



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**BIODEGRADACIÓN INDUCIDA DE NAPROXENO BAJO
CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

PRESENTA

ANA GABRIELA ORTEGA ALVARADO



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Víctor Manuel Luna Pabello

VOCAL: Profesor: Alejandro Camacho Cruz

SECRETARIO: Profesor: Honoria Fuentes Sixtos

1er. SUPLENTE: Profesor: Luciano Hernández Gómez

2do. SUPLENTE: Profesor: Guadalupe Tsuzuki Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EXPERIMENTAL, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. GUADALUPE TSUZUKI REYES

SUSTENTANTE:

ANA GABRIELA ORTEGA ALVARADO

RECONOCIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica a través de los proyectos PAPIIT-IN107209 y PAPIIT-IT103312-3.

Al PAIP 6190-14 (VMLP 2011-2012), otorgado por la Facultad de Química, para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Herminia de Jesús Loza-Tavera del Laboratorio 105, Conjunto E, UNAM-Facultad de Química; por la donación de la cepa bacteriana *Pseudomonas putida* KT2440.

A los técnicos académicos del Laboratorio de Microbiología Experimental, UNAM-Facultad de Química, M. en C. Guadalupe Tsuzuki-Reyes y al M. en C. Luciano Hernández-Gómez, por el apoyo técnico y las facilidades para el desarrollo experimental.

Al Ing. Daniel Martínez-Gutiérrez del Departamento de Ingeniería de Control, UNAM-Facultad de Ingeniería, por su apoyo en el mantenimiento electrónico del equipo empleado y por la adaptación de un regulador de velocidad con tacómetro a un agitador magnético.

AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater*, la **Universidad Nacional Autónoma de México**, a la **Facultad de Química** y a la **ENP #5 “José Vasconcelos”** por permitirme el honor de ser parte de sus alumnos, brindarme la educación y conocimientos adquiridos durante mi formación profesional y personal.

Al Dr. **Víctor Manuel Luna Pabello** por la generosidad con la que me recibió y por permitir integrarme a su grupo de investigación en el Laboratorio de Microbiología Experimental, por su apoyo, dedicación, paciencia, y por brindarme los recursos necesarios para la realización de este trabajo.

A los integrantes del jurado de examen, los profesores: **Alejandro Camacho Cruz**, **Honoría Fuentes Sixtos**, **Luciano Hernández Gómez** y **Guadalupe Tsuzuki Reyes**, por las aportaciones finales que de manera general enriquecieron el trabajo para convertirlo en un proyecto valorable.

A **Ale Galiote Flowers** por ser mi colega, cómplice, equipo y por haberse convertido en una amiga incondicional.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Experimental que hicieron del trabajo en el laboratorio una estancia placentera y de quienes tengo presente una gran amistad: **Almiutz**, **Benja**, **Édgar**, **Ernesto**, **Héctor**, **Hugo**, **Jacob**, **Jazz**, **Jorge**, **Lala Franco**, **Lore**, **Lynet**, **Manu manito**, **Moni Lindano**, **Paty**, **Pável**, **Rafa**, **Serch** y **Adrián** de la Torre de Ingeniería.

A mis compañeros del grupo cuatro y de carrera: **Ale**, **Betitronics**, **Beto**, **César**, **Daniel**, **Jack Sparrow**, **Linda**, **Marina**, **Marlenchas**, **Valeria**, **Viri**, **Xánic**, **Aldrich**, **Alex**, **Edgardo**,

Marie, Paco, Richard y demás personitas que convirtieron mi estancia en la facultad en recuerdos que por siempre atesoraré.

A mis mejores amigas, **Brench Montiel** y **Sara TRF**, por su invaluable amistad y cariño, por todo lo que hemos compartido juntas desde los primeros semestres y sobre todo a mi **Danonino** por estar conmigo en todo momento, tolerar mis histerias y darme tantos momentos de felicidad, gracias babe!!!!

***Para Nereo Ortega, Gabriela
Alvarado y mi hermanita Brenda.
Gracias por todo el amor, apoyo,
consejos, enseñanzas y confianza
que siempre me han brindado...
Los amo profundamente!!!***

CONTENIDO

Índice de tablas	x
Índice de gráficas	xii
Índice de figuras	xiv
RELACIÓN DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y SIGLAS.....	1
RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN	4
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	7
2.1. Hipótesis.....	7
2.2. Objetivo general	7
2.2.1. Objetivos particulares	7
3. MARCO TEÓRICO.....	8
3.1. Problemática de la contaminación del agua	8
3.1.1. Compuestos orgánicos emergentes en el agua.....	8
3.1.2. Ecotoxicidad de los COE	11
3.1.3. Presencia de naproxeno en aguas residuales mexicanas	12
3.1.4. Usos del naproxeno	14
3.2. Antecedentes de la degradación de COE	17
3.2.1. Aspectos generales sobre la biodegradabilidad aerobia rápida.....	19
3.2.2. Estudios de degradación de naproxeno.....	22

3.3. Procesos de inducción de la biodegradación de COE.....	24
3.3.1. Cometabolismo	24
3.3.2. Bioaumentación.....	27
4. METODOLOGÍA.....	29
4.1. Estrategia de trabajo	29
4.2. Equipo y material de laboratorio.....	31
4.3. Ensayos previos	33
4.3.1. Solución estándar de naproxeno	33
4.3.2. Inóculo proveniente de lodos activados en los biorreactores.....	33
4.3.3. Validación del sistema respirométrico.....	35
4.4. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia rápida del naproxeno usando el procedimiento OCDE 301-F.....	35
4.5. Inducción de la biodegradación de naproxeno	37
4.5.1. Selección del co-sustrato para la evaluación del cometabolismo	39
4.5.2. Selección de <i>Pseudomonas</i> sp. para evaluación de bioaumentación	40
4.5.3. Efecto de diferentes dosis de naproxeno en <i>P. putida</i> KT2440	44
4.5.4. Biodegradación de naproxeno por inóculo de lodos activados bajo condiciones de co-sustrato.....	46
4.5.5. Biodegradación de naproxeno por inóculo de <i>P. putida</i> KT2440 bajo condiciones de co-sustrato.....	47
4.5.6. Biodegradación de naproxeno modificando factores bióticos y abióticos	49

