muestra en las Figuras 7 y 8, donde se colocó una concentración inicial de 25 mg/L de amoxicilina, indican que los medios salinos suplementados elegidos tuvieron un efecto positivo para la remoción de CE, ya que en los experimentos en agitación (150 rpm) donde se adicionó extracto de levadura alcanzaron la máxima biorremediación del antibiótico en 6 h, mientras que en los medios suplementados con caldo nutritivo fueron de 7 h. Caso contrario sucedió en

los sistemas mantenidos en condiciones estáticas, donde los medios suplementados con extracto de levadura alcanzaron el 100% de biorremediación hasta las 7 h, y de 6 h para los medios donde se adicionó caldo nutritivo.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se pueden comparar con los controles, los cuales fueron buffer de fosfatos (pH = 7) suplementados con extracto de levadura al 0.1% y caldo nutritivo al 0.1%, usando 25 mg/L de amoxicilina. Ambos experimentos fueron sin inocular el consorcio microbiano. En el segundo conjunto de experimentos control se usó buffer de fosfatos (pH = 7) suplementado con extracto de levadura al 0.1% y caldo nutritivo al 0.1%, sin amoxicilina e inoculado con las poblaciones microbianas aisladas de los lodos de la PTAR. Todos los experimentos control fueron mantenidos en condiciones de cultivo usando agitación (150 rpm) y sin agitación, a 30 °C. Los resultados obtenidos de estos experimentos control muestran degradación nula de amoxicilina, indicando que las condiciones de cultivo no afectan la degradación del compuesto emergente (Figura 8a y 8b).

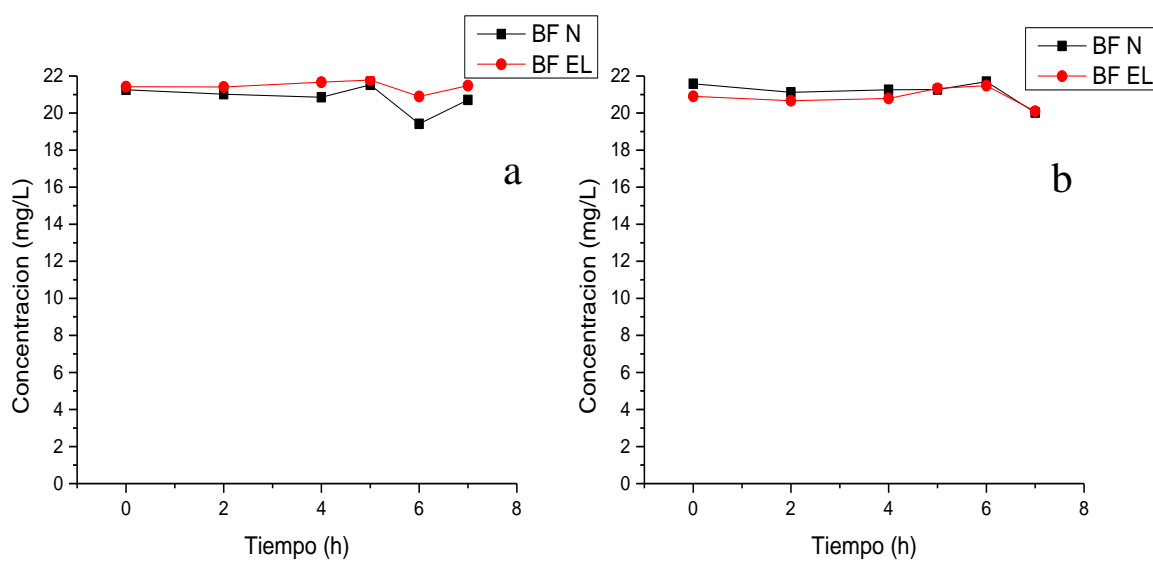


Figura 6. Controles experimentales. Buffer de fosfatos (pH = 7) suplementado con extracto de levadura al 0.1% y caldo nutritivo al 0.1% con una concentración de 25 mg/L de amoxicilina sin inocular en dos condiciones de 8a) 150 rpm a 30 °C (8a) y 0 rpm a 30°C (8b).

La biodegradación de amoxicilina depende de varios parámetros ambientales, como la temperatura, el pH, las fuentes de nitrógeno y carbono, el tiempo de retención de sólidos (SRT) y la actividad microbiana (Cyncon y col., 2019). Las bacterias *Rhodococcus* B30 (Githinji y col., 2011) y *Microcystis aeruginosa* (Liu y col., 2012) han sido reportadas en sistemas que degradan amoxicilina. En aquellos procesos donde se llevan a cabo procesos de biodegradación de compuestos emergentes combinados, se tienen reportes que indican hasta la degradación de 17 antibióticos, donde la amoxicilina mostró una degradación parcial con la formación de metabolitos estables, mientras que la penicilina mostró una degradación del 87% (Gartiser y col., 2007). Entonces, las bacterias que sobreviven y prosperan en presencia de amoxicilina pueden aprovecharse para eliminar este compuesto, por ejemplo, algunas especies de los géneros *Stenotrophomonas* y *Alcaligenes* pudieron eliminar la amoxicilina en medios mínimos M9 en 14 días, confirmando los productos de degradación y detectando los metabolitos, mediante LC-MS/MS, incluidos aquellos como el ácido benzoico y el ácido penicílico (Sondhi y col., 2020). Otras bacterias reportadas para la degradación de amoxicilina son las productoras de betalactamasas, como *Enterobacter* sp., *Corynebacterium* sp. (degradando 43%), *Bacillus subtilis* (degradando 76.7%), *Flavobacterium* sp. (degradando 41%), *Acinetobacter lwoffii* (degradando 74.3%). Resulta importante resaltar, la eficiencia de *Pseudomonas aeruginosa* para la degradación de este CE, en concentraciones de hasta 60 ppm y porcentajes de degradación de 77.8%. Otros géneros bacterianos señalados como útiles en la degradación de amoxicilina son *Escherichia coli*, *Achromobacter* sp., *Vibrio* sp. y *Micrococcus* sp. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se indica que la eficiencia de las cepas aisladas de los lodos activados de la PTAR es mejor que los trabajos publicados, ya que lograron bioremediar el 100% de la concentración de amoxicilina agregada al inicio del experimento. Es importante continuar con los estudios de las vías microbianas usadas para la degradación de antibióticos, porque algunos géneros bacterianos han sido señalados con resistencia a amoxicilina, entre otros fármacos, por ejemplo: *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*,

Acinetobacter (Zhang y col, 2009) y *Helicobacter* (Qureshi y col., 2011) y algunas cepas de especies como *Staphylococcus aureus* (Jury y col., 2010) y *Escherichia coli* (Briñas y col., 2002), lo que hace más difícil el desafío de eliminar antibióticos del medio ambiente usando sistemas microbianos.

Mediante un análisis de los trabajos previos se encontró que diversas tecnologías publicadas para la degradación de amoxicilina incluyen largos tiempos de operación, así como porcentajes de degradación que van de 20 a 80%, mientras que este trabajo reporta tiempos de hasta 5 veces más rápidos en comparación con los publicados, y que se logró remover el total de la concentración inicial usada (Tabla 6). Se ha reportado que la amoxicilina es resistente a *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Proteus*. Otras especies bacterianas reportadas como útiles en la remoción de antibióticos son *Staphylococcus aureus* (Jury y col., 2010), *Escherichia coli* (Briñas y col., 2002), *Acinetobacter* (Zhang y col., 2009), *Helicobacter pylori* (Qureshi y col., 2011), por lo que es un gran desafío eliminar los antibióticos del medio ambiente.

Tabla 6. Comparación de la degradación de amoxicilina en diferentes sistemas biológicos.

Condición operativa	Tiempo	Porcentaje de remocion	Referencia
Reactor de lodo anaeróbico de flujo ascendente UASB	23.2 h	21.6	Wang y col., 2009
Reactor de lodo anaeróbico de flujo ascendente UASB	23.5 h	20.2	Chen y col., 2011
Reactor de acidificación por hidrolisis micro aeróbica	9.3 h	20.4	Chen y col., 2011
Sistema de lodos activados cíclica	14.9 h	68.2	Chen y col., 2011

Tanque de oxidación por contacto biológico	14.9 h	80.6	Chen y col., 2011
Aerobio + CN	6 h	100	Este trabajo
Aerobio + EL	7 h	100	Este trabajo
Estatico + CN	7 h	100	Este trabajo
Estatico + EL	6 h	100	Este trabajo

Análisis del crecimiento de las poblaciones en presencia de amoxicilina

En este trabajo se realizaron experimentos de crecimiento microbiano midiendo la densidad óptica (mediante absorbancia a 600 nm) utilizando medios salinos suplementados con 0.1% de extracto de levadura y 0.1% en caldo nutritivo en condiciones de agitación (150 rpm) y en condiciones estáticas en presencia amoxicilina, dejando incubar el experimento hasta la completa degradación del CE. Los resultados de estos experimentos en presencia de amoxicilina fueron los presentados en las Figuras 9a y 9b. En el caso donde se usaron condiciones de agitación y medio suplementado con extracto de levadura, la densidad óptica alcanzada fue de 0.5, en un tiempo de 7 h, mientras que, en el medio salino suplementado con caldo nutritivo, la densidad óptica fue de 0.155. En condiciones estáticas con el mismo tiempo de incubación, usando un medio de cultivo de buffer de fosfatos suplementado con extracto de levadura, la densidad óptica fue de 0.205 y de 0.198 para el medio suplementado con caldo nutritivo.

