



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN**  
Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental

---

*Aislamiento y caracterización de  
microorganismos autóctonos con capacidad de  
degradación de oxitetraciclina*

---

AUTORA

Eliana Pace

DIRECTOR

Dr. Gustavo Curutchet

CO-DIRECTORA

Lic. Estefanía Bracco

Tesis de grado para optar por el título de Licenciada en Biotecnología

2022

*“You cannot get through a single day without having an impact on the world around you.*

***What you do makes a difference,**  
and you have to **decide what kind of difference** you want to make”.*

*Jane Goodall.*

## *Dedicatoria*

*A mis profesores, Alfredo y Marina. Gracias a ellos, hace 10 años, supe que éste era el camino que quería recorrer.*

*A mi mamá, mi apoyo incondicional. Teniendo miles de problemas y ninguna certeza, siempre me incitó a priorizar mis estudios. Festejó conmigo cada aprobado, me prestó un hombro para llorar cuando las cosas no iban tan bien y me animó a jamás bajar los brazos.*

*A mi abuela Emilia, que nunca supo muy bien qué estudiaba pero le contaba orgullosa a todo el mundo que tenía una nieta universitaria.*

*A todos los amigos que hice durante mi vida universitaria. A Joaquín, Laura, Pabli, Cami, Mauge, Lelen, Martu, Sofi, Rama y Lucas, con quienes quisiera siempre compartir mates en el pastito del campus. A Caro y Fran, quienes llegaron a mi vida para hacerla más amena.*

*A mi director, Gustavo, quien no dudó un segundo en darme la oportunidad de hacer investigación y aportó miles de ideas y positivismo en cada etapa. A mi co-directora, tutora y amiga, Estefi, que me tendió una mano y me acompañó en todo este recorrido. A mis compañeros de laboratorio, quienes hicieron divertido y más llevadero cada día de trabajo.*

*Especialmente a Luna, integrante canino de mi familia que se fue de mi vida hace muy poco. Ella y Halley siempre fueron mi brújula. En sus ojitos encontraba fuerzas para continuar y convertirme en una mejor persona para ellas.*

*Finalmente, a todos los que día a día aportan su granito de arena para cuidar el medio ambiente, desde sus laboratorios o desde sus propias casas.*

# Índice

<b>Abreviaturas</b>	<b>6</b>
<b>Resumen</b>	<b>7</b>
<b>Introducción</b>	<b>8</b>
Sobrepoblación y sobreproducción, el inicio de todos los problemas...	8
Sistemas productivos	9
Oxitetraciclina	10
Resistencia a antibióticos	12
Valoraciones ecotoxicológicas	12
Tratamiento de efluentes	13
<b>Hipótesis</b>	<b>16</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>16</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>16</b>
<b>Capítulo 1. Aislamiento y caracterización de microorganismos degradadores de oxitetraciclina.</b>	<b>17</b>
1.1 Metodología	17
1.1.1 Recolección y caracterización físico-química de efluente	17
1.1.1.1 pH	18
1.1.1.2 Conductividad	18
1.1.1.3 Análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC)	18
1.1.1.4 Carbono orgánico total	18
1.1.1.5 Demanda química de oxígeno	18
1.1.2 Aislamiento de microorganismos degradadores	19
1.1.2.1 Medios utilizados	19
1.1.2.2 Etapa de enriquecimiento	19
1.1.2.3 Etapa I de aislamiento	20
1.1.2.4 Etapa II de aislamiento	20
1.1.3 Caracterización de microorganismos degradadores	21
1.2 Resultados y discusión	21
1.2.1 Recolección y caracterización físico-química de efluente	21

1.2.2 Aislamiento de microorganismos degradadores	22
1.2.2.1 Etapa de enriquecimiento	22
1.2.2.2 Etapa I de aislamiento	23
1.2.2.3 Etapa II de aislamiento	24
1.2.3 Caracterización de microorganismos degradadores	25
1.3 Puntos destacables	28
<b>Capítulo 2. Estudio del potencial de degradación de oxitetraciclina de los microorganismos aislados.</b>	<b>29</b>
2.1 Metodología	29
2.1.1 Cinética de crecimiento de bacterias aisladas	29
2.1.2 Cinética de degradación de OTC por bacterias aisladas	29
2.1.2.1 Determinación de OTC por espectrofotometría	30
2.1.2.2 Determinación de OTC por COT	31
2.1.2.3 Ensayo de adsorción de OTC	31
2.2 Resultados y discusión	31
2.2.1 Cinética de crecimiento de bacterias aisladas	31
2.2.2 Cinética de degradación de OTC por bacterias aisladas	34
2.2.2.1 Determinación de OTC por espectrofotometría	34
2.2.2.2 Determinación de OTC por COT	35
2.2.2.3 Ensayo de adsorción de OTC	37
2.3 Puntos destacables	37
<b>Capítulo 3. Ensayos de degradación biológica-química de oxitetraciclina.</b>	<b>39</b>
3.1 Metodología	39
3.1.1 Ensayo de degradación biológica-química en matriz definida	39
3.1.1.1 Ensayos preliminares	39
3.1.1.2 Ensayo acoplado de degradación en matriz definida	40
3.1.2 Ensayo de degradación biológica-química en matriz real	41
3.1.2.1 Cinética de crecimiento en matriz real	41
3.1.2.2 Cinética de degradación de OTC en matriz real	42
3.1.2.3 Ensayo acoplado de degradación en matriz real	42
3.1.3 Ensayos ecotoxicológicos	42
3.1.3.1 Poder germinativo	43

3.1.3.2 Ensayo de sensibilidad a OTC	43
3.1.3.3 Medición de toxicidad	44
3.2 Resultados y discusión	45
3.1.1 Ensayo de degradación biológica-química en matriz definida	45
3.1.1.1 Ensayos preliminares	45
3.1.1.2 Ensayo acoplado de degradación en matriz definida	46
3.1.2 Ensayo de degradación biológica-química en matriz real	49
3.1.2.1 Cinética de crecimiento en matriz real	49
3.1.2.2 Cinética de degradación de OTC en matriz real	50
3.1.2.3 Ensayo acoplado de degradación en matriz real	50
3.1.3 Ensayos ecotoxicológicos	52
3.1.3.1 Poder germinativo	52
3.1.3.2 Ensayo de sensibilidad a OTC	53
3.1.3.3 Medición de toxicidad	55
3.3 Puntos destacables	57
<b>Conclusión</b>	<b>58</b>
<b>Perspectivas a futuro</b>	<b>59</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>60</b>

## *Abreviaturas*

**CI<sub>50</sub>**, concentración inhibid

**COT**, carbono orgánico total.

**DO**, densidad óptica.

**DQO**, demanda química de oxígeno.

**EF-Glu**, efluente con inóculo de microorganismos de cultivo MM-Glu

**EF-OTC**, efluente con inóculo de microorganismos de cultivo MM-OTC

**EF-SI**, efluente sin inóculo de microorganismos

**HPLC-MS**, cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.

**MM**, medio mineral.

**MM-Glu**, medio mineral con 574 mg/L de glucosa.

**MM-OTC**, medio mineral con 400 mg/L de OTC (excepto que se aclare otra concentración).

**MM-SI**, medio mineral con 400 mg/L de OTC sin inóculo de microorganismos.

**OTC**, oxitetraciclina.

**TS**, triptona de soja.

**TS-OTC**, triptona de soja con agregado de OTC.

## *Resumen*

La intensificación de los sistemas ganaderos provoca altas exigencias en cuanto a bioseguridad. Esto se debe a que el engorde a corral acompañado de una mayor concentración de animales por unidad de superficie (sistema *feedlot*) favorece la transmisión de enfermedades infecciosas. Antibióticos como la oxitetraciclina son ampliamente utilizados para evitar enfermedades provocadas por el hacinamiento de los animales. Sin embargo, son pobremente metabolizados por el organismo, por lo que un alto porcentaje de los mismos es excretado en heces y orina, ingresando al ambiente por medio de los efluentes industriales.

La presencia de oxitetraciclina en el medio ambiente tiene el potencial de inducir la proliferación de microorganismos resistentes, dentro de los cuales se encuentran aquellos que tienen la capacidad de degradar al antibiótico. La combinación de tratamientos biológicos y de tratamientos químicos de oxidación avanzada puede resultar eficiente para la degradación de este contaminante recalcitrante.

El objetivo de esta tesis de grado fue aislar microorganismos autóctonos con potencial para degradar oxitetraciclina y utilizarlos para desarrollar una estrategia de degradación biológica-química.

Partiendo de muestras de efluente de *feedlot* altamente contaminado con materia orgánica y sales, se obtuvieron comunidades capaces de crecer utilizando 400 mg/L de oxitetraciclina como única fuente de carbono. Se aisló una cepa de *Acinetobacter gernerii* capaz de mineralizar un 37 % del antibiótico y de disminuir un 52 % la toxicidad del medio acuoso al llevar a cabo un tratamiento de degradación biológica-química a lo largo de 13 días.



## *Introducción*

### ***Sobrepoblación y sobreproducción, el inicio de todos los problemas...***

La sobrepoblación se define como una condición en que la densidad de la población se amplía a un límite que excede la sostenibilidad de la Tierra y, como consecuencia, provoca un empeoramiento del entorno y una disminución en la calidad de vida de los individuos (Padilla Di Doménico, 2018).

En la actualidad, la población mundial supera los 7.7 mil millones de personas y, según proyecciones de las Naciones Unidas, se espera que alcance valores cercanos a 11 mil millones para el 2100 (UN, 2020). La relación entre la cantidad de personas en el planeta y la demanda de alimentos es directa, por lo que diversos autores (Ehrlich, 1968; Kuipers, 2012) aseguran que llegará un punto donde los mismos comenzarán a escasear (Bouroncle Luna *et al.*, 2019).

Con el advenimiento de la Revolución Industrial<sup>1</sup> y de la Revolución Verde<sup>2</sup>, fue posible mejorar el aprovechamiento de los recursos naturales y aumentar la productividad agrícola-ganadera, generando un aumento extraordinario en la producción de alimentos que forjó esperanzas en lo que podría ser el final del problema del hambre en el mundo (Tilman, 1998). Sin embargo, a día de hoy, mientras que en los países desarrollados se consumen 82 kg de alimento por habitante por año, en los países en desarrollo, se consumen apenas 32 kg, apareciendo en el mundo desarrollado un sector de la población, cifrado en 1.6 mil millones de personas, con problemas de sobrepeso, frente a los 690 millones que padecen desnutrición en los países en desarrollo (FAO, 2020; Saiz, 2010).

---

<sup>1</sup> La Primera Revolución Industrial fue un proceso de profundas transformaciones tecnológicas, económicas, sociales y culturales que se desarrolló entre 1760 y 1840. Entre sus consecuencias más destacables, se hallan las innovaciones tecnológicas y científicas que permitieron mejorar la productividad.

<sup>2</sup> Se denomina Revolución Verde al importante incremento en la productividad agrícola y, por lo tanto, de alimentos, ocurrido entre 1960 y 1980 en Estados Unidos y extendida después a numerosos países. Consistió en la adopción de prácticas y tecnologías como la siembra de variedades más resistentes y el uso de agroquímicos por irrigación.

“El actual sistema alimentario mundial, con todas sus semillas de alta tecnología y sus bonitos paquetes, no es capaz de cumplir con su función principal: alimentar a las personas”.  
(GRAIN, 2009).

El sector agropecuario, al igual que la mayoría de las actividades humanas desde hace varios siglos, viene determinado por el sistema económico actual. El capitalismo impulsa a un grupo reducido de grandes empresas transnacionales a buscar un máximo beneficio económico, considerando todos los elementos del territorio como recursos explotables ilimitados (Segrelles, 2004). Dicho beneficio económico no lo encuentra al abastecer a la población que más lo necesita sino que lo encuentra al abastecer a la que pueda pagar y reportarle beneficios económicos (Saiz, 2010).

En Argentina, por ejemplo, el 57 % de la mercadería que se vende al exterior son productos alimentarios. Los mismos, reportan al país aproximadamente 25 mil millones de dólares por año (Di Yenno & Terré, 2020), mientras que un 16 % de los niños menores a 6 años padece anemia debido a deficiencias en su alimentación (Longhi *et al.*, 2018). Sin embargo, esta situación parece no preocupar a los expertos en agro-negocios que continúan apostando por un crecimiento del país como exportador de alimentos y materias primas agroalimentarias, buscando abastecer segmentos globales de mayor poder adquisitivo, donde el consumo es estable y las cantidades demandadas se enmarcan en volúmenes muy adecuados a la capacidad de producción argentina (Saiz, 2010).

## ***Sistemas productivos***

Los primeros usos ganaderos se establecieron respetando un equilibrio entre el ser humano, el animal y el medio donde se realizaba su explotación. En la actualidad, este sistema lleva el nombre de producción tradicional o extensiva, y se contrapone al modelo capitalista de explotación. Promueve un uso sostenible de los recursos y un aprovechamiento sometido a los ciclos naturales, obteniéndose así un producto más saludable y más respetuoso con el ambiente. No obstante, este tipo de explotación es menos rentable económicamente que el modelo capitalista, porque utiliza más superficie de terreno para criar menos cantidad de animales y porque el producto que genera no siempre se adapta al patrón del mercado, ni en características, ni en cantidad, ni en tiempo (Saiz, 2010).

La producción industrial o intensiva busca conseguir un producto homogéneo que cumpla con las exigencias del mercado. Para ello, emplea técnicas modernas como la selección artificial y la explotación intensiva de los animales en corrales, lo cual se conoce como sistema *feedlot*. Como consecuencia de esto último, se utilizan mayores cantidades de alimentos y de agua, tanto para la ingesta como para la higiene de los corrales. Por lo mismo, los sistemas *feedlot* producen grandes volúmenes de efluentes que deben ser contenidos y tratados en instalaciones específicas, como las lagunas de sedimentación donde se procura separar físicamente las partículas orgánicas e inorgánicas más gruesas en suspensión y las lagunas de almacenamiento donde se realiza un tratamiento anaeróbico del efluente (Pordomingo, 2002, 2003). Los barros obtenidos suelen ser reciclados como fertilizante o descargados en aguas superficiales, representando una importante fuente de contaminación ambiental (Tufo *et al.*, 2017).

Por otro lado, el hacinamiento de los animales trae consigo la desventaja de que se ve favorecida la transmisión de enfermedades infecciosas (Miranda *et al.*, 2013). Alrededor del 65 % de los antibióticos producidos en Estados Unidos anualmente, son utilizados en el ganado (Wallinga *et al.*, 2020), y el 80 % de los mismos son utilizados por razones no terapéuticas, como la prevención de enfermedades o la promoción del crecimiento (Torres, 2002; Wallinga, 2002).

## ***Oxitetraciclina***

La oxitetraciclina (OTC) forma parte de una de las familias de antibióticos más antiguas, las tetraciclinas, llamadas así por su estructura tetracíclica. Debido a su complejidad estructural esta molécula puede reaccionar de múltiples formas y, según el grupo funcional que se vea modificado, habrá una pérdida o ganancia de actividad, lo cual influye tanto a nivel antimicrobiano como farmacocinético (González, 2016). Algunas uniones ocurren en grupos cromóforos de la molécula, por lo que su longitud de onda máxima de absorción puede presentar cambios según la presencia de otros compuestos (Hochstein *et al.*, 1953).

En condiciones normales, la OTC es un polvo cristalino amarillo con un punto de fusión de 180 °C. Su exposición a la luz solar o a temperaturas superiores a 90 °C con humedad provoca su descomposición (González, 2016).

Es un antibiótico de amplio espectro de acción. Es eficaz frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y otros organismos como *Mycoplasma sp.*, *Chlamydia sp.*, *Rickettsia sp.* y parásitos protozoarios (Alvarado *et al.*, 2008). Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis proteica por unión a la subunidad ribosómica 30S, lo cual bloquea la fijación del aminoacil ARNt al sitio receptor del complejo ARNm-ribosoma y, en consecuencia, la adición de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento (González, 2016).

Este fármaco es utilizado tanto en medicina humana como veterinaria y, debido a su amplio espectro de acción y a la ausencia de efectos secundarios mayores, su uso ha sido indiscriminado en los sistemas *feedlot*, donde se incorpora en la dieta de los animales para fines preventivos (Zhao *et al.*, 2010). Al igual que la mayoría de los antibióticos, la OTC es altamente soluble en agua, por lo cual es pobremente metabolizada por los animales, resultando en un 70–90 % del componente original siendo excretado en heces y orina y, posteriormente, liberado al ambiente (Massé *et al.*, 2014).

En los últimos años, se ha publicado un gran número de estudios (Campagnolo *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010) que alerta sobre la presencia de altas concentraciones de OTC en efluentes de *feedlot*, en suelos agrícolas y en aguas superficiales. Por ello, dicho antibiótico es considerado un contaminante emergente<sup>3</sup> y, como tal, representa un grave riesgo para los ecosistemas y para la salud y seguridad humana (Farré *et al.*, 2008; Sauvé & Desrosiers, 2014).

El efecto de los contaminantes emergentes no solo depende de su concentración en el medio, sino además de otros factores como pueden ser la bioacumulación<sup>4</sup>, el tiempo de exposición y su mecanismo para biotransformarse o eliminarse. Por ejemplo, al sufrir biotransformaciones en el medio ambiente se pueden generar subproductos o metabolitos más tóxicos que los compuestos originales (Kumar *et al.*, 2019; Kümmerer, 2009).

---

<sup>3</sup> Los contaminantes emergentes son aquellos compuestos, generalmente químicos, producidos de forma natural o por el humano, que han sido encontrados o se sospecha que están presentes en varios compartimentos ambientales y cuya toxicidad o persistencia tiene el potencial de afectar significativamente la salud humana o el medio ambiente. Además, la atribución de “emergente” también viene dada por la escasa información que hay sobre tales compuestos en la literatura científica o por la falta de investigación en cuanto a las problemáticas que la presencia de los mismos en la naturaleza podría acarrear, lo cual deriva en que estos compuestos no se encuentren regulados por reglamentos de calidad de agua (Sauvé & Desrosiers, 2014).

<sup>4</sup> La bioacumulación es el proceso de acumulación de sustancias químicas en organismos vivos de forma que estos alcanzan concentraciones más elevadas que las concentraciones en el medio o en los alimentos.

## ***Resistencia a antibióticos***

La presencia de antibióticos en cuerpos de agua, incluso en bajas concentraciones, ejerce una presión de selección sobre los microorganismos que puede inducir la proliferación de organismos resistentes. La resistencia a antibióticos puede originarse por mutaciones aleatorias o por la transferencia horizontal de genes de resistencia. Debido a que dichos genes confieren una ventaja evolutiva, se esparcen rápidamente entre organismos no-patógenos y patógenos, y permiten que los microorganismos resistentes superen la competencia y se propaguen más rápido que los microorganismos no resistentes, pudiendo así distribuirse por distintos ambientes (Da Silva *et al.*, 2006; Steinfeld *et al.*, 2006; Wallinga, 2002).

Existen numerosos mecanismos a través de los cuales las bacterias pueden desarrollar resistencia antibiótica. Todos ellos implican un cambio en las proteínas producidas por la célula. Algunos son la alteración en los lugares de unión ribosomal, la disminución del número o del diámetro de las porinas (poros en la membrana externa) en bacterias Gram-negativas y la sobreexpresión de genes que confieren la capacidad de degradar la molécula en cuestión (González, 2016; Liao *et al.*, 2010).