4.5.7.	Cuantificación de naproxeno por MEFS-CG	52
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
5.1.	Ensayos previos	54
5.1.1.	Inóculo de lodos activados.....	54
5.1.2.	Validación del sistema respirométrico.....	55
5.2.	Evaluación de la biodegradabilidad de naproxeno	56
5.3.	Inducción de la biodegradación de naproxeno	60
5.3.1.	Selección de co-sustrato.....	60
5.3.2.	Selección de especie del género <i>Pseudomonas</i>	63
5.3.3.	Efecto de distintas dosis de naproxeno en <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	68
5.3.4.	Evaluación de la biodegradación de naproxeno por co-sustrato conteniendo inóculo de lodos activados	70
5.3.5.	Evaluación de la biodegradación de naproxeno por co-sustrato conteniendo <i>P. putida</i> KT2440.....	73
5.3.6.	Evaluación de la biodegradación de naproxeno por efecto de bioaumentación y co-sustrato.....	77
5.4.	Análisis integral	81
6.	CONCLUSIONES.....	88
7.	RECOMENDACIONES	90
8.	GLOSARIO.....	91
9.	ANEXOS	93

9.1. Características del naproxeno	94
9.2. Protocolo para la obtención de muestra e inóculo de lodos activados	95
9.3. Cálculo de la demanda teórica de oxígeno (DTO)	99
9.4. Curva de calibración de McFarland	102
9.5. Procedimiento OCDE 301 F: respirometría manométrica	103
9.5.1. Uso del Respirómetro AER-200 <i>Challenge technology</i>	110
9.6. Repetibilidad de las celdas del Respirómetro <i>AER-200 Challenge Technology</i> previo a cada ensayo.....	113
9.7. Respirogramas de la biodegradación inducida de naproxeno.....	119
9.8. Cuantificación del naproxeno por MEFS-CG.....	122
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

Índice de tablas

Tabla 1. Categorías de los contaminantes emergentes y algunos ejemplos	9
Tabla 2. Reportes de ecotoxicidad de algunos fármacos.....	11
Tabla 3. Presencia de fármacos en influentes de aguas residuales en México.....	13
Tabla 4. DL ₅₀ de naproxeno en otras especies.	15
Tabla 5. Toxicidad de naproxeno en población humana.	16

Tabla 6. Condiciones para elegir el tipo de prueba de biodegradabilidad aerobia rápida (OCDE, 1992).....	21
Tabla 7. Antecedentes de degradación biológica de naproxeno.	23
Tabla 8. Tratamientos dados en los biorreactores para inducir la biodegradación.....	30
Tabla 9. Composición de los biorreactores para evaluar la biodegradabilidad aerobia rápida de naproxeno.....	37
Tabla 10. Variables modificadas para inducir la biodegradación aerobia de naproxeno. ...	38
Tabla 11. Condiciones experimentales de la prueba de toxicidad de naproxeno en <i>P. putida</i> KT2440.....	46
Tabla 12. Contenido de los reactores de inducción de la biodegradación con lodos activados.	47
Tabla 13. Contenido de los reactores para inducir la biodegradación con <i>P. putida</i> KT2440.	48
Tabla 14. Contenido de los reactores para el experimento de biodegradación con bioaumentación.....	51
Tabla 15. Parámetros determinados en diferentes muestras de lodos activados de la PTAR Chapultepec	54
Tabla 16. Crecimiento bacteriano en diferentes medios incubados a 28 °C	63
Tabla 17. Utilización de benzoato de sodio [720 mg/L] como fuente de carbono por <i>Pseudomonas</i> sp.....	66
Tabla 18. Tinciones de muestras con <i>P. fluorescens</i> y <i>P. putida</i> KT2440 en MM _B	67

Tabla 19. Comparación de los porcentajes de biodegradación obtenidos por el método respirométrico y por MEFS-CG	81
Tabla 20. Biodegradación calculada con las cinéticas obtenidas a partir del modelo de Gompertz al t=185h.....	84
Tabla 21. Resultados de ANOVA de una factor.	85
Tabla 22. Comparaciones múltiples de Tukey HSD.	86
Tabla 23. Resultados de homogeneidad por subgrupos con un 95% de intervalo de confianza.....	87
Tabla 24. Propiedades físicas, químicas, seguridad y entrega del naproxeno.....	94
Tabla 25. Composición de las soluciones estándar para preparar el medio mineral.....	105
Tabla 26. Datos de certificado de calibración otorgado por el fabricante.	114
Tabla 27. Concentraciones determinadas de naproxeno al inicio y al final de cada ensayo.	123

Índice de gráficas

Gráfica 1. Viabilidad microbiana en lodos activados para seleccionar la forma de toma de inóculo.....	55
Gráfica 2. Comportamiento del inóculo de lodos activados en el respirómetro.....	56
Gráfica 3. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia de naproxeno durante 28 días.....	57
Gráfica 4. Resultados del ensayo para la selección del co-sustrato.....	62

Gráfica 5. Evaluación del efecto del naproxeno a distintas concentraciones en <i>P. putida</i> KT2440.....	69
Gráfica 6. Biodegradación de naproxeno con lodos activados y benzoato de sodio como co-sustrato.....	72
Gráfica 7. Biodegradación inducida de naproxeno con <i>P. putida</i> KT2440 y benzoato de sodio como co-sustrato.....	76
Gráfica 8. Presencia de bacterias degradadoras de ceftrimida (<i>Pseudomonas</i> sp) en lodos activados.	77
Gráfica 9. Adaptación de la comunidad microbiana..	78
Gráfica 10. Biodegradación inducida de naproxeno bioaumentando <i>P. putida</i> KT2440 a lodos activados.....	80
Gráfica 11. Cinética modelada de la biodegradación de naproxeno por inóculo de lodos activados	82
Gráfica 12. Cinética modelada de la biodegradación de naproxeno por <i>P. putida</i> KT2440.....	83
Gráfica 13. Cinética modelada de la biodegradación de naproxeno por lodos activados y <i>P. putida</i> KT2440.....	83
Gráfica 14. Curva de Mc Farland realizada en espectrofotómetro (A_{600}).....	102
Gráfica 15. Verificación de la repetibilidad previo a la validación del sistema respirométrico.	115
Gráfica 16. Verificación de la repetibilidad previo a la evaluación de la biodegradabilidad de naproxeno.....	115
Gráfica 17. Verificación de la repetibilidad previo a la selección del co-sustrato.....	116