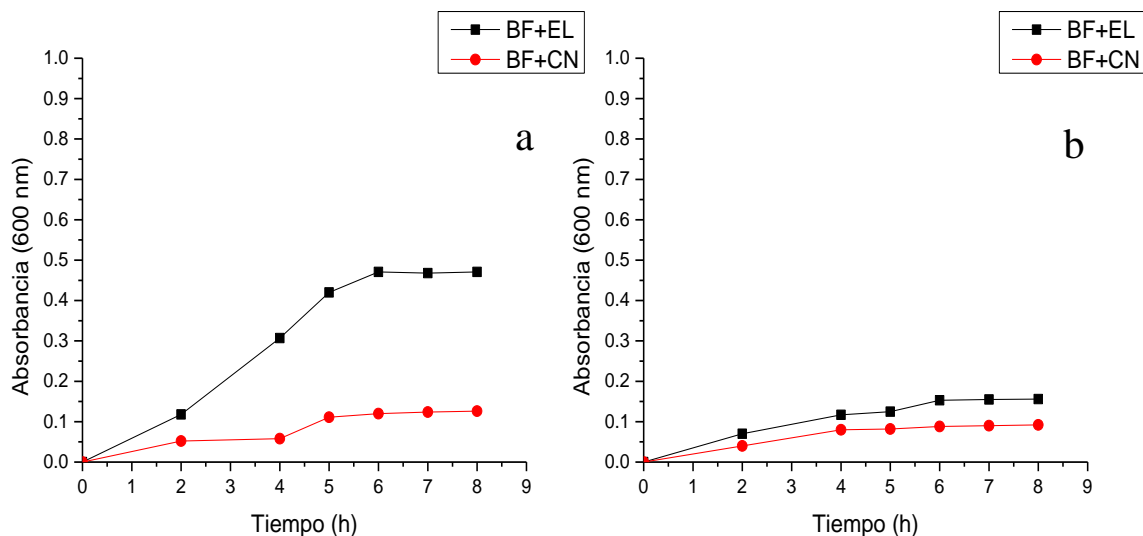


Figura 7 Crecimiento de las poblaciones microbianas aisladas de una PTAR en presencia de amoxicilina, con un medio soporte de buffer de fosfatos suplementado con extracto de levadura y caldo nutritivo al 0.1 % en dos condiciones de cultivo, a) 150 rpm a 30°C y b) 0 rpm a 30°C.

Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos en los experimentos control, donde se utilizó buffer de fosfatos pH 7, suplementado con extracto de levadura y caldo nutritivo al 0.1% sin inocular (Figura 10a y 10b). Se puede observar que, en el control experimental del cultivo suplementado con extracto de levadura en condiciones de agitación, la densidad óptica fue de 0.159 O.D. a las 7 h, mientras que el experimento donde estuvo el CE (25 mg/L) la densidad óptica fue 3 veces mayor, por lo que el fármaco no inhibe el crecimiento de las poblaciones microbianas presentes, sugiriendo que puede ser utilizado como fuente de carbono para el crecimiento del inóculo. Caso contrario sucede donde se utilizó suplementación con caldo nutritivo en condiciones estáticas donde la densidad óptica pasa de 0.209 para el control experimental hasta a 0.09 en el experimento donde se agregó la concentración inicial de 25 mg/L, relacionado entonces que bajo estas condiciones la presencia del fármaco resulta inhibitoria del crecimiento de las poblaciones microbianas presentes. Para las condiciones control suplementadas con caldo nutritivo en condiciones de agitación y suplementadas con extracto de levadura en estático, los valores de densidad óptica no presentaron algún cambio

significativo, lo que nos indica que el fármaco no influye estos casos al crecimiento de las poblaciones.

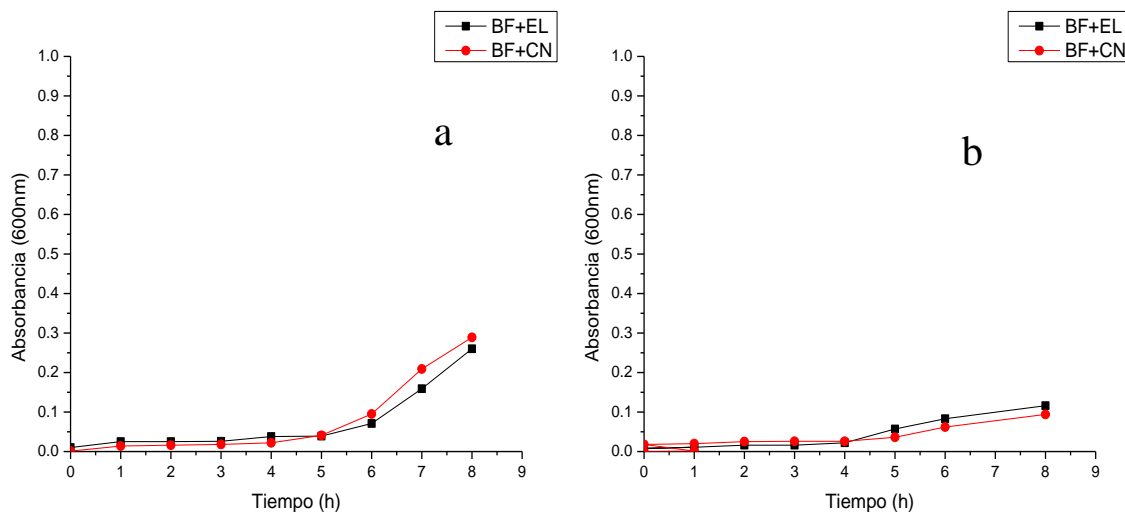


Figura 8. Controles experimentales de cinéticas de crecimiento de las poblaciones microbianas aisladas de una PTAR, con un medio soporte de buffer de fosfatos suplementado con extracto de levadura y caldo nutritivo al 0.1 % en dos condiciones de cultivo, a) 150 rpm a 30°C y b) 0 rpm a 30°C sin amoxicilina.

El análisis conjunto de los resultados obtenidos para el crecimiento de las poblaciones y degradación del CE, en aquellos medios donde se utilizaron buffer suplementado con extracto de levadura o caldo nutritivo (agitación), indica que la duración de la etapa de latencia fue de 2 h en las cuales hubo una degradación del 21% y 6% respectivamente. La siguiente fase de crecimiento identificada fue la exponencial que tuvo una duración de 5 h para los dos medios suplementados, durante la cual también se alcanzó el 100 % de la degradación concluyendo a las 7 h. Después de este tiempo, se observa la etapa estacionaria de crecimiento de las poblaciones microbianas. Los valores de densidad óptica relacionados con el crecimiento microbiano son diferentes para cada medio suplementado, de 0.5 (O.D.) para el medio suplementado con extracto de levadura y de 0.155 (O.D.) para los medios suplementados con caldo nutritivo (Figura 11).

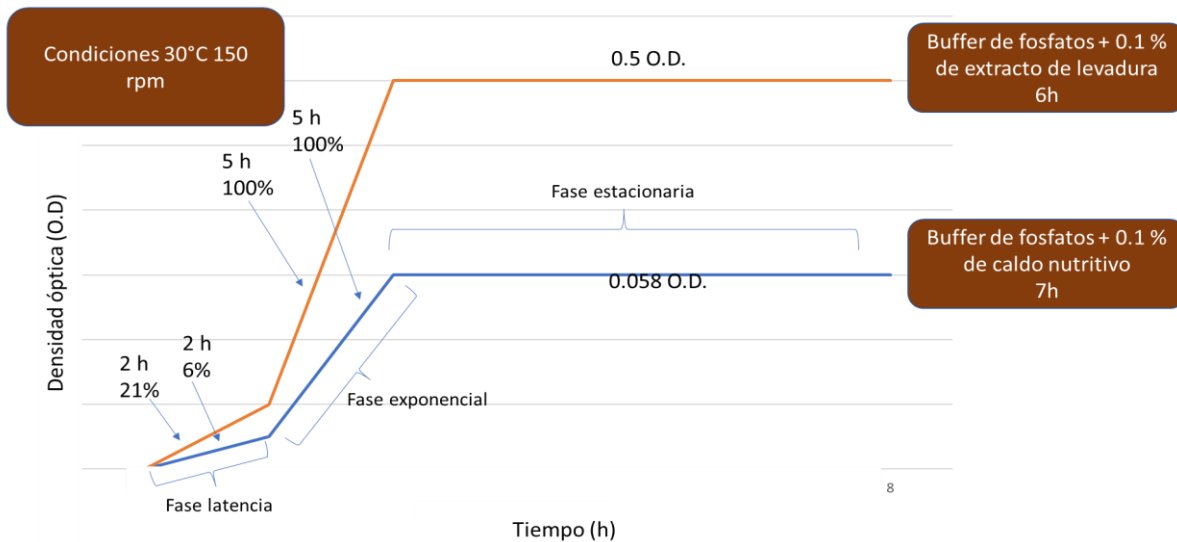


Figura 9. Fases de degradación y crecimiento en presencia de amoxicilina (25 mg/L) en condiciones de agitación.

El mismo análisis fue realizado al crecimiento y valores de degradación del CE, en cultivos sin agitación (Figura 12). Los resultados indican que los tiempos de las fases de latencia y exponencial fueron similares a los obtenidos en condiciones de agitación (2 y 5 h), sólo cambiaron los porcentajes de remoción, siendo de 35.4% para los cultivos de poblaciones en medios suplementados con extracto de levadura y de 37.4% para cultivos en medios suplementados con caldo nutritivo. Al igual que en condiciones de agitación, se alcanzó la degradación del CE al final de la etapa exponencial. Después de las 7 h de cultivo, en todos los medios suplementados, se obtuvo la fase estacionaria de crecimiento, con diferencias en los valores de la concentración de microorganismos, cuantificados por densidad óptica. En aquellos medios suplementados con extracto de levadura se alcanzó una D.O. = 0.125, y de D.O. = 0.09 para los medios suplementados con caldo nutritivo.