## ***Valoraciones ecotoxicológicas***

Durante mucho tiempo, se había considerado que el único problema causado por la liberación de antibióticos en el medio ambiente era la aparición de resistencias en poblaciones bacterianas. Sin embargo, es necesario considerar su impacto sobre organismos no diana (Planes & Fuchs, 2015). Por esto, los contaminantes emergentes representan un problema complejo, no suficientemente cuantificado, que sugiere la necesidad de intensificar la investigación .

El término Ecotoxicología fue introducido en 1969 y deriva de las palabras "ecología" y "toxicología". Es la rama de la Toxicología que se ocupa del estudio de los efectos tóxicos causados por contaminantes de origen natural o sintético a los constituyentes de los ecosistemas, animal, vegetal y microbiano, en un contexto integral (Truhaut, 1977).

El objetivo primordial de la ecotoxicología es la identificación de los efectos que los contaminantes, ya sea de forma independiente o combinados con otros agentes de estrés, ejercen en el medio ambiente; de forma tal de predecir y prevenir los efectos perjudiciales sobre el mismo (González, 2016).

Los efectos tóxicos de los contaminantes se evalúan a través de ensayos ecotoxicológicos, también llamados bioensayos. En ellos se asume que si no hay efectos relevantes sobre los individuos, no se alterarán las poblaciones ni las comunidades, y por lo tanto no se esperan cambios en la función ni en la estructura de los ecosistemas (González, 2016). Se considera efectos relevantes a aquellos que son perjudiciales para los eventos de desarrollo temprano y de supervivencia de los organismos.

Debido a su sensibilidad a sustancias tóxicas, a su fácil empleo y almacenamiento y a su bajo costo, las semillas de algunas especies han sido ampliamente utilizadas en ensayos ecotoxicológicos. En estos se estudian procesos como la germinación y la elongación de la raíz de las semillas que entran en contacto con el contaminante en un medio acuoso o en barro (Romero Gómez & Prieto Zapata, 2014).

## ***Tratamiento de efluentes***

Como se dijo previamente, la presencia de antibióticos en el ambiente puede representar riesgos para los ecosistemas y la salud humana, por lo tanto, resulta necesario desarrollar técnicas para remover eficientemente dichos contaminantes.

El uso de tecnologías convencionales como filtración, sedimentación, adsorción o degradación biológica ha dado resultados variables (Arikan *et al.*, 2006, 2007; Al-Gheethi *et al.*, 2015; Batt *et al.*, 2007; Ruscasso *et al.*, 2021), altamente dependientes de las propiedades del antibiótico y de la matriz. El tratamiento de efluentes con estas tecnologías fue originalmente diseñado para la remoción de materia orgánica y de sólidos en suspensión hasta alcanzar los valores mínimos necesarios para el vertido en aguas superficiales (Yang *et al.*, 2017), por lo que suele ser insuficiente para la degradación de altas concentraciones de contaminantes emergentes.

Entre las tecnologías mencionadas, el tratamiento biológico de efluentes utilizando microorganismos autóctonos ha resultado ser el más efectivo, más amigable con el medioambiente y menos costoso (Amorim *et al.*, 2014; Azubuiké *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015). Esto se debe a que los microorganismos autóctonos presentes en ambientes contaminados encuentran, en dichos ecosistemas, condiciones adecuadas para su crecimiento y metabolismo (Azubuiké *et al.*, 2016), por lo tanto, si entre ellos existen organismos con la capacidad de convertir los contaminantes emergentes en productos inocuos (dióxido de

carbono, agua y biomasa) a través de reacciones metabólicas, será posible el tratamiento del efluente sin modificar extensamente el ecosistema original ni utilizar tecnologías costosas (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006).

En las dos últimas décadas, se han realizado muchos avances en técnicas de biorremediación<sup>5</sup> con la finalidad de modelar un proceso que permita restaurar todos los ambientes contaminados (Azubuiké *et al.*, 2016). Sin embargo, debido a la amplia cantidad de contaminantes emergentes y de ecosistemas con características particulares, se requiere desarrollar y optimizar técnicas de biorremediación específicas para cada caso.

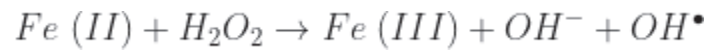
Si bien se pueden encontrar microorganismos en prácticamente cualquier condición ambiental, los mismos no necesariamente estarán presentes en un número que permita llevar a cabo un tratamiento biológico. Además, estos presentarán un rango estrecho de condiciones óptimas para su crecimiento y metabolismo (Vidali, 2001). Por lo tanto, para realizar un tratamiento biológico, luego de aislar los microorganismos de interés, su crecimiento y actividad deberán ser estimulados, para lo cual se deberán manipular parámetros como temperatura, pH y concentraciones de oxígeno y de nutrientes, principalmente aquellos que aporten carbono (Azubuiké *et al.*, 2016).

No obstante, no siempre es posible remover contaminantes eficientemente mediante el uso de microorganismos. En algunos casos ocurre que el rango de concentración de contaminante en el cual el tratamiento biológico es efectivo es limitado, la escala de tiempo requerida es relativamente larga o los niveles residuales de contaminante al finalizar el tratamiento no son apropiados.

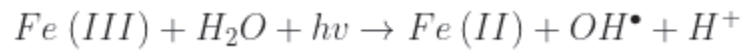
En la actualidad ha cobrado mayor importancia el tratamiento de efluentes utilizando tecnologías no convencionales (Bracco *et al.*, 2019; López Loveira *et al.*, 2012), como los procesos de oxidación avanzada. Entre estos, se encuentra la reacción foto-Fenton, que utiliza una mezcla de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y hierro ferroso (Fe (II)) para generar radicales hidroxilo (OH•), los cuales actúan como oxidantes no específicos capaces de mineralizar u oxidar parcialmente una gran cantidad de compuestos orgánicos disueltos en agua (Ebrahiem *et al.*, 2017; López Loveira *et al.*, 2016).

---

<sup>5</sup> La biorremediación es un proceso que utiliza organismos vivos tales como bacterias, hongos, algas, plantas y animales, para disminuir la concentración de contaminantes de un determinado ambiente. Los abordajes de la biorremediación generalmente se clasifican en *in situ* o *ex situ*; la biorremediación *in situ* implica tratar al contaminante en el sitio mientras que la biorremediación *ex situ* implica remover al compuesto y tratarlo en otro lugar (Hashmi, 2020).



El proceso de foto-Fenton se lleva a cabo bajo iluminación en un rango de 365-420 nm, con el fin de promover la fotoreducción de los iones Fe (III) a Fe (II) y proveer nuevos radicales (Ruppert *et al.*, 1993).



Procesos donde se acoplan tratamientos biológicos con otras tecnologías como el proceso de foto-Fenton, han resultado muy eficientes en la degradación de diversos contaminantes emergentes (Ballesteros *et al.*, 2009; Lapertot *et al.* 2007; López Loveira *et al.*, 2016).



## *Hipótesis*

Los efluentes de *feedlot* pueden contener antibióticos y otros contaminantes emergentes que se utilizan en este tipo de producción durante la alimentación y sanitización de los animales.

Los antibióticos ejercen una presión de selección sobre los microorganismos autóctonos y pueden inducir la proliferación de organismos resistentes, dentro de los cuales se encuentran aquellos que tienen la capacidad de degradar el contaminante.

Utilizando dichos microorganismos en un tratamiento biológico, y combinando este con un tratamiento químico de oxidación avanzada, es posible desarrollar una estrategia económica y eficiente para el tratamiento de efluentes contaminados con antibióticos como la oxitetraciclina.

## *Objetivo general*

Aislar de muestras de efluente de *feedlot* microorganismos autóctonos con potencial para degradar eficientemente oxitetraciclina y utilizarlos en el desarrollo de tratamientos de degradación biológica-química.

## *Objetivos específicos*

1. Aislar, identificar y caracterizar microorganismos resistentes a oxitetraciclina de muestras de efluente de *feedlot*.
2. Estudiar el potencial de los microorganismos seleccionados en procesos de degradación del antibiótico.
3. Llevar a cabo el tratamiento del efluente contaminado con oxitetraciclina a escala laboratorio, acoplando procesos de biodegradación con los microorganismos seleccionados a procesos de oxidación avanzada por foto-Fenton. Realizar bioensayos para evaluar la evolución de la toxicidad a lo largo del tratamiento.

# *Capítulo 1. Aislamiento y caracterización de microorganismos degradadores de oxitetraciclina.*

## **1.1 Metodología**

### **1.1.1 Recolección y caracterización físico-química de efluente**

En colaboración con el INTA-Castelar, se tomaron muestras de efluente de un *feedlot* porcino de la localidad de Marcos Paz. El mismo incorpora oxitetraciclina (OTC) en la dieta de sus animales, a razón de 2 kg por tonelada de alimento. En la figura 1.1 se observa la pileta de sedimentación de donde fueron tomadas las muestras de la primera decantación de las heces con agua de lavado. Dichas muestras se almacenaron en recipientes estériles de polietileno a una temperatura aproximada de 4 °C, para mantener inalterados sus parámetros físico-químicos hasta el momento del análisis.

En el laboratorio, se realizó la caracterización del efluente mediante técnicas estandarizadas internacionalmente.



**Fig. 1.1:** Pileta de sedimentación.

### ***1.1.1.1 pH***

Se determinó el pH del efluente crudo con un pHmetro Hanna Instruments HI2211.

### ***1.1.1.2 Conductividad***

Se determinó la conductividad del efluente crudo utilizando un conductímetro de sobremesa Orion Versa Star Pro de Thermo Scientific ([Técnica 2510, Standard Methods, 2018](#)).

### ***1.1.1.3 Análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC)***

Se centrifugó el efluente crudo dos veces a 15000 rpm y 15 °C para eliminar el exceso de sedimentos. Se tomó el sobrenadante y se filtró utilizando un cartucho HyperSep C18 de Thermo Scientific. Luego se filtró con membrana de acetato de celulosa de 13 mm de diámetro y poros de 0.45 µm.

Con el objetivo de determinar OTC e intermediarios, la muestra se analizó por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) de Thermo Scientific utilizando un sistema Dionex UltiMate 3000 RS LC de Thermo Scientific para la inyección del solvente y de las muestras. Se usó una columna Kinetex C18 de Phenomenex con un gradiente de elución de acetonitrilo y agua conteniendo 0.1 % (v/v) de ácido fórmico, a una tasa de flujo de 0.2 mL/min.

### ***1.1.1.4 Carbono orgánico total***

Se centrifugó el efluente crudo dos veces a 15000 rpm y 15 °C y se realizó una dilución 1/100 del sobrenadante. Se determinó el carbono orgánico total (COT) de 10 mL del sobrenadante utilizando un analizador TOC-L Shimadzu ([Técnica 5310B, Standard Methods, 2016](#)).

### ***1.1.1.5 Demanda química de oxígeno***

Se centrifugó el efluente crudo dos veces a 15000 rpm y 15 °C y se cuantificó la demanda química de oxígeno (DQO) a través de un método colorimétrico utilizando, por cada mL de muestra, 0.5 mL de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.04 M como agente oxidante y 1 mL de Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado como agente catalizador ([Técnica 5220, Standard Methods, 1992](#)).

La solución se mezcló en vortex y luego se digirió en un bloque calefactor a 160 °C durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 585 nm en un espectrofotómetro Hach DR1900.

## ***1.1.2 Aislamiento de microorganismos degradadores***

### ***1.1.2.1 Medios utilizados***

Para llevar a cabo el enriquecimiento y el aislamiento de microorganismos autóctonos degradadores de OTC, se utilizaron distintos medios de cultivo.

En las primeras etapas se utilizó medio de triptona de soja (TS) de Britania en una concentración de 30 g/L. El mismo se preparó en un frasco de vidrio Schott de 1 L y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Para los experimentos posteriores se utilizaron medios de composición definida, a partir de un medio mineral base (MM) con agregados de clorhidrato de oxitetraciclina (OTC-HCl 96%) del Laboratorio Burnet SA como fuente de carbono y energía. El MM está constituido por 2.0 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.0 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 g/L de  $\text{MgSO}_4$  y 0.01 g/L de  $\text{CaCl}_2$  (López-Loveira *et al.*, 2016). Se preparó en un frasco de vidrio Schott de 1 L y se esterilizó en autoclave.

También se preparó medio sólido mezclando TS con agar al 1,5% (TS-agar) en un frasco de vidrio Schott de 150 mL y se esterilizó en autoclave. Previo a su uso, se recalentó en horno microondas con 3 pulsos de 1 minuto cada uno y se vertieron 20 mL del mismo en placas de Petri estériles en una cabina de flujo laminar.

### ***1.1.2.2 Etapa de enriquecimiento***

Se inocularon muestras de 5 mL del efluente de *feedlot* en 45 mL de TS con el fin de tener un gran crecimiento inicial de microorganismos autóctonos. Esta etapa se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 150 mL previamente esterilizados en autoclave. Se mantuvieron en agitación constante a 120 rpm y a 24 °C. Además, se agregaron tapones de algodón a los frascos para asegurar el intercambio gaseoso y evitar la contaminación.

Durante la incubación se siguió el crecimiento microbiano por turbidimetría a través de mediciones periódicas de la densidad óptica a una longitud de onda de 620 nm ( $\text{DO}_{620}$ ) en espectrofotómetro UV-Vis PG Instruments Ltd. Las mediciones se hicieron por duplicado.

Por un plazo de dos semanas, se realizaron repiques cada 96 horas, momento en el que el cultivo se encontraba en fase estacionaria.

### ***1.1.2.3 Etapa I de aislamiento***

Semanalmente se preparó una solución madre de 2000 mg/L de OTC y se mantuvo en oscuridad a 4 °C. Antes de ser utilizada, se la esterilizó por filtración mediante el uso de jeringa y membranas de acetato de celulosa de 25 mm con poros de 0.45 µm previamente autoclavados.

Se tomaron alícuotas de 5 mL de los cultivos de TS con 96 horas de crecimiento y se las inoculó en medios de TS con concentraciones crecientes (0, 200 y 400 mg/L) de OTC (TS-OTC). Estos cultivos fueron incubados a 120 rpm y a 24 °C en matraces Erlenmeyer de 150 mL previamente esterilizados. Cada 24 horas, se tomaron muestras de 1 mL de cada cultivo y se midió la DO<sub>620</sub>. Con los valores de turbidez obtenidos, se graficaron curvas de crecimiento para cada concentración de OTC.

Este ensayo permitió evaluar la resistencia y viabilidad de las comunidades microbianas autóctonas a distintas concentraciones del antibiótico.

### ***1.1.2.4 Etapa II de aislamiento***

En esta etapa se buscó obtener microorganismos capaces de crecer en un medio con OTC como única fuente de carbono y energía, es decir, microorganismos degradadores de OTC. Para ello, se tomaron alícuotas de 5 mL de los cultivos TS-OTC y se las llevó a matraces Erlenmeyer de 150 mL conteniendo 40 mL de MM y 5 mL de OTC (MM-OTC) de 200 o 400 mg/L de concentración final. Además, se preparó un control de MM sin agregado de OTC. Se incubaron a 120 rpm y a 24 °C durante 4 semanas, haciendo nuevos repiques cada 96 horas.

Luego de 4 semanas, tras hacer un nuevo repique, se comenzaron a tomar muestras de 2 mL de cada cultivo cada 24 horas por un plazo de 96 horas y se midió la DO<sub>620</sub> de cada una.

Utilizando un ansa esterilizada se tomó una muestra del cultivo MM-OTC 400 mg/L en fase estacionaria y se realizó un estriado en una placa de Petri con TS-agar. La misma fue incubada a 24 °C hasta observar crecimiento. Se tomaron distintas colonias y se realizaron estriados en nuevas placas de Petri con medio TS-agar hasta lograr aislar los diferentes

microorganismos que conformaban la comunidad estudiada. Lo mismo se corroboró al llevar un conjunto de colonias de cada placa a un portaobjetos de vidrio y observar bajo microscopio óptico Leica DM 2700P que los microorganismos tuvieran la misma morfología. Una vez aislados, se llevaron los distintos microorganismos a medios líquidos MM-OTC.

### ***1.1.3 Caracterización de microorganismos degradadores***

Partiendo de los cultivos en medio sólido realizados en el apartado anterior, se procedió a caracterizar los diferentes microorganismos degradadores de OTC.

En primer lugar, se tomó un conjunto de colonias de cada placa y se los llevó a portaobjetos de vidrio para un análisis morfológico rápido bajo microscopio óptico, con el fin de determinar si los microorganismos se trataban de bacterias u hongos. A continuación se llevó a cabo una Tinción de Gram siguiendo el protocolo del kit comercial Britania y se observó la coloración resultante en microscopio.

Al observar que uno de los microorganismos aislados era levaduriforme, se utilizó el kit colorimétrico RapiD Yeast Plus System de Remel para caracterizar a las levaduras aisladas. Se tomó un conjunto de colonias crecidas en TS-agar y se lo llevó al líquido de inoculación RapID, luego se depositó el mismo en los paneles que contenían sustratos cromogénicos y se dejó incubar siguiendo el protocolo del kit. Pasado el tiempo de incubación, se analizó la coloración obtenida en cada panel según el protocolo.

Finalmente, las bacterias se caracterizaron por secuenciación. Para ello, se preparó una nueva placa de Petri con las bacterias y se envió a MacroGen, Inc para la secuenciación parcial del gen ARNr 16S. Se solicitó la amplificación de un fragmento de alrededor de 1400 pb utilizando los *primers* universales 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') y 1492R (5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'), y la identificación de la especie bacteriana.

## ***1.2 Resultados y discusión***

### ***1.2.1 Recolección y caracterización físico-química de efluente***

En la tabla 1 se informan los valores físico-químicos iniciales del efluente de *feedlot*.

El pH resultó ser ligeramente alcalino, encontrándose dentro de los límites admisibles para descargas a cuerpos de agua superficiales por la resolución N° 336/03 de la Autoridad del Agua (ADA) para la Provincia de Buenos Aires.

Los valores de DQO obtenidos fueron muy superiores a los valores permitidos en la resolución mencionada. En cuanto a los valores de conductividad y de COT, si bien estos también fueron muy elevados, no se encuentran regulados por ADA.

Al llevar a cabo el análisis del sobrenadante por HPLC-MS no se encontraron picos correspondientes a OTC o sus intermediarios. Esto puede ser consecuencia de que el antibiótico tiende a adsorberse en sedimentos (Cheng *et al.*, 2013) y no permanece en solución, por lo cual su detección en matrices complejas se ve dificultada. Para hacer el análisis por HPLC-MS se requiere desarrollar y optimizar una técnica que permita extraer eficientemente a la OTC y sus intermediarios de los sedimentos, sin que otras moléculas interfieran en la señal. Dicha técnica aún se encuentra en proceso de desarrollo por lo que en este trabajo no será posible discutir resultados de HPLC-MS.

