



## Método de degradación de antibióticos y evaluación de la actividad antibiótica residual

Rene Sanjuan-Galindo<sup>1,\*</sup>, Armando Emiliano Peña-González<sup>1</sup>, Miguel Angel Reyes-González<sup>2</sup>,  
Cinthia Guadalupe Aba-Guevara<sup>2</sup>, Norma Alicia Ramos-Delgado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación e Innovación Tecnológica, Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Nuevo León, Apodaca, N.L., México

<sup>2</sup>Investigador de Cátedras CONACyT, Centro de Investigación e Innovación Tecnológica, Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Nuevo León, Apodaca, Nuevo León, México

\*rene.sanjuan@itnl.edu.mx

### Resumen

Se describen la degradación y actividad antibiótica de ciprofloxacina (CIP) en solución acuosa en experimentos con concentración inicial de 10, 25 y 50 mgL<sup>-1</sup> y pH 4.5. Primero se desarrolló un proceso de fotocatalisis utilizando TiO<sub>2</sub> como catalizador y luz UVC de 254 nm. Se determinó el avance de la degradación mediante espectrofotometría UV-Vis y el carbono mineralizado mediante análisis TOC. Se observó que se logró la degradación de la CIP pero la solución continuó presentando actividad antibiótica. El medio residual de la degradación se enriqueció con el nutriente TSB y se inoculó el hongo *Pleorotus ostreatus*. Este cultivo se mantuvo en agitación orbital por dos semanas y al término se evaluó la actividad enzimática en el medio. Se observó que la actividad antibiótica se redujo al 100 %, 68 % y 51 % para las concentraciones de 10, 25 y 50 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Palabras claves:** Degradación fotocatalítica, Actividad antibiótica residual, *P. ostreatus*, Ciprofloxacina.

### Abstract

Ciprofloxacin (CIP) degradation and its antibiotic activity are described for experiments with initial concentrations of 10, 25 y 50 mgL<sup>-1</sup> and pH of 4.5. Firstly, a photocatalytic process was carried out using TiO<sub>2</sub> as catalyst and 254 nm UVC light. The degradation performance was estimated by UV-Vis spectrophotometry and the carbon mineralization was estimated throughout TOC analysis. It was observed the CIP degradation but the solution continued presenting antibiotic activity. The residual medium from the CIP degradation was enriched with TSB and the fungus *Pleorotus ostreatus* was inoculated. This culture was maintained in orbital shaking during two weeks and thereafter the enzymatic activity in the broth was quantified. It was found that the antibiotic activity was reduced 100 %, 68 % and 51 % for the 10, 25 and 50 mg L<sup>-1</sup> concentrations, respectively.

**Keywords:** Photocatalytic degradation, Residual antibiotic activity, *P. ostreatus*, Ciprofloxacin.



## 1. Introducción

En décadas recientes se ha incrementado la producción, consumo y deshecho de nuevas sustancias de cuidado personal y médico, como los antibióticos. Al ser desechados sin recibir tratamiento se afectan los ecosistemas y el ambiente pues su acumulación representa un efecto nocivo para la flora, fauna y la microbiota. La actividad antibiótica residual se origina en los fármacos usados en el control y prevención de enfermedades de los humanos o del ganado, cuyo uso se incrementó en los últimos 20 años al emplearse como agentes bacteriostáticos o por sus propiedades bactericidas [1]. Los residuos de antibióticos como norfloxacina, ciprofloxacina y sulfametoxazol han sido detectados en efluentes, en concentraciones que escalan desde nanogramos hasta miligramos por litro [2]. Esta condición promueve que las bacterias patógenas ganen resistencia a los antibióticos induciendo una espiral de riesgo: se requieren mayores dosis para tratar enfermedades causadas por microorganismos, que a su vez, se hacen tolerantes cada vez más.

En la literatura se reportan múltiples maneras de eliminar este tipo de contaminantes del ambiente. Los procesos avanzados de oxidación (PAOs), incluidos dentro de los métodos físico-químicos, han sido utilizados para tratar contaminantes presentes en el agua mediante especies reactivas de oxígeno o radicales. También se han documentado los tratamientos biológicos, en donde se emplean organismos vivos como bacterias, plantas, hongos y algas. Entre éstos destacan las enzimas que producen los hongos, pues por ser parte de las redes tróficas su impacto ecológico es bajo. Sin embargo, la finalidad principal de estos procesos ha sido la degradación del compuesto original, sin determinar los efectos recalcitrantes al ambiente de los subproductos resultantes. Esta condición es un problema, ya que como producto residual de la degradación de compuestos se liberan otras moléculas que pueden tener propiedades de mayor toxicidad al ambiente [3].

La ciprofloxacina (CIP) es un antibiótico perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas, es un antibiótico de amplio espectro usado para tratar enfermedades e infecciones en humanos o en animales. La Organización Mundial de la Salud ha denominado a la CIP como críticamente importante debido a que se usa para tratar enfermedades comunes como faringitis, sinusitis e infecciones en el tracto urinario o enfermedades más graves como la bronquitis y la neumonía. Sin embargo, se ha reportado el caso de algunas especies de bacterias patógenas que presentan resistencia a la CIP como *Campylobacter jejuni*, condición que representa un riesgo de contagio en animales o en humanos [4, 5]. Debido a que esta situación es cada vez más frecuente, resulta primordial determinar la actividad antibiótica de los desechos después del tratamiento aplicado, para garantizar o rechazar la liberación de los residuos al ambiente. Es necesario también, asegurar el efecto negativo de los subproductos que resultan del tratamiento y prevenir daños al ambiente y a las especies.

## 2. Degradación de compuestos por medio de procesos físico-químicos y bioquímicos

### 2.1 Procesos avanzados de oxidación

Los Procesos Avanzados de Oxidación (PAOs) como ozonificación, fotocatalisis heterogénea, reacciones tipo Fenton, sonólisis o su combinación, entre otros más, se han aplicado a la degradación de agentes contaminantes [6, 7]. Estos procesos fisicoquímicos requieren de catalizadores para crear pares de electrones-huecos ( $e^-/h^+$ ) y generar radicales libres como  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $\cdot O_2$ ,  $\cdot O_3$  que son altamente reactivos y no selectivos, y desencadenan otras reacciones secundarias [6, 8]. Los fotocatalizadores más usados en los PAOs son  $TiO_2$ ,  $ZnO$ ,  $Fe_2O_3$ ,  $CdS$ ,  $GaP$ , y  $ZnS$ , debido a que han mostrado ser eficientes en la degradación de contaminantes orgánicos, reduciendo su toxicidad o logrando que sean mineralizados hasta formar  $CO_2$  y  $H_2O$  [6-9].