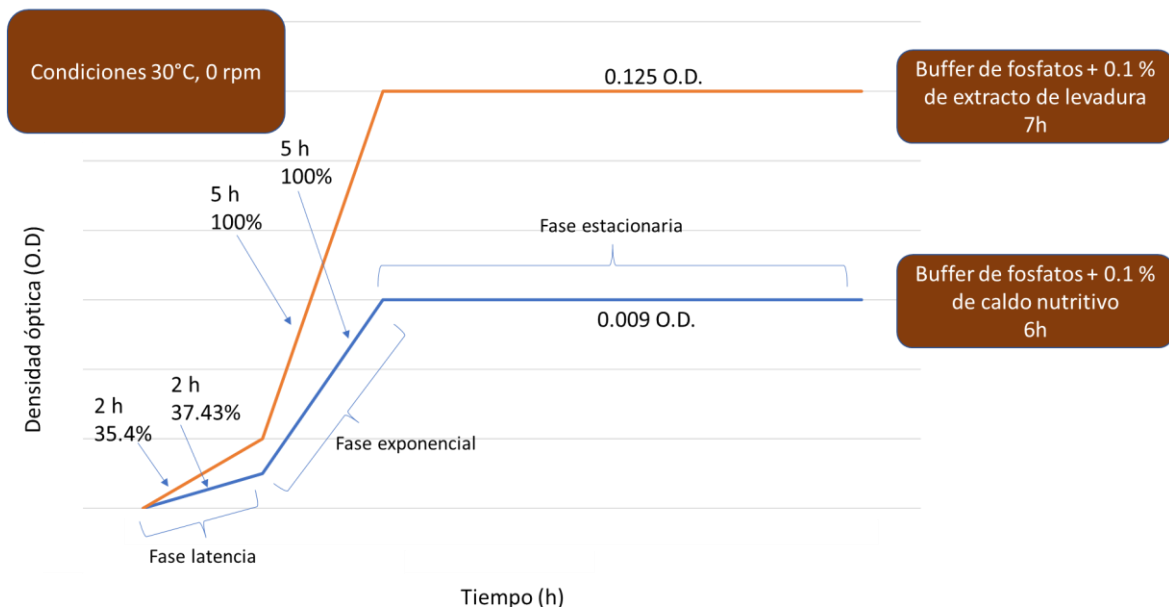


Figura 10. Fases de degradación y crecimiento en presencia de amoxicilina (25 mg/L) en condiciones estáticas.

Análisis del crecimiento de las poblaciones en presencia de triclosán

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una degradación del 74% en un tiempo de 24 h, en los dos sistemas evaluados, en agitación (150 rpm) y sin agitación, a una temperatura de 30°C. En las Figuras 13a y 13b, se observan cambios en las concentraciones iniciales con respecto al tiempo, alcanzando una velocidad de degradación del compuesto de $v = 0.07$ mg/L para los cultivos en agitación, y para los cultivos en estático se obtuvo una velocidad de degradación de $v = 0.08$ mg/L. Estas diferencias en la velocidad de remoción sugieren que el comportamiento en ambas condiciones es similar.

De acuerdo con la metodología propuesta se evaluaron concentraciones más altas que las usadas en los experimentos de biorremediación de triclosán, para determinar que la concentración utilizada no tuviera efectos negativos sobre el crecimiento de las poblaciones. A concentraciones de 30 y 20 mg/L, no se obtuvo crecimiento celular de las poblaciones. En los estudios relacionados con procesos

biotecnológicos para el tratamiento de triclosán, se han usado concentraciones superiores, en un rango de 10 – 700 mg/L, con porcentajes de remoción máximos de 20 - 70%. La concentración usada para estos experimentos donde el crecimiento celular no se ve afectado por los porcentajes de CE aplicados fue en el caso de triclosán de 10 mg/L.

Al igual que en los experimentos para estudiar la biorremediación de amoxicilina, en el caso de la biorremediación de triclosán se usaron medios a base de sales de fosfato (medios isotónicos) para mantener la integridad de las células y condiciones de pH estables, así como, suplementación con sustratos (extracto de levadura y caldo nutritivo, 0.1%) que faciliten la biorremediación, biotransformación y/o mineralización de contaminantes emergentes, como el triclosán (Zhang y col., 2021; Xiong y col., 2018; Wang y col., 2019; Ma y col., 2018).

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 13a y 13b, donde se colocó una concentración inicial de 10 mg/L de triclosán, indican que los medios salinos suplementados elegidos tuvieron un efecto positivo para la remoción de CE, ya que en los experimentos en agitación (150 rpm) donde se adicionó extracto de levadura alcanzaron una concentración máxima del 68% de biorremediación del CE en 24 h, mientras que en los medios suplementados con caldo nutritivo la remoción fue del 74%, en un tiempo de 24 h.

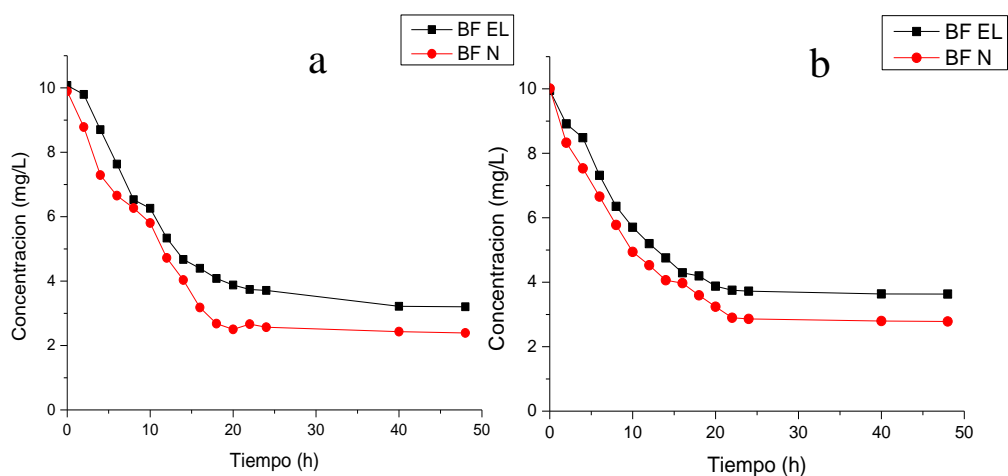


Figura 11. Degradación de triclosán (10 mg/L) en dos condiciones de incubación, a) 150 rpm a 30°C y b) 0 rpm a 30°C.

En el caso de los sistemas mantenidos en condiciones estáticas, donde los medios salinos fueron suplementados con extracto de levadura, se alcanzó un porcentaje de biorremediación del 60% en 24 h, y del 72% en 24 h, para los medios donde se adicionó caldo nutritivo. Los resultados obtenidos en estos experimentos se pueden comparar con los controles (Figura 14a y 14b), los cuales fueron buffer de fosfatos (pH = 7) suplementados con extracto de levadura y caldo nutritivo (0.1 %, ambos) con 10 mg/L de triclosán sin inocular y como segundo control buffer de fosfatos (pH = 7) suplementados con extracto de levadura y caldo nutritivo (0.1 %, ambos) sin triclosán e inoculado con las poblaciones microbianas aisladas de los lodos de la PTAR. Las condiciones de cultivo fueron en agitación a 150 rpm y sin agitación, a 30 °C. En todos estos experimentos se obtuvo una nula degradación de triclosán, por lo que podemos inferir que las condiciones no afectan a la degradación del compuesto (Figura 14a y 14b).

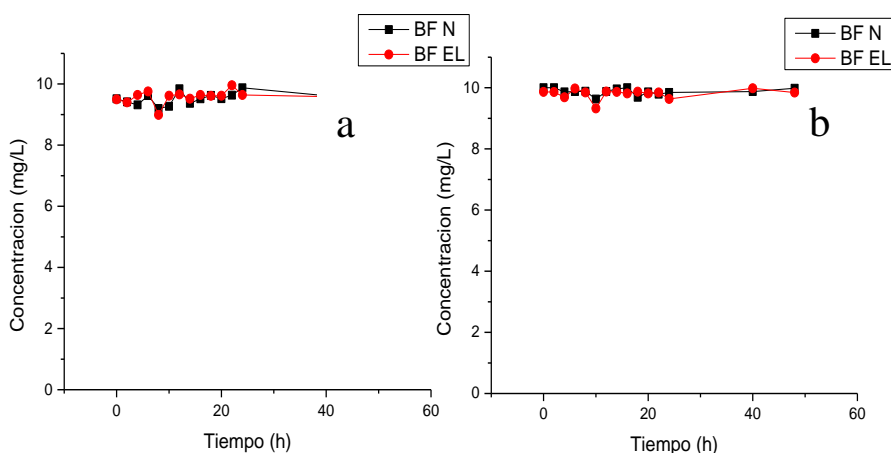


Figura 12. Controles experimentales: Buffer de fosfatos pH 7 suplementado con extracto de levadura al 0.1 % y caldo nutritivo al 0.1 % con una concentración de 10 mg/L de triclosán sin inocular en dos condiciones 8a) 150 rpm, 30 °C y 8b) 0 rpm, 30°C.