Gráfica 18. Verificación de la repetibilidad previo al ensayo de inducción de la biodegradación de naproxeno por cometabolismo con inóculo de lodos activados.	116
Gráfica 19. Verificación de la repetibilidad previo al ensayo de inducción de la biodegradación de naproxeno por cometabolismo por co-sustrato con <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.	117
Gráfica 20. Verificación de la repetibilidad previo al ensayo de adaptación de la comunidad microbiana.	117
Gráfica 21. Verificación de la repetibilidad previo al ensayo de inducción de la biodegradación de naproxeno por cometabolismo y bioaumentación.	118
Gráfica 22. Datos crudos de consumo de oxígeno de la evaluación de la biodegradación de naproxeno por cometabolismo con inóculo de lodos activados.	119
Gráfica 23. Datos crudos de consumo de oxígeno en la evaluación de la biodegradación de naproxeno por cometabolismo con inóculo de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.	120
Gráfica 24. Datos crudos de consumo de oxígeno en la evaluación de la biodegradación de naproxeno bioaumentando <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 a lodos activados aunado al efecto de cometabolismo.	121
Gráfica 25. Curva de calibración del naproxeno silanizado por cromatografía de gases .	122

Índice de figuras

Figura 1. Destino de los compuestos farmacéuticos en el medio ambiente.	10
Figura 2. Concentración de algunos fármacos en: A) agua tratada. B) agua superficial. Datos obtenidos de diferentes estudios.	10

Figura 3. Comparación del consumo de fármacos en distintos países.....	12
Figura 4. Metabolitos humanos de naproxeno.....	14
Figura 5. Procesos de transformación y destino de los fármacos.	18
Figura 6. Degradación de naproxeno y formación de desmetilnaproxeno en presencia de leche como co-sustrato.	25
Figura 7. (A) Integración de las vías metabólicas de algunos contaminantes. (B) Vía degradativa de naproxeno a partir de su metabolito 2-metilnaftaleno	26
Figura 8. Mecanismo de degradación bacteriana de fenantreno	27
Figura 9. Diagrama de Trabajo.....	29
Figura 10. Bacterias desarrolladas en agar cetrimida presentes en una muestra tomada de un biorreactor con lodos activados y alimentado con benzoato de sodio.....	64
Figura 11. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 en MM _B expuesta a diferentes concentraciones de naproxeno.....	69
Figura 12. Evaluación de la biodegradación de naproxeno empleando un co-sustrato y bioaumentando el sistema.....	80
Figura 13. Verificación de la normalidad e igualdad de varianza en los ensayos realizados.	85
Figura 14. Componentes del Respirómetro AER-200 Challenge Technology.....	110

RELACIÓN DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y SIGLAS

A ₆₀₀	Absorbancia a 600 nm
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
Benzo	Benzoato de sodio
CG	Cromatografía de gases
COD	Carbono orgánico disuelto
COE	Compuestos orgánicos emergentes
Comet	Cometabolismo
C. V.	Coefficiente de variación
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
DTO	Demanda teórica de oxígeno
HAP	Hidrocarburo aromático policíclico
MEFS	Microextracción en fase sólida
MIX	Lodos activados mezclados en proporción 1:1 de medio mineral y sedimento
MM	Medio mineral indicado por OCDE
MM _B	Medio mineral con benzoato de sodio [720,5 mg/L ≈ 5 mM]
MM _{co-s} 5 mM	Medio mineral con el co-sustrato seleccionado 5 mM
Naprox	Naproxeno
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
PEG	Polietilenglicol
ppb	Partes por billón
PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales
SN	Sobrenadante de lodos activados
SST	Sólidos suspendidos totales
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias entre mililitro

RESUMEN

El naproxeno es un fármaco empleado como antiinflamatorio y analgésico cuyo consumo en México, así como a nivel internacional, se hace cada vez más extenso debido a su alta efectividad y a que es un medicamento de libre venta. A causa de su alto consumo, y dado que su eliminación generalmente es por productos glucoronidados que conservan su estructura química aromática, cuando se desecha del organismo tiene como destino aguas residuales que son tratadas por sistemas biológicos como lodos activados; sin embargo, aún se ha detectado su presencia en aguas tratadas y superficiales, por lo que se clasifica dentro de los compuestos orgánicos emergentes (COE). Es indispensable la eliminación de estos contaminantes ya que las concentraciones ambientales reportadas son tóxicas para dafnias, trucha arcoíris y además se puede incrementar su presencia por bioacumulación llegando a ser tóxico incluso para la salud humana.

En este trabajo se evaluó la biodegradabilidad aerobia rápida del naproxeno bajo los criterios establecidos por la OCDE empleando el procedimiento 301 F: respirometría manométrica. Al determinar que no es un compuesto fácilmente biodegradable, se indujo la biodegradación del mismo bajo condiciones de co-sustrato y/o bioaumentación. Asimismo, la concentración a evaluar de naproxeno fue de 5 mg/L de modo que pudiera ser comparable con los datos de concentración en cuerpos de agua reportados en la literatura.

El co-sustrato elegido fue el benzoato de sodio a una concentración de 720,5 mg/L (5 mM), que fue seleccionado después de evaluarlo simultáneamente con almidón y lactosa. Por otro lado los sistemas se bioaumentaron con la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 que fue seleccionada de entre otras cuatro especies de *Pseudomonas* sp. por ser

.....

la que aprovechó más el sustrato disponible produciendo mayor biomasa en presencia del benzoato de sodio.

Los resultados se evaluaron a las 185 h ($\approx 7,7$ días) en función del consumo de oxígeno en el respirómetro automático de volumen constante *AER-200 Challenge Technology*, obteniéndose mediante las cinéticas de biodegradación generadas por el modelo de Gompertz, que en tiempo, las mejores cinéticas de biodegradación fueron las de los tratamientos con lodos activados y el sistema con bioaumentado, que contenían benzoato de sodio como co-sustrato, ya que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ellos (75% con $p=0,05$) y las cinéticas de biodegradación más bajas en los tratamientos donde se adicionó naproxeno como única fuente de carbono y se emplearon los inóculos de lodos activados y la cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 y (0,0%). Estos resultados fueron obtenidos de acuerdo con la relación entre las cinéticas de biodegradación y la cuantificación del naproxeno inicial y residual por cromatografía de gases.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos farmacéuticos son sustancias químicas destinadas a tener un modo específico de acción ya que se emplean en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de las enfermedades mejorando la calidad y esperanza de vida tanto de seres humanos como de animales. No obstante debido a su uso extenso y a que son eliminadas del organismo mayoritariamente como productos metabólicos, es importante su estudio considerando que estos contaminantes en el agua no son regulados por la normatividad vigente y porque se ha detectado su presencia e incremento de concentración tanto en afluentes como en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), cuyos procesos principales de degradación son los lodos activados. Puesto que las aguas tratadas habitualmente se descargan en aguas superficiales o se utilizan para actividades agrícolas, los fármacos presentes en ellas pueden filtrarse en el subsuelo hasta llegar a aguas subterráneas y de ahí ser un riesgo potencial de contaminación de agua potable.

