

# **Inhibición metanogénica de lodo anaerobio por exposición a antibióticos de origen veterinario y su sorción en carbón activado granular.**

## **Methanogenic inhibition of anaerobic sludge by exposure to veterinary antibiotics and its sorption in granular activated carbon.**

Perla A. Gonzalez-Tineo<sup>1</sup>, Ulises Durán-Hinojosa<sup>4</sup>, Pablo Gortáres-Moroyoqui<sup>2</sup>, Ruth G. Ulloa-Mercado<sup>2</sup>, Luis Álvarez Valencia<sup>3</sup> Denisse Serrano-Palacios<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias del Agua y Medio Ambiente,

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias,

<sup>3</sup> Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias. Instituto Tecnológico de Sonora. Av Antonio Caso 2266, Itson, 85137. Col. Centro. Cd. Obregón, Sonora, México.

<sup>4</sup> Instituto de Ingeniería, UNAM, P.O. Box 70-186, Cd. México

**Palabras clave:** Inhibición anaerobia, tetraciclinas, aguas residuales porcinas, biodegradabilidad

**Key words:** anaerobic inhibition, tetracycline, swine wastewater, biodegradability

### **INTRODUCCIÓN**

Actualmente, una amplia gama de antibióticos veterinarios es utilizada en granjas porcinas para el control de enfermedades o como promotores de crecimiento (Barton, 2014). Una vez ingeridos por los animales estos compuestos pueden metabolizarse siguiendo diferentes vías, para ser finalmente excretados al medio ambiente de forma inalterada o como metabolitos activos (Massé et al., 2014). Se reporta que hasta el 72% de la tetraciclina consumida por ganado porcino ha sido encontrada en Agua Residual Porcina (ARP) y medio ambiente en forma del compuesto original (Sara et al., 2013). La clase de antibióticos más frecuentemente detectados en residuos porcinos son las sulfonamidas, tetraciclinas y macrólidos con concentraciones de 324.4, 388.7 y 72 µg/L, respectivamente (Cheng et al., 2018; Li et al., 2016; Wei et al., 2011). En este sentido, uno de los efectos negativos de estos compuestos es la inhibición de las actividades biológicas de los microorganismos. De esta forma, pueden ejercer un efecto adverso e inhibidor sobre la biodegradación de compuestos orgánicos en las aguas residuales disminuyendo la eficiencia de los sistemas de tratamiento (Ince *et al.*, 2013). Al respecto, se reportan pocos estudios del efecto de los antibióticos en los microorganismos involucrados en el proceso de digestión anaerobia. Adicionalmente el rango de antibióticos utilizados en estos estudios no se encuentra normalmente en el medio ambiente (Aydin et al., 2015; Meng et al., 2015). En este contexto, el objetivo de este trabajo es determinar la inhibición causada en la digestión anaerobia por la presencia de antibióticos de origen veterinario. En contra parte, también se plantea una posible solución mediante la eliminación de antibióticos usando Carbón Activado Granular (CAG).

### **METODOLOGIA**

*Ensayos de inhibición anaerobia*

Los ensayos se llevaron a cabo en botellas serológicas de 60 mL con un volumen de trabajo de 20 mL (4 mL biomasa anaerobia + 16 mL de ARP). El diseño experimental consistió en una botella control (sin antibiótico) y 3 tratamientos bajo diferentes concentraciones de antibiótico (15, 30 y 45 µg/L), así como una mezcla de antibióticos con cada una de las concentraciones mencionadas (MIX). Los antibióticos utilizados fueron Clorhidrato de oxitetraciclina (OTC, 99%), clorhidrato de tetraciclina (TCN, 99%) y tartrato de tilosina (TYL, 99%). Los antibióticos fueron obtenidos a través de Sigma-Aldrich (Steinem, Alemania). La cuantificación de CH<sub>4</sub> producido se llevó a cabo por medio de un cromatógrafo de gases (Fisher Gas Partitioner model 1200).