Estudios realizados para la degradación de triclosán en sistemas de lodos activados realizados en laboratorio demostraron que este compuesto puede degradarse rápidamente en condiciones aerobias, mientras que es bastante persistente en condiciones anaerobias y anoxicas. Estudios previos usando con lodos activados

han reportado biodegradación de este compuesto del 61 al 91%, con una concentración inicial de 0.1 mg/L (Stasinakis y col., 2010), mientras que un estudio que comenzó con 5 mg/L informó una eliminación del 99.8% (Chen y col., 2015). En reactores de lodos activados estáticos sin alimentación a escala de laboratorio en condiciones aeróbicas, los porcentajes de eliminación de triclosán fueron relativamente bajos (75 - 86%) cuando la concentración inicial fue baja ($\leq 0,5$ mg/L) y alcanzaron valores más altos ($> 99\%$) cuando la concentración inicial era alta (≥ 1 mg/L) (Chen y col., 2011). Stasinakis y col. (2010) demostraron la importancia del tiempo de retención de lodos (SRT), porque la operación con SRT = 20 d produjo una mayor remoción de los compuestos de interés que la operación con SRT = 3 - 20 d. Armstrong y col. (2018) informaron que la eliminación de triclosán mejora con el aumento del tiempo de retención hidráulica (HRT), SRT y la temperatura en el sistema de lodos activados. Chen y col., (2011) realizaron experimentos de incubación de lodos activados a escala de laboratorio en condiciones aeróbicas, anaeróbicas y anóxicas y reportaron la eliminación de triclosán en un 49% en 80 h. Comparado con los resultados obtenidos en este trabajo la degradación de triclosán alcanza una degradación similar a lo reportado en diferentes estudios de eliminación de este compuesto, la diferencia radica en el TRH donde el tiempo de incubación es de 24 h donde se alcanza la degradación máxima, en comparación a lo reportado donde el valor de TRH es de alrededor de 2-20 días. Estos resultados sugieren que las poblaciones microbianas en este trabajo son más eficientes en comparación a otras ya reportadas. Además, comparado a otras tecnologías de degradación (Tabla 7) el tiempo de degradación de triclosán es más eficiente el sistema biológico aplicado en este trabajo.

Tabla 7. Comparación de la degradación de triclosán en diferentes sistemas biológicos.

Condición operativa	Tiempo (h)	Porcentaje de remoción (%)	Referencia
Fotocatálisis con ZnO nanoestructurado y óxido de grafeno	3	45	Want y col., 2019
<i>Nannochloris sp</i>	168	90	Zhap y col., 2016
Proceso biotecnológico usando Lacasa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> CS43	12	55	Ngoyeon y col., 2014
Plasma de descarga de barrera dieléctrica combinada con fibras de carbón activado	1	24	García- Morales y col., 2014
Carbón activado granular con Filtrocarb CC60	0.9	90	Dou y col., 2018
Aerobio + CN	24 h	68	Este trabajo
Aerobio + EL	24 h	72	Este trabajo
Estatico + CN	24 h	60	Este trabajo
Estatico + EL	24 h	74	Este trabajo

Análisis del crecimiento de las poblaciones en presencia de triclosán

La resistencia de los microorganismos a múltiples sustancias es un problema de salud pública observado a nivel mundial, en especial después de la aparición y uso masivo de productos de higiene personal. Está generalmente aceptado que la causa de este problema ha sido, y todavía es, el extendido e inapropiado uso de estos productos en la vida cotidiana. Del mismo modo, se ha incrementado el uso de otros agentes antimicrobianos, como los biocidas, que incluyen a los antisépticos y a los desinfectantes. Triclosán se describe como un biocida de amplio espectro, es un agente antimicrobiano que se ha utilizado durante más de 40 años como antiséptico,

desinfectante o conservante en entornos clínicos y en diversos productos de consumo incluyendo cosméticos, materiales de plástico, juguetes, etc. Cuenta con una amplia gama de actividad que abarca muchos, pero no todos, tipos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas no esporulantes, bacterias, algunos hongos como *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*. Sin embargo, algunas bacterias son intrínsecamente resistentes a triclosán, en especial *P. aeruginosa*. Triclosán no es activo contra las endosporas bacterianas, debido probablemente a la estructura Gram-negativa bacteriana y en particular a la membrana externa que impide a triclosán penetrar a través de la bacteria.

En este trabajo se reporta el crecimiento de poblaciones microbianas en presencia de una concentración de 10 mg/L de triclosán, en dos medios de cultivo a) Buffer de fosfatos 0.1% de extracto de levadura y b) buffer de fosfatos 0.1% de caldo nutritivo, los dos medios se incubaron a dos condiciones en agitación (150 rpm, 30°C) y estático (0 rpm, 30°C) (Figura 15a y 15b).

Los resultados de estos experimentos mostraron valores a las 24 h, de 0.5 (O.D) en un tiempo de 24 h, en el medio suplementado con extracto de levadura, mientras que el medio suplementado con caldo nutritivo se alcanzó solo 0.46 (O.D.). Cuando los cultivos se mantuvieron en condiciones estáticas, al mismo tiempo de incubación (24 h), se obtuvieron valores de 0.18 (O.D.) usando extracto de levadura y 0.19 (O.D.) usando caldo nutritivo.

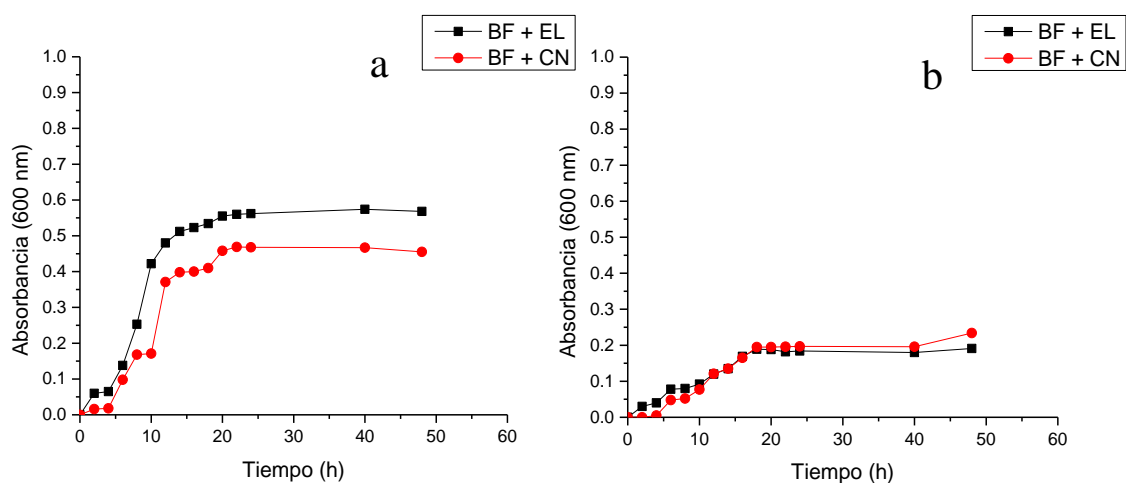


Figura 13. Experimentos de crecimiento microbiano: Buffer de fosfatos pH 7 suplementado con extracto de levadura al 0.1 % y caldo nutritivo al 0.1 % con una concentración de 10 mg/L e inoculado con poblaciones microbianas aisladas de una PTAR.

Los resultados obtenidos se pueden comparar con los obtenidos en condiciones control donde se utilizó buffer de fosfatos (pH = 7), suplementado con extracto de levadura y caldo nutritivo al 0.1% sin inocular (Figura 16 a y b), mostrando que en condiciones de agitación la densidad óptica fue de 0.15 O.D. a las 48 h, mientras que para condiciones estáticas fue de 0.12 (O.D.). Si se comparan estos resultados control con los obtenidos en los experimentos inoculados, el crecimiento celular fue 3 veces mayor, por lo que se puede sugerir que el fármaco induce al crecimiento de las poblaciones microbianas presentes. Resultados contrarios fueron obtenidos para los controles experimentales en condiciones estáticas (Figura 16a y 16b) donde la densidad celular no tuvo cambios en los dos medios suplementados con extracto de levadura y caldo nutritivo, con estos resultados podemos sugerir que estos medios a estas condiciones y concentración de fármaco no tiene algún efecto al crecimiento microbiano.

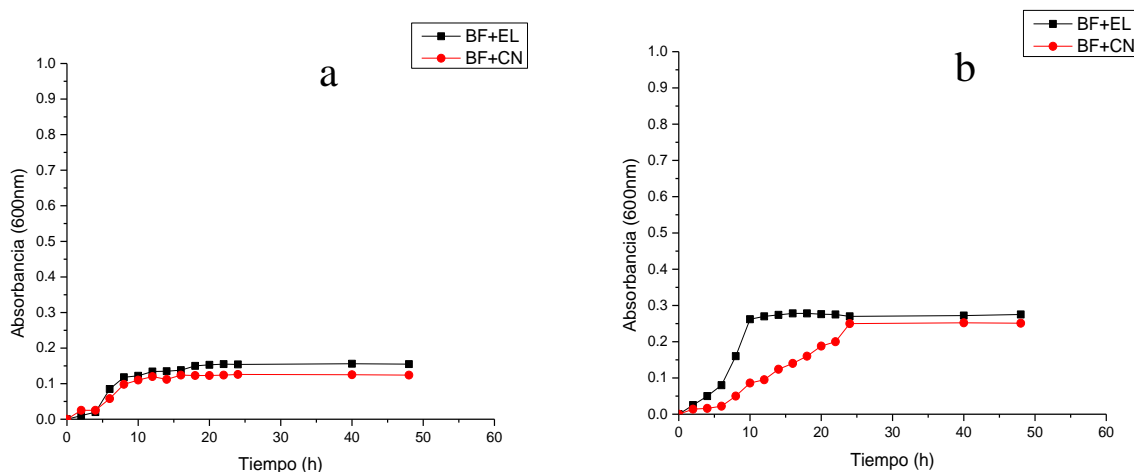


Figura 14. Controles experimentales de crecimiento microbiano: Buffer de fosfatos pH 7 suplementado con extracto de levadura al 0.1 % y caldo nutritivo al 0.1 % con una concentración de 10 mg/L sin inocular.