La energía necesaria para la excitación del  $TiO_2$  es de 3.2 V, por lo que solamente absorbe luz en el espectro ultravioleta ( $\lambda < 385$  nm). En solución acuosa, la excitación del  $TiO_2$  causa la migración de los electrones ( $e^-$ ) de la banda de valencia a la banda de conducción liberando huecos ( $h^+$ ) en la banda de valencia. De esta manera se generan pares ( $e^-/h^+$ ) que interactúan con las moléculas de agua para



formar radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). Los electrones en la banda de conducción reaccionan con el oxígeno molecular para formar radicales superóxidos ( $\cdot\text{O}_2$ ) y peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que a su vez generan radicales ( $\cdot\text{OH}$ ). La recombinación entre los pares ( $e^-/h^+$ ) se previene en presencia de un agente oxidante que acepte estos electrones, en solución acuosa el radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ) es el que actúa como oxidante, pero se desplaza por otros compuestos como materia biológica, contaminantes, etc. [10]. El uso de  $\text{TiO}_2$  en los PAOs presenta ventajas como el precio, baja toxicidad, etc. pero sus inconvenientes son la necesidad de diluir el contaminante en agua y también que la solución permita el paso de luz, al final del proceso puede complicarse la remoción del catalizador de la solución [11].

## 2.2 Biorremediación y procesos enzimáticos

La biorremediación es un proceso basado en la actividad biológica de microorganismos, hongos, plantas o enzimas para eliminar del ambiente algún tipo de agente contaminante. Este proceso se mejora al aumentar o estimular el metabolismo del agente biológico a través de nutrientes adicionales, o adecuando condiciones como pH, humedad, temperatura, etc. ya sea *in situ*, o en condiciones controladas en biorreactores [12]. La biodegradación basada en la aplicación de enzimas ligninolíticas, que son producidas por hongos filamentosos del tipo de podredumbre blanca como *Pleurotus ostreatus*, ha demostrado tener potencial en la descomposición de antibióticos, colorantes, fármacos, químicos organoclorados, colorantes de tipo azo, antraquinonas, arilmetano, fármacos, pesticidas como el DDT, etc. [13-15]. Enzimas como la lacasa, manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa, xylanasas, entre otras, son algunos ejemplos de estas. La lacasa es una cuproproteína del grupo de las oxidasas de cobre azul que catalizan la oxidación de sustratos orgánicos o inorgánicos formando radicales libres de un grupo hidroxilo removiendo un electrón y un protón. La molécula de la enzima lacasa tiene en su interior 4 átomos de cobre. En el sitio del cobre tipo 1 se unen los sustratos que son oxidados y en los otros 2 tipos de cobre se forma un clúster trinuclear (cobre tipo 2 y 3). La función de este clúster se divide en 2, el cobre tipo 2 tiene la función de aceptar los electrones que se transfieren del cobre de tipo 1 y el cobre tipo 3 es el encargado de reducir el oxígeno en agua [16]. La lacasa almacena electrones a partir de oxidaciones individuales de sustratos, de manera similar a la forma en que ocurre en una batería. Esta enzima utiliza oxígeno molecular como un aceptor de electrones para remover protones de los grupos hidroxilo de compuestos fenólicos. Esta reacción genera radicales que pueden espontáneamente romper enlaces C-C y C-O o anillos aromáticos.

## 2.3 Proceso de degradación de ciprofloxacina

En el trabajo de Van Epps y Blaney [17] los autores estudiaron el nivel de concentración residual de varios antibióticos encontrados en materia fecal de ganado bovino, porcino y avícola en muestras tomadas en sitios alrededor del mundo. Así como este estudio, otros trabajos también justifican dar mayor atención a la degradación de antibióticos antes de que sean liberados al ambiente [2]. Entre los antibióticos de amplio espectro, la ciprofloxacina (CIP) ha sido uno de los compuestos más usados [18]. La CIP, ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-quinolin-3-carboxílico, es un antibiótico sintético de segunda generación del grupo de las fluoroquinolonas y se caracteriza por tener un átomo de flúor en la posición 6 y también un anillo de piperazina en la posición 7 de su estructura química. Su uso médico en humanos o en ganado está diversificado para tratar clínicamente diarrea infecciosa, ántrax, infecciones en la piel, infecciones en el tracto urinario y otras más [9]. De acuerdo con diversos reportes en la literatura, la degradación de CIP mediante fotocatalisis es posible. Hassani *et al.*, [19] utilizaron nanopartículas con  $\text{TiO}_2$  fijadas en montmorillonita (hidrosilicato de aluminio y magnesio) para estudiar la degradación de CIP en concentraciones de 5 a 25  $\text{mgL}^{-1}$ . Los autores reportaron el efecto de la fuente de luz UV y del pH concluyendo que el pH de 5 y la luz UVC mejoran la degradación de CIP. El máximo de degradación lograda que reportaron fue del 71 % para una concentración inicial  $C_0 = 5 \text{ mgL}^{-1}$  y 120 minutos de irradiación. En otro estudio desarrollado por Čvančarová *et al.* [20] se reportó la



degradación de fluoroquinolonas usando enzimas producidas por hongos de pudrición blanca como *Irpexlacteus*, *Panustigrinus*, *Dichomitussqualens*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*. Los autores estudiaron la degradación de CIP, norfloxacin y orfloxacin con  $C_0 = 10\text{mgL}^{-1}$  de los compuestos y el cultivo fue enriquecido con sustratos como extracto de malta-glucosa. El resultado reportado fue la degradación del 64% de los de los compuestos originales, pero evidenciaron la persistencia al 90% de la actividad antibiótica residual. Por su parte, Yahiat *et al.* [21] analizaron la degradación de tetraciclina y de tilosina utilizando un tratamiento biológico complementado por fotocatalisis. En este estudio se reportó la degradación completa de los compuestos estudiados y la disminución de la ecotoxicidad de hasta el 10% para tetraciclina y 36 % para tirosina.

Por las razones expuestas, en el presente estudio se expone el desarrollo de un método que permita mejorar la degradación del antibiótico CIP en medio acuoso y disminuir su actividad antibiótica residual. El procedimiento mostrado está basado en dos etapas que integran dos técnicas diferentes. En la Etapa I se degrada el analito mediante un proceso de fotocatalisis heterogénea. Posteriormente, en la Etapa II se aplica un tratamiento enzimático. Por cada etapa se evalúa la actividad antibiótica y la persistencia de la CIP.

### 3. Metodología experimental

#### 3.1 Cultivo y conservación de *Pleurotus ostreatus*

La cepa *P. ostreatus* usada en el presente trabajo fue comprada a Setas Monarca (Tulancingo, Hgo. México). El micelio fue cultivado y sembrado en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) a  $26^\circ\text{C}$ , pH inicial de 5, y posteriormente conservado en refrigeración. De una caja fresca se cortaron discos de 5 mm para usarse como inóculo en todos los ensayos [22]. Se verificó que el fármaco utilizado (ciprofloxacina) no tuviera algún efecto en el crecimiento del micelio en medio sólido o líquido.