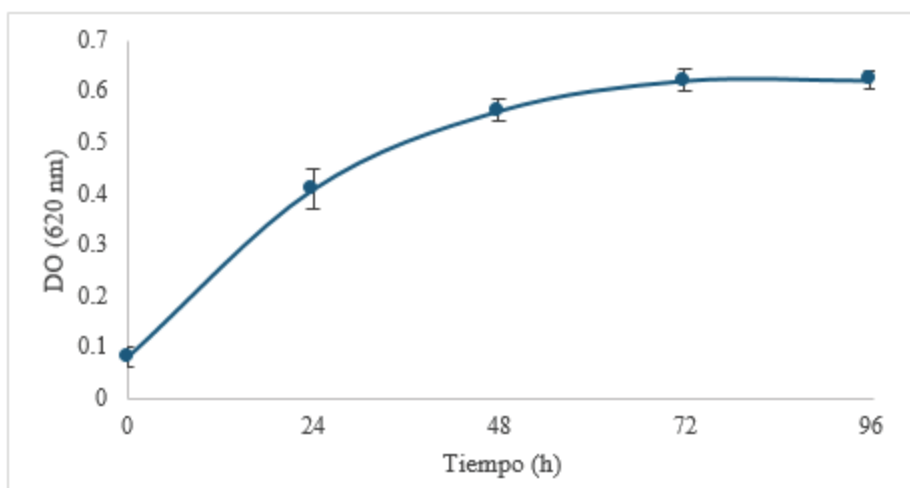
**Tabla 1.1: Valores físico-químicos iniciales del efluente de *feedlot* y valores establecidos por ADA para el vertido de efluentes líquidos.** NE significa que, por el momento, no se establecen límites permisibles.

Variable	Unidades	Valor obtenido en efluente de <i>feedlot</i>	Valor límite para descarga a cuerpo de agua superficial por Resolución de ADA
pH	upH	7.6	6.5 - 10.0
Conductividad	mS/cm	27.6	NE
DQO	mg <sub>O2</sub> /L	23120	≤ 250
COT	mg/L	8340	NE

## ***1.2.2 Aislamiento de microorganismos degradadores***

### ***1.2.2.1 Etapa de enriquecimiento***

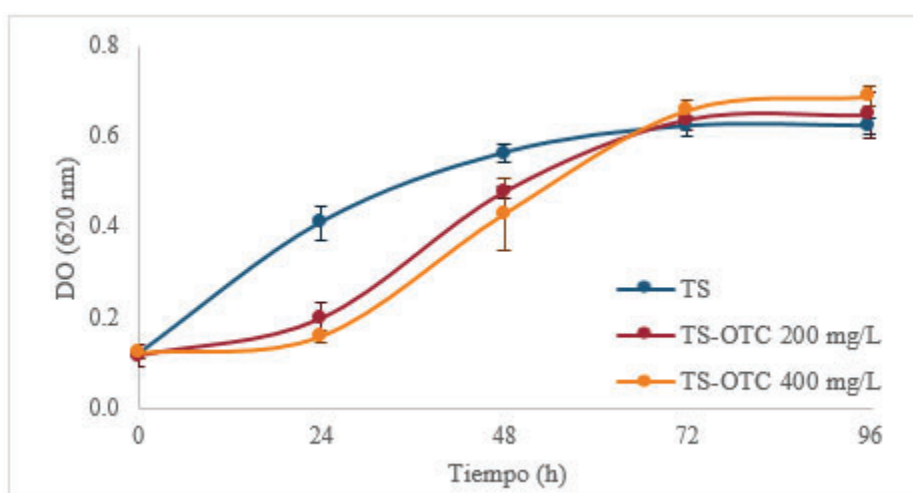
En la figura 1.2 se muestra el crecimiento de los microorganismos autóctonos en TS. Al ser incubados en agitación constante a 120 rpm y a 24 °C, alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento luego de las 72 horas.



**Fig. 1.2: Cinética de crecimiento de comunidad autóctona.** Seguimiento de la densidad óptica a 620 nm en medios de TS durante un plazo de 96 horas.

### 1.2.2.2 Etapa I de aislamiento

En la figura 1.3 se muestra el crecimiento de los microorganismos autóctonos en cultivos TS-OTC con diferentes concentraciones del antibiótico.



**Fig. 1.3: Cinéticas de crecimiento de comunidades autóctonas expuestas a OTC.** Seguimiento de la densidad óptica a 620 nm en medios de TS con agregados de 200 (rojo) y 400 mg/L (naranja) de OTC. Como control se utilizó un cultivo sin OTC.



Se observó que, independientemente de la concentración de OTC, los cultivos de microorganismos alcanzaron la fase estacionaria luego de 72 horas de incubación, tal como ocurrió en la etapa de enriquecimiento (apartado 1.2.2.1).

En los cultivos TS-OTC 200 mg/L y TS-OTC 400 mg/L se evidenció una fase de latencia no detectada en los cultivos TS. Esto es consecuencia de que en los sistemas con OTC sólo pueden proliferar los microorganismos resistentes presentes en el inóculo, por lo que la cantidad inicial de biomasa capaz de desarrollarse resulta ser menor.

Al finalizar la fase de crecimiento exponencial, los tres sistemas alcanzaron valores de DO similares, siendo los de los cultivos TS-OTC levemente superiores.

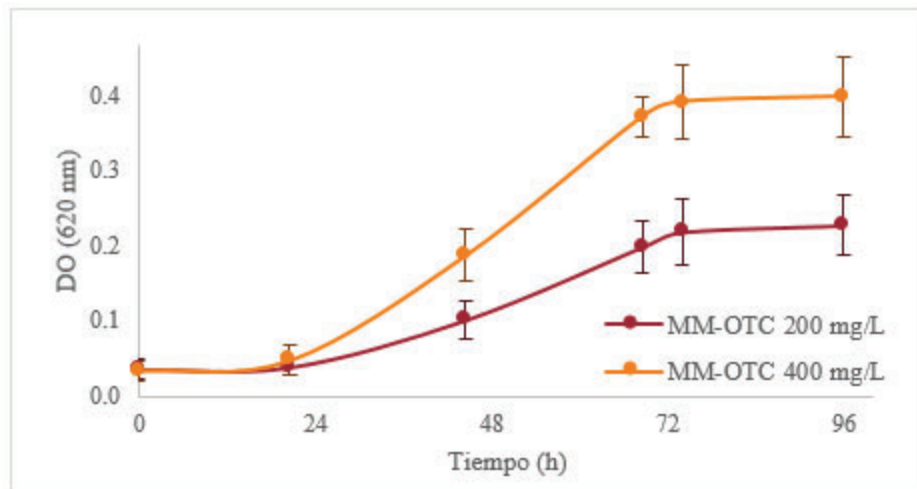
### ***1.2.2.3 Etapa II de aislamiento***

Para estudiar el crecimiento de los microorganismos en medios MM-OTC, en los cuales la única fuente de carbono es el antibiótico, se realizó un control de MM sin agregado de OTC. Durante las 96 horas en las que se siguió la cinética de crecimiento, se obtuvo un ligero aumento en la turbidez de dicho control (desde 0.01 hasta 0.16) sin presentar crecimiento de microorganismos, lo cual se comprobó al tomar una muestra del cultivo con un ansa, llevarla a una placa de Petri con TS-agar e incubarla por 48 horas sin observar crecimiento microbiano. Se puede asumir que el incremento en la  $DO_{620nm}$  es consecuencia del precipitado de las sales y otros compuestos que conforman el MM y, por lo tanto, se procedió a restar el promedio de los valores de  $DO_{620nm}$  obtenidos para los cultivos MM al promedio de los valores obtenidos para cada uno de los cultivos MM-OTC.

En la figura 1.4 se muestran las cinéticas de crecimiento obtenidas para los cultivos MM-OTC. Estas sugieren que se logró aislar microorganismos capaces de utilizar al antibiótico como única fuente de carbono y que el crecimiento de los mismos no se ve inhibido hasta concentraciones de 400 mg/L de OTC. Además, en el cultivo con 400 mg/L de antibiótico, se obtuvo aproximadamente el doble de turbidez luego del tercer día y una mayor velocidad de crecimiento a comparación del cultivo con 200 mg/L de OTC.

Con el fin de potenciar la capacidad degradadora de los microorganismos, se decidió continuar trabajando con la comunidad desarrollada en el cultivo de 400 mg/L de OTC. Se tomó una muestra del mismo y se lo llevó a medio sólido TS-agar. Por microscopía se diferenciaron dos tipos de microorganismos por su morfología y, a continuación, se

purificaron por estriados sucesivos en medio sólido. En la figura 1.5 se muestran los dos microorganismos aislados, MD01 y MD02.



**Fig. 1.4:** Cinéticas de crecimiento de comunidades autóctonas degradadoras de OTC. Seguimiento de la densidad óptica a 620 nm en medios selectivos (MM) con agregados de 200 (rojo) y 400 mg/L (naranja) de OTC.



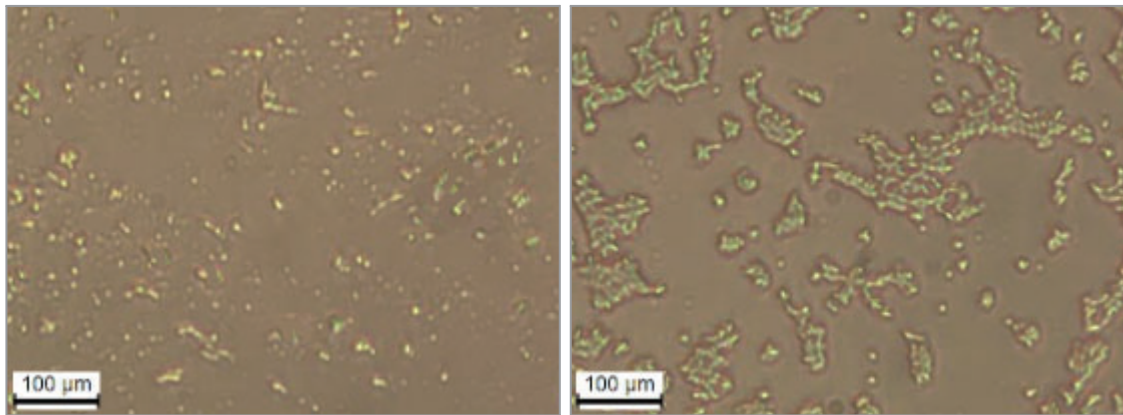
**Fig. 1.5:** Microorganismos degradadores de OTC. Imagen de placas de Petri con TS-agar con microorganismos degradadores de OTC. Izquierda: MD01. Derecha: MD02.

### ***1.2.3 Caracterización de microorganismos degradadores***

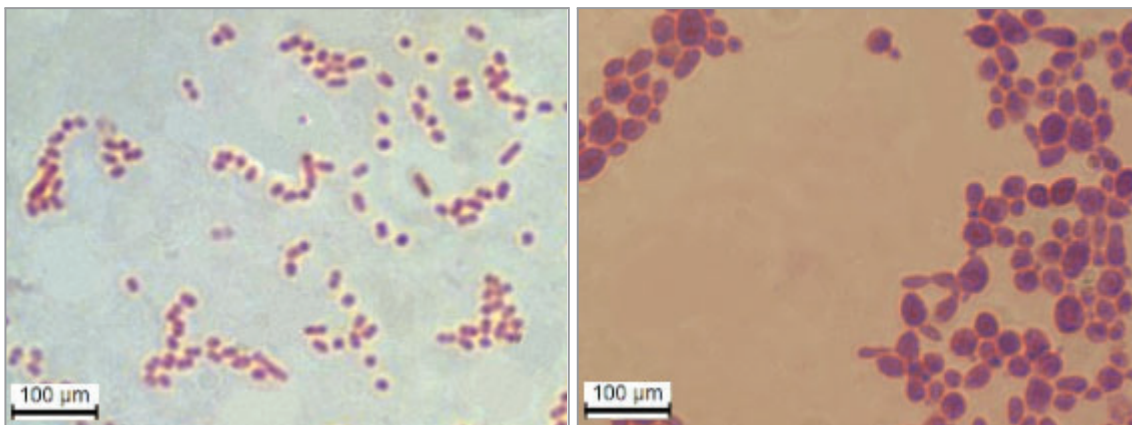
Al observar en microscopio óptico un conjunto de las colonias obtenidas en medio sólido, se identificó a MD01 como microorganismos de pequeño tamaño con morfología de

cocobacilos y a MD02 como microorganismos de mayor tamaño, tal como se muestra en la figura 1.6.

En la figura 1.7 se presentan los resultados obtenidos luego de realizar la Tinción de Gram. Los microorganismos MD01 adquirieron coloración rosada propia de bacterias Gram-negativas, en cambio, los organismos MD02 presentaron morfología levaduriforme.



**Fig. 1.6: Observación microscópica de microorganismos degradadores de OTC.** Imágenes tomadas bajo microscopio óptico con magnitud 200X. Izquierda: MD01. Derecha: MD02.



**Fig. 1.7: Observación microscópica de bacterias y levaduras degradadoras de OTC.** Imágenes tomadas bajo microscopio óptico con magnitud 1000X. Izquierda: MD01. Derecha: MD02.

Mediante el kit colorimétrico RapiD Yeast Plus System que se muestra en la figura 1.8, las levaduras fueron identificadas como una posible cepa de *Rhodotorula rubra* o de *Candida sp.*



**Fig. 1.8: Resultado obtenido del kit colorimétrico RapID Yeast Plus System.**

Debido a que trabajar con dos cepas de microorganismos excede los objetivos de esta tesis y, además, conllevaría modificar los medios de cultivo y las condiciones de incubación para cubrir los requerimientos de las levaduras, se decidió no continuar los ensayos con los microorganismos MD02 y trabajar con las bacterias MD01.

Como se muestra en la tabla 1.2, al solicitar a MacroGen, Inc la secuenciación del gen ARNr 16S, se obtuvo que la especie con mayor porcentaje de similitud a MD01 es *Acinetobacter gernerii*.

**Tabla 1.2: Identificación de la bacteria aislada a partir de secuenciación del gen RNAr 16S.**

Especie	Linaje	Número de acceso	Porcentaje de identidad
<i>Acinetobacter gernerii</i>	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria ; Pseudomonadales; Moraxellaceae; Acinetobacter	NR_117620	99.7%

Otros autores (Carr *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2012; Kabir *et al.*, 2018) han aislado a *A. gernerii* de lodos activados, muestras de suelo y efluentes de curtiembre. A partir de su estudio, se sabe que estas bacterias son estrictamente aeróbicas y que en agar crecen como cocobacilos unidos de a pares, aunque en otros medios presentan pleomorfismo<sup>6</sup>. Además, son capaces de crecer en medios con concentraciones elevadas de contaminantes, como metales pesados y polímeros.

<sup>6</sup> En microbiología, el pleomorfismo es la capacidad de algunos microorganismos para alterar su morfología o funciones biológicas en respuesta a las condiciones ambientales.

Por otro lado, se ha reportado que en microorganismos Gram-negativos, como es el caso de *A. gernerii*, la resistencia a tetraciclinas es inducida y, por lo tanto, se obtienen niveles máximos de resistencia cuando los microorganismos sensibles están expuestos a concentraciones cercanas a la concentración inhibitoria mínima del antibiótico (Nesin *et al.*, 1990). Esto se condice con lo hallado previamente en las etapas de aislamiento (apartados 1.2.2.2 y 1.2.2.3) ya que se obtuvo un mayor crecimiento en medios que presentaban concentraciones más elevadas de OTC. Sin embargo, es necesario realizar ensayos específicos para comprobar que *A. gernerii* posee esta característica.

### **1.3 Puntos destacables**

- El efluente de *feedlot* presentó valores elevados de COT, DQO y conductividad, propios de sitios altamente contaminados con materia orgánica y sales.
- No se detectó OTC ni sus intermediarios al analizar la fracción acuosa del efluente por HPLC-MS. Esto puede ser consecuencia de que la OTC se adsorbe a sedimentos.
- A través de un proceso de enriquecimiento y aislamiento de microorganismos, se evaluó el crecimiento de las comunidades microbianas frente a diferentes concentraciones de OTC. Además, se obtuvieron comunidades capaces de crecer utilizando OTC como única fuente de carbono.
- A partir de la comunidad microbiana crecida en cultivos con 400 mg/L de OTC, se aislaron dos microorganismos capaces de crecer en medio sólido: bacterias MD01 identificadas por secuenciación del gen ARNr 16S como *Acinetobacter gernerii* y levaduras MD02 identificadas como posibles *Rhodotorula rubra* o *Candida sp.* a partir del uso de un kit colorimétrico.

## *Capítulo 2. Estudio del potencial de degradación de oxitetraciclina de los microorganismos aislados.*

### **2.1 Metodología**

Se prepararon cultivos de las bacterias *A. gernerii* en MM con 400 mg/L de OTC (de ahora en más, será llamado MM-OTC) y de 574 mg/L de glucosa (MM-Glu). La concentración de glucosa en este último cultivo se calculó para que ambos presentaran la misma cantidad de carbono. Por otro lado, se preparó un control en MM con 400 mg/L de OTC pero sin inóculo de microorganismos (MM-SI). Cada cultivo tuvo un duplicado.

Los cultivos fueron incubados a 24 °C y agitación constante a 120 rpm durante un periodo de 11 días. Se midió el pH del cultivo al inicio y al final del ensayo.

#### **2.1.1 Cinética de crecimiento de bacterias aisladas**

Cada 24 horas se tomaron muestras de los cultivos MM-OTC, MM-Glu y MM-SI y se realizaron mediciones de la  $DO_{620}$ . Para determinar la cinética de crecimiento de las bacterias aisladas, se restó el promedio de los valores de  $DO_{620}$  obtenidos para los cultivos MM-SI al promedio de los valores obtenidos para los cultivos MM-OTC.

Por otro lado, se buscó estimar la relación entre  $DO_{620}$  y concentración de biomasa en unidades de g/L mediante el método de peso seco. Se llevaron las bacterias aisladas a medios con exceso de TS con el fin de obtener un gran crecimiento bacteriano y, luego de 7 días de incubación, se prepararon diluciones (0.1, 0.2, 0.5, 1 y 2.5 mL de cultivo en 10 mL de solución) en tubos Falcon de 14 mL. Se midió la  $DO_{620}$  de cada uno y se centrifugaron por 15 minutos a 10000 rpm y 15 °C, luego se desechó el sobrenadante y se resuspendió al *pellet* en un pequeño volumen de agua destilada. Se repitió el proceso para cada tubo.

El *pellet* resuspendido se llevó a estufa a 80 °C hasta obtener peso constante.

#### **2.1.2 Cinética de degradación de OTC por bacterias aisladas**

Se siguió la degradación de OTC mediante medición espectrofotométrica y del COT. Además, se realizaron ensayos de adsorción del antibiótico para verificar la importancia de este fenómeno *in vitro*.

### ***2.1.2.1 Determinación de OTC por espectrofotometría***

En estudios realizados por otros autores (Liu *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2013) se determinó que la OTC presenta dos picos de absorción UV en longitudes de onda cercanas a 275 y 352 nm, respectivamente. Además, ambos picos varían con el pH de la solución (Zhao *et al.*, 2013).

Se procedió a comprobar los picos de absorción de la OTC en MM con pH neutro y la variación de los mismos con el metabolismo celular. Para ello, se tomaron muestras de 2 mL de cultivos MM-OTC en diferentes estadios (0 y 3 días de crecimiento bacteriano), se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos y se realizaron diluciones 1/10 del sobrenadante. Se llevaron 0.7 mL del mismo a una cubeta de cuarzo para hacer mediciones del espectro completo en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35.