El análisis de los resultados de crecimiento y degradación del CE mostró que la suplementación de los medios no tiene efecto sobre las diferentes fases de crecimiento obtenidas, solamente sobre la cantidad de biomasa cultivada, ya que para los medios que fueron suplementados con extracto de levadura se alcanzó una D.O. = 0.58 mientras que para los medios suplementados con caldo nutritivo se obtuvieron valores de D.O. = 0.43. En ambos casos, las fases de latencia y exponencial, duraron 5 y 15 h, respectivamente, con ligeras diferencias en los

valores de remoción del CE (Figura 17). Ya que en los medios suplementados con caldo nutritivo se alcanzó el 37.4% de remoción durante la fase de latencia, mientras que sólo fue removido el 35.4% en la misma fase usando medios suplementados con extracto de levadura. El efecto fue inverso durante la fase exponencial, ya que se alcanzó el 55% en los medios suplementados con extracto de levadura, y de 50% para los medios suplementados con caldo nutritivo. Es importante resaltar, que después de las 20 h (fase estacionaria para todos los cultivos suplementados) no se observó aumento en el porcentaje de degradación del compuesto, manteniéndose en 72% para el caso de la suplementación con caldo nutritivo y de tan sólo 68% para los cultivos suplementados con extracto de levadura. Los cultivos fueron dejados en las mismas condiciones de cultivo hasta las 72 h, tomando muestra cada 2 h hasta las 48 h de crecimiento y después cada 6 h hasta las 72 h, sin observar cambios en la degradación del CE.

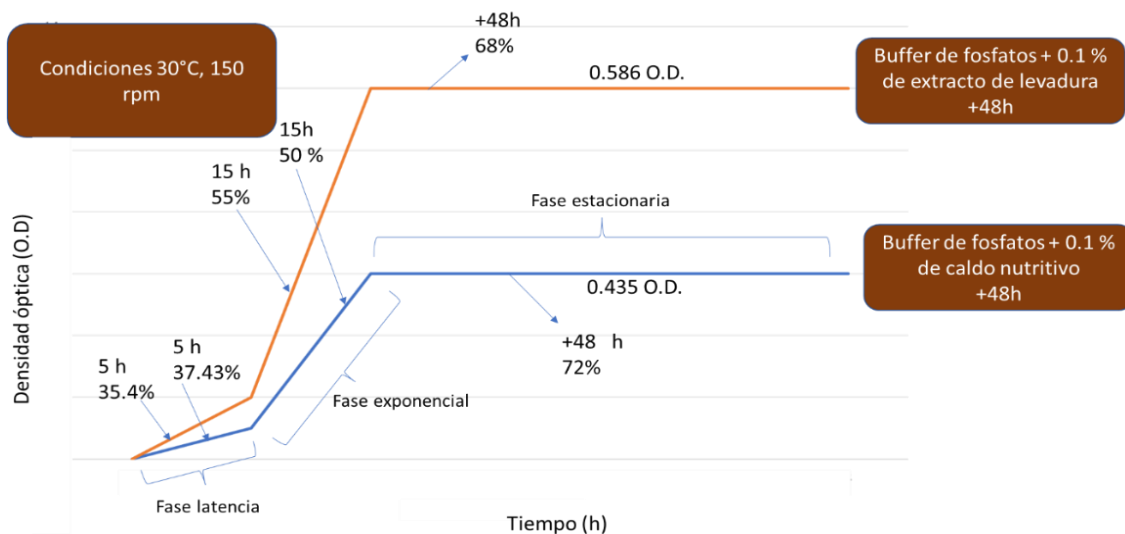


Figura 15. Fases de degradación y crecimiento en presencia de triclosán (10 mg/l) en condiciones de agitación.

Para los resultados obtenidos de crecimiento y degradación en condiciones estáticas con una concentración inicial de 10 mg/L de triclosán, donde se utilizó buffer suplementado con extracto de levadura y caldo nutritivo en condiciones estáticas (Figura 18), se obtuvo que la duración de la etapa de latencia fue de 5 h, obteniéndose una degradación del 35% y del 10%, respectivamente. La etapa exponencial tuvo una duración de 15 h para los dos medios suplementados, alcanzando una degradación del 60% para el medio suplementado con extracto de levadura y del 50% para los medios con caldo nutritivo. Cuando las poblaciones microbianas llegan a la etapa estacionaria (20 h) la degradación de triclosán se detiene en los dos medios utilizados alcanzando una degradación del 60% y 74%, respectivamente. Los valores de densidad celular final fueron de 0.20 O.D. y 0.19 O.D., para medios suplementados con extracto de levadura o caldo nutritivo, respectivamente. Estos cultivos se dejaron en las mismas condiciones hasta las 72 h, sin que hubiera cambios en los porcentajes de degradación de CE.

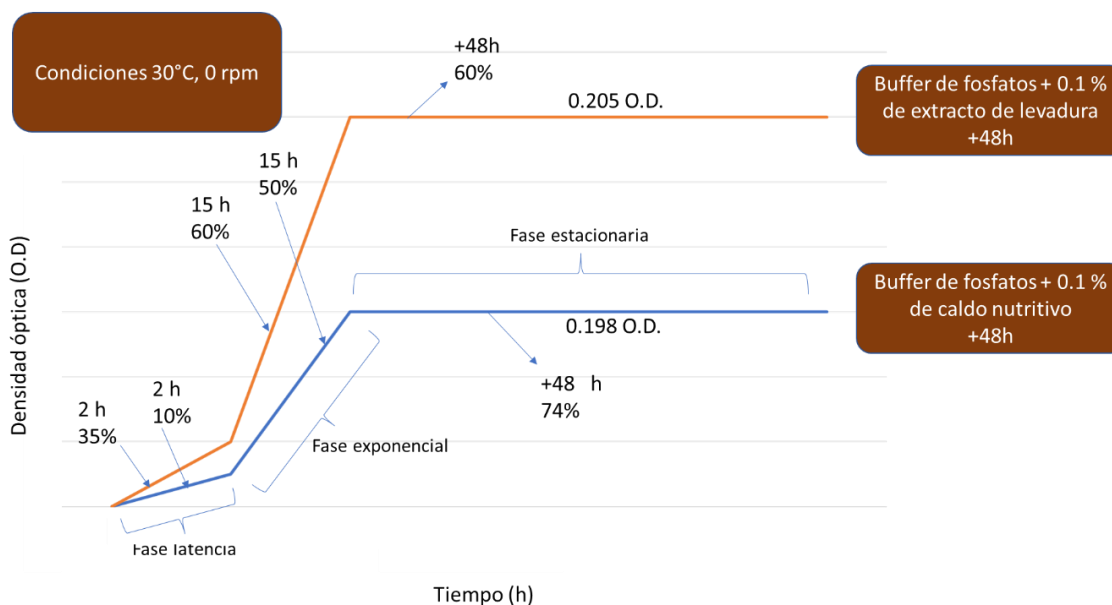


Figura 16. Fases de degradación y crecimiento en presencia de triclosán (10 mg/L) en condiciones estáticas.

Análisis de la bioremediación de amoxicilina extracelular e intracelular

Algunos estudios demuestran que la ruta de biodegradación de amoxicilina por poblaciones microbianas extraídas de lodos de una PTAR es la expresión de enzimas beta lactamasa y aminasa para hidrolisar el compuesto y que este pueda después ser metabolizado dentro de las poblaciones microbianas presentes en los lodos (Zhang y col., 2020). Para determinar si la amoxicilina fue metabolizada por las poblaciones microbianas aisladas en este trabajo se propusieron dos experimentos, considerando que la amoxicilina había sido removida ya que no se encontró su presencia en el medio de cultivo. El primer experimento analizó la presencia de amoxicilina en el ambiente extracelular de las células por medio de lavados de las mismas después de terminar el experimento, y evaluar la concentración del antibiótico (Figura 19). El segundo experimento evaluó la presencia del CE dentro de las células realizando una lisis celular. Estos experimentos se realizaron en los medios de cultivo que degradaron una concentración inicial de 25 mg/L, en las mejores condiciones de degradación del compuesto usando la misma concentración inicial:

- a) en agitación (150 rpm a 30 °C), medio suplementado con extracto de levadura.
- b) sin agitación (30°C), medio suplementado con caldo nutritivo.

Los medios tuvieron un tiempo de incubación de 10 h. Después de este tiempo, se realizó un análisis de cromatografía líquida para cuantificar la amoxicilina residual. Los resultados indicaron que se había eliminado por completo el antibiótico, tal como se demostró en los experimentos de bioremediación. Una vez terminada la degradación se realizaron lavados de células, obteniéndose que en los dos medios suplementados no hubo presencia de amoxicilina residual, con lo que podemos inferir que la amoxicilina no se encontraba adherida en la pared celular de las poblaciones microbianas .