#### 3.2 Etapa I: Seguimiento de la degradación fotocatalítica de Ciprofloxacina (CIP)

Se llevó a cabo la degradación de CIP en medio acuoso en un volumen de 300 mL y pH de 4.5 por duplicado. Se estudiaron tres niveles de concentración inicial ( $C_0$ ) de CIP: 10, 25 y  $50\text{mgL}^{-1}$ . En todos los casos la carga del catalizador fue de  $200\text{mgL}^{-1}$  de  $\text{TiO}_2$  Degussa P-25. El control fue un experimento de fotólisis de CIP (sin catalizador) [23]. Para desarrollar la fotocatalisis se utilizó una lámpara UV Coospider de 254 nm por un periodo de 4 horas conservando una distancia entre la lámpara y superficie expuesta de 12 cm. La solución se mantuvo en agitación a 700 rpm. El arreglo experimental mediante el cual se desarrolló la fotodegradación está representado en la Fig. 1. La concentración de CIP se determinó por espectrofotometría de UV-Vis (longitud de onda 272 nm, HACH DR 6000) y la mineralización lograda fue evaluada en un equipo TOC-L Shimadzu [24] analizando la cantidad de Carbono Orgánico Total (TOC, por sus siglas en inglés) de acuerdo con la ecuación (1):

$$TOC (\%) = 100 \left( \frac{C - C_t}{C} \right) \quad (1)$$

En la ecuación (1) el término  $C$  se refiere al carbono orgánico inicial de la solución y el término  $C_t$  representa el carbono orgánico total de la solución en el tiempo de muestreo.

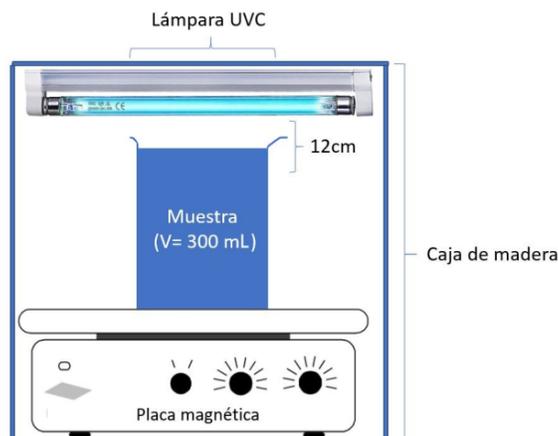


Fig. 1. Esquema del arreglo experimental del proceso de fotodegradación.

### 3.3 Etapa II: Cultivo de *P. ostreatus* en el residuo del tratamiento fotocatalítico de CIP

A la solución que resultó de la degradación fotocatalítica se le agregó Caldo de Soya Trypticaseína (TSB) como fuente de carbono, se ajustó el pH a 5 y el medio se esterilizó. En cada volumen de 100 mL se sembró un disco de micelio de *P. ostreatus* de 5 mm de diámetro [25] y el cultivo se incubó a 25°C en agitación orbital de 130 rpm durante 14 días. También se preparó un testigo y la biomasa final se cuantificó por base seca [26]. Mediante un análisis de varianza se compararon las medias de los tratamientos y las diferencias se compararon mediante una prueba de Tukey.

La actividad de la enzima lacasa producida por el hongo *P. ostreatus* en el medio se evaluó en presencia de CIP (10, 25 y 50 mgL<sup>-1</sup>) y también en un control, a los 14 días, en 2 mL del sobrenadante filtrado [27]. En un tubo de ensayo se mezclaron 2.85 mL de una mezcla preparada de buffer de acetatos al 0.1 M (pH 5) y ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) al 0.5 mM y como sustrato se utilizaron 0.15 mL de sobrenadante del caldo de cultivo. El volumen total de la mezcla fue de 3 mL. A partir de una medición inicial en UV-Vis a 420 nm se determinó la diferencia en el cambio de oxidación de ABTS, posteriormente se colocaron los tubos en baño maría a 30°C por 1 minuto para completar la reacción de oxidación de ABTS, se enfriaron de inmediato con agua fría y las muestras se estudiaron por espectrofotometría UV-Vis a 420 nm [28]. La actividad enzimática total ( $\Delta E$ , -UL<sup>-1</sup>-) se calculó por medio de la ecuación (2).

$$\Delta E = \frac{(Abs_{420nm})(V_f)(D)}{(\epsilon_{ABTS})(V_m)} \quad (2)$$

Siendo  $Abs_{420nm}$  la diferencia en la medición de la absorbancia medida a 420 nm,  $V_f$  es el Volumen final,  $D$  es el factor de dilución de la muestra,  $\epsilon_{ABTS}$  es el Coeficiente de extinción molar del ABTS ( $\epsilon_{420\text{ nm}} = 36\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y  $V_m$  es el volumen de la muestra usada.

### 3.4 Análisis de actividad antibiótica

Se determinó la actividad antibacteriana de los compuestos resultantes de la degradación tomando muestras del sobrenadante después de la fotocatalisis y del tratamiento enzimático. Se prepararon antibiogramas con *E. coli* como organismo de prueba siguiendo el protocolo Kirby-Bauer. Discos de papel filtro estéril fueron sumergidos en el sobrenadante final por cada etapa de la degradación para que se impregnaran de la CIP residual o de los compuestos resultantes de cada tratamiento y también del control. Sobre la superficie del medio Mueller-Hinton, inoculadas con *E. coli*, se distribuyeron 3

discos antibacteriales de manera equidistante en la caja Petri para evitar aglomeración en los halos de inhibición. Las cajas se prepararon por triplicado y se incubaron a 37°C por 24 h, posteriormente se analizó la presencia de halos de inhibición en las cajas de Petri según Bauer *et al* [29]. La actividad antibiótica residual se determinó midiendo el diámetro de los halos de inhibición generados en cada caja y se hizo la comparación con el control. La actividad antibiótica residual estimada se expresa en porcentaje.

### 3.5 Detección de la CIP residual mediante HPLC

La degradación total de CIP se verificó mediante cromatografía líquida de alta resolución en un equipo HPLC-DAD Agilent a 275 nm. Se utilizó una columna Agilent C18 y una fase móvil preparando una mezcla (15:85) de acetonitrilo con agua acidificada con ácido fosfórico a pH 3.28, de acuerdo con el protocolo de Singh *et al.* [9]. La curva de calibración se preparó usando un estándar del compuesto CIP (Sigma Aldrich).