Desde la detección del ácido clofibrico, en agua subterránea en Berlín en 1992 (Seeber y Hoa, 2010), se ha despertado el interés científico y socio-político sobre el destino y comportamiento de los fármacos como compuestos orgánicos emergentes (COE), asimismo se han desarrollado nuevas herramientas analíticas para la detección de residuos ambientales como el empleo de técnicas cromatográficas y la espectrometría de masas que permiten la detección de contaminantes orgánicos polares, tales como los productos farmacéuticos en niveles de concentración relativamente bajos (ppb) para todos los tipos de agua (residuales, superficiales, subterráneas y potable) así como en matrices sólidas (lodos de depuradora, estiércol, suelos y sedimentos).

Aunque por el momento no hay riesgos toxicológicos para los seres humanos que consumen agua potable contaminada por COE, se han identificado a corto plazo y a concentraciones ambientales: efectos estrogénicos, alteraciones en el aparato excretor de peces y dafnias, así como mutaciones en algas. Sin embargo, aún falta información sobre efectos adversos crónicos y se ignora si los fármacos o sus metabolitos pueden llevar a cabo reacciones entre sí produciendo conexiones toxicológicas desconocidas.

En el caso particular de este trabajo, se eligió el naproxeno debido a que es uno de los compuestos farmacéuticos más consumidos en México y su identificación así como su cuantificación han sido reportadas en aguas de la Ciudad de México y su Zona Metropolitana, encontrándose en mayor concentración en influentes de aguas residuales respecto a otros fármacos (Castillo-Alanís, 2009; Siemens, Huschek y Siebe, 2008; Gibson, Becerril-Bravo y Silva-Castro, 2007).

Por otro lado, se ha observado que como ocurre con otros COE, cuando disminuye la concentración del naproxeno respecto al influente hay grandes variaciones en los porcentajes de remoción, lo que conduce a buscar el motivo de esta baja eficiencia con un tratamiento de lodos activados. En este sentido, se hace necesario determinar si la vía por la cual está siendo removido en un sistema de tratamiento de aguas residuales se debe a biodegradación, adsorción o alguna transformación química, en el entendido de que cualquier proceso existente no se diseñó para la eliminación de estos compuestos.

Como se mencionó anteriormente, hasta hoy día los productos farmacéuticos no son considerados en la directiva del marco de agua, lo cual implica desarrollar normas de

calidad ambiental para los contaminantes de modo que se pueda proteger y mejorar el estado de los ecosistemas acuáticos y terrestres.

Es de esperar que en el futuro las normas de calidad ambiental para COE se definirán a partir de los métodos para la evaluación científica de los riesgos, por lo que actualmente se están desarrollando o modificando procedimientos existentes. De ese modo, en este trabajo se evaluó la biodegradabilidad del naproxeno (Sección 5.1) y se propuso una metodología para inducir la biodegradación de dicho fármaco (Sección 5.3) como compuesto orgánico emergente.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Es posible eliminar el naproxeno en fase acuosa por medio de bioaumentación empleando *Pseudomonas* sp. y adicionando un co-sustrato en un inóculo de lodos activados.

2.2. Objetivo general

Obtener un método eficiente para biodegradar el naproxeno bajo condiciones de co-sustrato y bioaumentación con la especie *Pseudomonas* sp. que mejor metabolice el fármaco.

2.2.1. Objetivos particulares

- Evaluar la biodegradabilidad aerobia rápida del naproxeno.
- Determinar y seleccionar el co-sustrato adecuado para inducir la biodegradación del compuesto farmacéutico por cometabolismo.
- Seleccionar la especie de *Pseudomonas* sp. que al utilizar el co-sustrato permita una mayor eficiencia en la inducción de la biodegradación del fármaco.
- Evaluar la biodegradación de naproxeno bajo condiciones de co-sustrato y/o bioaumentación.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Problemática de la contaminación del agua

En la NOM-001-SEMARNAT-1996, el agua residual se define como: “aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas”. En dicho documento sólo se consideran como contaminantes: grasas y aceites, materia flotante, sólidos sedimentables, sólidos suspendidos totales, demanda bioquímica de oxígeno a los cinco días (DBO₅), nitrógeno total, fósforo total, temperatura elevada (>40 °C), pH fuera del intervalo 5-10 unidades, metales pesados, patógenos y parásitos. Si las aguas residuales no cumplen con los límites permitidos establecidos en la norma, se deben someter a procesos de tratamiento para habilitarla y que posteriormente pueda descargarse a cuerpos receptores de agua.

En general, la razón principal para tratar el agua es evitar mayores problemas de contaminación; sin embargo, los tratamientos empleados actualmente sólo consideran la eliminación de sustancias reguladas en las normas y no así los compuestos orgánicos emergentes (COE).

3.1.1. Compuestos orgánicos emergentes en el agua

Los COE son sustancias de nueva síntesis química que se han detectado en aguas residuales cuyo incremento de concentración se correlaciona con el uso creciente de muchos de ellos. En la mayoría de los casos es deficiente su remoción en plantas de

tratamiento de aguas residuales convencionales (*PTAR*) (Nikolaou, Meric y Fatta, 2007; Fent, Weston y Caminada, 2006; Daughton, 2004; Daughton y Ternes, 1999).

Estos compuestos emergentes se han clasificado en dos grupos principales: los productos farmacéuticos y los productos de cuidado y aseo personal (Tabla 1). Los fármacos representan un interés especial por ser diseñados para actuar de manera específica que a la vez proporcionan un efecto biológico.