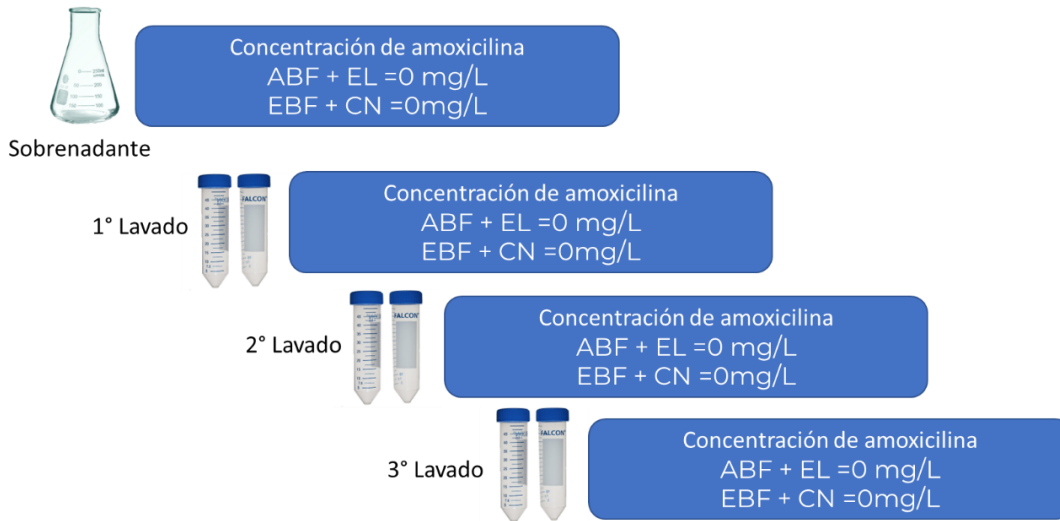


Figura 17. Resultados obtenidos de la cuantificación de amoxicilina después del lavado celular.

Una vez obtenido que los compuestos no estuvieron adheridos en la pared celular, se procedió a cuantificar amoxicilina dentro de las células utilizando un tratamiento de lisis celular, que incluyó tres pasos de ruptura: choque térmico, física y mecánica. Una vez realizada la ruptura celular se procedió a cuantificar amoxicilina por cromatografía de líquidos, encontrándose concentraciones residuales del compuesto. Para el caso donde se utilizó medio suplementado con extracto de levadura (condiciones de agitación) se obtuvo una biomasa final de 18.65 g/L. Esta biomasa fue sometida al proceso de lisis celular, y la concentración de amoxicilina encontrada en el buffer de fosfatos, después de haber realizado la lisis, fue de 2.0036 mg/L. En el caso del cultivo usando un medio suplementado con caldo nutritivo (sin agitación) se obtuvo una concentración de 2.08 mg/L de amoxicilina y después del proceso de lisis celular de 18.3 g/L de biomasa. Estos resultados sugieren que las poblaciones microbianas presentes metabolizan amoxicilina (Figura 20).



Figura 18. Cuantificación de amoxicilina después de la ruptura celular.

Análisis de la bioremediación de triclosán extracelular e intracelular

Los trabajos publicados sobre la remoción de triclosán por procesos biotecnológicos reportan que existen tres vías de degradación de este compuesto:

- 1) **Biosorción:** El TCS tiene un alto coeficiente de partición octanol/agua, y las superficies de los microorganismos son hidrofóbicas con un área de superficie específica alta (Wang y col., 2013). Por lo tanto, los microorganismos suelen ser capaces de adsorber TCS.
- 2) **Biotransformación:** Este proceso biológico ocurre principalmente en hongos y bacterias, y algunas células de algas. El cambio que sufre un compuesto a través de enzimas se le denomina que domina la biotransformación (Wang y col., 2018).
- 3) **Absorción biológica:** La absorción biológica se refiere a que las células microbianas absorben TCS y lo acumulan, pero no lo convierten. Este mecanismo ocurre principalmente en las algas (Lipnick, 1995).

Para determinar la ruta de degradación biológica de triclosán, en este trabajo se realizó el análisis de TCS residual extracelular e intracelularmente (Figura 21). Se consideró que el compuesto se había adherido en la pared de las células de las poblaciones microbianas, por lo que se realizaron lavados de células, en aquellos

cultivo llevados a cabo en las mejores condiciones de degradación del compuesto, con una concentración inicial de 10 mg/L de triclosán y 48 h de cultivo:

- a) en agitación 150 rpm a 30 °C, medio suplementado con extracto de levadura.
- b) sin agitación, 30°C, medio suplementado con caldo nutritivo.

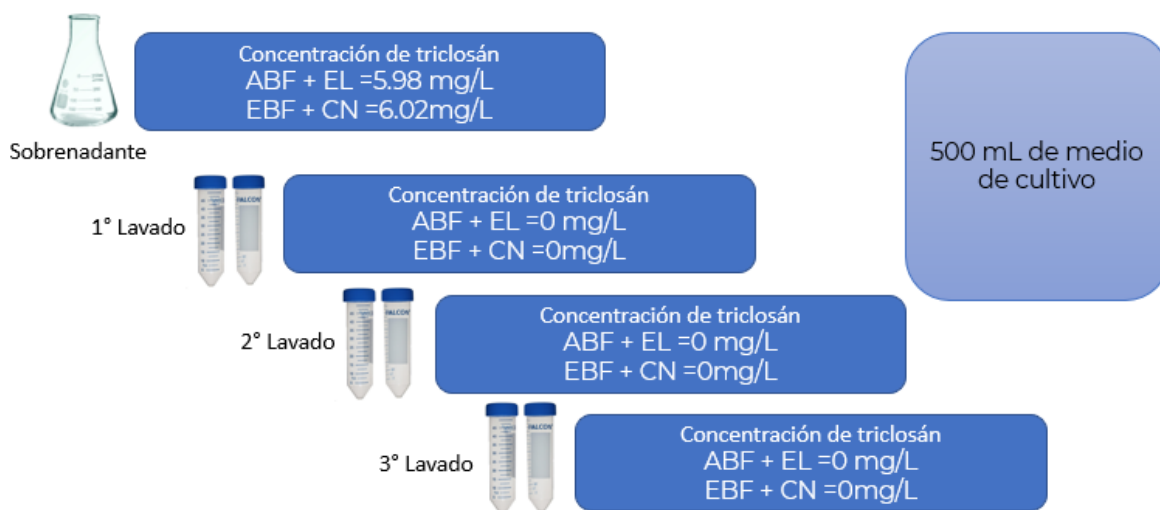


Figura 19. Cuantificación de triclosán después del lavado celular.

Después del tiempo de incubación, se realizó un análisis de cromatografía de líquidos para cuantificar el triclosán residual. Los resultados del experimento indicaron que la degradación del compuesto fue del 72% y 74% de la concentración inicial, respectivamente, como ya se había demostrado en los experimentos de bioremediación realizados anteriormente. Una vez alcanzado el tiempo de mayor degradación, se realizaron los lavados de células. Los resultados obtenidos indicaron que en medios suplementados no se encontró triclosán residual, con lo que podemos inferir que el TCS no se encontraba adherido en la pared celular de las poblaciones microbianas. Este resultado sugiere que la vía de degradación por biosorción se puede descartar.

Lisis celular

Una vez analizado que los compuestos no estuvieron adheridos a la pared celular, se procedió a cuantificar triclosán dentro de las células. Para este caso se realizó el tratamiento de lisis celular, después del cual se procedió a cuantificar el CE por cromatografía de líquidos. Los resultados indicaron la presencia del compuesto en concentraciones residuales. Cuando se utilizó medio suplementado con extracto de levadura (agitación) se obtuvo una biomasa final de 15.64 g/L y una concentración de amoxicilina de 1.64 mg/L. Mientras que en los cultivos usando el medio suplementado con caldo nutritivo se obtuvo una biomasa de 15.26 g/L con una concentración de 1.57 mg/L de amoxicilina (Figura 22). Estos resultados sugieren que las poblaciones microbianas no biacumulan triclosan ya que la concentración final dentro de las células no es igual a la concentración inicial, con lo que podemos inferir que las poblaciones microbianas pueden metabolizar triclosán. Estudios futuros tendrán que determinar los compuestos intermediarios de transformación para asegurar un proceso de biodegradación.

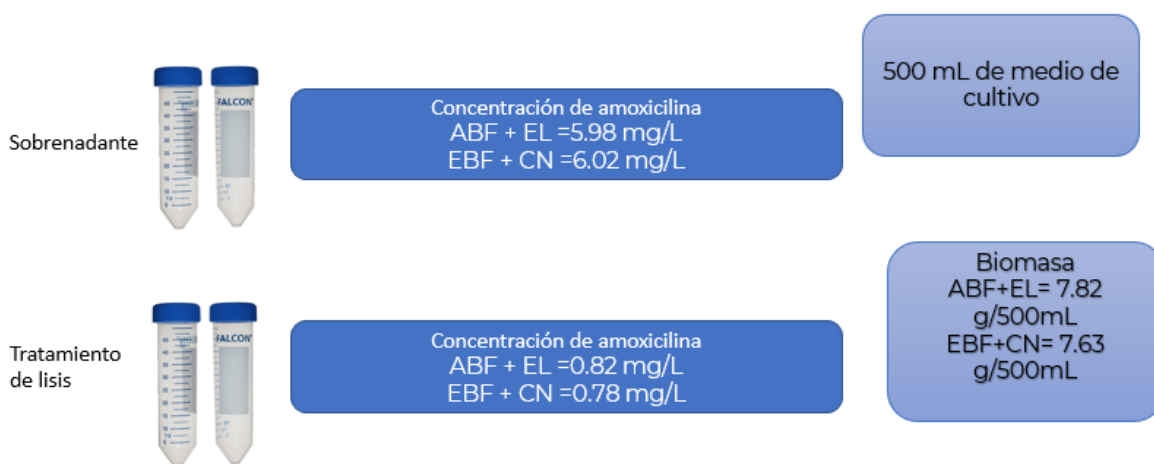


Figura 20. Cuantificación de amoxicilina después de la ruptura celular.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que es factible remover concentraciones iniciales de dos contaminantes emergentes representativos de los grupos de los antibióticos como amoxicilina y del grupo de los farmacéuticos (productos de cuidado personal) como triclosán. La metodología cromatográfica estandarizada fue útil para la cuantificación de ambos compuestos emergentes durante cinéticas de crecimiento bacterianas y de remoción de los compuestos.