Se llevó a cabo el mismo procedimiento con los cultivos MM-Glu con el fin de comparar espectros de absorción y, de esa manera, establecer la línea de base debida a la absorbancia de compuestos segregados por el cultivo.

Se seleccionó el pico de absorbancia hallado a los 357 nm para hacer el seguimiento de OTC. Se procedió a medir la concentración de antibiótico a lo largo de 11 días de cultivo, tomando, cada 24 horas, 2 mL de muestra de los ensayos MM-OTC, MM-Glu y MM-SI. Se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos, se realizaron diluciones 1/10 con el sobrenadante y se llevó a cabo la medición de la densidad óptica a 357 nm ( $DO_{357}$ ) en cubeta de cuarzo en espectrofotómetro UV-Vis PG Instruments Ltda. A su vez, en el primer día de incubación, se preparó una curva de calibración con soluciones de OTC en MM de concentraciones 0, 5, 10, 20, 40 y 50 mg/L. Cada 24 horas se realizó la medición de la  $DO_{357}$  de cada solución.

Para determinar la cinética de degradación de OTC, se restaron los promedios de los valores de absorbancia de los cultivos MM-Glu a los promedios de los valores de MM-OTC. Se interpolaron estos valores a la curva de calibración de OTC para obtener la concentración de la misma y, posteriormente, se multiplicaron dichas concentraciones por el factor de dilución (10).

### ***2.1.2.2 Determinación de OTC por COT***

Se determinó la concentración de OTC a lo largo de 11 días por medición de COT tomando, cada 24 horas, 2 mL de los cultivos MM-OTC, MM-Glu y MM-SI. Se centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 10 minutos y se realizaron diluciones 1/10 del sobrenadante. Posteriormente, se llevaron 10 mL de cada dilución a un analizador TOC-L Shimadzu para llevar a cabo la medición del COT.

Se siguió la degradación de OTC utilizando el promedio de los valores obtenidos para los cultivos MM-OTC. El promedio de los valores obtenidos los últimos días del periodo de incubación para los cultivos MM-Glu fueron utilizados como línea base.

### ***2.1.2.3 Ensayo de adsorción de OTC***

Para analizar la adsorción de la OTC en los medios ensayados, se preparó un cultivo con exceso de TS. Luego de 7 días de incubación, se vertió el volumen en un tubo Falcon de 50 mL y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió al *pellet* en MM. Se llevó el volumen a diez tubos de ensayo y se agregaron en los mismos 25 mL de soluciones de MM con OTC a distintas concentraciones (0, 100, 200, 300 y 400 mg/L, por duplicado). Se dejaron en agitación constante y, cada 30 minutos, se tomaron muestras de 0.5 mL de cada ensayo. Se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos y se midió la  $DO_{357}$  del sobrenadante en cubeta de cuarzo por un plazo de 3 horas.

## ***2.2 Resultados y discusión***

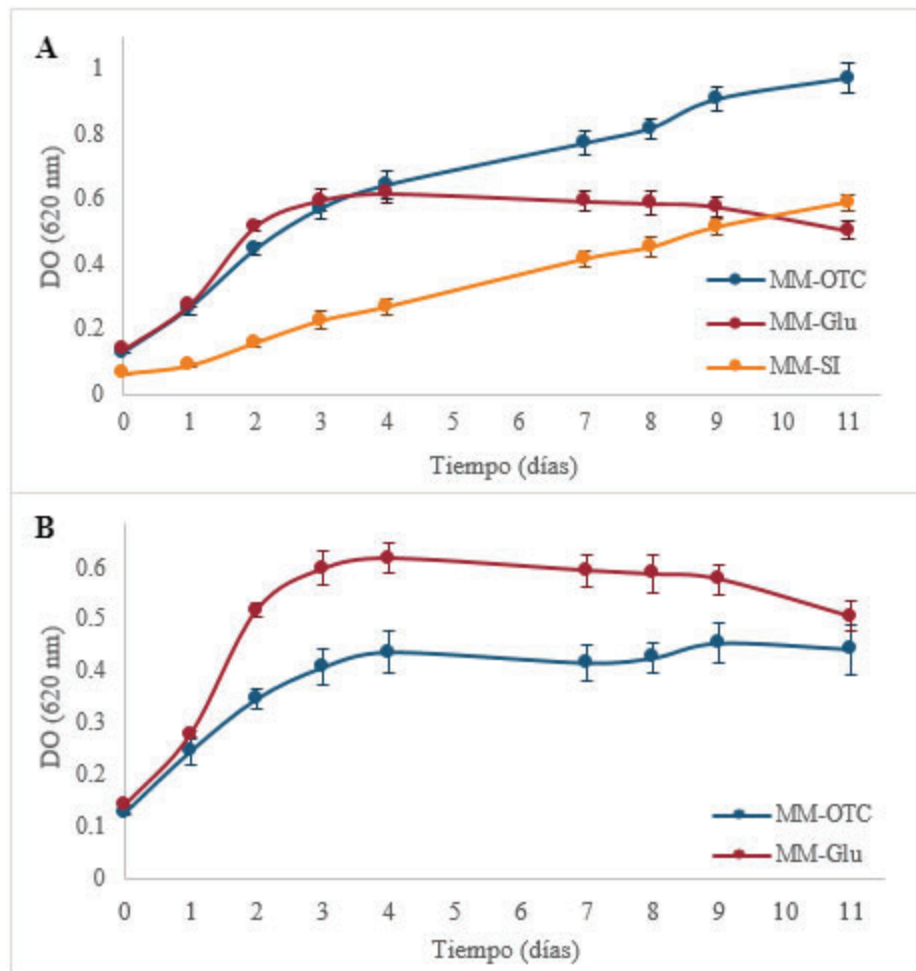
### ***2.2.1 Cinética de crecimiento de bacterias aisladas***

En la figura 2.1A se muestran los valores de absorbancia obtenidos para los cultivos MM-OTC, MM-Glu y MM-SI durante 11 días. Se puede observar que los cultivos MM-Glu alcanzaron la fase estacionaria luego de 3 días de incubación, con valores similares a los obtenidos para la etapa de enriquecimiento inicial (apartado 1.2.2.1).

Por otro lado, los valores de absorbancia de los cultivos MM-OTC y MM-SI continuaron aumentando de manera similar, e incluso superaron a los de MM-Glu. Una de las posibles causas de este comportamiento es la formación de complejos entre la OTC y sales del MM (Ibsen & Urist, 1962) que aumentan la  $DO_{620nm}$ . Por esta razón, se procedió a restar el promedio de los valores de  $DO_{620nm}$  de los cultivos MM-SI a los de los cultivos MM-OTC



para obtener la cinética de crecimiento que se observa en la figura 2.1B. La misma resulta más acorde a microorganismos que están siendo expuestos a concentraciones elevadas de antibiótico.

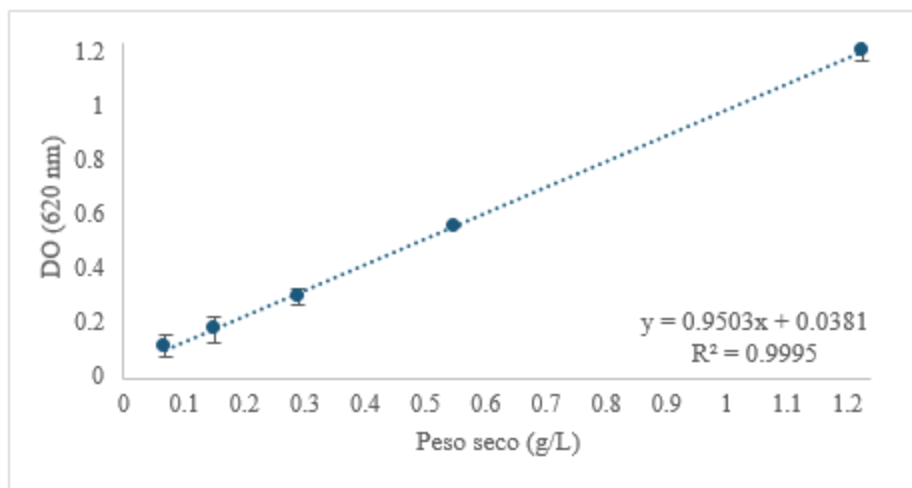


**Fig. 2.1: Cinéticas de crecimiento de bacterias aisladas.** A: Seguimiento de la densidad óptica a 620 nm de cultivos MM-OTC (azul), MM-Glu (rojo) y MM-SI (naranja). B: Seguimiento de la absorbancia a 620 nm de cultivos MM-OTC y MM-Glu, habiendo restado previamente los valores de absorbancia de los cultivos MM-SI a los cultivos MM-OTC.

En la figura 2.2 se muestra la relación entre la  $DO_{620nm}$  y el peso seco de la biomasa obtenida en un cultivo crecido en medio rico con alta concentración de fuente de carbono y energía. Utilizando la ecuación de la regresión lineal ( $DO_{620nm} = 0.9503 * peso\ seco + 0.0381$ ), se intentó estimar las concentraciones iniciales y finales de biomasa para cada cultivo expresadas en g/L.

Sin embargo, en estos ensayos se utilizaron concentraciones muy bajas de fuente de carbono y energía (del orden de 400 mg/L) y, como se esperaba, se obtuvo un crecimiento de biomasa muy pequeño. Para estos valores, la determinación del peso seco estuvo dentro de los límites de detección de la balanza incrementando así el error relativo en la medición de cada una de las muestras. Por lo tanto, no se pudo determinar con precisión suficiente y se sobreestimó la concentración de biomasa. Por dicha razón el análisis del crecimiento solo se discutirá en parámetros relativos y sin utilizar números "absolutos".

De esta manera se observó que, tal como era esperado, el crecimiento de *A. gernerii* en MM-Glu tuvo un mayor rendimiento que el crecimiento en MM-OTC.



**Fig. 2.2:** Relación entre densidad óptica y peso seco de la biomasa. Se presenta la ecuación de la regresión lineal y el  $R^2$ .

En la tabla 2.1 se muestran los valores de pH obtenidos para los cultivos MM-OTC y MM-Glu al inicio y al final del periodo de incubación.

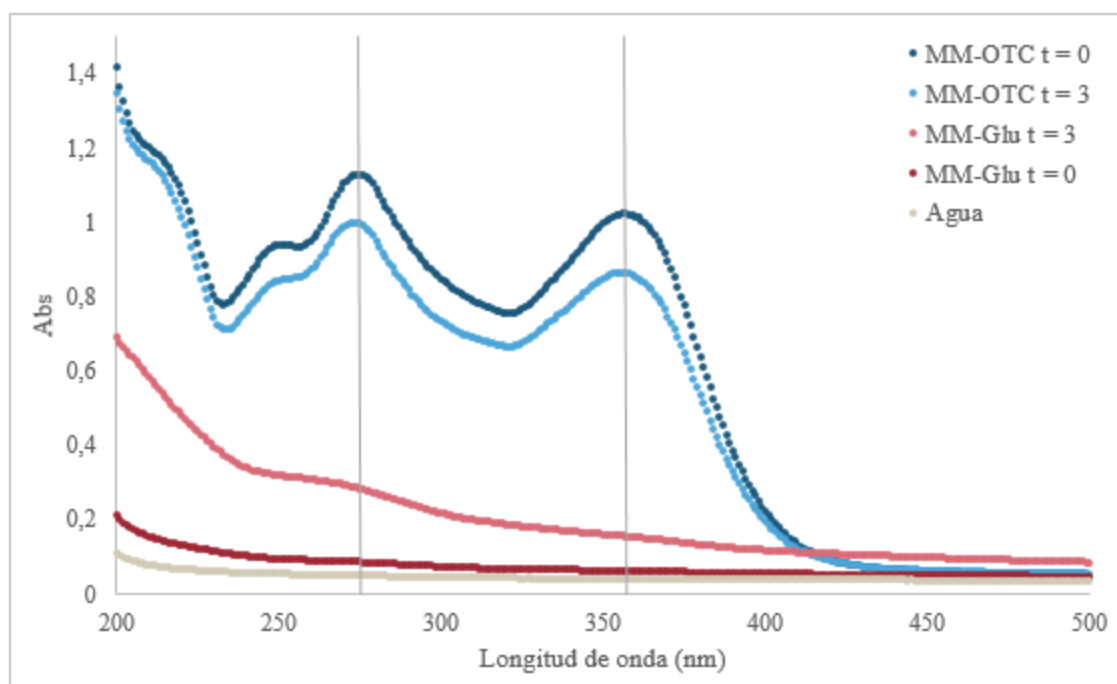
**Tabla 2.1:** Valores de pH obtenidos al inicio y al final del periodo de incubación.

Cultivo	pH inicial	pH final
MM-OTC	6.67	6.65
MM-Glu	7	5.14

## 2.2.2 Cinética de degradación de OTC por bacterias aisladas

### 2.2.2.1 Determinación de OTC por espectrofotometría

En la figura 2.3 se comparan los espectros de absorción de cultivos MM-OTC y MM-Glu en diferentes estadios de incubación. Tal como se halló en bibliografía, la OTC presentó dos picos de absorción, el primero a los 275 nm y el segundo a los 357 nm, siendo éste último más ancho y menos variable al avanzar el tiempo de incubación.



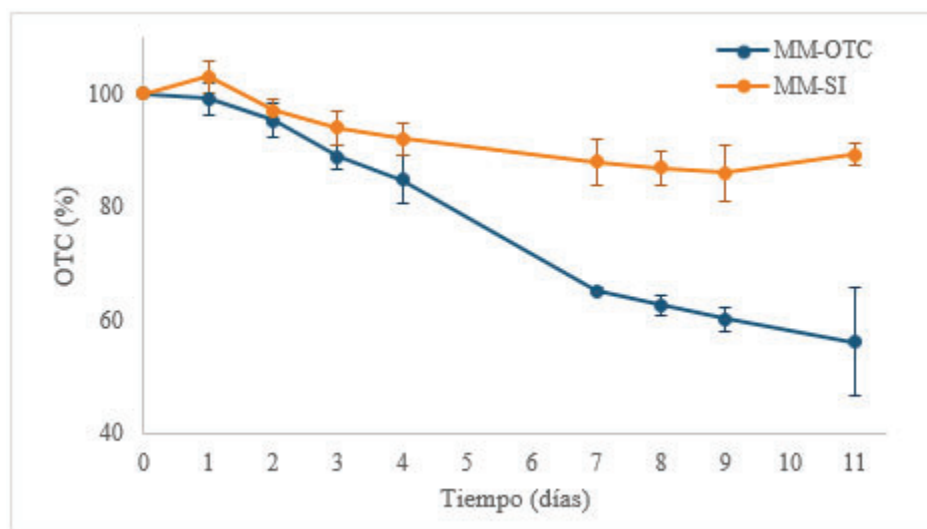
**Fig. 2.3:** Espectros de absorción de cultivos MM-OTC y MM-Glu. Las líneas verticales corresponden a los 275 y 357 nm. Las expresiones t = 0 y t= 3 indican, respectivamente, cultivos con 0 y 3 días de incubación.

Por otro lado, se observó que el espectro de absorción de los cultivos MM-Glu aumentó con el tiempo, de tal forma que en un comienzo resultó ser similar al del agua pura y, al alcanzar la fase estacionaria en el tercer día de incubación, adquirió un leve pico de absorción en el rango de los 250-300 nm. Esto es consecuencia del propio metabolismo celular que genera la liberación de metabolitos, como aminoácidos aromáticos, que absorben en rangos similares a los de la OTC.

Para obtener la cinética de degradación de OTC, se procedió a restar el promedio de los valores de absorbancia obtenidos para los cultivos MM-Glu al promedio de los valores

obtenidos para los cultivos MM-OTC, de forma de “restar” el aumento de absorción provocado por la síntesis de metabolitos y no subestimar la disminución de la absorción a los 357 nm causada por la degradación de la OTC.

Se utilizaron curvas de calibración para convertir valores de absorbancia a 357 nm en valores de concentración de OTC y se graficaron las cinéticas de degradación que se presentan en la figura 2.4.



**Fig. 2.4:** Seguimiento de degradación de OTC por espectrofotometría. Se representa el porcentaje de OTC respecto al valor inicial para los cultivos MM-OTC (azul) y MM-SI (naranja).

Se observó una disminución del 43.8 % en la concentración de OTC en cultivos MM-OTC y una disminución del 10.6 % en cultivos MM-SI. Este último resultado puede deberse a la degradación basal de la OTC debido a la fotosensibilidad de la misma (Xuan *et al.*, 2009) o a la formación de complejos entre la OTC y las sales que componen el MM, lo cual puede conducir a pérdida en la absorbancia o a precipitación del antibiótico.

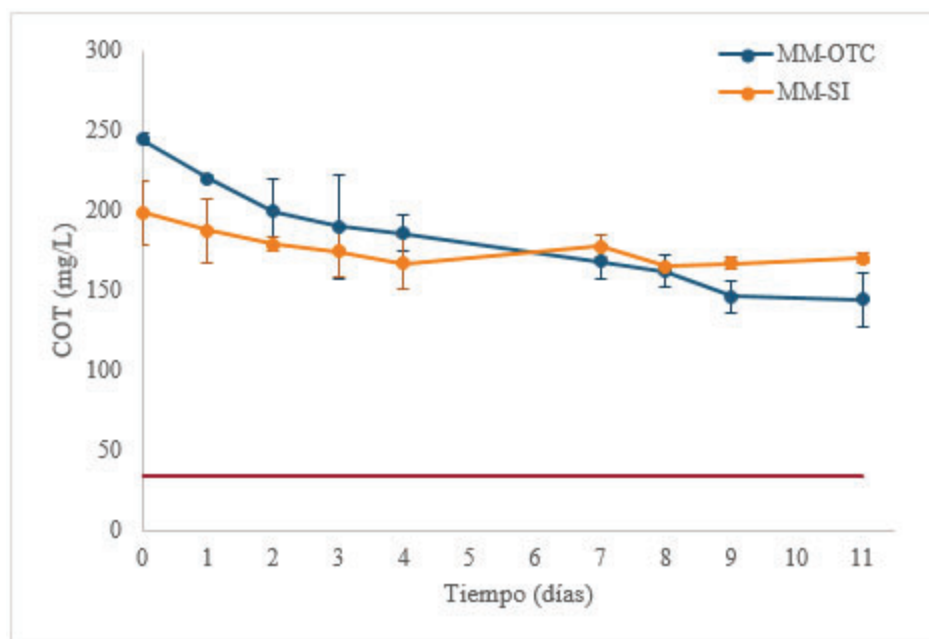
### ***2.2.2.2 Determinación de OTC por COT***

Estudiar la degradación de OTC mediante los valores de COT aporta información sobre la aparición de intermediarios del antibiótico. Por ejemplo, si por espectrofotometría a 357 nm se detecta una disminución en la absorbancia mucho mayor a la disminución en los valores de COT, se puede asumir que la OTC no se mineralizó sino que se degradó

parcialmente y dio lugar a intermediarios carbonados que mantienen los valores de COT elevados.

En la figura 2.5 se muestra la evolución del COT, el cual disminuyó en ambos cultivos, MM-OTC y MM-SI. En el caso de los cultivos MM-OTC, se alcanzó una degradación del 41.1 % al finalizar el periodo de incubación. En cuanto a los cultivos MM-SI, se notó que la curva no fue únicamente en descenso durante el tiempo de incubación, sin embargo, al considerar los valores de COT iniciales y finales, se puede decir que el antibiótico fue degradado en un 14.4 %.

