

## **Biodegradación de 17 $\beta$ -estradiol, ampicilina y acetato por desnitrificación.**

### **Biodegradation of 17 $\beta$ -estradiol, ampicillin and acetate by denitrification.**

**Cesar Camacho-López<sup>1</sup>, Claudia Romo-Gómez<sup>1\*</sup>, Elena Otazo-Sánchez<sup>1</sup>, Otilio Acevedo-Sandoval<sup>1</sup>, Libertad Juárez-Santacruz<sup>2</sup>, Edelmira García-Nieto<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Área Académica de Química), Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma C.P. 42184, Hidalgo, México Tel 7717172000 Ext. 2219; <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Tlaxcala (Centro de Investigación en Genética y Ambiente). Autopista San Martín-Tlaxcala Km. 10.5, CP 90120, Tlaxcala, México.

[ca409823@uaeh.edu.mx](mailto:ca409823@uaeh.edu.mx), \*[claudiar@uaeh.edu.mx](mailto:claudiar@uaeh.edu.mx), [profe\\_4339@uaeh.edu.mx](mailto:profe_4339@uaeh.edu.mx),  
[acevedo@uaeh.edu.mx](mailto:acevedo@uaeh.edu.mx), [liber\\_05@yahoo.com.mx](mailto:liber_05@yahoo.com.mx), [mirosgn@gmail.com](mailto:mirosgn@gmail.com).

**Palabras clave:** 17 $\beta$ -estradiol, ampicilina, biodegradación, desnitrificación.

**Key words:** 17 $\beta$ -estradiol, ampicillin, biodegradation, denitrification.

## **INTRODUCCIÓN.**

Los contaminantes emergentes (CEs) son compuestos de uso común, sin regulación clara y su introducción es continua a cuerpos de agua natural. Dentro de este grupo se encuentran productos de cuidado personal, aditivos alimenticios, solventes, detergentes, fármacos, entre otros (Islas y col., 2017). 17 $\beta$ -estradiol (E2) es una hormona natural, se utiliza también en el ser humano y zootecnia (Haiyan y col., 2007). Es un disruptor endócrino en el medio ambiente e incluso a bajas concentraciones ( $\text{ng L}^{-1}$ ) (Fernández y col., 2017). La ampicilina (AMP) es un antibiótico  $\beta$ -lactámico, de amplio espectro y de mayor uso en el mundo. Ha sido cuantificado en cuerpos de agua naturales a concentraciones de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ , ello ha contribuido a la resistencia bacteriana a antibióticos (Ramírez y col., 2020). Esto ha generado diferentes propuestas para su eliminación mediante procesos físicos, químicos y biológicos, donde los resultados reportados indican eficiencias de eliminación bajas y no se demuestra el destino final del contaminante (Bennett y col., 2018). El proceso de desnitrificación ha demostrado buenos resultados en la biodegradación de algunos compuestos reportados como recalcitrantes, tales como 2-clorofenol, tolueno, entre otros (Peña y col., 2007). Por lo que, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la biodegradación de una mezcla de 17 $\beta$ -estradiol, ampicilina y acetato por desnitrificación.