Los lodos activados de una PTAR fueron fuente de consorcios bacterianos útiles para la remoción de compuestos, siendo posible aislar consorcios de bacterias con metabolismo aerobio y anaerobio, susceptibles de cultivarse en condiciones de laboratorio. Se obtuvieron diferentes porcentajes de biorremediación de los compuestos emergentes seleccionados dependiente del tipo de cultivo, con agitación y sin agitación. Además, se logró cultivar a tales poblaciones bacterianas en una solución de buffer de fosfatos suplementadas con solamente una fuente de carbono: extracto de levadura o caldo nutritivo. En el caso de la degradación de amoxicilina fue del 100% en un tiempo de 6 - 7 h, para ambos medios suplementados y en las dos condiciones utilizadas, mientras que para el experimento de degradación de triclosán se alcanzó una degradación alrededor del 60 al 70% en un tiempo de 24 h, de manera similar para las dos condiciones, con agitación y sin agitación. De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de la biorremediación intracelular y extracelular, se puede sugerir el tipo de vía de degradación biológica que utilizaron las poblaciones microbianas en cada compuesto.

10. PERSPECTIVAS

Después del análisis de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se recomienda realizar un diseño de experimentos para la optimización de las condiciones de remoción, como una mejora en la eficiencia de biorremediación (tiempo, condiciones de cultivo) de amoxicilina y triclosán.

Se sugiere realizar estudios de metagenómica para estudiar la dinámica de las poblaciones microbianas presentes, o bien, realizar la identificación del género y especies de las bacterias aisladas de los lodos utilizados para la biorremediación de contaminantes emergentes.

También se recomienda estudiar con las vías de degradación de amoxicilina y triclosán de las poblaciones microbianas, así como las interacciones entre el microorganismo, el contaminante emergente y sus intermediarios.

11. REFERENCIAS

- Aus der Beek, T., Weber, F.A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2016. Pharmaceuticals in the environment global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (4), 823–835.
- Baker, V. Očenášková, M. Kviclova, B. Kasprzyk-Hordern, 2012. *Environ. Int.* 48, 28
- Baquero, F.; Martinez, J. & Cantón, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology.* 2008. Vol. 19, No. 3. p. 260-265.
- Barceló, D. & López de Alda, M.J. 2008. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC (Barcelona). <http://www.unizar.es/fnca/varios/panel/15.pdf> (Consultado: 23/04/2020)
- Birnbaum, Linda S. y Staskal, Daniele F., 2004. Brominated Flame Retardants: Cause for Concern? En: *Environmental Health Perspectives.* Vol. 112, N° 1, p. 9-17.
- Biziuk, M., Pryjazny, A., Czerwinski, J. & Wierowski, M. 1996. Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. *J. Chromatogr. A*, 754 (1-2), 103-123.
- C. Zwiener, FH. Frimmel 2000 Residuos farmacéuticos en el medio acuático y su importancia para la producción de agua potable. En: Kümmerer K. (eds) *Pharmaceuticals in the Environment.* Springer, Berlín, Heidelberg.págs. 81-89.

- Campanha, M.B., Awan, A.T., de Sousa, D.N., Grosseli, G.M., Mozeto, A.A., Fadini, P.S., 2015. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (10), 7936–7947.
- Carlos, L., Pedersen, B.W., Ogilby, P.R., Mártire, D.O., 2011. The role of humic acid aggregation on the kinetics of photosensitized singlet oxygen production and decay. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10 (6), 1080–1086.
- Chen X, Nielsen JL, Furgal C, Liu Y, Lolas IB, Bester K, 2011. Biodegradation of triclosan and formation of methyl-triclosan in activated sludge under aerobic conditions. *Chemosphere* 84:452–456.
- Dias, V. y Vymazal, J., 2003. The Use of Aquatic Macrophytes for Wastewater Treatment in Constructed Wetlands. En 1º International Seminar. Instituto nacional da Água, Lisboa, Portugal.
- Díaz-Cruz, D. Barceló, 2015. *Personal Care Products in the Aquatic Environment*, Springer Suiza, 413 p.
- Díaz-Cruz, S., López de Alda, M.J., D. Barceló, 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge TrAC-Trend in Analytical Chemistry. 22, pages 340-351.
- Eggen, Trine; Moeder, Monika y Arukwe, Augustine, 2010. Municipal landfill leachates: A significant source for new and emerging pollutants. En: *Science of the Total Environment*. Vol. 408. Nº 21. p. 5147-5157.
- El Fantroussi, S., Agathos, S.N., 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 268-275.

- Ellis, J., 2006. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. En: *Environmental Pollution*. Vol. 144, No. 1. p. 184-189.
- Esplugas S.; Bila D.M.; Krause L.G.T.; Dezotti M. 2007; Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of Hazardous Materials*. 149: 631-642.
- Ferrari, B.; et al., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid and di-clofenac. En: *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 55, No. 3. p. 359-370.
- Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental, A.C., «Contaminación del agua,» agua.org, 7 junio 2015. [En línea]. Available: <https://agua.org.mx/contaminacion-del-agua>. [Último acceso: 13 enero 2020].
- Fromme, H., Tittlemier, S.A., Völkel, W., Wilhelm, M. & Twarderlla, D. 2009. Perfluorinated compounds – Exposure assessment for the general population in western countries. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.*, 212 (3), 239-270.
- Gago-Ferrero, V. Borova, M. Dasenaki, N. Thomaidis ,2015. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 4287.
- Gallego, J.R., González-Rojas, E., Peláez, A.I., Sánchez, J., GarcíaMartínez, M.J., Llamas, J.F., 2006. Effectiveness of bioremediation for the Prestige fuel spill: a summary of case studies, en: Ubertini, L. (Ed) *Advanced technology in the environmental field*. ACTA Press. 68-73.
- Gerrity, Daniel; Trenholmb, Rebecca y Snyder, Shane, 2011. Temporal variability of pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and the effects of a major sporting event. En: *Water Research*.. Vol. 45. p. 5399-5411.

- Ghadouani A, Coggins LX. Science, 2011. Technology and policy for Water Pollution Control at the Watershed. Scale: Current issues and future challenges. Physics and Chemistry of the Earth. 36:335–341.
- Gogate, Parag & Pandit, 2004. Aniruddha. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. En: Advances in Environmental Research. Vol. 8. p. 501–551.
- González-Mariño, Iria; et al., 2012. Screening and selective quantification of illicit drugs in wastewater by mixed mode solid phase extraction and quadrupole time-of-flight liquid chromatography mass spectrometry. En: Anal Chem. Vol. 84. p. 1708-17.
- Halling-Sorensen, B.; et al., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment, A review. En: Chemosphere. Vol. 36, No. 2. p. 357-393.
- Huber M, Gobel A, Joss A, Hermann N, Loffler D, Mcardell A, Siegrist H, Ternes T y Gunten U, 2005, 2006. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: A pilot study. Environ. Sci. Technol. 39 4290-4299.
- Iranzo, M., Sainz-Pardo, I., Boluda, R., Sánchez, J., Mormeneo, S., 2001. The use of microorganisms in environmental remediation. Ann. Microbiol. 51, 135-143.
- K. Jury, T. Vancov, R. Stuetz, S. Khan A.Méndez- Vilas (Ed.), 2010. Antibiotic Resistance Dissemination and Sewage Treatment Plants, Formatex Research Center, Bodajez, Spain, pp. 509-519.
- Kaštelan-Macan, Marija; et al., 2007. Water resources and waste water

management in Bosnia and Herzegovina, Croatia and the State Union of Serbia and Montenegro. En: Water Policy. Vol. 9, p. 319-43.

Kenne, K. & Ahlborg, U.G. 1996. Environmental Health Criteria 181, Chlorinated Paraffins. Recuperado, Diciembre 1, 2013, de International Programme on Chemical Safety.

K.K. Sodhi, M. Kumar, D.K., 2020. Singh Potential application in amoxicillin removal of *Alcaligenes* sp. MMA and enzymatic studies through molecular docking Arch. Microbiol, pp. 1-7.

Kocurek , D. Wojcieszynska, 2015. Degradación cometabólica del naproxeno por *Planococcus* sp . Ceba S5 Agua, aire, suelo contaminado. , 226 (9), pp. 1 – 8.

Kümmerer, Klaus., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources da review. En: Chemosphere. Vol. 45. p. 957-969.

L. Briñas, M. Zarazaga, Y. Sáenz, F. Ruiz-Larrea, C. Torres β -Lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals Antimicrob. Agents Chemother., 46 (10) (2002), pp. 3156-3163.