Los valores de COT para ambos cultivos, incluso luego de 11 días de incubación, se mantuvieron muy por encima de la línea base, la cual corresponde al COT basal debido a componentes celulares carbonados.



**Fig. 2.5: Seguimiento de degradación de OTC por medición de COT.** Se representa la concentración de OTC para los cultivos MM-OTC (azul) y MM-SI (naranja). La línea base corresponde al COT basal para las bacterias aisladas.

Los valores de degradación de OTC obtenidos por método espectrofotométrico (43.8 %) y por medición de COT (41.1 %) resultaron ser similares. Esto sugiere que *A. gernerii* al metabolizar el antibiótico, es capaz de mineralizarlo en su totalidad, es decir, convertirlo en dióxido de carbono, agua y biomasa.

### 2.2.2.3 Ensayo de adsorción de OTC

Analizar la adsorción de la OTC en los medios ensayados permite descartar que parte de la disminución en la concentración de antibiótico sea provocada porque el mismo se adsorbe a las paredes del recipiente o a las membranas celulares.

En la figura 2.6 se muestra el seguimiento de la  $DO_{357nm}$  para cada solución de OTC durante un plazo de 3 horas. En las soluciones de 0-200 mg/L de OTC los valores de  $DO_{357nm}$  permanecieron prácticamente constantes, mientras que en las soluciones de 300 y 400 mg/L los valores de  $DO_{357nm}$  presentaron variaciones, sin embargo, las mismas no son estadísticamente significativas y no son propias de un fenómeno de adsorción.

Se concluye, entonces, que el antibiótico no se adsorbe de manera apreciable en las condiciones de incubación utilizadas y, por lo tanto, la disminución en la concentración de OTC obtenida en los anteriores apartados se debe a su degradación.

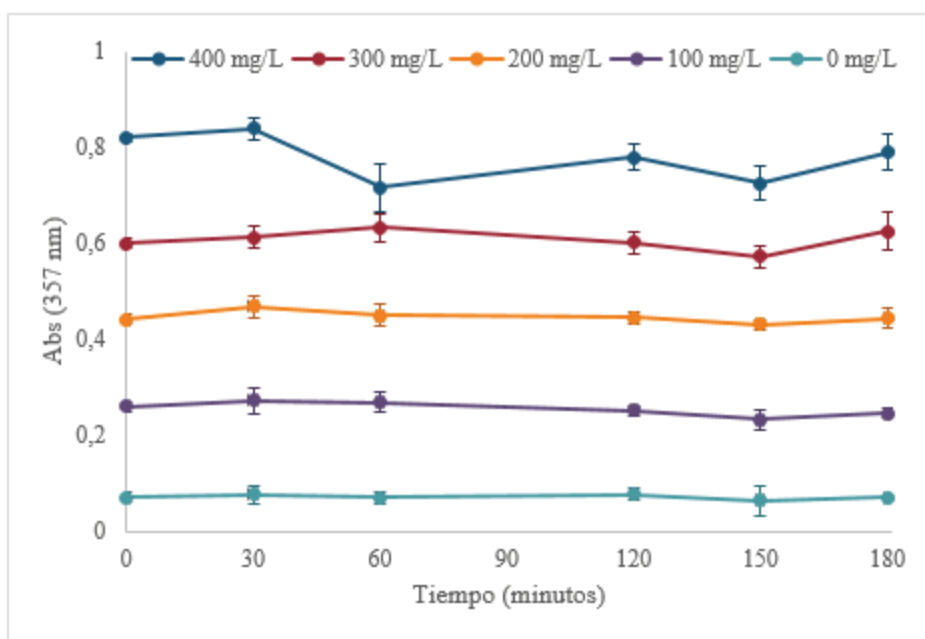


Fig. 2.6: Cinéticas de adsorción de soluciones de OTC.

## 2.3 Puntos destacables

- Se estudiaron las cinéticas de crecimiento de *A. gernerii* en MM con OTC y glucosa como fuentes de carbono y energía.
- Utilizando cultivos de TS, se buscó hallar la relación entre la absorbancia y el peso seco de la biomasa en unidades de g/L. Sin embargo, al trabajar con bajas

concentraciones de fuentes de carbono y energía, el crecimiento obtenido fue muy poco y no fue posible cuantificarlo.

- Se comprobó que los cultivos MM-OTC presentan dos picos de absorción UV. Sabiendo eso, se estudiaron las cinéticas de degradación de OTC de *A. gernerii* complementando mediciones por espectrofotometría a 357 nm y por COT.
- Los resultados combinados de medición espectrofotométrica y de COT, sugieren que utilizando *A. gernerii* se obtuvo una mineralización total del 41 % de la OTC presente en los medios durante un plazo de 11 días, sin haber acumulación de productos intermediarios durante el proceso.
- El fenómeno de adsorción de la OTC sobre la biomasa u otros componentes de los sistemas es despreciable.

## *Capítulo 3. Ensayos de degradación biológica-química de oxitetraciclina.*

### ***3.1 Metodología***

#### ***3.1.1 Ensayo de degradación biológica-química en matriz definida***

##### ***3.1.1.1 Ensayos preliminares***

Antes de llevar a cabo el ensayo acoplado de degradación biológica-química con cultivos MM-OTC, se realizaron ensayos preliminares de degradación química por foto-Fenton para determinar las condiciones óptimas del mismo.

Se prepararon soluciones de 300 mg/L de OTC en MM (sin microorganismos) y se ajustó el pH a 3 utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 M. Luego se llevaron las soluciones al reactor que se muestra en la figura 3.1, el mismo está equipado con luces que emiten radiación UVA (372 nm). En la tabla 3.1 se muestran las distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y Fe (III) que se añadieron para comenzar el tratamiento foto-Fenton.



**Fig. 3.1:** Reactor utilizado para proceso foto-Fenton, compuesto por un agitador magnético, lámparas de luz ultravioleta y un sistema de ventilación que permite mantener la temperatura constante.



**Tabla 3.1: Condiciones con las que se llevó a cabo el proceso foto-Fenton para cada tratamiento.**

Tratamiento	Cc. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	Cc. Fe (III) (mg/L)	Pulso	Tiempo del pulso (min)
1	5	3	-	-
2	10	3	de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	180
3	10	6	de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	180
4	10	6	de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y Fe (III)	180

Cada 30 o 60 minutos, se tomaron muestras de 2 mL para seguir el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de OTC. La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se midió por espectrofotometría a 450 nm utilizando el método del vanadato (Nogueira *et al.*, 2005). Para cuantificar OTC, se centrifugaron 1.5 mL de las muestras a 4000 rpm durante 5 minutos y se hicieron diluciones 1/10. El seguimiento se realizó por espectrofotometría a 357 nm y por medición de COT.

Cuando la DO<sub>450</sub> alcanzó valores muy bajos o cuando se detectó un estancamiento en la mineralización de OTC, se añadió un pulso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el caso de los tratamientos 2 y 3, y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe (III) en el tratamiento 4. A partir de la disminución de OTC, se seleccionaron las condiciones de tratamiento óptimas para llevar a cabo el ensayo acoplado de degradación biológica-química.

### ***3.1.1.2 Ensayo acoplado de degradación en matriz definida***

Se prepararon cultivos MM-OTC con las bacterias *A. gernerii* y se siguió la cinética de degradación de OTC por espectrofotometría a 357 nm y por medición de COT durante el plazo de una semana. En los días 0 y 7 del cultivo se tomaron muestras de 12 mL de MM-OTC y se llevaron a cabo ensayos ecotoxicológicos (descritos en el apartado 3.1.3.3).

Al finalizar el periodo de incubación, se centrifugaron los cultivos a 4000 rpm durante 20 minutos y se tomó el sobrenadante. Se les ajustó el pH a 3 utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M y se procedió a llevar a cabo el tratamiento foto-Fenton durante 420 minutos, utilizando 6 mg/L de Fe (III) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM, y agregando un pulso de estos mismos componentes a los 180 minutos de reacción.

Cada una hora se tomaron 2 mL de muestra para controlar el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y para seguir la disminución de OTC por espectrofotometría y COT. Al finalizar el tratamiento, se

ajustó a 7 el pH de la solución resultante utilizando NaOH (0.5 M) y se llevaron a cabo ensayos ecotoxicológicos (apartado 3.1.3.3) para analizar la toxicidad final del medio.

Como blanco se utilizó una solución de 400 mg/L de OTC en MM (sin microorganismos) que se expuso a radiación UVA durante 420 minutos sin agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ni Fe (III). La finalidad de este ensayo fue estudiar la degradación del antibiótico por fotólisis al ser expuesto a radiación UVA.

Los valores obtenidos para ambos ensayos fueron interpolados en una curva de calibración de OTC que permitió obtener la concentración de la misma en cada punto del proceso.

### ***3.1.2 Ensayo de degradación biológica-química en matriz real***

#### ***3.1.2.1 Cinética de crecimiento en matriz real***

Se partió de una muestra de 500 mL de efluente de *feedlot* porcino tomada en Julio de 2021 y almacenada hasta la fecha en un recipiente estéril a 4 °C. Con el efluente crudo se realizó un ensayo ecotoxicológico (apartado 3.1.3.3) y posteriormente se dejó decantar el material sólido por 24 horas. Se tomó la parte líquida y se centrifugó dos veces a 4000 rpm durante 20 minutos.

Se agregó OTC al sobrenadante hasta alcanzar una concentración de 400 mg/L y, luego, se repartió el mismo en seis matraces Erlenmeyer, para realizar los tres tratamientos biológicos por duplicado que se detallan a continuación:



**EF-OTC**

45 mL de efluente + muestra de 5 mL de cultivo de *A. gernerii* en MM-OTC



**EF-Glu**

45 mL de efluente + muestra de 5 mL de cultivo de *A. gernerii* en MM-Glu



**EF-SI**

45 mL de efluente + 5 mL de agua esterilizada (control sin inóculo)

Se incubaron en agitación constante a 120 rpm y a 24 °C, y se siguió el crecimiento microbiano tomando muestras de 1 mL cada 2 días y realizando diluciones al medio para medir la DO<sub>620</sub> durante un plazo de 12 días.

### ***3.1.2.2 Cinética de degradación de OTC en matriz real***

Debido a la turbidez del efluente y a la alta concentración de compuestos que absorben en el rango de longitudes de onda de trabajo, no fue posible seguir la degradación de OTC por espectrofotometría a 357 nm, por lo tanto, la misma se siguió por COT.

Se tomaron muestras de 2 mL cada 2 días, se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos y se realizaron diluciones 1/100 con el sobrenadante. Se tomaron 10 mL de dilución y se llevó a cabo la medición del COT.

### ***3.1.2.3 Ensayo acoplado de degradación en matriz real***

Luego de 12 días de incubación en los que se siguieron las cinéticas de crecimiento y degradación de OTC, se tomó una muestra de 12 mL del cultivo EF-OTC con el fin de realizar ensayos ecotoxicológicos (apartado 3.1.3.3). También se controló el pH del medio.

Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 4000 rpm durante 20 minutos y se expuso el sobrenadante al proceso de foto-Fenton durante 480 minutos utilizando Fe (III) 6 mg/L y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM y añadiendo un pulso de dichos componentes a los 180 minutos de reacción. Se siguió cada una hora la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de OTC por espectrofotometría a 450 nm y COT, respectivamente.

Al finalizar el ensayo se ajustó a 7 el pH del efluente tratado y se llevaron a cabo ensayos ecotoxicológicos (apartado 3.1.3.3).

## ***3.1.3 Ensayos ecotoxicológicos***

Con el fin de estudiar la disminución de la toxicidad del medio, se llevaron a cabo ensayos ecotoxicológicos siguiendo las normas IRAM 2008 y 2016. Se utilizaron semillas de *Lactuca sativa* (lechuga), *Eruca vesicaria* (rúcula) y *Raphanus sativus* (rabanito), almacenadas a 4 °C en oscuridad.

### 3.1.3.1 Poder germinativo

En primera instancia, se probó el poder germinativo de las semillas para determinar cuáles especies podrían ser utilizadas en los ensayos ecotoxicológicos. Para ello, se prepararon 9 placas de Petri con un papel de filtro cubriendo su radio y, a continuación, se saturó el papel con 4 mL de agua destilada evitando que se formen burbujas de aire. Con la ayuda de una pinza, se colocaron 10 semillas en cada placa, correspondiendo 3 placas a cada especie, como se muestra en el siguiente diagrama:



Se incubaron las placas en oscuridad a una temperatura de 24 °C. Las semillas de *L. sativa* se dejaron 120 horas, mientras que las semillas de *E. vesicaria* y *R. sativus* se dejaron 48 horas (Iannacone & Alvariño, 2005; Foti *et al.*, 2005). Posteriormente, se realizó el recuento de las semillas que presentaron crecimiento de radícula y se obtuvo el poder germinativo de cada especie calculando el porcentaje de semillas germinadas sobre el total de semillas (30 para cada especie).

### 3.1.3.2 Ensayo de sensibilidad a OTC

Se prepararon soluciones MM-OTC (sin microorganismos) con un rango de concentraciones entre 0-600 mg/L de antibiótico. Para cada concentración, se utilizaron 2 placas de Petri con 10 semillas de *R. sativus* cada una y se vertieron 4 mL de solución.

Se incubaron en oscuridad a una temperatura de 24 °C durante 48 horas y se utilizó una hoja milimetrada para medir la longitud de la radícula de cada una de las plántulas, tal como se muestra en la figura 3.2. Se calculó la longitud media para cada concentración de OTC y se obtuvo el porcentaje de inhibición con respecto al control (4 mL de MM sin OTC). Posteriormente, se graficó el porcentaje de inhibición vs. el logaritmo de la concentración de

OTC y, a partir de la ecuación de la regresión lineal, se determinó la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ).

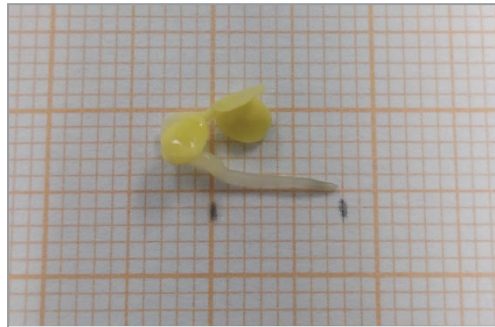
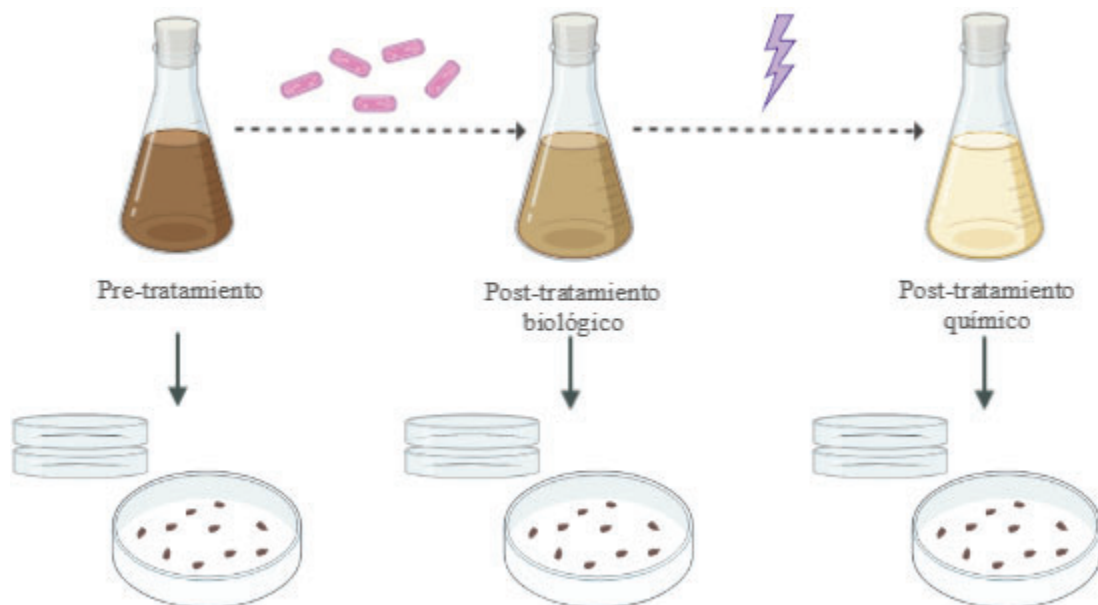


Fig. 3.2: Medición de la longitud de la radícula utilizando hoja milimetrada.

### 3.1.3.3 Medición de toxicidad

Para llevar a cabo la medición de la toxicidad en puntos críticos de los ensayos de degradación biológica-química, se utilizaron 3 placas de Petri con 10 semillas de *R. sativus* cada una y 4 mL del medio líquido o efluente con distintos grados de tratamiento (apartados 3.1.1 y 3.1.2), tal como se puede ver en el siguiente diagrama:



Se incubaron en oscuridad a una temperatura de 24 °C durante 48 horas y se utilizó una hoja milimetrada para medir la longitud de la radícula de cada una de las plántulas. Se

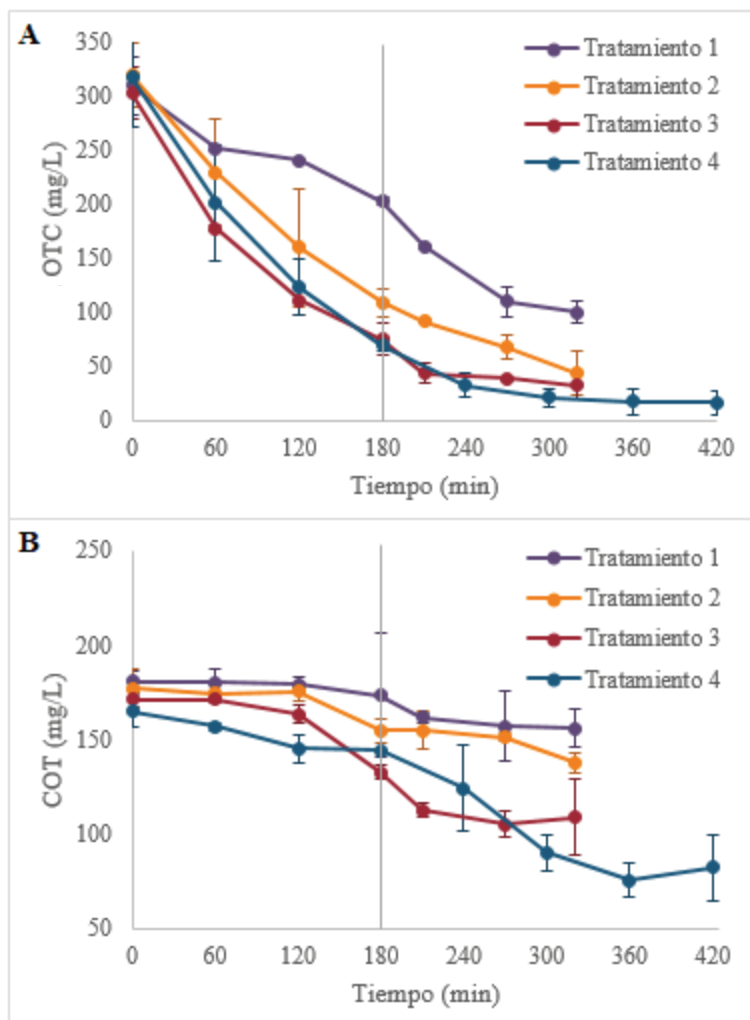
calculó la longitud media para cada etapa de tratamiento y se obtuvo el porcentaje de inhibición con respecto al control (4 mL de agua destilada).