## 4. Resultados experimentales

### 4.1 Etapa I: Degradación fotocatalítica

Para la solución con  $C_0 = 10 \text{ mgL}^{-1}$  de CIP se logró la degradación completa después de 120 minutos de irradiación. Sin embargo, en los experimentos con mayor  $C_0$  no se observó el mismo resultado, a pesar de prolongar el tiempo de exposición a 240 min. Por ejemplo, para las soluciones que contenían  $C_0 = 25 \text{ mgL}^{-1}$  y  $C_0 = 50 \text{ mgL}^{-1}$  la degradación alcanzó solamente 87% y 31%, respectivamente. La evolución de la degradación fotocatalítica en los tres tratamientos se puede observar en la Fig. 2a. Sin embargo, las lecturas de absorbancia por UV-Vis son afectadas debido a que los compuestos resultantes de la degradación tienen una estructura similar al compuesto original, como se explica más adelante.

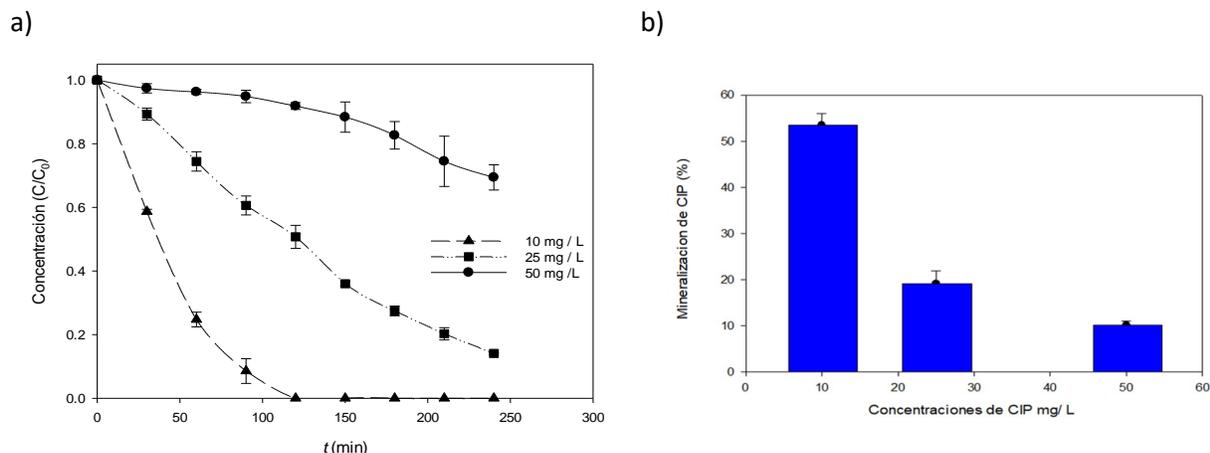


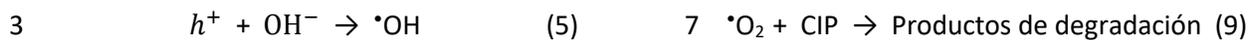
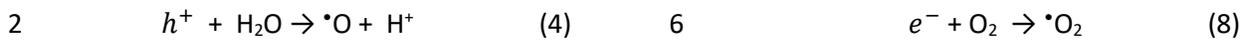
Fig. 2. a) Seguimiento de la degradación fotocatalítica de CIP por UV-Vis con diferentes concentraciones  $C_0$ : 10  $\text{mgL}^{-1}$ , 25  $\text{mgL}^{-1}$  y 50  $\text{mgL}^{-1}$  a 254 nm. b) Porcentajes de mineralización lograda al final de la fotocatalisis.

Mediante HPLC se observaron diferencias en los tiempos de retención de los compuestos en solución, con esto se pudo comprobar la eficacia de la fotodegradación para reducir la concentración de CIP hasta menos del 0.5  $\text{mgL}^{-1}$  en los tres tratamientos. A pesar de reportar la degradación de CIP al 100 % la mineralización más alta lograda fue solamente del 55 % en la solución con  $C_0 = 10 \text{ mgL}^{-1}$ . Para los



experimentos con mayor concentración inicial, por ejemplo,  $C_0 = 25 \text{ mgL}^{-1}$  y  $C_0 = 50 \text{ mgL}^{-1}$ , solamente se mineralizó el 20 y 10 %, respectivamente (Fig. 2b). La diferencia de la degradación alcanzada en los tres tratamientos podría atribuirse a que el incremento de concentración afecta el paso de la luz en el medio y de esta forma se afecta la producción de radicales libres necesarios para que ocurra la reacción de degradación [30]. Los autores citados anteriormente reportaron la degradación de CIP en agua en el rango de concentración inicial  $1 < C_0 < 10 \text{ mgL}^{-1}$  mientras que en el actual trabajo se experimentó con soluciones de mayor concentración inicial de CIP y menor área de exposición de luz.

De acuerdo a Malakootian *et al.* [31] la degradación de CIP con  $\text{TiO}_2$  ocurre con la generación de pares de electrones huecos ( $e^-/h^+$ ) con una energía de 3.2 V o mayor (ecuación 3) este hueco genera la creación de radicales  $\cdot\text{O}$  u otros radicales que reaccionan al agua o aniones de hidróxido presentes ( $\text{OH}^-$ ) (ecuación 4 y 5), estos radicales generados oxidan a la CIP presente en el medio (ecuación 6) o también pueden sufrir una degradación directa por los huecos generados en el catalizador (ecuación 7), además, la CIP puede sufrir una degradación por los electrones fotogenerados o interactuar con un aceptor para generar radicales superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ) (ecuaciones 8 y 9).



#### 4.2 Etapa II: Producción de biomasa y actividad enzimática

El crecimiento del hongo *P. ostreatus* en medio sólido o líquido en presencia de CIP no registró diferencias en ningún caso ni en la formación de pellets. En la Fig. 3a se muestra el crecimiento radial del hongo *P. ostreatus* crecido en medio sólido de Agar de Soya Tripticaseina para uno de los tratamientos. En la Fig. 3b se muestran los pellets producidos en uno de los tratamientos. La Fig. 3c exhibe la función de densidad de población (PDF) (ecuación 10) estimada para el diámetro ( $x$ ) de los pellets cultivados en medio líquido.

$$PDF = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{\left[\frac{-(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right]} \quad (10)$$