#### *Ensayos de adsorción con Carbón Activado Granular (CAG)*

Cada botella contó con un volumen de trabajo de 50 mL de agua milli-Q que se pusieron en contacto con 0.05 g de CAG el cual actuó como adsorbente. Los ensayos fueron llevados a cabo a dos diferente valores de pH (6 y 8). Las concentraciones manejadas fueron 15, 60 y 100 µg/L de antibióticos. Los antibióticos fueron contabilizados en un equipo UPLC Acquity con detector Xevo TQD.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los ensayos de inhibición anaerobia, se realizaron en ARP como sustrato. Adicionalmente se llevaron a cabo ensayos de Actividad Metanogénica Específica (AME) utilizando ácido acético. Lo anterior fue llevado a cabo para conocer la inhibición en la producción de metano en condiciones donde el sustrato no es un factor limitante. En este estudio los ensayos mostraron una clara inhibición con el aumento en la concentración de antibióticos. El máximo porcentaje de inhibición observado fue de 51.2% en presencia de TCN, el cual resultado más toxico que la mezcla de antibióticos (MIX), afectando el proceso en un 41.2% (Tabla 1). Por otro lado, se observó que utilizando ácido acético como sustrato, la máxima inhibición causada fue considerablemente mayor que en ARP (58.5 y 78% con TCN y OTC respectivamente). Esto puede deberse a que a diferencia del ácido acético, el ARP contiene otros compuestos que pueden mejorar el rendimiento de la digestión anaerobia como por ejemplo: polisacáridos, lípidos y proteínas (Riaño et al., 2011). Mustapha et al. (2016) reporta que bacterias de la clase *Clostridia*, encontradas en ARP contribuyen a una alta tasa de hidrólisis y degradación de ácidos grasos volátiles, lo cual favorece la digestión anaerobia. En este sentido, a diferencia del ácido acético el ARP cuenta con microorganismos que favorezcan el proceso anaerobio.

**Tabla 1.** Resumen de la inhibición de la producción de CH<sub>4</sub> bajo las diferentes concentraciones de antibióticos en ensayos de biodegradabilidad y AME.

Ensayos	Antibiótico	Concentración (µg/L)		
		15	30	45
Agua residual porcina	OTC	62.3%	63.6%	50%
	TCN	35.3%	38.7%	51.2%
	TYL	5.4%	40.7%	48.5%
	MIX	19.6%	26.5%	41.2%
Acido acetico	OTC	64.6%	69.4%	78%
	TCN	52%	54%	58.5%

<b>TYL</b>	41.6%	43.6%	46.3%
<b>MIX</b>	59.6%	69.7%	69.7%

En este sentido, la inhibición en la producción de metano no solo depende del sustrato disponible para la biomasa, si no de la concentración del antibiótico utilizado, y su toxicidad. Por ejemplo, la mayoría de los estudios de inhibición metanogénica indican una mayor reducción de la producción de metano causada por Clortetraciclina que lo observado por la OTC. Por último, en el caso particular de TYL, García (2015) observó que a concentraciones de 10 y 50 µg/L se inhibe la AME en un rango de 49 % a 63 %, similar a lo encontrado en este estudio.

#### *Ensayos con Carbón Activado Granular (CAG)*

A continuación se muestra la remoción lograda por CAG después de 24 horas de estar en contacto con el antibiótico. En este estudio, se observó que el pH del medio no presentó un efecto considerable en la adsorción de estos compuestos en CAG (Tabla 2). Lo anterior, según Rivera et al. (2009) puede indicar que las interacciones electrostáticas entre el CAG y el medio de ARP no juegan un papel importante en los procesos de adsorción. En contraste, estudios posteriores realizados por Rivera et al. (2013) reportan la influencia del pH en la adsorción de tetraciclinas con carbón activado en un rango de pH de 2 a 7 observando una reducción en la adsorción durante el aumento de pH, ya que se produce un aumento en su carga superficial y una consecuente reducción en la adsorción.