## 3.2 Resultados y discusión

### 3.1.1 Ensayo de degradación biológica-química en matriz definida

#### 3.1.1.1 Ensayos preliminares

En la figura 3.3 se muestra la disminución de la OTC para los distintos tratamientos durante el proceso de degradación química por foto-Fenton.



Al analizar la disminución de OTC por espectrofotometría, se observó que en los tratamientos 2, 3 y 4, la concentración de antibiótico disminuyó alcanzando valores similares. Sin embargo, al analizar los valores de COT para dichos tratamientos, resultó ser el

tratamiento 4 el que presentó una mayor disminución de la OTC y de sus intermediarios. Dichos resultados se muestran en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2: Disminución porcentual de OTC obtenida en el proceso foto-Fenton para cada tratamiento.**

Tratamiento	Disminución de OTC según DO (%)	Disminución de OTC según COT (%)
1	68	14
2	86	22
3	89	36
4	95	50

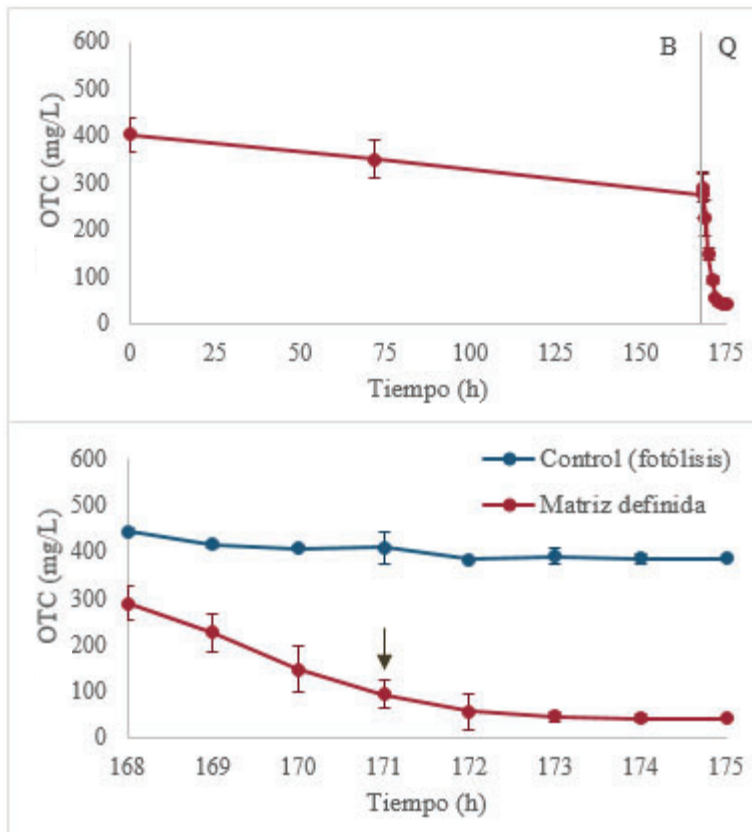
Realizar estos ensayos preliminares permitió establecer las condiciones que conducen a una mayor degradación de OTC por foto-Fenton entre las condiciones estudiadas. Las mismas resultaron ser las del tratamiento 4, es decir:  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM, 6 mg/L de Fe (III) y un pulso a los 180 minutos con estos dos componentes.

### ***3.1.1.2 Ensayo acoplado de degradación en matriz definida***

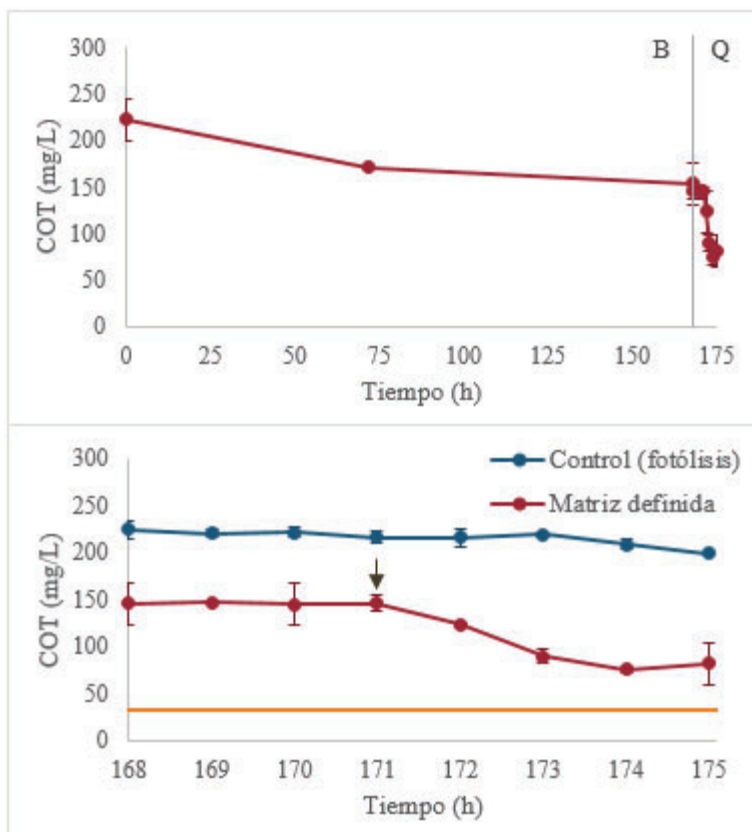
Luego de optimizar las condiciones de reacción, se llevó a cabo el ensayo acoplado de degradación biológica-química en matriz definida. Para ello, se siguió la cinética de degradación de OTC de cultivos MM-OTC por un plazo de 7 días y, posteriormente, se aplicó el tratamiento de foto-Fenton durante 420 minutos.

En la figura 3.4A se muestra la evolución en la concentración de OTC medida por espectrofotometría a 357 nm durante el tratamiento biológico-químico. Se puede observar que el mayor porcentaje de degradación de OTC ocurrió durante el proceso de foto-Fenton. En la figura 3.4B se muestra con más detalle la evolución en la concentración de OTC durante el tratamiento químico por foto-Fenton.

Por otro lado, en la figura 3.5A se muestra la evolución en la medición del COT durante el tratamiento biológico-químico, y en la figura 3.5B se detalla la evolución del COT durante el tratamiento químico. En este caso, el porcentaje de disminución del COT no resultó ser tan diferente entre ambos tratamientos.



**Fig. 3.4: Evolución de OTC en ensayo de degradación biológica-química en una matriz definida medida por espectrofotometría a 357 nm.** A: Concentración de OTC a lo largo del tratamiento biológico (B)-químico (Q). La línea vertical corresponde a la división entre ambos tratamientos. B: Concentración de OTC a lo largo del tratamiento químico. La flecha indica el pulso de  $H_2O_2$  y Fe (III) añadido a los 180 minutos de tratamiento químico.



**Fig. 3.5: Evolución de OTC en ensayo de degradación biológica-química en una matriz definida medida por COT.** A: Concentración de COT a lo largo del tratamiento biológico (B)-químico (Q). La línea vertical corresponde a la división entre ambos tratamientos. B: Concentración de COT a lo largo del tratamiento químico. La flecha indica el pulso de  $H_2O_2$  y Fe (III) añadido a los 180 minutos de tratamiento químico. La línea base (naranja) corresponde al valor de COT basal para las bacterias aisladas.



En la tabla 3.3 se detallan los porcentajes de disminución de OTC y COT al final del tratamiento biológico y del proceso de foto-Fenton, y los porcentajes de mineralización y degradación obtenidos a lo largo del ensayo.

Al seguir los niveles del antibiótico por espectrofotometría, se obtuvieron porcentajes de degradación de OTC del 32 % para el tratamiento biológico, del 58 % para el tratamiento químico y del 13% para el control de fotólisis. Por otro lado, los valores obtenidos al realizar la medición de COT fueron de 31 y 32 % para el tratamiento biológico y el tratamiento químico, respectivamente, y 11% para el control.

Como se mencionó previamente (apartado 2.2.2.2), el seguimiento de OTC por medición de COT permite conocer los valores de mineralización del antibiótico, es decir, de degradación completa (de OTC y todos sus intermediarios). Por lo mismo, se procedió a restar los porcentajes obtenidos al realizar el seguimiento por medición de COT a los porcentajes obtenidos para el seguimiento por medición espectrofotométrica y, a su vez, a restar los valores del control. De esta forma se puede estimar que, a lo largo del tratamiento biológico-químico, se logró mineralizar un 52 % y degradar un 25 % de los 400 mg/L de OTC que originalmente había en el cultivo.

**Tabla 3.3: Porcentajes de disminución, mineralización y degradación de OTC a lo largo del tratamiento biológico-químico en matriz definida.** (\*) El total se obtuvo restando el valor del control a la suma de los tratamientos biológico y químico.

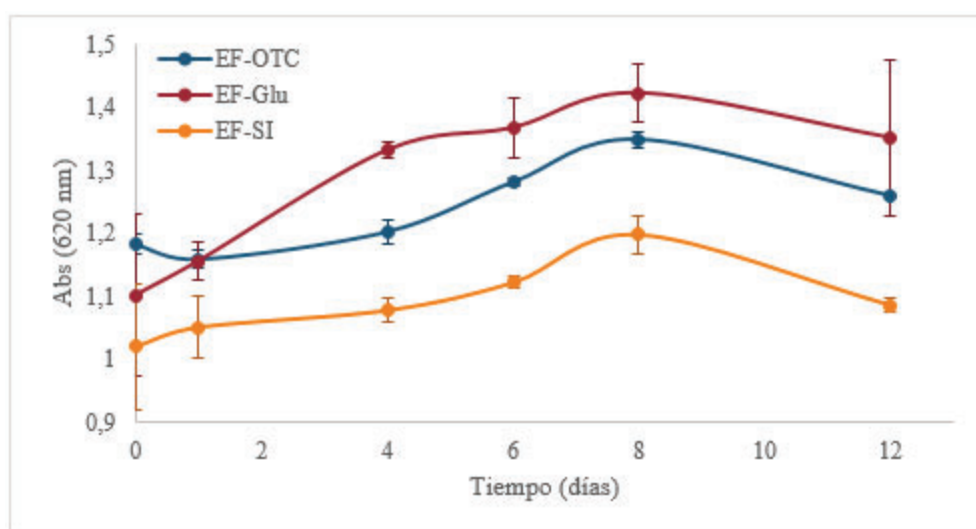
<b>Tratamiento</b>	<b>Disminución de OTC según DO (%)</b>	<b>Disminución de OTC según COT (%)</b>	<b>Mineralización (%)</b>	<b>Degradación (%)</b>
Biológico	32	31	31	1
Químico	58	32	32	26
Control	13	11	11	2
Total (*)	90	63	52	25

### 3.1.2 Ensayo de degradación biológica-química en matriz real

#### 3.1.2.1 Cinética de crecimiento en matriz real

En el capítulo 1 se comprobó que el efluente no presentaba concentraciones significativas de OTC en solución, lo cual permitiría el crecimiento de microorganismos no resistentes al antibiótico. Por esta razón, y con miras de ampliar el espectro de posibilidades de remediación a efluentes con concentraciones elevadas de contaminante, se llevó a cabo el ensayo de degradación de OTC en una matriz real con agregados del antibiótico.

En la figura 3.6 se muestra la cinética de crecimiento en matriz real de ensayos EF-OTC, EF-Glu y EF-SI. Se observó que los cultivos EF-OTC y EF-Glu alcanzaron valores de turbidez similares luego de 12 días de incubación. En cambio, los cultivos EF-SI no presentaron un aumento de turbidez considerable durante el periodo de incubación, probablemente como consecuencia de que los microorganismos autóctonos no tuvieron un periodo de adaptación a concentraciones de 400 mg/L de OTC y, por lo tanto, no fueron capaces de crecer tan eficientemente en presencia de la misma.



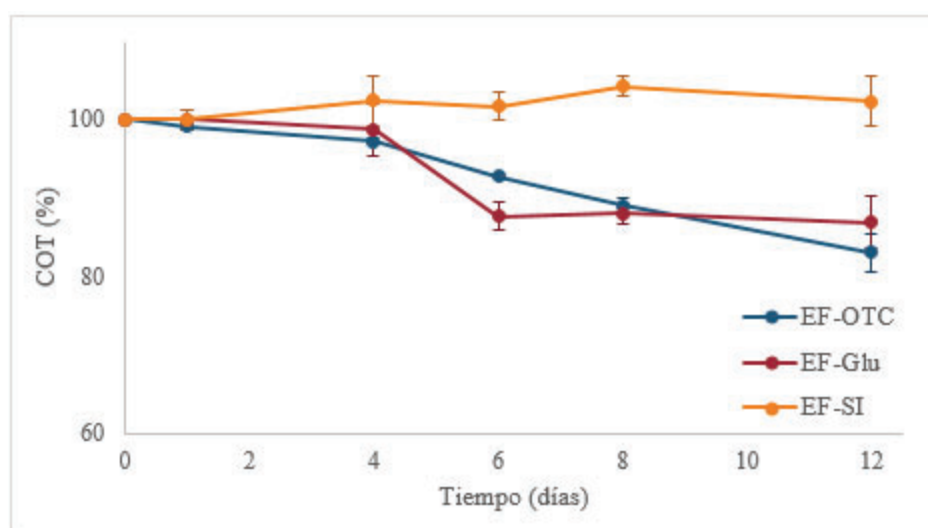
**Fig. 3.6:** Cinéticas de crecimiento microbiano en matriz real durante el tratamiento biológico. Se representa la  $DO_{620nm}$  para muestras de efluente con agregado de microorganismos provenientes de cultivos MM-OTC (azul), MM-Glu (rojo) y MM-SI (naranja).

Los valores de pH obtenidos durante el día 0 y el día 12 del tratamiento biológico para los cultivos MM-OTC fueron 8.94 y 9.09, respectivamente. En dichas condiciones, se puede asumir que el crecimiento de los microorganismos se vio desfavorecido y, por lo mismo, no

hubo un gran aumento en los niveles de absorbancia a pesar de la cantidad de carbono disponible en los sistemas.

### 3.1.2.2 *Cinética de degradación de OTC en matriz real*

En la figura 3.7 se muestra la evolución del COT en los diferentes ensayos en matriz real. Se observó que los cultivos EF-SI no presentaron una disminución en la concentración de COT, en cambio los cultivos EF-OTC y EF-Glu mostraron una disminución similar, siendo los cultivos EF-OTC los que alcanzaron valores levemente menores. Es posible que esto se deba a que los microorganismos que fueron agregados a los cultivos EF-OTC, provenían de cultivos que contienen OTC como única fuente de carbono y, por lo tanto, ya se encontraban aclimatados a concentraciones elevadas de la misma.

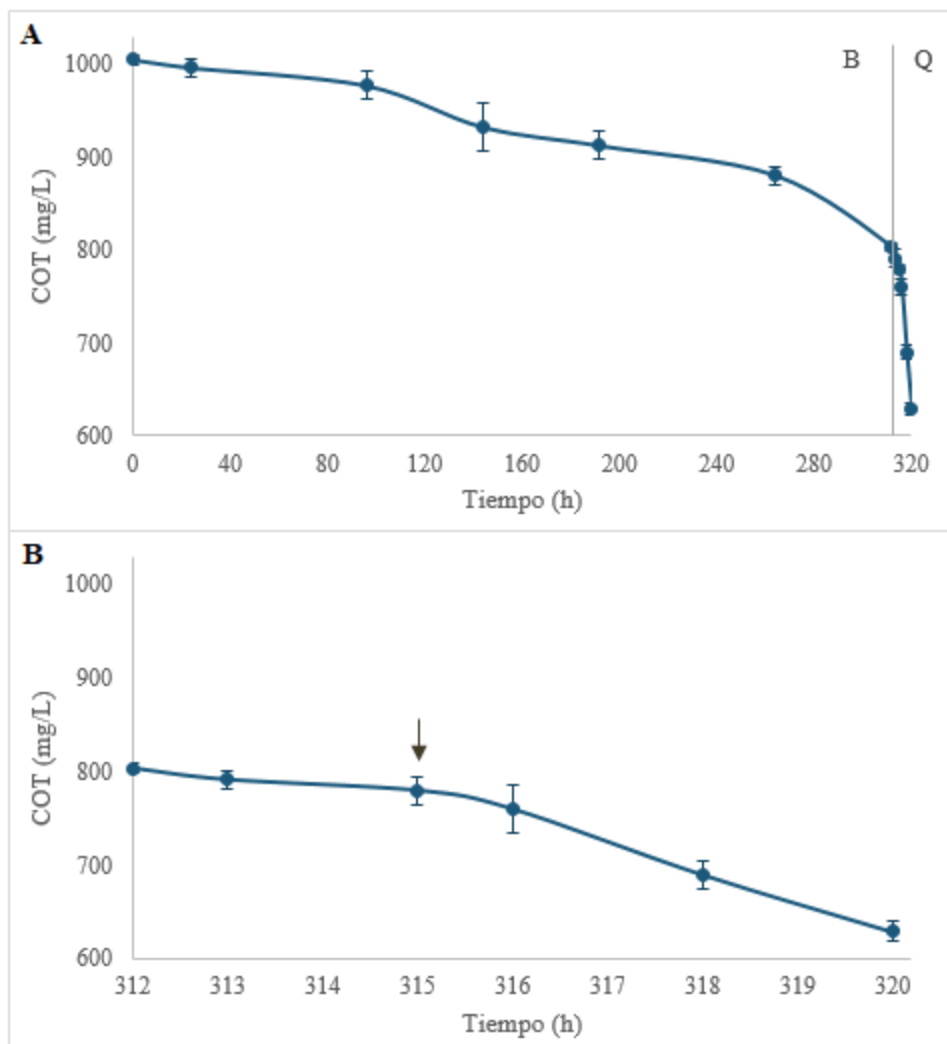


**Fig. 3.7: Evolución del COT en matriz real durante el tratamiento biológico.** Se representa el porcentaje de COT respecto al valor inicial obtenido para muestras de efluente con agregado de microorganismos provenientes de cultivos MM-OTC (azul), MM-Glu (rojo) y MM-SI (naranja).

### 3.1.2.3 *Ensayo acoplado de degradación en matriz real*

En la figura 3.8 se muestra la evolución del COT a lo largo del tratamiento biológico-químico. A diferencia de lo ocurrido en el ensayo acoplado en una matriz definida, se obtuvo una mayor disminución del COT durante el tratamiento químico por foto-Fenton, siendo ésta de 25%, frente al 12% obtenido durante el tratamiento biológico. De esta forma, el porcentaje de mineralización total resultó ser de 37%.

Si bien estos valores son inferiores a los obtenidos en el ensayo acoplado de degradación en una matriz definida, se debe destacar que, en este caso, e incluso luego de haber centrifugado el efluente con el fin de eliminar parte de la materia orgánica, el COT al inicio del periodo de incubación fue hasta cinco veces superior al de la matriz definida. Además, la turbidez remanente del cultivo pudo afectar al proceso de foto-Fenton ya que éste es más efectivo en soluciones translúcidas (Xuan *et al.*, 2009). Aun así, se logró eliminar alrededor de 400 mg/L de COT.