Tabla 1. Categorías de los contaminantes emergentes y algunos ejemplos (Durán, 2009).

Categoría	Ejemplos
Fármacos	
Antibióticos de uso humano y veterinario	Trimetoprim, eritromicina, lincomicina, sulfametoxasol
Analgésicos y anti-inflamatorios	Codeína, ibuprofeno, acetaminofén, diclofenaco
Fármacos de uso psiquiátrico	Diazepam
Reguladores lipídicos	Bezafibrato, ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico
β -bloqueadores	Metoprolol, propranolol, timolol
Medios de contraste para rayos X	Iopromida, iopomidol, diatrizoato.
Anticonceptivos	Estrona, 17- β -estradiol, estriol, 17- α -etinilestradiol
Productos de aseo personal	
Fragancias	Almizcles: nitro, poli y macrocíclicos
Bloqueadores de sol	Benzofenona, alcanfor metilbencilidano
Repelentes de insectos	N,N-dimetiltoluamida
Antisépticos	Triclosán, clorofeno
Subproductos de la desinfección	Trihalometanos, bromoácidos, bromoaldehidos.

Las fuentes de emisión de los COE son los hospitales, consultorios médicos, clínicas veterinarias, granjas, hogares, la excreción y eliminación directa de fármacos caducados; cuantitativamente, las dos últimas son las principales fuentes al medio ambiente (Figura 1), de tal modo que si no se eliminan por completo después de su paso por una *PTAR*, seguirán llegando a sitios de depósito o aguas superficiales, como ríos, lagos y canales facilitando un incremento en su concentración (Musson y Townsend, 2009; Moldovan, 2006; Fent *et al*, 2006; Nikolaou *et al*, 2007).

Biodegradación inducida de naproxeno bajo condiciones controladas de laboratorio

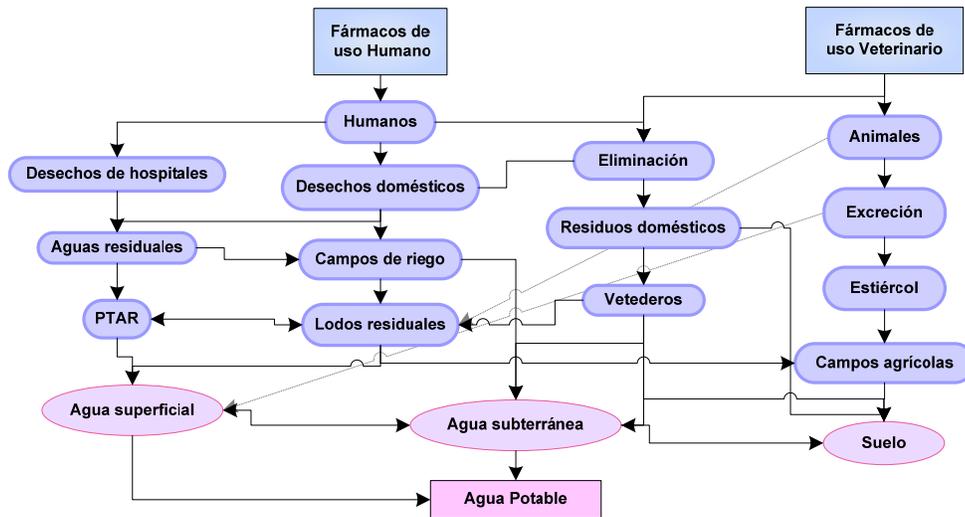


Figura 1. Destino de los compuestos farmacéuticos en el medio ambiente.

La problemática existente por la presencia de compuestos farmacéuticos tanto en agua tratada como superficial (Figura 2), indica que no es suficiente su tratamiento por un método tradicional ya que además de su ubicuidad, los COE son persistentes a consecuencia de que las velocidades de liberación son mayores a las de su transformación (Nikolaou *et al*, 2007).

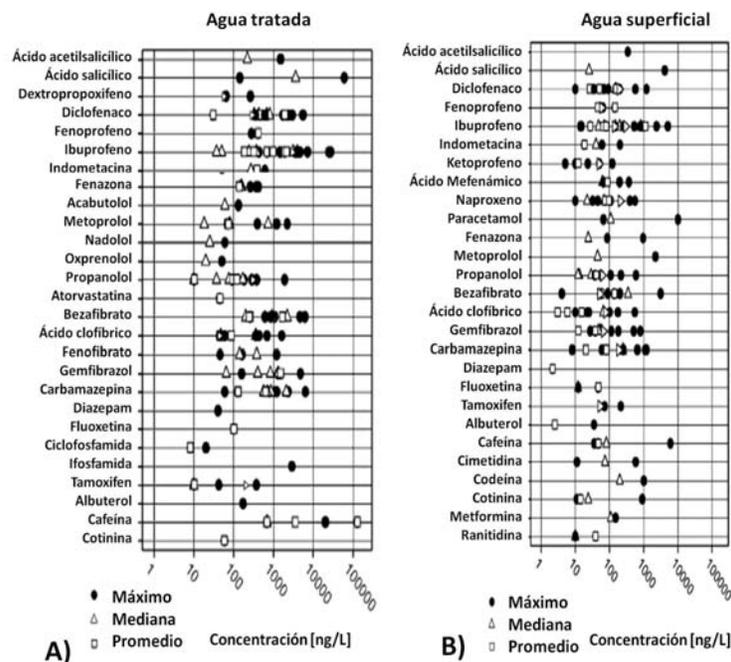


Figura 2. Concentración de algunos fármacos en: A) agua tratada. B) agua superficial. Datos obtenidos de diferentes estudios. Tomado y modificado de (Fent *et al*, 2006).

3.1.2. Ecotoxicidad de los COE

A partir del hallazgo de fármacos en aguas superficiales se iniciaron investigaciones sobre los efectos que pudieran tener los COE aun a concentraciones de trazas (Fun-Choong *et al*, 2006), como es de esperarse, la mayoría de las investigaciones son dirigidas hacia los efectos en organismos acuáticos (Tabla 2). Sin embargo, no se debe descartar el hecho de que parte del agua tratada es utilizada para riego y por tanto puede llegar al ser humano. Asimismo se ha concluido que cuanto mayor sea el coeficiente de partición de las sustancias octanol/agua (log Kow) mayor es su toxicidad (Cleuvers, 2004) y más aún, la producción de fotoproductos hallados, sugieren la oportunidad de considerar en la evaluación ecotoxicológica, derivados de fármacos así como sus efectos adversos en organismos diferentes a los acuáticos.