La biomasa que se produjo en el medio residual de la fotocatalisis, enriquecido con TSB, para cada experimento y con periodo de incubación de 14 días se presenta en la Tabla 1. Se observa que la biomasa producida en el experimento libre de CIP inicial (control) fue de  $3.4 \text{ gL}^{-1}$  y en el experimento con  $C_0 = 50 \text{ mgL}^{-1}$  fue de  $3.89 \text{ gL}^{-1}$ , para estas cantidades no se registraron diferencias estadísticas de acuerdo a una prueba de Tukey (grupo a). Sin embargo, para los tratamientos con  $C_0 = 10$  y  $C_0 = 25 \text{ mgL}^{-1}$  la biomasa producida fue mayor, se obtuvo  $6.69 \text{ gL}^{-1}$  y  $6.41 \text{ gL}^{-1}$ , respectivamente, pero sin diferencias entre sí (grupo b). Se asume que la diferencia entre los grupos a y b, podría ser efecto de degradación de la fotocatalisis. Los subproductos que resultaron de la mejor degradación de CIP pueden convertirse en sustrato para el crecimiento de *P. ostreatus*. En un estudio previo [30], se reportó la presencia de nitritos ( $-\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $-\text{NO}_3^-$ ) en el medio que fueron resultado de la degradación por fotocatalisis de CIP, los autores realizaron ensayos variando la concentración inicial en el rango de 5 a  $15 \text{ mg L}^{-1}$ . Por su

composición, los compuestos residuales de CIP pueden aportar nitrógeno adicional al medio y de esta forma promover mayor crecimiento de *P. ostreatus*, así fue reportado en el trabajo de Patel *et al.* [32]. Sin embargo, la producción total de biomasa está determinada por el sustrato limitante como el oxígeno o el carbono disponible y también de la hidrodinámica, cambios en el pH, etc.

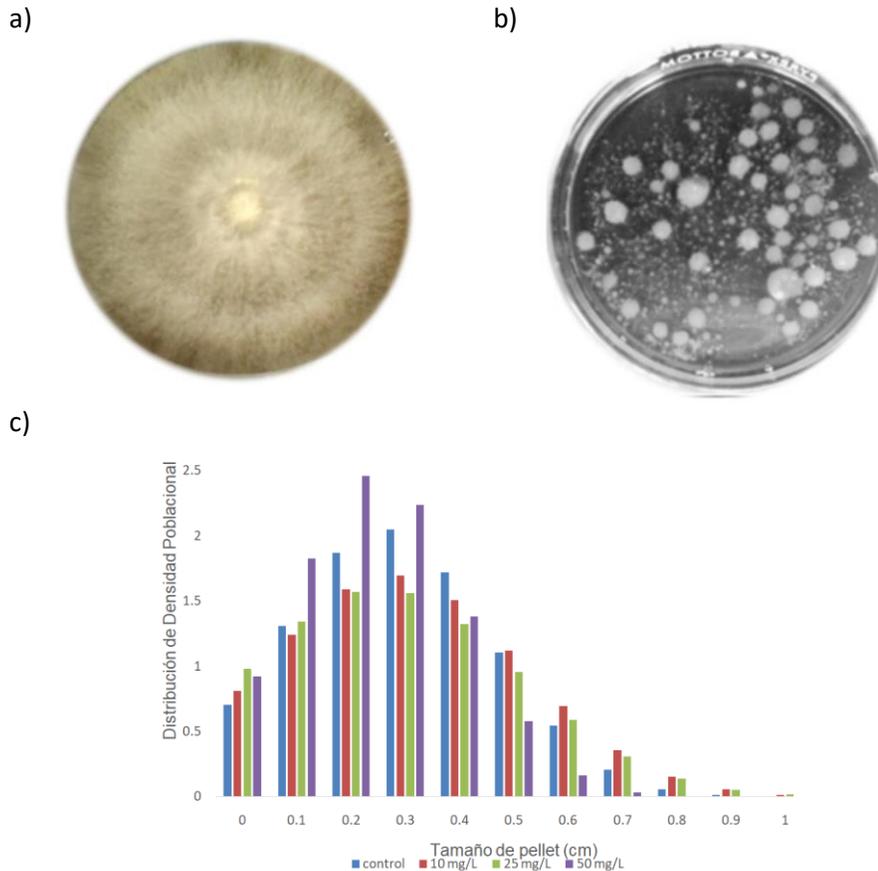


Fig. 3. a). Crecimiento radial del hongo *P. ostreatus* en medio sólido. b) Formación de pellets de *P. ostreatus* en medio líquido. c) Función de densidad de población (PDF) del diámetro de los pellets cultivados en medio líquido.

| Concentración inicial de CIP<br>$C_0$<br>(mgL <sup>-1</sup> ) | Biomasa<br>( $\sigma$ )<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Actividad Enzimática<br>( $\sigma$ )<br>(UL <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Control                                                       | 3.40 <sup>a</sup> (1.23)                       | 557.77 <sup>a</sup> (73.468)                                |
| 10                                                            | 6.69 <sup>b</sup> (0.82)                       | 787.22 <sup>c</sup> (5.092)                                 |
| 25                                                            | 6.41 <sup>b</sup> (2.71)                       | 770.92 <sup>bc</sup> (32.157)                               |
| 50                                                            | 3.89 <sup>a</sup> (0.39)                       | 667.96 <sup>ab</sup> (82.840)                               |

Tabla 1. Producción de biomasa y actividad enzimática de *P. ostreatus* a los 14 días crecido a 28°C en medio STB y presencia de CIP y sus compuestos residuales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante una prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).



La actividad enzimática de la lacasa se cuantificó en cada uno de los sobrenadantes residuales del tratamiento fotocatalítico y del control al día 14 de cultivo (Tabla 1). Se observan tres grupos según una prueba de Tukey. El control y el experimento con  $C_0 = 50 \text{ mgL}^{-1}$  registraron  $557.77 \text{ UL}^{-1}$  y  $667.96 \text{ UL}^{-1}$ , respectivamente (grupo a). Los tratamientos con  $C_0 = 10$  y  $C_0 = 25 \text{ mgL}^{-1}$  reportaron mayor actividad enzimática de  $787.22 \text{ UL}^{-1}$  y  $770.92 \text{ UL}^{-1}$ , respectivamente (grupo c). La actividad de lacasa observada sugiere que disminuye la actividad antibiótica de los compuestos de degradación de CIP, como se observará en la siguiente sección. Otros autores también observaron que la presencia de CIP tenía un efecto estimulante en la actividad de la enzima lacasa al día 14 en un cultivo de *P. ostreatus* [26]. Este comportamiento también se ha reportado para otros antibióticos, Praveen *et al.*, encontraron que *Stereumostrea* y *Phanerochaete chrysosporium* registraron incremento de la actividad de las enzimas lacasa, lignina peroxidasa y magnesio peroxidasa en medio líquido adicionado con tetraciclina, un compuesto aromático [33].