Lai, R. Bruno, H.W. Leung, P.K. Thai, C. Ort, S. Carter, K. Thompson, P.K.S. Lam, J.F. Mueller, 2013. Forensic Sci. Int. 233, 126.

Lajeunesse, S.A. Smyth, K. Barclay, S. Sauvé, C. Gagnon, 2012. Water Res. 46, 5600.

Lambert, M.R., Skelly, D.K., 2016. Diverse sources for endocrine disruption in the wild. Endocr. Disruptors 4 (1), e1148803.

- Langford, M. Reid, K.V. Thomas, J., 2011. Environ. Monit. 13, 2284.
- Lapworth, D. J. y Goody, D. C., 2006. Source and persistence of pesticides in a semiconfined chalk aquifer of southeast England. En: Environmental Pollution. Vol. 144, p.1031-1044.
- Li D.; Min Y.; Jianying H.; Yu Z.; Hong C.; Fen, J. 2008; Determination of Penicillin G and IDegradation Products in a Penicillin Production Wastewater Treatment Plant and the Receiving River. Water Research 42(1–2):307–17.
- Liu, A., Goonetilleke, A., Egodawatta, P., 2015. Role of Rainfall and Catchment Characteristics on Urban Stormwater Quality. Springer.
- L.J.M. Githinji, M.K. Musey, R.O. Ankumah, 2011. Evaluation of the fate of ciprofloxacin and amoxicillin in domestic wastewater Water Air Soil Pollut., 219, pp. 191-201.
- López-Morales C.A., Rodríguez-Tapia L., 2019. On the economic analysis of wastewater treatment and reuse for designing strategies for water sustainability: Lessons from the Mexico Valley Basin. Resources, Conservation & Recycling 140:1–12.
- M. Cycoń, A. Mroziak, Z. Piotrowska-Seget, 2019. Antibiotics in the soil environment- degradation and their impact on microbial activity and diversity Front. Microbiol., 10, p. 338.
- Margot, J., Rossi, L., Barry, D.A., Holliger, C., 2015. A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants. Wiley Interdiscip. Rev. Water 2 (5), 457–487.

- Mastroianni, C. Postigo, M.L. de Alda, D. Barcelo, J., 2013 *Chromatogr. A* 1322, 29.
- Maya, N., Crispo, C., McFarland, V., Nasuhoglu, D., Isazadeh, S., Yargeau, V., & Metcalfe, C. D., 2018. Toxicity of extracts from municipal wastewater to early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate removals of micropollutants by wastewater treatment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 37(1), 136-144.
- Metcalfe, K. Tindale, H. Li, A. Rodayan, V. Yargeau, 2010. *Environ. Pollut.* 158, 3179.
- Morales-Torres, S., Pastrana-Martínez, L.M., Figueiredo, J.L., Faria, J.L., Silva, A.M., 2013. Graphene oxide-P25 photocatalysts for degradation of diphenhydramine pharmaceutical and methyl orange dye. *Appl. Surf. Sci.* 275, 361–368.
- Morten Hjorth, Joan Holst Hansen y Lionel Camus, 2010. Efectos a corto plazo de la sucralosa en *Calanus finmarchicus* y *Calanus glacialis* en Disko Bay, Groenlandia, *Chemistry and Ecology*, 26: 5, 385-393.
- Mousel, D., Palmowski, L., & Pinnekamp, J., 2017. Energy demand for elimination of organic micropollutants in municipal wastewater treatment plants. *Sci Total Environ*, 575, 1139-1149.
- Msigala, S. C., Mabiki, F. P., Styrihave, B., & Mdegela, R. H. 2017. Pollution by endocrine disrupting estrogens in aquatic ecosystems in Morogoro urban and peri-urban areas in Tanzania. *Afr. J. of Environ Sci. Technol.*, 11(2), 122-131.
- N.N. Qureshi, D. Morikis, N.L. Schiller, 2011. Contribution of specific amino acid changes in penicillin binding protein 1 to amoxicillin resistance in clinical *Helicobacter pylori* isolates *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55 (1), pp. 101-109.

NOM-04-SEMARNAT-2013., protección ambiental. - Lodos y biosólidos, 15 de agosto 2013.

Pal, A., He, Y., Jekel, M., Reinhard, M., Gin, K.Y.H., 2014. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environ. Int.* 71, 46–62.

Petrović, Mira; González, Susana & Barceló, Damià., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. En: *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 22, N° 10, p.685-696.

Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C., Calamari, D., 2006. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. *Environ. Sci. Technol.* 40 (7), 2442–2447.

Rippy, M.A., Weiden, L.M., Cooper, W.J., Deletic, A., Grant, S.B., 2016. Microlayer enrichment in natural treatment systems: linking the surface microlayer to urban water quality. *Wiley Interdiscip. Rev. Water* 3 (2), 269–281.

R.L. Lipnick, 1995. Computational chemistry in environmental toxicology QSAR SAR QSAR *Environ. Res.*, 4, pp. 125-130.

Rodríguez Tapia L, Morales Novelo JA., 2000. La aplicación de instrumentos económicos para disminuir la contaminación del agua: experiencias en el uso de cuotas por descargas de aguas residuales. *Análisis Económico*; XV111-135.

S. Gartiser, E. Urich, R. Alexy, K. Kümmerer., 2007. Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes *Chemosphere*, 66 (10), pp.

1839-1848.

S. Wang, K. Poon, Z. Cai, 2018. Removal and metabolism of triclosan by three different microalgal species in aquatic environment *J. Hazard. Mater.*, 342, pp. 643-650.

S. Wang, X. Wang, K. Poon, Y. Wang, S. Li, H. Liu, S. Lin, Z. Cai, 2013. Removal and reductive dechlorination of triclosan by *Chlorella Pyrenoidosa* *Chemosphere*, 92, pp. 1498-1505.

Sánchez, J., Gallego, J.R., 2005. Biorremediación: conceptos esenciales y ámbitos de aplicación, en: Marín, I., Sanz, J.L., (Ed), *Biología y Medioambiente Vol 1 (2)*, Ephemera. 61-75.

Sánchez, J., Rodríguez, J.L., 2003. Biorremediación: fundamentos y aspectos microbiológicos. *Ind. Min.* 351, 12-16.

Sinclair, C. J. y Boxall, A. B., 2003. Assessing the Ecotoxicity of Pesticide Transformation Products. En: *Environmental Science and Technology*. Vol. 37. p. 4617-4625.

Souza-Silva, R. Jiang, A. Rodríguez-Lafuente, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, 2015. *Trac-Trends Anal. Chem.* 71, 224.

Stasinakis AS, Kordoutis CI, Tsiouma VC, Gatidou G, Thomaidis NS, 2010. Removal of selected endocrine disrupters in activated sludge systems: effect of sludge retention time on their sorption and biodegradation. *Bioresour Technol* 101:2090–2095.

Stumpf, M., 1996. Determination of drugs in sewage treatment plants and river

water. En: Vom Was-ser. Vol. 86. p. 291-303.

Subedi, K. Kannan, 2014. Environ. Sci. Technol. 48, 6661.

Subedi, S. Lee, H.-B. Moon, K. Kannan, 2013. Environ. Sci. Technol. 47,13321.

Taheran, M., Naghdi, M., Brar, S. K., Verma, M., & Surampalli, R. Y. 2018. Emerging contaminants: Here today, there tomorrow! Environ. Nanotechnol. Monit. Manage., 10, 122–126.

Ternes, T. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. En: Water research. 1998. Vol. 32, No. 11. p. 3245-3260.

Valcárcel, Y.; et al. Drugs of abuse in surface and tap waters of the Tagus river basin: heterogeneous photo-Fenton process is effective in their degradation. En: Environ Int. 2012. Vol. 41. p. 35–43.

Vazquez-Roig, R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu, Y. Picó, J., 2010. Chromatogr. A 1217 2471.

Vulliet E.; Cren-Olive C.; Grenier-Loustalot M. 2011; Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. Environmental Chemistry Letters. 9 (1):103-114.

Watanabe, Naoko; et al., 2010. Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manure forage fields. En: Environmental Science and Technology. Vol. 44. p. 6591-6600.

Wilkinson, J., Hooda, P. S., Barker, J., Barton, S., & Swinden, J., 2017. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching

review of the field. *Environmental Pollution*, 231, 954–970.

Wilkinson J.; Peter S.; Hooda J.B.; Stephen B.; Swinden J. 2017; Occurrence, Fate and Transformation of Emerging Contaminants in Water: An Overarching Review of the Field. *Environmental Pollution*. 231:954–70.

Wit, C. 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment *Chemosphere*, 46 (5), 583624.

Xu, H., Cooper, W.J., Jung, J., Song, W., 2011. Photosensitized degradation of amoxicillin in natural organic matter isolate solutions. *Water Res.* 45 (2), 632–638.

Y. Zhang, C.F. Marrs, C. Simon, C. Xi, 2009. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp *Sci. Total Environ.*, 407, 12, pp. 3702-3706.

Y. Liu, Y. Guan, B. Gao, Q. Yue, 2012. Antioxidant responses and degradation of two antibiotic contaminants in *Microcystis aeruginosa* *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 86, pp. 23-30.

Yang, L., Yan, K., Zeng, D., Lai, X., Chen, X., Fang, Q., ... Zhang, X., 2017. Association of polycyclic aromatic hydrocarbons metabolites and risk of diabetes in coke oven workers. *Environ. Pollut.* 223, 305–310.

Yargeau, B. Taylor, H. Li, A. Rodayan, C.D, 2014. *Metcalf*, *Sci. Total Environ.* 487, 722.