Tabla 2. Reportes de ecotoxicidad de algunos fármacos.

Fármaco	Efecto	Referencia
Antidepresivos	Retraso en el desarrollo de peces y en la metamorfosis de ranas a largo plazo	(Henry <i>et al</i> , 2004; Brooks <i>et al</i> , 2003)
Ciclizina (CYC) Procloraperazina (PCZ)	Toxicidad sobre el crustáceo percebe. DL ₅₀ PCZ=93 µg/mL y DL ₅₀ CYC= 0.04 µg/mL	(Fun-Choong <i>et al</i> , 2006)
Diclofenaco	Se bioacumula en buitres y en trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).	(Oaks <i>et al</i> , 2004; Schwaiger <i>et al</i> , 2004 y Triebkorn <i>et al</i> , 2004)
Naproxeno	Toxicidad crónica desde 32 µg/L observados en bioensayos en algas del tipo <i>Selenastrum capricornutum</i> .	(Brun <i>et al</i> , 2006)
	Los resultados de los bioensayos realizados en las algas, rotíferos y microcrustáceos, mostraron que los fotoproductos son más tóxicos que los compuestos originales tanto para toxicidad aguda y crónica.	(Isidori <i>et al</i> , 2005)
	Tóxico para los hepatocitos de la trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) que habita principalmente en ríos.	(Gagné, Blaise y Andre, 2006)
	Tóxico en <i>Hydra attenuata</i> , a concentraciones desde 1 mg/L.	(Quinn, Gagné y Blaise, 2008)

3.1.3. Presencia de naproxeno en aguas residuales mexicanas

Dentro de los compuestos farmacéuticos más consumidos tanto en México como a nivel mundial (Figura 3), se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que son adquiridos sin receta médica como es el caso del naproxeno, lo que a su vez representa una mayor probabilidad de encontrarse en el agua (Siemens *et al*, 2008).

Por el momento la búsqueda de COE en nuestro país se ha realizado sólo en aguas de la Ciudad de México y su Zona Metropolitana, documentándose la presencia de antibióticos y AINE en función de reportes internacionales sin argumentar claramente el motivo de su identificación (Castillo-Alanís, 2009; Siemens *et al*, 2008; Gibson *et al*, 2007). En este sentido, es importante establecer una justificación, ya que las concentraciones en agua y el consumo de fármacos están en función de las problemáticas de salud que aquejan a cada población.

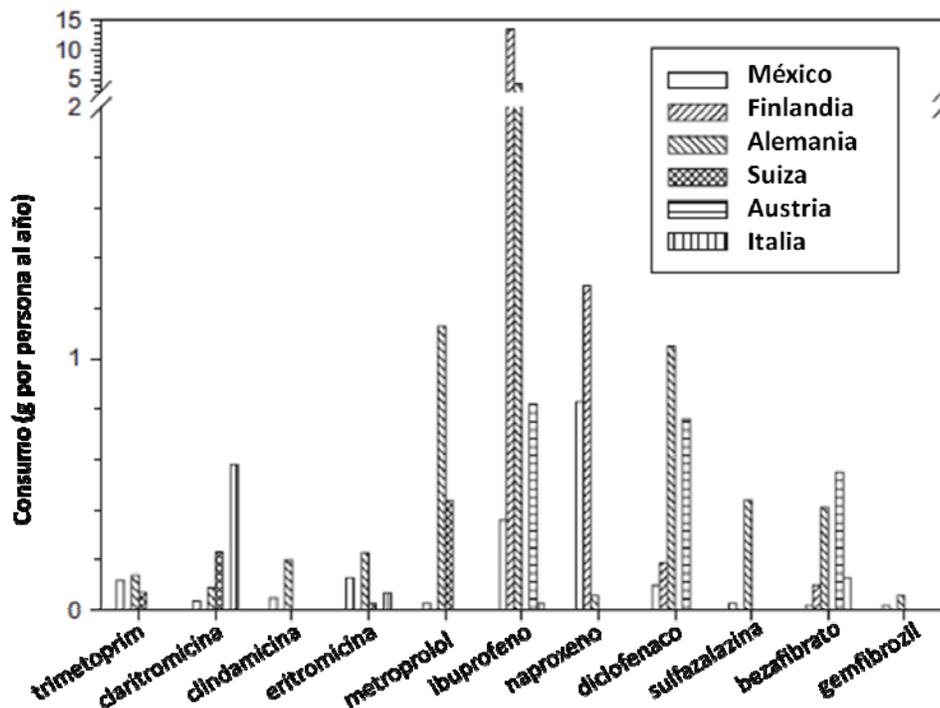


Figura 3. Comparación del consumo de fármacos en distintos países. Datos de 2004. Tomado y modificado de Siemens *et al* (2008).

Como se observa en la Tabla 3, hay grandes variaciones en las concentraciones de los fármacos que pueden ser debidas a que las regiones de toma de muestra y los métodos de detección fueron diferentes; sin embargo, los tres estudios concuerdan en que el naproxeno es el más concentrado.

Tabla 3. Presencia de fármacos en influentes de aguas residuales en México.

Fármaco	Gibson <i>et al</i> , 2007 (µg/L)	Siemens <i>et al</i> , 2008 (µg/L)	Castillo-Alanís, 2009 (µg/L)
Ácido salicílico	0,62 – 29,06	ND	ND
Trimetoprim	ND	0,11 – 0,32	ND
Claritromicina	ND	0,37 – 1,40	ND
Clindamicina	ND	0,07 – 0,12	ND
Clorofeno	ND	ND	0,07 – 5,04
Eritromicina	ND	<0,01 – 0,08	ND
Gemfibrozil	0,064 – 0,068	<0,01 - 0,22	ND
Metoprolol	ND	0,21 – 3,10	ND
Ibuprofeno	4,38 – 5,09	0,22 – 0,54	0,38 – 2,83
Naproxeno	15,22 – 16,65	2,84 – 6,74	3,45 – 54,36
Diclofenaco	1,72 – 6,36	0,25 - 0,55	ND
Sulfasalazina	ND	0,29 - 0,438	ND
Bezafibrato	ND	0,03 - 0,10	ND
Bisfenol A	0,77 – 2,50	ND	0,02 – 4,27

ND: No determinado

Detectar la presencia de los fármacos en aguas que han pasado por un tratamiento biológico, indica que hay una pobre eliminación de ellos. Esto es importante ya que en México gran parte de las aguas tratadas y residuales se destinan a riego de suelo agrícola donde pueden acumularse.