**Fig. 3.8: Evolución de COT en ensayo de degradación biológica-química en una matriz real. A:** Concentración de COT a lo largo del tratamiento biológico (B)-químico (Q). La línea vertical corresponde a la división entre ambos tratamientos. B: Concentración de COT a lo largo del tratamiento químico. La flecha indica el pulso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe (III) añadido a los 180 minutos de tratamiento químico.

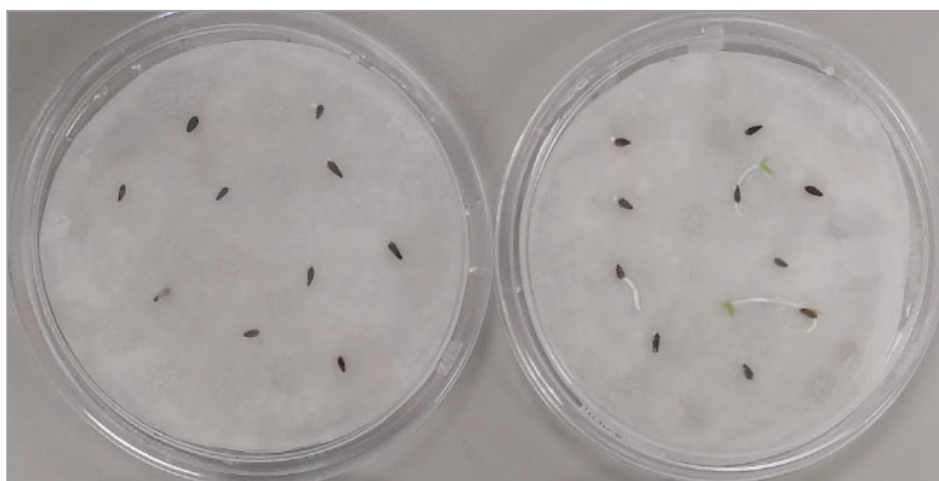
Debido a que al trabajar con una matriz real no fue posible seguir los niveles del antibiótico por espectrofotometría a 357 nm, no se pudo realizar el análisis que se llevó a cabo en el caso de la matriz definida (apartado 3.1.1.2) y determinar los porcentajes de degradación y de mineralización de OTC. Al trabajar con matrices reales resulta conveniente optimizar un método de detección del antibiótico y de sus intermediarios por HPLC-MS.

### ***3.1.3 Ensayos ecotoxicológicos***

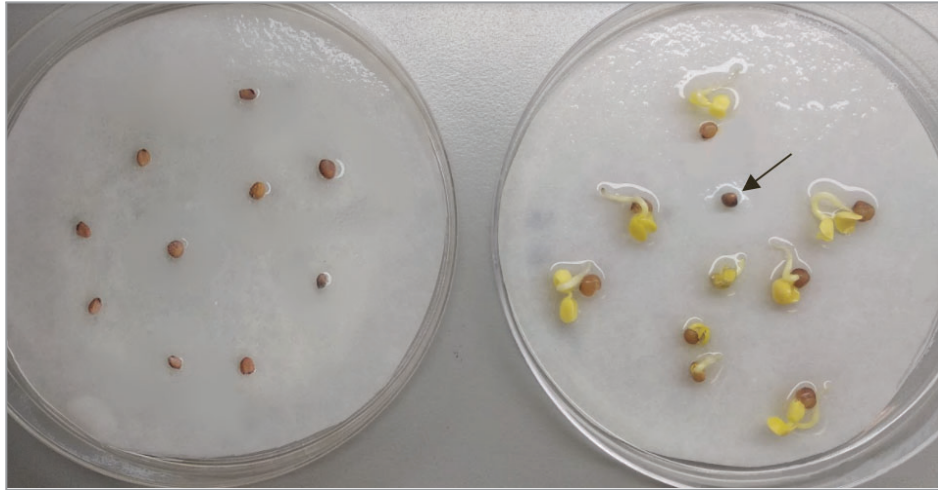
#### ***3.1.3.1 Poder germinativo***

Para utilizar semillas en ensayos de ecotoxicidad, el poder germinativo de las mismas debe ser de al menos el 90%, de otra forma no se puede atribuir la inhibición en la germinación de las semillas a la exposición al contaminante estudiado. En el caso de las semillas de *L. sativa*, que se muestran en la figura 3.9, y de *E. vesicaria*, se alcanzaron porcentajes muy inferiores al requerido para llevar a cabo ensayos de toxicidad, por lo cual no se continuó trabajando con las mismas.

Por otro lado, el poder germinativo de las semillas de *R. sativus* fue del 97%, ya que germinaron 29 de las 30 semillas incubadas, tal como se observa en la figura 3.10. Por este motivo, se utilizaron semillas de esta especie para realizar los ensayos de toxicidad descritos en el siguiente apartado.



**Fig. 3.9: Ensayo de poder germinativo con semillas de *L. sativa*.** Izquierda: semillas antes del periodo de incubación. Derecha: semillas al finalizar el periodo de incubación. Se obtuvieron resultados similares para *E. vesicaria*.



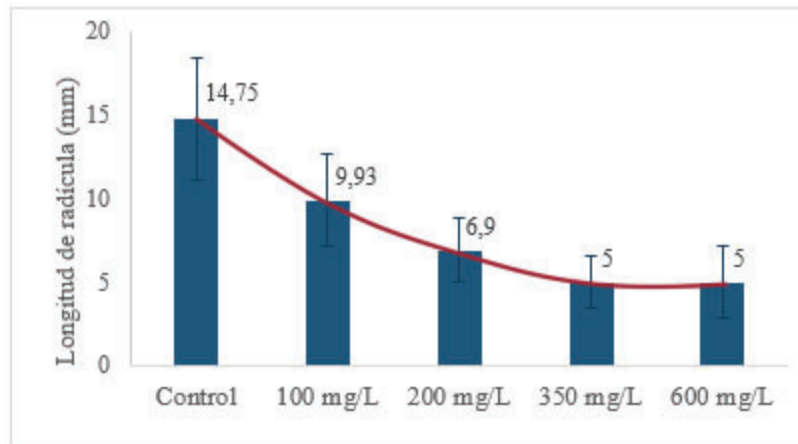
**Fig. 3.10: Ensayo de poder germinativo con semillas de *R. sativus*.** Izquierda: semillas antes del periodo de incubación. Derecha: semillas al finalizar el periodo de incubación. La flecha señala la única semilla de *R. sativus* que no germinó.

### ***3.1.3.2 Ensayo de sensibilidad a OTC***

La elongación de la raíz es inhibida a concentraciones más bajas de contaminante a comparación de la germinación de las semillas (Romero Gómez & Prieto Zapata, 2014), por lo que se procedió a evaluar el efecto inhibitorio de la OTC en la elongación de la raíz de semillas de *R. sativus*.

En la figura 3.11 se presenta el promedio de longitudes de radículas para cada concentración de OTC ensayada y en la figura 3.12 se muestra una semilla representativa de cada concentración. Se determinó que la elongación de la raíz se ve inhibida por el antibiótico y que la relación entre la concentración de OTC y la longitud de las radículas es prácticamente lineal hasta alcanzar los 350 mg/L. A concentraciones de 600 mg/L, la inhibición en la elongación no aumentó.

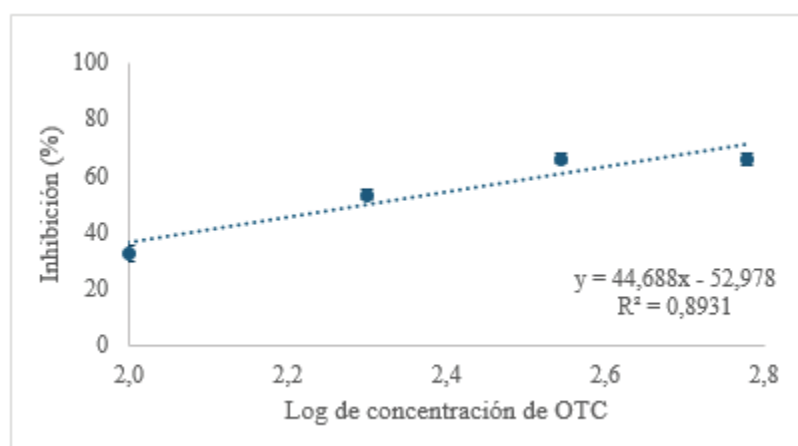
En la figura 3.13 se muestra el porcentaje de inhibición en la elongación de la raíz con respecto al control para cada concentración de OTC. A partir de la ecuación de la regresión lineal de dicho gráfico ( $CI_{50} = 44.688 * cc. OTC - 52.978$ ) se obtuvo la concentración de OTC para la cual se estima que habrá un efecto inhibitorio en la elongación de las raíces del 50 % ( $CI_{50} = 50$ ) en semillas de *R. sativus*, es decir, la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) (Romero Gómez & Prieto Zapata, 2014). La misma resultó ser de 201.5 mg/L de OTC.



**Fig. 3.11: Ensayo de sensibilidad a OTC con semillas de *R. sativus*.** Se representa la longitud promedio de radículas obtenida para cada concentración de OTC ensayada.



**Fig. 3.12: Elongación radicular diferencial de semillas de *R. sativus*,** incubadas en soluciones de (de izquierda a derecha) 0, 100, 200, 350 y 600 mg/L de OTC.

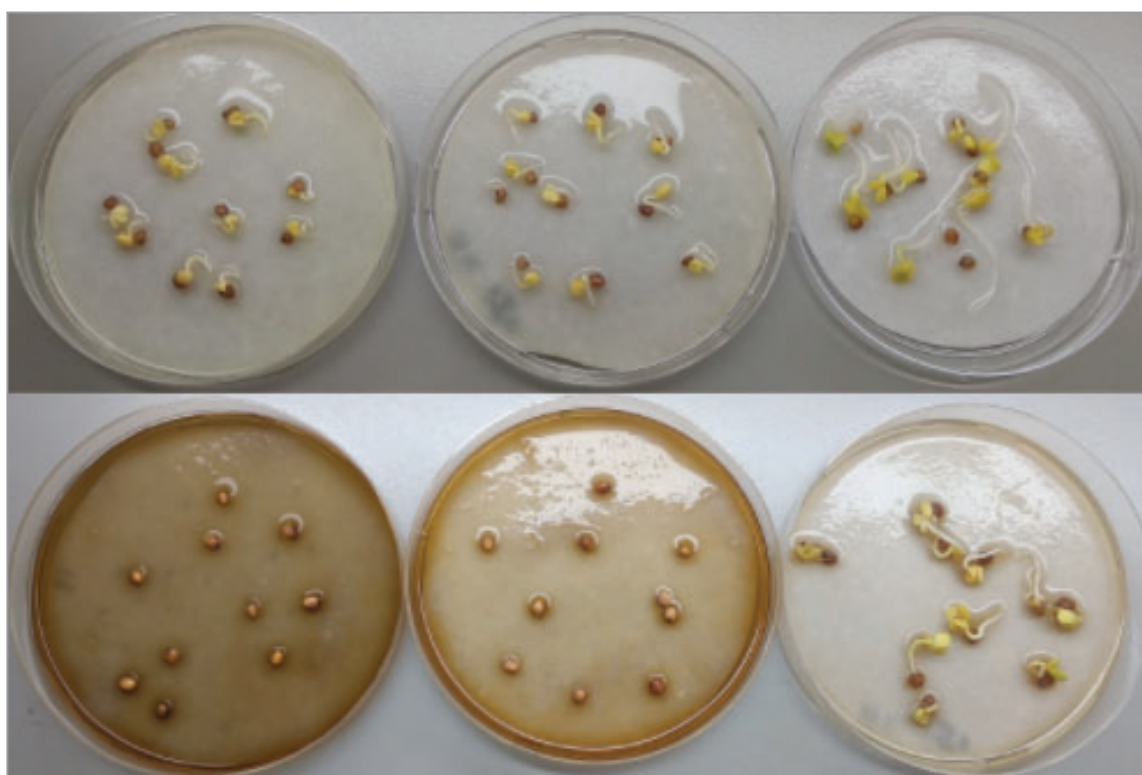


**Fig. 3.13: Inhibición en la elongación radicular de semillas de *R. sativus* expuestas a diferentes concentraciones de OTC.** Se representa el porcentaje de inhibición en la elongación de las radículas con respecto al control para cada concentración de OTC ensayada.

### 3.1.3.3 Medición de toxicidad

En la figura 3.14 se muestra la germinación de semillas de *R. sativus* para diferentes puntos en los tratamientos de degradación de OTC (pre-tratamiento, post-tratamiento biológico y post-tratamiento químico) en matriz definida y matriz real.

A partir de la medición de la elongación de la raíz de cada semilla, se observó una notable disminución de la toxicidad a medida que se avanzó en el ensayo en matriz definida y una disminución de la toxicidad en la última etapa del ensayo en matriz real. Dichos resultados se presentan en la figura 3.15.



**Fig. 3.14: Ensayos de ecotoxicidad.** Se muestra la elongación de las radículas de 10 semillas de *R. sativus* incubadas con las muestras, de izquierda a derecha, pre-tratamiento, post-tratamiento biológico y post-tratamiento químico para el medio en matriz definida (superior) y el medio en matriz real (inferior).

En la tabla 3.4 se muestran los valores porcentuales de inhibición respecto del control para cada etapa de tratamiento. Se notó que, en el caso del ensayo en matriz definida, al finalizar el tratamiento de degradación química, el crecimiento de radículas no solo dejó de verse inhibido sino que parece verse favorecido, posiblemente como consecuencia de la presencia de sales que componen el MM u otras sustancias generadas durante el tratamiento biológico que estimulan la germinación.



Por otro lado, se observó que en el ensayo de degradación en matriz real, en la última etapa de tratamiento, el porcentaje de inhibición para el crecimiento de las radículas disminuyó cerca de un 50 % a comparación de las primeras etapas de tratamiento.

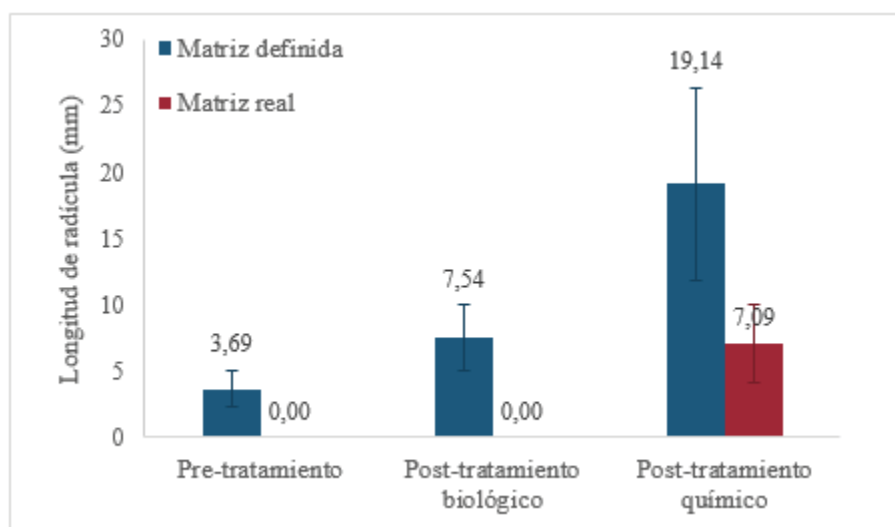


Fig. 3.15: Longitud promedio de radícula para cada etapa del tratamiento.

**Tabla 3.3: Parámetros de interés ecotoxicológico obtenidos en cada etapa de los tratamientos.** (\*) El porcentaje de inhibición se considera 0 % aunque, en realidad, el crecimiento de las radículas es mayor con respecto al control.

Muestra	Longitud promedio de radícula (mm)	Porcentaje de inhibición respecto del control (%)
Control	14.75	-
Pre-tratamiento matriz definida	3.69	75
Post-tratamiento biológico matriz definida	7.54	49
Post-tratamiento químico matriz definida	19.14	0 (*)
Pre-tratamiento matriz real	0.00	100
Post-tratamiento biológico matriz real	0.00	100
Post-tratamiento químico matriz real	7.09	52

Comparando los resultados obtenidos para ambas matrices, se puede decir que no hay evidencia de que a lo largo de los tratamientos se generen nuevos intermediarios de OTC de elevada toxicidad, ya que la misma, como se detalló previamente, disminuye a lo largo de los ensayos. Por lo tanto, se puede asumir que el porcentaje de inhibición no disminuye durante el tratamiento biológico en matriz real debido a la presencia de otros componentes, de una alta salinidad y de valores altos de pH (apartados 1.2.1 y 3.1.2.1) que interfieren en el crecimiento de la radícula.

### ***3.3 Puntos destacables***

- Al realizar ensayos preliminares de foto-Fenton se determinó que las condiciones que permiten obtener una mayor degradación química de OTC son: 6 mg/L de Fe (III), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM y un pulso con ambos componentes a los 180 minutos de reacción.
- En el ensayo de degradación biológica-química con matriz definida se obtuvo una mineralización del 52 % y una degradación del 25 % de la OTC.
- En el ensayo de degradación biológica-química con matriz real se obtuvieron valores más elevados de turbidez y de degradación del antibiótico al añadir un inóculo de microorganismos proveniente del cultivo MM-OTC. El pH en este ensayo fue elevado, lo cual pudo afectar al crecimiento y metabolismo bacteriano. Por otro lado, no se logró cuantificar OTC por espectrofotometría como consecuencia de la turbidez del medio. Al finalizar el ensayo, se obtuvo una disminución del COT del 37 %.
- El poder germinativo de las semillas de *R. sativus* fue del 97 % y la CI<sub>50</sub> para la elongación de las raíces fue de 201.5 mg/L de OTC.
- A lo largo del ensayo de degradación biológica-química en matriz definida se obtuvo una disminución de la toxicidad que alcanzó valores del 0 % al finalizar el proceso de foto-Fenton.
- En el ensayo de degradación biológica-química en matriz real sólo se obtuvo una disminución de la toxicidad luego de realizar el foto-Fenton y la misma fue del 52 %.

## Conclusión

En este trabajo, partiendo de muestras de efluente de *feedlot*, se lograron enriquecer y caracterizar dos especies de microorganismos autóctonos, una levadura y una bacteria. Los mismos fueron capaces de resistir y degradar OTC, incluso cuando el antibiótico se encuentra en concentraciones de 400 mg/L. Dichos microorganismos presentaron un crecimiento rápido, alcanzando la fase estacionaria luego de las 72 horas, tanto en cultivos ricos (TS-OTC) como cultivos basales sin otra fuente de carbono más que el antibiótico (MM-OTC).

Mediante secuenciación del gen ARNr 16S se determinó que las bacterias eran de la especie *A. gernerii*. En la bibliografía consultada se ha reportado que estos cocobacilos Gram-negativos tienen la capacidad de crecer aún con elevadas concentraciones de contaminantes emergentes, por lo que se puede asumir que son bacterias multi-resistentes y que podrían tener un rol importante en el tratamiento de efluentes.