## **METODOLOGIA**

Se operó un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB, upflow anaerobic sludge blanket, por sus siglas en inglés) de 1.3 L de volumen de trabajo inoculado con un lodo de origen metanogénico proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Atotonilco de Tula, Hidalgo. El UASB se mantuvo bajo un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 2.4 d, a 30 °C y pH de  $8.1 \pm 0.7$ . Fue alimentado con 250 mg de  $C\text{-CH}_3\text{COO}^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y 138 mg  $\text{N-NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , por separado y manteniendo una  $C \text{ N}^{-1}$  de 1.8. La composición de los medios de las fuentes carbonada y nitrogenada fue de acuerdo a lo reportado por Islas y col. (2017). Bajo estas condiciones se obtuvieron  $E_{C\text{-CH}_3\text{COO}^-}$  y  $E_{\text{N-NO}_3^-}$  superiores al 99%, así como  $Y_{C\text{-HCO}_3^-}$  y  $Y_{\text{N}_2}$  de  $0.9136 \pm 0.0001$  y  $0.9135 \pm 0.01$ , respectivamente. Demostrando que se había alcanzado el estado fisiológicamente estable del lodo desnitrificante. Posteriormente, se realizaron ensayos control abióticos y con biomasa estéril para descartar la pérdida de los sustratos por procesos físico-químicos. Igualmente, se llevó a cabo un control desnitrificante de referencia con (1) 30 mg  $C\text{-CH}_3\text{COO}^- \text{ L}^{-1}$  a una  $C \text{ N}^{-1}$  de 1.8 y (2) una mezcla (10 mg  $\text{L}^{-1}$ ) con C-E2, C-AMP y  $C\text{-CH}_3\text{COO}^-$  a una  $C \text{ N}^{-1}$  de 1.1, en botellas serológicas de 60 mL con 48 mL de medio de cultivo y 12 mL de espacio de cabeza. Cada una fue inoculada con 0.5 gr de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)  $\text{L}^{-1}$  y el respectivo medio de cultivo bajo la composición reportada por Islas y col. (2017). Cada botella fue sellada con goma y casquillo de aluminio. Además, se desplazó el oxígeno presente en el espacio de cabeza haciendo pasar una corriente de Argón extrapuro durante 5 min para obtener una atmósfera anóxica. Todas las botellas fueron incubadas a 34 °C y 200 rpm. Se tomaron muestras líquidas y gaseosas de cada ensayo y se analizaron en cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía de gases (GC). Para evaluar la biodegradación, se realizaron los cálculos de eficiencias (E) de consumo de sustratos, rendimientos (Y) de productos, así como las velocidades específicas (q) de cada uno de los sustratos y productos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