3.1.4. Usos del naproxeno

El naproxeno es empleado para efectos antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos en el tratamiento sintomático de la artritis reumatoide, osteoartritis, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, alivio del dolor post-operatorio, dolor posparto, dismenorrea primaria, dolor ortopédico, dolor de cabeza (incluyendo migraña) y dolor visceral asociado con el cáncer (AHFS, 2009).

Este fármaco se metaboliza en el hígado y entre los productos identificados se encuentran el O-desmetilnaproxeno en un 28% y el otro 70% está conformado por la suma de las formas glucuronidadas: glucurónido acilo (50,8%), isoglucurónido isomerizado conjugado (6,5%), glucurónido acilo O-desmetilnaproxeno (14,3%) e isoglucuronido (5,5%) como se muestra en la Figura 4.

La eliminación de los metabolitos es por la orina; sin embargo, éstos pueden acumularse en pacientes con insuficiencia renal y retardar su eliminación (AHFS, 2009; Vree *et al*, 1993). La concentración plasmática máxima (60- 100 µg/mL) se produce entre 1-4 horas tras la administración oral (AHFS, 2009) y en humanos la vida media del naproxeno es de 24,7 horas.

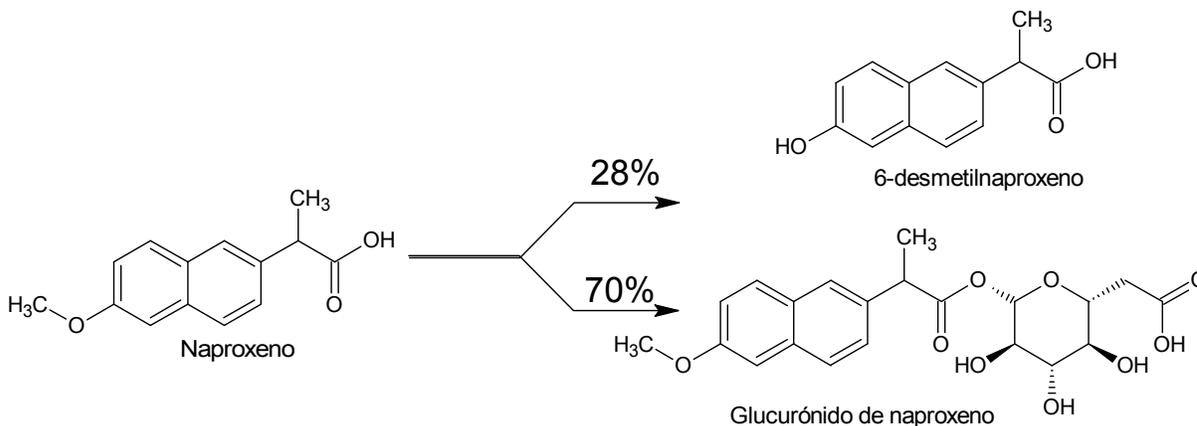


Figura 4. Metabolitos humanos de naproxeno (Aresta *et al*, 2006).

A diferencia de los humanos, en los que la excreción de naproxeno por vía heces es menor al 5% (AHFS, 2009), en perros, el fármaco se elimina principalmente a través de la bilis. La larga vida media del naproxeno en perros parece ser debido a su extensa recirculación enterohepática (Kahn,2005). Los datos de dosis letal media (DL₅₀) en algunos animales se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. DL₅₀ de naproxeno en otras especies.

Animal	DL ₅₀	Referencia
Ratón	IV 435 mg/kg	(Merck & Co., 2006)
	Oral 1234 mg/kg	(AHFS, 2009)
	IP 500 mg/kg	(Lewis, 2004)
Rata	Oral 534 mg/kg	(AHFS, 2009)
	IP 354 mg/kg	(Lewis, 2004)
Perros	Oral >1000 mg/kg	(AHFS, 2009)

IV= intravenosa

IP= intraperitoneal

A pesar de los beneficios aportados por el naproxeno a la salud, se pueden presentar efectos adversos sobre el sistema nervioso; aproximadamente entre el 3 y 9% de los pacientes presentan dolor de cabeza, somnolencia, mareos, incapacidad para concentrarse, depresión mental, nerviosismo, irritabilidad, fatiga, malestar, insomnio, trastornos del sueño e incluso se puede producir meningitis aséptica.

El uso a partir de la semana 30 de gestación debe evitarse, ya que se puede contraer el conducto arterioso en el útero o inhibir o prolongar el trabajo de parto como resultado de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. El fármaco puede ser detectado en la leche materna alrededor del 1% (Rumack y Hall, 2010; Stockton y Paller, 1990). En la Tabla 5, se detallan algunos casos reportados y se observa que la frecuencia de efectos adversos en el sistema nervioso de los niños parece ser similar a la de adultos (AHFS, 2009).

Tabla 5. Toxicidad de naproxeno en población humana.