La mayor actividad de lacasa registrada fue de  $787.22$  y  $770.92 \text{ UL}^{-1}$  y se observó para los experimentos con  $C_0 = 10$  y  $C_0 = 25 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente. Se puede asumir que los subproductos resultantes de la degradación previa por fotocatalisis presentes en el medio estimulan la actividad enzimática y que el mecanismo enzimático de descomposición de la CIP o de los compuestos residuales es el mismo por el que se degradan los compuestos fenólicos. Estudios previos identificaron las estructuras posibles de los compuestos generados por fotocatalisis de la CIP y señalaron las moléculas con mayor frecuencia de producirse [34]. En la Fig. 4 se compara la estructura de la CIP (a) con los compuestos residuales de su degradación (estructuras b, c, d y e). Se observa que estas moléculas conservan una estructura similar a la CIP, condición que sugiere que también podrían conservar propiedades comparables a la CIP.

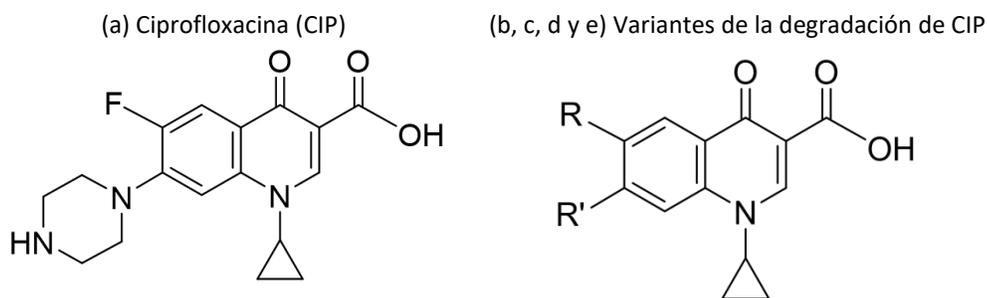


Fig. 4. a) Ciprofloxacina. Los radicales R o R' de los compuestos residuales son: b) R = OH y R' = Piperacina; c) R = H y R' =  $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCHO}$ ; d) R = H y R' =  $\text{N}(\text{CHO})(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$  y e) R = F y R' =  $\text{NHCHO}$  (adaptado de Paul *et al.*, [34]).

La cantidad de biomasa ( $3.40 - 6.69 \text{ gL}^{-1}$ ) y la actividad enzimática ( $557 - 787 \text{ UL}^{-1}$ ) que se reportan en el presente trabajo se pueden comparar con información reportada previamente para diferentes cepas del hongo *P. ostreatus* [27, 35, 36]. En estos trabajos se observa que la producción de biomasa está en función de la composición del medio de cultivo. Tinoco *et al.* [37] valoraron distintas fuentes de carbono y nitrógeno en el crecimiento de *P. ostreatus*. Zhu *et al.* [22] ensayaron con sulfato de cobre y peptona de soya y evidenciaron la importancia del nitrógeno en la producción de biomasa de la cepa de *P. ostreatus* ACCC 5285. En la literatura también se encuentran disponibles datos de la actividad enzimática, reportados en el rango de  $45$  a  $2430 \text{ UL}^{-1}$  para cultivos de *P. ostreatus* [22, 27, 35 - 38]. En dichos estudios se observa que la actividad de la enzima lacasa puede optimizarse en presencia de sulfato de cobre adicional, sin embargo, en el presente estudio no fue utilizada para no interferir en la complejidad del medio que ya contenía CIP o sus residuos provenientes de la fotocatalisis.

### 4.3 Actividad antibiótica residual

En la Fig. 5 se comparan imágenes con los halos de inhibición de *E. coli*. para cada nivel de degradación de CIP. Columna 1: sin tratamiento de degradación (control). Columna 2: degradación únicamente por tratamiento fotocatalítico. Columna 3: degradación por fotocátalisis seguida por tratamiento enzimático. Se observa la persistencia de la actividad antibiótica de acuerdo a la concentración inicial del antibiótico, por ejemplo:  $C_0 = 10, 25$  ó  $50 \text{ mgL}^{-1}$ . La actividad antibiótica en el experimento con  $C_0 = 10 \text{ mgL}^{-1}$  disminuyó el 100% solamente con el tratamiento de fotocátalisis y sin ser necesario el tratamiento enzimático. Respecto al experimento con  $C_0 = 25 \text{ mgL}^{-1}$  la actividad antibiótica se logró disminuir al 52% con el tratamiento fotocatalítico. Pero al aplicarse el tratamiento enzimático la reducción alcanzada de la actividad antibiótica fue del 68%. Finalmente, para el experimento con  $C_0 = 50 \text{ mgL}^{-1}$  la actividad antibiótica solamente disminuyó 28% con la fotocátalisis, pero se redujo al 51% después de la degradación enzimática.