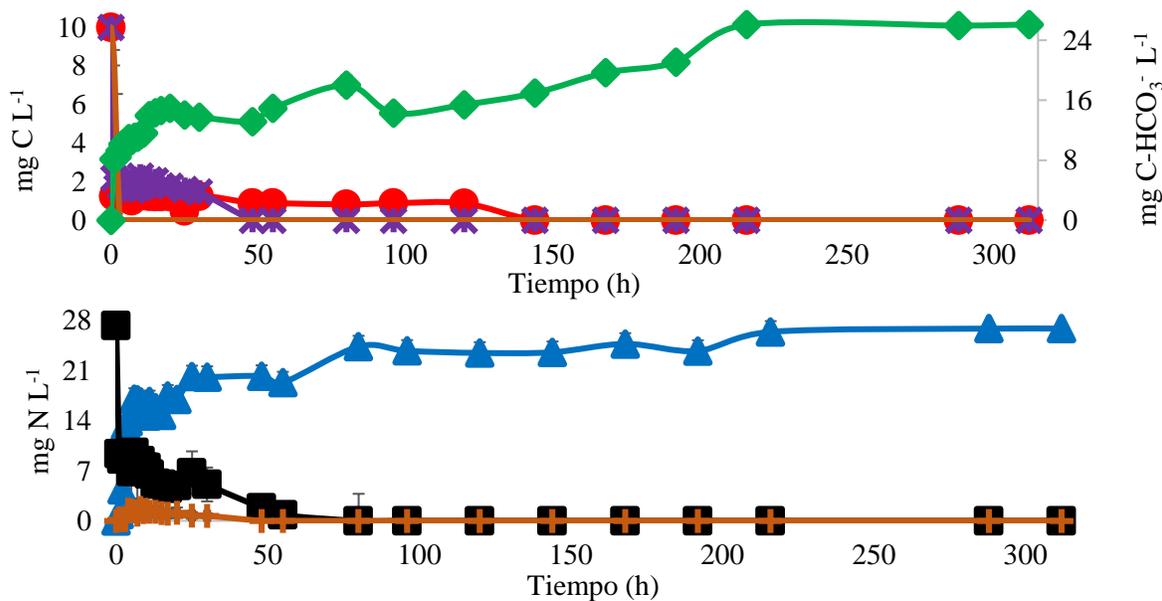
Los resultados de los ensayos control abióticos y con biomasa estéril no mostraron pérdidas por procesos físico-químicos. Los ensayos de referencia mostraron un consumo total de los sustratos después de 4 horas de reacción, obteniéndose  $E_{C\text{-CH}_3\text{COO}^-}$  y  $E_{\text{N-NO}_3^-}$  de  $100 \pm 0.01$  y  $99.62 \pm 0.01$  % respectivamente. Asimismo, se alcanzaron  $Y_{C\text{-HCO}_3^-}$  y  $Y_{\text{N}_2}$  de  $0.97 \pm 0.01$  y  $1.29 \pm 0.04$ , respectivamente, (Tabla 1). Posteriormente, al cambiar la fuente de electrones por la mezcla de (10 mg  $\text{L}^{-1}$ ) E2, AMP y  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , se obtuvieron  $E_{C\text{-CH}_3\text{COO}^-}$ ,  $E_{C\text{-E2}}$ ,  $E_{C\text{-AMP}}$  y  $E_{\text{N-NO}_3^-}$  de  $100 \pm 0.01$ , en todos los casos (Tabla 1). Cabe mencionar que, al realizar la comparación con el ensayo de referencia, el  $C\text{-CH}_3\text{COO}^-$  se agotó al mismo tiempo en ambos ensayos (Figura 1). Asimismo, el C-AMP y C-E2 se agotaron a las 48 y 144 h de reacción, respectivamente. Estos resultados indicaron que, aunque el sustrato con mayor dificultad para ser biodegradado por el lodo fue 17 $\beta$ -estradiol, se consumió por completo en cometabolismo con C-AMP y  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ . Los Y obtenidos fueron mayores a 0.86 en todos los casos. Cabe resaltar que este trabajo es el primero en evaluar el proceso desnitrificante en presencia de E2, AMP y  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  con  $E_{\text{Consumo}}$  de 100 % en tiempos cortos. Otros trabajos han reportado  $E_{E2}$  de 68 % de 5 mg  $E2 \text{ L}^{-1}$  iniciales en un lapso de 90 días (2160 h) (Fernández y col., 2017). Li y col. (2020), reportaron 90 % de consumo de 20 mg  $E2 \text{ L}^{-1}$  en un tiempo de 168 horas de reacción y en presencia de 0.1 mg  $\text{L}^{-1}$  de tetraciclinas por *Novosphingobium sp.* En los trabajos

anteriores se menciona la eliminación de los contaminantes, pero no indican el destino final de ellos. Islas y col. (2017) realizaron el estudio de la biotransformación de una mezcla de 10 mg C-AMP L<sup>-1</sup> y 100 mg C-CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> L<sup>-1</sup> en 10 h de reacción con una relación entre sustratos de 1 a 10, el presente trabajo se usó una mezcla de tres sustratos a la misma relación de concentraciones (10 mg L<sup>-1</sup>). Cabe mencionar que además de obtener eficiencias del 100%, solo se cuantificó la producción N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, transitoriamente, el cual se consumió antes de la terminación del ensayo.

**Tabla 1.** Eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de productos de los ensayos en lote.

Ensayo	Eficiencias (%)				Rendimientos (Y)	
	C-CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	C-E2	C-AMP	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N <sub>2</sub>	C-HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
(1)	100 ± 0.01	-	-	99.62 ± 0.06	1.29 ± 0.04	0.97 ± 0.01
(2)	100 ± 0.01	100 ± 0.01	100 ± 0.01	100 ± 0.01	0.97 ± 0.09	0.86 ± 0.02