Se realizaron ensayos acoplados de degradación biológica-química con dichas bacterias en matriz definida (MM-OTC) y en matriz real (EF-OTC). En el primer caso, a lo largo de 7 días, se obtuvo una degradación del 77 % de la OTC. Al ensayar en una matriz real, a lo largo de 13 días, se obtuvo una mineralización del 37 % del antibiótico. Es necesario profundizar la investigación sobre los mecanismos de degradación del antibiótico y optimizar el proceso en matriz real, en el cual la OTC interactúa de manera compleja con los diferentes compuestos del medio y donde el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos se ve desfavorecido por factores como el pH.

Los ensayos ecotoxicológicos llevados a cabo con semillas de *R. sativus* mostraron un incremento en la elongación de la radícula al avanzar en las etapas de degradación biológica-química de OTC, por lo que se puede afirmar que, para ambas matrices, el tratamiento disminuye la toxicidad del efluente.

Los parámetros iniciales del efluente de *feedlot* porcino hacían que el mismo no fuera seguro para ser vertido en aguas superficiales. Tomando muestras de dicho efluente, fue posible aislar microorganismos autóctonos capaces de remediarlo y disminuir así el impacto ambiental asociado a su liberación.

## *Perspectivas a futuro*

- Continuar el estudio de los procesos de degradación biológica-química de oxitetraciclina y evaluar otras condiciones de cultivo para aumentar el porcentaje de mineralización del antibiótico. Fundamentalmente, hacer un control del pH y estudiar el metabolismo de la fuente de nitrógeno al trabajar con muestras de efluente.
- Optimizar una técnica que permita estudiar la concentración de oxitetraciclina y de sus intermediarios en sedimentos y matrices complejas por HPLC-MS.
- Caracterizar la comunidad microbiana original utilizando técnicas moleculares de secuenciación masiva.
- Comparar los resultados obtenidos con muestras de efluente de otras industrias *feedlot*.

## Bibliografía

ADA. Autoridad del Agua de la Provincia de Buenos Aires. Resolución 336/03. Disponible en: <http://www.ada.gba.gov.ar/node/250>

Al-Gheethi, A. A. S., Lalung, J., Noman, E. A., Bala, J. D. & Norli, I. (2015). Removal of heavy metals and antibiotics from treated sewage effluent by bacteria. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 17(8), 2101–2123. doi:10.1007/s10098-015-0968-z

Alvarado, S. M., Ascanio, E., & Méndez, C. (2008). Determinación de residuos de oxitetraciclina en muestras de tejido Bovino destinadas al consumo Humano. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*, 49(2), 73-79. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=373139071002>

Amorim, C. L., Moreira, I. S., Maia, A. S., Tiritan, M. E. & Castro, P. M. (2014) Biodegradation of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin as single and mixed substrates by *Labrys portucalensis* F11. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(7), pp. 3181–3190. doi: 10.1007/s00253-013-5333-8.

Arikan, O. A., Sikora, L. J., Mulbry, W., Khan, S. U., Rice, C. & Foster, G. D. (2006). The fate and effect of oxytetracycline during the anaerobic digestion of manure from therapeutically treated calves. *Process Biochemistry*, 41(7), 1637–1643. doi:10.1016/j.procbio.2006.03.010

Arikan, O., Sikora, L., Mulbry, W., Khan, S. U. & Foster, G. D. (2007) Composting rapidly reduces levels of extractable oxytetracycline in manure from therapeutically treated beef calves. *Bioresource Technology*, 98, 169–176. doi:10.1016/j.biortech.2005.10.041

Azubuike, C. C., Chikere, C. B. & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11). doi:10.1007/s11274-016-2137-x

Ballesteros, M. M., Pérez, J. S., López, J. C., Oller, I. & Rodríguez, S. M. (2009). Degradation of a four-pesticide mixture by combined photo-Fenton and biological oxidation. *Water Res*, 43(3), 653–660

Batt, A. L., Kim, S. & Aga, D. S. (2007). Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations, *Chemosphere*, 68(3), pp. 428–435. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.01.008.

Bouroncle Luna, L., Félix Díaz, J., & Heracles Alcalde, L. (2019). La sobrepoblación: efectos. *Revista De Investigaciones De La Universidad Le Cordon Bleu*, 5(2), 119-132. <https://doi.org/10.36955/RIULCB.2018v5n2.010>

Bracco, E., Butler, M., Carnelli, P., & Candal, R. (2019). TiO<sub>2</sub> and N-TiO<sub>2</sub>-photocatalytic degradation of salicylic acid in water: characterization of transformation products by mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-019-06045-6

Campagnolo, E. R., Johnson, K. R., Karpati, A., Rubin, C. S., Kolpin, D. W., Meyer, M. T., ... McGeehin, M. (2002). Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Science of The Total Environment*, 299(1-3), 89–95. doi:10.1016/s0048-9697(02)00233-4

Carr, E. L., Kämpfer, P., Patel, B. K. C., Gürtler, V. & Seviour, R. J. (2003). Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(4), 953–963. doi:10.1099/ijs.0.02486-0

- Cheng, D.-H., Yang, S.-K., Zhao, Y. & Chen, J. (2013). Adsorption Behaviors of Oxytetracycline onto Sediment in the Weihe River, Shaanxi, China. *Journal of Chemistry*, 2013, 1–10. doi:10.1155/2013/652930
- Da Silva, M. F., Tiago, I., Veríssimo, A., Boaventura, R. A. R., Nunes, O. C. & Manaia, C. M. (2006). Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 55(2), 322–329. doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00032.x
- Di Yenno, F. & Terré, E. (2020). En el 2020 ingresarían 26.300 millones de dólares al país por exportaciones de los principales granos, derivados y biodiesel. *Bolsa de Comercio de Rosario*. Disponible en: <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/en-el-2020>
- Ebrahiem, E. E., Al-Maghrabi, M. N. & Mobarki, A. R. (2017). Removal of organic pollutants from industrial wastewater by applying photo-Fenton oxidation technology. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1674–S1679. doi:10.1016/j.arabjc.2013.06.012
- Ehrlich, P. R. (1968). The population bomb. *New York: Ballantine Books*
- Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L. & Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991–1007. doi:10.1016/j.trac.2008.09.010
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A. & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006) Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista latinoamericana de microbiología*, 48(2), 179-187.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP & WHO. (2020). The State of Food Security and Nutrition in the World 2020. Transforming food systems for affordable healthy diets. *Rome, FAO*. <https://doi.org/10.4060/ca9692en>
- Foti, N. M., Billard, C. & Lallana, V. H. (2005). Bioensayos De Germinacion Con Semillas De Rucula Y Lechuga Para Monitoreo De Calidad De Agua. *Revista Científica Agropecuaria*, 9(1), 47-53.
- GRAIN (2009) Cambio climático - El fracaso del sistema alimentario transnacional. Disponible en: <https://grain.org/es/article/737-cambio-climatico-el-fracaso-del-sistema-alimentario-transnacional>
- González, F. J. (2016) Valoración de efectos ecotoxicológicos de oxitetraciclina en organismos terrestres y acuáticos mediante el empleo de sistemas multi-especie en suelo (MS3). *Memoria presentada para optar al Grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Toxicología y Farmacología*. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/38767/1/T37611.pdf>
- Hashmi, M. Z. (2020) Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes. *Springer International Publishing*.
- Hochstein, F. A., Stephens, C. R., Conover, L. H., Regna, P. P., Pasternack, R., Gordon, P. N., ... Woodward, R. B. (1953). The Structure of Terramycin. *Journal of the American Chemical Society*, 75(22), 5455–5475. doi:10.1021/ja01118a001
- Howard, G. T., Norton, W. N. & Burks, T. (2012). Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. *Biodegradation*, 23(4), 561–573. doi:10.1007/s10532-011-9533-6
- Hu, X., Yi, L., Zhou, Q., & Xu, L. (2008). Determination of Thirteen Antibiotics Residues in Manure by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36, 1162-1166. doi: 10.1016/S1872-2040(08)60063-8

- Iannacone, J. & Alvarino, L. (2005). Ecotoxicological Effects of Three Heavy Metals on the Root Growth of Four Vascular Plants. *Agricultura Técnica*, 65(2), 198-203. doi: 10.4067/S0365-28072005000200009
- Ibsen, K. H. & Urist, M. R. (1962). Complexes of Calcium and Magnesium with Oxytetracycline. *Experimental Biology and Medicine*, 109(4), 797–801. doi:10.3181/00379727-109-27339
- Kabir, M. M., Fakhruddin, A. N. M., Chowdhury, M. A. Z., Pramanik, M. K. & Fardous, Z. (2018). Isolation and characterization of chromium(VI)-reducing bacteria from tannery effluents and solid wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9). doi:10.1007/s11274-018-2510-z
- Kuipers, A. (2012). La Tierra necesita más espacio. *WWF. Planeta Vivo. Informe 2012. Biodiversidad, biocapacidad y propuestas de futuro*. Disponible en: [http://d2ouvy59p0dg6k.cloudfront.net/downloads/informe\\_planeta\\_vivo\\_2012\\_9.pdf](http://d2ouvy59p0dg6k.cloudfront.net/downloads/informe_planeta_vivo_2012_9.pdf)
- Kumar, M., Jaiswal, S., Sodhi, K. K., Shree, P., Singh, D. K., Agrawal, P. K. & Shukla, P. (2019). Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International*, 124, 448–461.
- Kümmerer, K., (2009). Antibiotics in the environment – a review – Part II. *Chemosphere* 75 (4), 435–441.
- Lapertot, M., Ebrahimi, S., Dazio, S., Rubinelli, A. & Pulgarin, C. (2007) PhotoFenton and biological integrated process for degradation of a mixture of pesticides. *J Photochem Photobiol A Chem*, 186(1), 34–40
- Liao, W.-J., Jiang, J.-H., Xu, Y.-J., Yi, J.-Y., Chen, T., Su, X.-X, Pan, S.-Z, Wei, X.-P. & Li, Y.-G. (2010). Survey for  $\beta$ -lactamase among bacterial isolates from Guangzhou, China hospitals between 2005–2006. *Journal of Antibiotics*. Nature Publishing Group, 63(5), 225–229 doi:10.1038/ja.2010.23
- Liu, H., Ding, L., Chen, L., Chen, Y., Zhou, T., Li, H., Xu, Y., Zhao, L. & Huang, N. (2018). A facile, green synthesis of biomass carbon dots coupled with molecularly imprinted polymers for highly selective detection of oxytetracycline. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 69. doi:10.1016/j.jiec.2018.10.007
- Longhi, F., Gómez, A., Zapata, E., Paolasso, P., Olmos, F. & Ramos Margarido, S. (2018) La desnutrición en la niñez argentina en los primeros años del siglo XXI: un abordaje cuantitativo. *Salud Colectiva*, 14(1), 33-50. doi: 10.18294/sc.2018.1176
- López-Loveira, E., Ariganello, F., Medina, M. S., Centrón, D., Candal, R. & Curutchet, G. (2016). Degradation alternatives for a commercial fungicide in water: biological, photo-Fenton, and coupled biological photo-Fenton processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(33), 25634–25644. doi:10.1007/s11356-016-7602-4
- López Loveira, E. *et al.* (2012) ‘TiO<sub>2</sub> 2-photocatalytic treatment coupled with biological systems for the elimination of benzalkonium chloride in water’, *Separation and Purification Technology*, 91, pp. 108–116. doi: 10.1016/j.seppur.2011.12.007.
- Massé, D., Saady, N., & Gilbert, Y. (2014). Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals*, 4(2), 146–163. doi:10.3390/ani4020146
- Miranda, A. O., Zielinski, G. C. & Rossanigo, C. E. (2013). Sanidad en el Feedlot. *Publicación técnica N° 96*. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/sanidad-en-feedlot>
- Nesin, M., Svec, P., Lupski, J. R., Godson, G. N., Kreiswirth, B., Kornblum, J. & Projan, S. J. (1990). Cloning and nucleotide sequence of a chromosomally encoded tetracycline resistance determinant, *tetA(M)*, from a pathogenic, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(11), 2273–2276. doi:10.1128/aac.34.11.2273

Nogueira, R., Oliveira, M. & Paterlini, W. (2005). Simple and fast spectrophotometric determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in photo-Fenton reactions using metavanadate. *Talanta*, 66(1), 86–91. doi:10.1016/j.talanta.2004.10.001

Norma IRAM 29114. (2008). Método de ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga. Método en papel.

Norma IRAM 29118 (2016) Determinación de los efectos de los contaminantes sobre la flora del suelo. Efectos de los compuestos químicos sobre la emergencia y el crecimiento temprano de plantas superiores.

Padilla Di Doménico, O. F. (2018) La sobrepoblación desde la perspectiva bioética de Lizbeth Sagols. *Trabajo de grado para optar al título de Magister en Bioética. Universidad El Bosque. Bogotá, D.C.* Disponible en: [https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/2092/Padilla\\_Di\\_Domenico\\_Omar\\_Fernando\\_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/2092/Padilla_Di_Domenico_Omar_Fernando_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Planes, E. & Fuchs, J. (2015) Cuales son los aportes de la ecotoxicología a las regulaciones ambientales. *Ciencia e investigación*, 65(2), 45-62. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/48860>

Pordomingo, A. J. (2002). Efectos ambientales de la intensificación ganadera. *Idia XXI: revista de información sobre investigación y desarrollo agropecuario*, 2(2), 208-211 Disponible en: <http://ceiba.agro.uba.ar/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=28055>

Pordomingo, A. J. (2003) Gestión ambiental en el feedlot. *Guía de buenas prácticas. INTA.* Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-gestin\\_ambiental\\_en\\_el\\_feedlot\\_\\_guia\\_de\\_buenas\\_prctic.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-gestin_ambiental_en_el_feedlot__guia_de_buenas_prctic.pdf)

Romero Gómez, J. C. & Prieto Zapata, F. A. (2014). Determinación de la concentración de inhibición media (CE50) de vanadio y calcio para la semilla *Lactuca sativa* mediante ensayos de toxicidad. Disponible en: [https://ciencia.lasalle.edu.co/ing\\_ambiental\\_sanitaria/451](https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/451)

Ruppert, G., Bauer, R. & Heisler, G. (1993). The photo-Fenton reaction — an effective photochemical wastewater treatment process. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 73(1), 75–78. doi:10.1016/1010-6030(93)80035-8

Ruscasso, F., Bezus, B., Garmendia, G., Vero, S., Curutchet, G., Cavello, I. & Cavalitto, S. (2021). Debaryomyces hansenii F39A as biosorbent for textile dye removal. *Revista Argentina de Microbiología*. doi:10.1016/j.ram.2020.10.004

Saiz, A. (2010). Ganadería y cambio climático: una influencia recíproca. *GeoGraphos*, 1. doi:10.14198/GEOGRA2010.1.03

Sauvé, S., & Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 15. doi: 10.1186/1752-153X-8-15

Segrelles Serrano, J. A. (2004) Mundialización y espacio. *Departamento de Geografía Humana. Universidad de Alicante, España.* Disponible en: <https://web.ua.es/es/giecryal/documentos/documentos839/docs/espacio.pdf>

Steinfeld, H., Food and Agriculture Organization of the United Nations & Livestock, Environment and Development (Firm). (2006). Livestock's long shadow: Environmental issues and options. *Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.*

Tilman, D. (1998) The greening of the green revolution. *Nature* 396, 211–212. <https://doi.org/10.1038/24254>

Torres, C. & Zarazaga, M. (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales: ¿Vamos por el buen camino?. *Gaceta Sanitaria*, 16(2), 109-112. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0213-91112002000200002&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112002000200002&lng=es&tlng=es).



- Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1(2), 151–173. doi:10.1016/0147-6513(77)90033-1
- Tufo, A. E., Porzionato, N. F., & Curutchet, G. (2017). Effects of pollution and bioleaching process on the mineral composition and texture of contaminated sediments of the Reconquista River, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(22), 21368–21384. doi:10.1007/s11356-017-0484-2
- United Nations (2020) *Population*. Disponible en: <https://www.un.org/en/global-issues/population#:~:text=The%20world's%20population%20is%20expected,near ly%2011%20billion%20around%20100.>
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163-1172. <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>
- Wallinga, D., Avinash, K. NRDC & Klein, E. (2020). New Data: Animal vs. Human Antibiotic Use Remains Lopsided. *Center on Disease Dynamics, Economics & Policy*. Disponible en: <https://www.nrdc.org/experts/david-wallinga-md/most-human-antibiotics-still-going-us-meat-production>
- Wallinga, D. (2002). Antimicrobial use in animal feed an ecological and public health problem. *Minnesota Medicine*, 85(10), 12-6.
- Wang, J., Ben, W., Yang, M., Zhang, Y. & Qiang, Z. (2016). Dissemination of veterinary antibiotics and corresponding resistance genes from a concentrated swine feedlot along the waste treatment paths. *Environment International*, 92-93, 317–323. doi:10.1016/j.envint.2016.04.020
- Xuan, R., Arisi, L., Wang, Q., Yates, S. R. & Biswas, K. C. (2009). Hydrolysis and photolysis of oxytetracycline in aqueous solution. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 45(1), 73–81. doi:10.1080/03601230903404556
- Yang, Q., Zhang, J., Zhu, K. & Zhang, H. (2009). Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil. *Journal of Environmental Sciences. The Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences*, 21(7), 954–959. doi: 10.1016/S1001-0742(08)62367-0.
- Yang, Y., Ok, Y. S., Kim, K.-H., Kwon, E. E. & Tsang, Y. F. (2017). Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of The Total Environment*, 596-597, 303–320. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.102
- Zhang, K., Mengting, G., Xin, Z., Shen, D., Shentu, J. & Wang, M. (2015). Isolation, identification, and bioaugmentation of an oxytetracycline-degrading bacterium *Staphylococcus sp. TJ-1* in composting of swine manure. *Future Energy, Environment and Materials II, 1(Iea)*, 268–277. doi: 10.2495/feem140341
- Zhang, H.-M., Zhang, M.-K. & Gu, G.-P. (2008). Residues of tetracyclines in livestock and poultry manures and agricultural soils from north Zhejiang Province. *Journal of Ecology and Rural Environment*. 24. 69-73.
- Zhao, C., Pelaez, M., Duan, X., Deng, H., O’Shea, K., Fatta-Kassinos, D. & Dionysiou, D. D. (2013). Role of pH on photolytic and photocatalytic degradation of antibiotic oxytetracycline in aqueous solution under visible/solar light: Kinetics and mechanism studies. *Applied Catalysis B: Environmental*, 134-135, 83–92. doi:10.1016/j.apcatb.2013.01.003
- Zhao, L., Dong, Y. H., & Wang, H. (2010). Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of The Total Environment*, 408(5), 1069–1075. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.11.014

2510 - Conductivity. (2018). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. doi: 10.2105/SMWW.2882.027

5220 - Chemical Oxygen Demand Analysis. (1992). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. doi: 10.2105/SMWW.2882.103

5310B - Total Organic Carbon Analysis. (2016). *TOC Analysis for Standard Methods 5310B: High-Temperature Combustion Method*. Shimadzu corporation. Disponible en: [https://www.shimadzu.fr/sites/shimadzu.seg/files/tocanalysisforstandardmethods\\_.pdf](https://www.shimadzu.fr/sites/shimadzu.seg/files/tocanalysisforstandardmethods_.pdf)

A día 6 de octubre de 2022, dejo constancia que la presente es la última versión de la tesis, con las correcciones y sugerencias de los jurados incluídas.



Eliana Pace

---

Firma y aclaración de Autora



Gustavo Curutchet

---

Firma y aclaración de Director