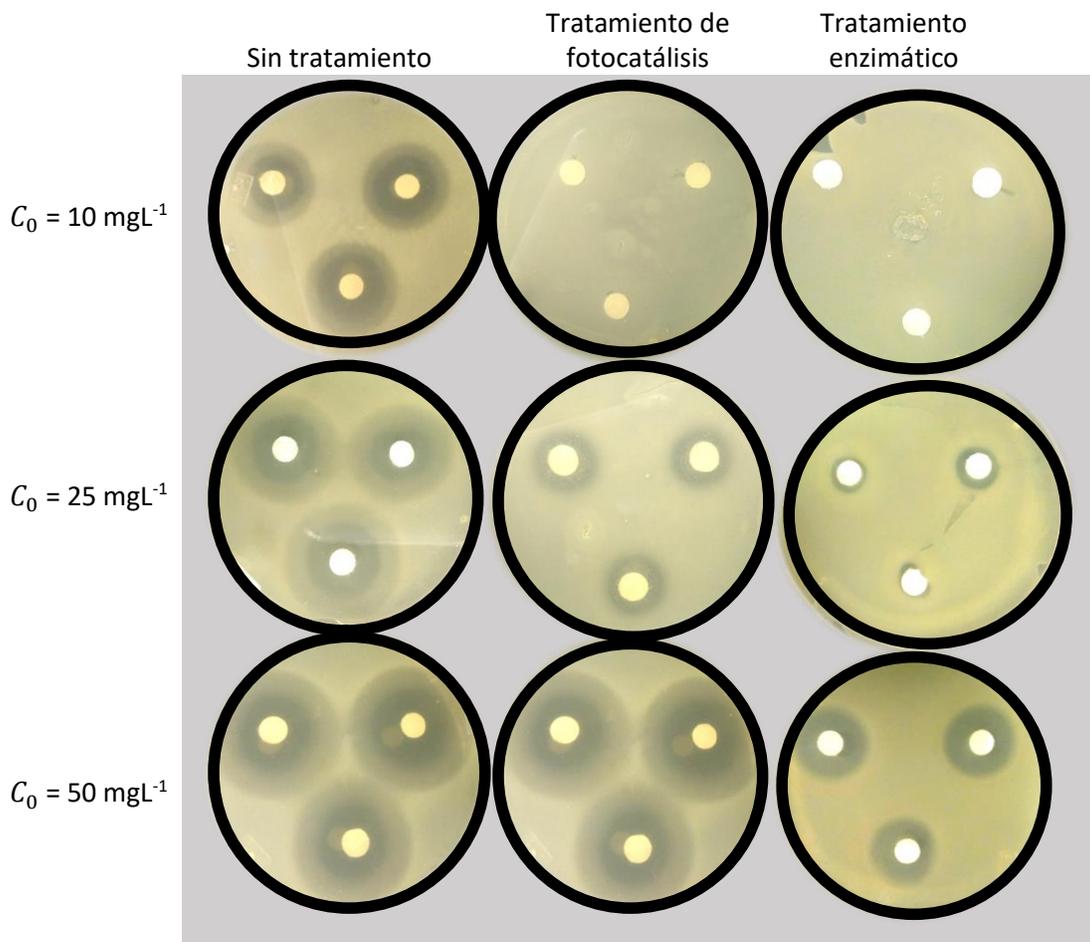


Fig. 5. Antibiogramas del crecimiento de *E. coli* cultivada en Agar Muller-Hinton en cajas Petri por 24 h en tres concentraciones de CIP:  $C_0 = 10, 25$  y  $50 \text{ mgL}^{-1}$ . En la primera columna se muestra la falta de inhibición en los controles (CIP sin degradar). En la segunda columna se muestran los halos de inhibición de CIP degradada solo por fotocátalisis. En la tercera columna se muestran los halos de inhibición de CIP degradada por los tratamientos fotocatalítico enzimático.

Los resultados mostrados demuestran que el tratamiento por fotocátalisis con  $\text{TiO}_2$  y 4 h de exposición, es efectiva en la eliminación de la actividad antibiótica para un nivel bajo de  $C_0$  (por ejemplo,  $C_0 = 10 \text{ mgL}^{-1}$ ) mientras que al incrementarse la concentración  $C_0$  (por ejemplo  $C_0 = 25$  ó  $50 \text{ mgL}^{-1}$ ) la actividad



antibiótica de CIP permanece. Este comportamiento se puede atribuir a que los compuestos resultantes de la degradación fotocatalítica o enzimática también pueden inhibir el crecimiento bacteriano.

En la Tabla 2 se presenta el resumen de resultados por cada etapa de degradación de CIP por fotocatalisis (Etapa I) para las tres soluciones con diferente concentración inicial  $C_0$ : 10, 25 y 50  $\text{mgL}^{-1}$  y el porcentaje promedio de mineralización logrado en cada caso. Se observa que a pesar de haberse logrado la degradación desde la Etapa I, no se produjo la mineralización total de los compuestos orgánicos y la actividad antibiótica persiste en las soluciones con  $C_0 = 25 \text{ mgL}^{-1}$  y  $C_0 = 50 \text{ mgL}^{-1}$ . Para estos dos experimentos, la actividad antibiótica se redujo considerablemente a menos del 50 % en el tratamiento enzimático (Etapa II).

| Concentración inicial de CIP $C_0$ ( $\text{mgL}^{-1}$ ) | Etapa I<br>Tratamiento por fotocatalisis    |                                |                                 |                                              |                    |                                       | Etapa II<br>Tratamiento o enzimático  |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|                                                          | Concentración de CIP* ( $\text{mgL}^{-1}$ ) | Porcentaje de degradación* (%) | Porcentaje de degradación** (%) | Concentración de CIP** ( $\text{mgL}^{-1}$ ) | Mineralización (%) | Actividad antibiótica persistente (%) | Actividad antibiótica persistente (%) |
| 10                                                       | 0.0                                         | 100                            | 100                             | 0.00                                         | 55                 | 0                                     | 0                                     |
| 25                                                       | 3.5                                         | 86                             | 99.8*                           | 0.029                                        | 20                 | 48                                    | 32                                    |
| 50                                                       | 34.5                                        | 31                             | 99.2*                           | 0.34                                         | 10                 | 72                                    | 49                                    |

Tabla 2. Degradación de CIP mediante fotocatalisis y porcentaje de mineralización.

\* Mediciones de UV-Vis a 271 nm; \*\* Mediciones mediante HPLC.

## 5. Conclusiones

La ciprofloxacina no demostró una interferencia en el crecimiento de *P. ostreatus* cuando se utilizó por sí sola a concentraciones de 10, 25 y 50  $\text{mgL}^{-1}$  en medio sólido, pero sí con los productos de la degradación de la fotocatalisis en las concentraciones de 10 y 25  $\text{mgL}^{-1}$  en medio líquido.

Se observó el incremento de la actividad enzimática de la lacasa producida por *P. ostreatus* en medio líquido en las soluciones de concentración inicial de CIP de 10  $\text{mgL}^{-1}$  y 25  $\text{mgL}^{-1}$  tratadas por fotocatalisis, lo que sugiere que los productos que resultan de la degradación estimulan la actividad enzimática.

La degradación por fotocatalisis aplicada en un periodo de 4 horas permitió la degradación del 100, 99.2 y 99.8% de CIP y la mineralización hasta del 55, 20 y 10 %, respecto a la concentración inicial de las soluciones con 10, 25 y 50  $\text{mgL}^{-1}$ , respectivamente.

El tratamiento enzimático incrementó la producción de biomasa en las soluciones de concentración inicial de 10 y 25  $\text{mgL}^{-1}$ .

El método propuesto permitió reducir la actividad antibiótica total hasta el 100, 68% y 51 % en las soluciones con concentración inicial de 10, 25 y 50  $\text{mgL}^{-1}$  respectivamente.

Los resultados sugieren que la actividad antibiótica residual se debe a los subproductos que se forman en el proceso de degradación de la molécula original.

## 6. Agradecimientos

Los autores agradecen la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México al coautor A.-E. P.-G. de acuerdo con la Convocatoria de Becas Nacionales 2018.