Por otro lado, al evaluar las  $q_{\text{Consumo}}$  y  $q_{\text{Producción}}$ , se observó que la  $q_{\text{C-CH}_3\text{COO}^-}$  en el ensayo con las tres fuentes de carbono disminuyó 1.66 veces, en relación con el ensayo de referencia (Tabla 2), la  $q_{\text{C-E2}}$  y  $q_{\text{C-AMP}}$  fueron similares, pero la  $q_{\text{N-NO}_3^-}$  aumentó 1.55 veces en el ensayo de la mezcla. Los resultados mostraron que la  $q_{\text{C-HCO}_3^-}$  fue la variable más afectada, porque disminuyó 16 veces al cambiar de fuente de electrones. Sin embargo, la  $q_{\text{N}_2}$  solo disminuyó 1.04 veces en la mezcla, contrario a la  $q_{\text{N-NO}_3^-}$ . A pesar de la disminución de las  $q$ , el proceso se llevó a cabo eficientemente.



**Figura 1.** Perfil cinético de los ensayos con (10 mg L<sup>-1</sup>) C-E2, C-AMP y C-CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> (C N<sup>-1</sup> 1.1). A) (●) C-E2, (—) C-CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, (x) C-AMP, (◆) C-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (eje secundario), B) (■) N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, (+) N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, (▲) N<sub>2</sub>

**Tabla 2.** Velocidades específicas de cada especie química en ensayos en lote.

Ensayo	Consumo (q) [=] mg/g SSV h				Producción (q) [=] mg/g SSV h	
	C-CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	C-E2	C-AMP	N-NO <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	C-HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
(1)	15.43 ± 2.48	-	-	7.32 ± 0.4	8.52 ± 0.94	15.08 ± 2.4
(2)	5.79 ± 1.42	8.75 ± 2.53	7.28 ± 2.41	18.68 ± 4.94	4.16 ± 0.38	0.87 ± 0.05

## CONCLUSIONES

El lodo desnitrificante tuvo la capacidad de biodegradar por completo una mezcla de 10 mg L<sup>-1</sup> de C-E2, C-AMP y C-CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> con eficiencias de 100% y, Y<sub>C-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub> y Y<sub>N<sub>2</sub></sub> de 0.86 y 0.97, respectivamente. No se produjeron intermediarios carbonados, solo 1.8 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>, el cual fue consumido por completo al finalizar el ensayo.

## REFERENCIAS

- Bennett, J. L.; Mackie, A. L.; Park, Y.; Gagnon, G. A. (2018); *Advanced oxidation processes for treatment of 17β-Estradiol and its metabolites in aquaculture wastewater*. Aquac. Eng. 83(August): 40–46.
- Fernández, L.; Louvado, A.; Esteves, V. I.; Gomes, N. C. M.; Almeida, A.; Cunha, Â. (2017); *Biodegradation of 17β-estradiol by bacteria isolated from deep sea sediments in aerobic and anaerobic media*. J. Hazard. Mater. 323: 359–366.
- Haiyan, R.; Shulan, J.; ud din Ahmad, N.; Dao, W.; Chengwu, C. (2007); *Degradation characteristics and metabolic pathway of 17α-ethynylestradiol by Sphingobacterium sp. JCR5*. Chemosphere. 66(2): 340–346.
- Islas, I.; Romo, C.; Cuervo, F. de M. (2017); *Ampicillin Mineralization by Denitrifying Process: Kinetic and Metabolic Effects*. Appl. Biochem. Biotechnol. 183: 1049-1061
- Ramírez, J. J.; Cuervo, F. de M.; Texier, A. (2020); *Ampicillin biotransformation by a nitrifying consortium*. J. Microbiol. Biotechnol. 36 (21).
- Li, S.; Liu, J.; Sun, K.; Yang, Z.; Ling, W. (2020); *Degradation of 17β-estradiol by Novosphingobium sp. ES2-1 in aqueous solution contaminated with tetracyclines*. Environ. Pollut. 260: 114063.
- Peña, A.; Olmos, A.; Viniestra, G.; Cuervo, F. M.; Gómez, J. (2007); *Denitrification in presence of benzene, toluene, and m-xylene*. Appl. Biochem. Biotechnol. 119(3): 195–208.