**Tabla 2.** Ensayos de remoción de antibióticos en carbón activado granular a 35±2 °C.

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración inicial (µg/L)</b>	<b>Remoción (%)</b>	
		<b>pH 6</b>	<b>pH 8</b>
<b>TCN</b>	15	0	27.1
	60	48.4	39.2
	100	<b>67.9</b>	<b>75.5</b>
<b>TYL</b>	15	<b>67.7</b>	<b>43.5</b>
	60	15.6	31.7
	100	15.9	10.8

## **CONCLUSIONES**

Este estudio mostró que los antibióticos de origen veterinario son capaces de ocasionar una inhibición de más del 70% en la digestión anaerobia reflejado en una disminución en la producción de metano. Lo anterior muestra que en presencia de 45 µg/L de OTC es posible afectar sistemas de tratamiento anaerobio, lo cual brinda una perspectiva de importancia al estudiar este tipo de compuestos por debajo de los 100 µg/L. En contra parte, este trabajo planteó una solución a esta problemática con el uso de CAG para la eliminación de antibióticos. Después de 24 horas de estar en contacto con el CAG se observó una remoción máxima de TCN cuando la concentración era de 100 µg/L.

## **Agradecimientos**

Esta investigación fue financiada por el proyecto: “Evaluación del Impacto de los cambios metabólicos en la comunidad microbiana de un sistema híbrido por la eliminación de antibióticos presentes en agua residual porcícola” del fondo CONACYT\_ Proyectos de Investigación Científica Básica\_2019-2021 con folio\_ A1-S-43472.

## REFERENCIAS

- Aydin, S., Ince, B., Cetecioglu, Z., Arikan, O., Ozbayram, E. G., Shahi, A., & Ince, O. (2015). Combined effect of erythromycin, tetracycline and sulfamethoxazole on performance of anaerobic sequencing batch reactors. *Bioresource technology*, 186, 207-214.
- Barton, M. D. (2014). Impact of antibiotic use in the swine industry. *Current opinion in microbiology*, 19, 9-15.
- Cheng, D. L., Ngo, H. H., Guo, W. S., Liu, Y. W., Zhou, J. L., Chang, S. W., ... & Zhang, X. B. (2018). Bioprocessing for elimination antibiotics and hormones from swine wastewater. *Science of the Total Environment*, 621, 1664-1682.
- Ince, B., Coban, H., Turker, G., Ertekin, E., & Ince, O. (2013). Effect of oxytetracycline on biogas production and active microbial populations during batch anaerobic digestion of cowmanure. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(5), 541-546.
- Li, J., Zhang, H., (2016). Adsorption-desorption of oxytetracycline on marine sediments: kinetics and influencing factors. *Chemosphere* 164, 156–163
- Meng, L. W., Li, X. K., Wang, K., Ma, K. L., & Zhang, J. (2015). Influence of the amoxicillin concentration on organics removal and microbial community structure in an anaerobic EGSB reactor treating with antibiotic wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 274, 94-101.
- Mustapha, N. A., Sakai, K., Shirai, Y., & Maeda, T. (2016). Impact of different antibiotics on methane production using waste-activated sludge: mechanisms and microbial community dynamics. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(21), 9355-9364.
- Riaño, B. Molinuevo, and M. C. García-González. (2011). “Potential for methane production from anaerobic co-digestion of swine manure with winery wastewater,” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 5, pp. 4131–4136.
- Rivera-Utrilla, J., Gómez-Pacheco, C. V., Sánchez-Polo, M., López-Peñalver, J. J., & Ocampo-Pérez, R. (2013). Tetracycline removal from water by adsorption/bioadsorption on activated carbons and sludge-derived adsorbents. *Journal of environmental management*, 131, 16-24.
- Rivera-Utrilla, J., Prados-Joya, G., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M. A., & Bautista-Toledo, I. (2009). Removal of nitroimidazole antibiotics from aqueous solution by adsorption/bioadsorption on activated carbon. *Journal of hazardous materials*, 170(1), 298-305.
- Massé, D. I., Saady, N. M. C., & Gilbert, Y. (2014). Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: an overview. *Animals*, 4(2), 146-163
- Wei, R.C., Ge, F., Huang, S.Y., Chen, M., Wang, R., (2011). Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere* 82 (10), 1408–1414.