## 7. Referencias

- [1] Bansal, O. P. (2019). Antibiotics in hospital effluents and their impact on the antibiotics resistant bacteria and remediation of the antibiotics: A review. *Network Pharmacology*, 4(3-4), 6-30.
- [2] Awad, Y. M., Kim, S. C., Abd El-Azeem, S. A. M., Kim, K. H., Kim, K. R., Kim, K., ... Ok, Y. S. (2014). Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility. *Environmental Earth Sciences*, 71(3), 1433-1440.
- [3] 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.
- [4] Picó, Y., & Andreu, V. (2007). Fluoroquinolones in soil-risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1287-1299.
- [5] Szczepanska, B., Andrzejewska, M., Spica, D., & Klawe, J. J. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from children and environmental sources in urban and suburban areas. *BMC Microbiology*, 17(1), 1-9.
- [6] Chong, M. N., Jin, B., Chow, C. W. K., & Saint, C. (2010). Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. *Water Research*, 44(10), 2997-3027.
- [7] Wang, C. C., Li, J. R., Lv, X. L., Zhang, Y. Q., & Guo, G. (2014). Photocatalytic organic pollutants degradation in metal-organic frameworks. *Energy and Environmental Science*, 7(9), 2831-2867.
- [8] Zangeneh, H., Zinatizadeh, A. A. L., Habibi, M., Akia, M., & Hasnain Isa, M. (2015). Photocatalytic oxidation of organic dyes and pollutants in wastewater using different modified titanium dioxides: A comparative review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 26, 1-36.
- [9] Singh, G. D., & Gupta, K. C. (2014). Photo and UV degradation of Ciprofloxacin Antibiotic. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(6), 641-648.
- [10] Kalantary, R. R., Dadban Shahamat, Y., Farzadkia, M., Esrafil, A., & Asgharnia, H. (2015). Photocatalytic degradation and mineralization of diazinon in aqueous solution using nano-TiO<sub>2</sub> (Degussa, P25): kinetic and statistical analysis. *Desalination and Water Treatment*, 55(2), 555-563.
- [11] Nakata, K., & Fujishima, A. (2012). TiO<sub>2</sub> photocatalysis: Design and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13(3), 169-189.
- [12] Wilson, S. C., & Jones, K. C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A Review. *Environmental Pollution*, 81(3), 229-249.
- [13] Cohen, R., Persky, L., & Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5), 582-594.
- [14] Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, 32(1), 147-156.
- [15] Ding, H., Wu, Y., Zou, B., Lou, Q., Zhang, W., Zhong, J., ... Dai, G. (2016). Simultaneous removal and degradation characteristics of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics by laccase-mediated oxidation coupled with soil adsorption. *Journal of Hazardous Materials*, 307, 350-358.
- [16] Tuomela, M., & Hatakka, A. (2011). Oxidative Fungal Enzymes for Bioremediation. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition (Second Ed, Vol. 6)*. Elsevier B.V.
- [17] Van Epps, A., & Blaney, L. (2016). Antibiotic Residues in Animal Waste: Occurrence and Degradation in Conventional Agricultural Waste Management Practices. *Current Pollution Reports*, 2(3), 135-155.
- [18] Heeb, S., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Diggle, S. P., Williams, P., & Cámara, M. (2011). Quinolones: From antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(2), 247-274.
- [19] Hassani, A., Khataee, A., & Karaca, S. (2015). Photocatalytic degradation of ciprofloxacin by synthesized TiO<sub>2</sub> nanoparticles on montmorillonite: Effect of operation parameters and artificial neural network modeling. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 409, 149-161.



- [20] Čvančarová, M., Moeder, M., Filipová, A., & Cajthaml, T. (2015). Biotransformation of fluoroquinolone antibiotics by ligninolytic fungi - Metabolites, enzymes and residual antibacterial activity. *Chemosphere*, 136, 311–320.
- [21] Yahiat, S., Fourcade, F., Brosillon, S., & Amrane, A. (2011). Removal of antibiotics by an integrated process coupling photocatalysis and biological treatment - Case of tetracycline and tylosin. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(7), 997–1003.
- [22] Zhu, C., Bao, G., & Huang, S. (2016). Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ATCC 52857) induced through yeast extract and copper. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(2), 270–276.
- [23] Michael, I., Hapeshi, E., Michael, C., & Fatta-Kassinos, D. (2010). Solar Fenton and solar TiO<sub>2</sub> catalytic treatment of ofloxacin in secondary treated effluents: Evaluation of operational and kinetic parameters. *Water Research*, 44(18), 5450–5462.
- [24] Rodríguez, E. M., Márquez, G., Tena, M., Álvarez, P. M., & Beltrán, F. J. (2015). Determination of main species involved in the first steps of TiO<sub>2</sub> photocatalytic degradation of organics with the use of scavengers: The case of ofloxacin. *Applied Catalysis B: Environmental*, 178, 44–53.
- [25] Nogueira, V., Lopes, I., Freitas, A. C., Rocha-Santos, T. A. P., Gonçalves, F., Duarte, A. C., & Pereira, R. (2015). Biological treatment with fungi of olive mill wastewater pre-treated by photocatalytic oxidation with nanomaterials. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 234–242.
- [26] Singh, S. K., Khajuria, R., & Kaur, L. (2017). Biodegradation of ciprofloxacin by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *3 Biotech*, 7(1).
- [27] Téllez-Téllez, M., Fernández, F. J., Montiel-González, A. M., Sánchez, C., & Díaz-Godínez, G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 675–679.
- [28] Páez, L. M. G. (2010). Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. Tesis de licenciatura. Escuela Politécnica del Ejército.
- [29] Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turck, A. M., & Graevenitz, A. Von. (1978). 40 Microbiology: A Centenary Perspective 1966 Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(3), 493–496.
- [30] Pretali, L., Maraschi, F., Cantalupi, A., Albin, A., & Sturini, M. (2020). Water depollution and photo-detoxification by means of TiO<sub>2</sub>: Fluoroquinolone antibiotics as a case study. *Catalysts*, 10(6).
- [31] Malakootian, M., Nasiri, A., & Amiri Gharaghani, M. (2020). Photocatalytic degradation of ciprofloxacin antibiotic by TiO<sub>2</sub> nanoparticles immobilized on a glass plate. *Chemical Engineering Communications*, 207(1), 56–72.
- [32] Patel, H., Gupte, A., & Gupte, S. (2009). Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResources*, 4(1), 268–284
- [33] Praveen, K., Usha, K. Y., & Rajasekhar Reddy, B. (2012). Effect of antibiotics on ligninolytic enzymes production from *Stereum ostrea* and *Phanerochaete chrysosporium* under submerged fermentation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(SUPPL.3), 135–138.
- [34] Paul, T., Dodd, M. C., & Strathmann, T. J. (2010). Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin: Transformation products and residual antibacterial activity. *Water Research*, 44(10), 3121–3132.
- [35] Mayans, B., Camacho-arévalo, R., & García-delgado, C. (2020). An assessment of *Pleurotus ostreatus* to remove sulfonamides, and its role as a biofilter based on its own spent mushroom substrate Hazard quotient. *Environmental Science and Pollution Research*.
- [36] An, Q., Wu, X.-J., Han, M.-L., Cui, B.-K., He, S.-H., Dai, Y.-C., & Si, J. (2016). Sequential Solid-State and Submerged Cultivation of the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* on Biomass and the Activity of



Lignocellulolytic Enzymes. *BioResources*, 11(4), 8791–8805. <https://doi.org/10.15376/biores.11.4.8791-8805>

[37] Tinoco, R., Acevedo, A., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2011). Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(4), 531–540.

[38] Guillén-Navarro, G. K., Márquez-Rocha, F. J., & Sanchez-Vázquez, J. E. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15(4), 302–306.