DOSIS	COMPLICACIONES*	REFERENCIAS
ADULTOS		
Sobredosis	Efectos adversos gastrointestinales, convulsiones, somnolencia, prolongación del tiempo de coagulación, necrosis epidémica tóxica, eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, urticaria, alopecia, reacción pustulosa. Prolongado tiempo de protrombina. Inhibición de la síntesis de factores de coagulación dependientes de Vitamina K.	(AHFS, 2009; Waugh y Keatinge, 1983)
Dosis terapéutica	Hombre de 39 años desarrolló disnea y edema periorbitario, ronquera, dificultad respirar y tragar al realizar la primera toma del tratamiento (1125 mg), un año después se incrementó la dosis (1500 mg) y presentó los mismos síntomas iniciales. Tres mujeres de mediana edad presentaron hipersensibilidad, infiltrados pulmonares, debilidad, fatiga, tos, fiebre, eosinofilia en sangre y esputo. Insuficiencia renal aguda y nefritis intersticial. Disfunción eyaculatoria. Paciente de 71 años desarrolló pancitopenia severa después de su tratamiento durante ocho semanas. En el examen de médula ósea se observó hipocelularidad que sugiere anemia aplásica.	(AHFS, 2009; Buscaglia, Cowden y Brill, 1984; Briscoe-Dwyer y Etzel, 1994) (AHFS, 2009; Sanal & Gur-Lavi, 1992)
NIÑOS		
Sobredosis	Erupción, prolongación del tiempo de sangrado, necrosis epidémica tóxica, eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, urticaria, alopecia, eritema nudoso, reacción pustulosa. En un estudio doble ciego 12% de los pacientes con artritis reumatoide juvenil presentaron pseudoporfiria.	(AHFS, 2009)
Ingesta ≥ 4 semanas	Niño de 12 años presenta cicatrices en zonas expuestas a la luz después de la terapia a largo plazo para la artritis reumatoide. Pseudoporfiria se reporta en 10-20% de los tratados con naproxeno durante más de 4 semanas. Se sugiere formación de metabolitos fototóxicos en un subgrupo de individuos genéticamente predisuestos.	(Maerker <i>et al</i> , 2001; Ray, Rigolizzo <i>et al</i> , 1988)
Dosis terapéutica	Niña de 15 años de edad presenta grave acidosis metabólica y convulsiones. Seis niños tratados para artritis crónica juvenil presentan protoporfiria eritropoyética o porfiria cutánea tardía	(Allen, Rogers y Humphrey, 1991; Martínez, Smith y Frankel, 1989)
BEBÉS		
Sobredosis	Recién nacido presenta severa retención de agua e hiponatremia asociada con ingesta de naproxeno por la madre 8 h previo al nacimiento. Recién nacido de 3 790 g desarrolló hipertensión pulmonar persistente después del nacimiento con un conducto cerrado arterioso ya que la madre tomó naproxeno inmediatamente antes del parto.	(Talati, Salim y Korones, 2000; Alun-Jones y Williams, 1986)

* Los síntomas desaparecieron al suspender la administración del fármaco.

3.2. Antecedentes de la degradación de COE

El conocimiento sobre el comportamiento de los COE permite caracterizar su forma de eliminación, sin embargo, esta caracterización se ha visto afectada por una amplia variación en las eficiencias de remoción, lo que es adjudicado a la clase de fármaco, su concentración en el influente, el proceso de tratamiento, el tiempo de residencia hidráulica, la técnica para analizar el compuesto y el lugar de donde se obtuvo el inóculo de bacterias (Matamoros, Arias, Brix y Bayona, 2009; Onesios, Yu y Bouwer, 2008). Cabe mencionar que la desaparición del compuesto en análisis del efluente en un sistema es lo que se conoce como remoción y no necesariamente es sinónimo de que haya una completa degradación.

Por el momento se sabe que diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales pueden eliminar los compuestos farmacéuticos presentes, pero se sabe muy poco sobre los mecanismos involucrados ya que sólo el monitoreo de los metabolitos y de los productos finales de la mineralización puede aportar la información acerca del grado de biotransformación (Onesios *et al*, 2008). Pese a dicha restricción para poder entender la vía por la cual se eliminan los COE, se pueden hacer algunas aseveraciones al respecto teniendo en cuenta los conocimientos sobre la biodegradación de compuestos químicamente similares más estudiados.

Una sustancia en el ambiente puede sufrir transformaciones por procesos abióticos y biológicos que dependerán de la estructura química, propiedades físicas de la molécula *per sé* y su interacción en el ambiente en el que se encuentra (Onesios *et al*, 2008); en el caso de la transformación biológica, se le llama biodegradación a la eliminación de un compuesto orgánico en un ecosistema por la actividad metabólica de las diferentes especies presentes

en el sistema, esperando que sean transformados a bióxido de carbono y agua lo que se conoce como mineralización (Figura 5).

Al respecto de los fármacos, se sabe que su baja volatilidad indica que la distribución en el ambiente ocurrirá primariamente por transporte acuoso, a través de la cadena alimenticia así como también puede ser adsorbido en sólidos suspendidos si es lipofílico hasta alcanzar el ambiente terrestre cuando los lodos sean utilizados como fertilizantes en la agricultura (Nikolaou *et al*, 2007).

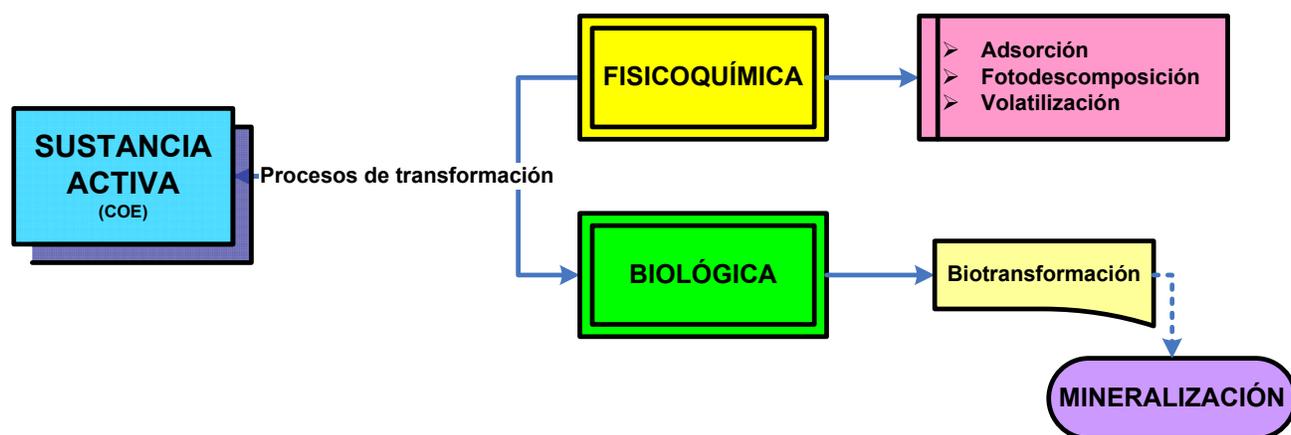


Figura 5. Procesos de transformación y destino de los fármacos. Tomado y modificado de Onesios *et al*, 2008.

Los fármacos ácidos, por ejemplo ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco e indometacina, con valores de pKa de 4,1 - 4,9, se encuentran ionizados a un pH neutro, y por tanto no son fácilmente adsorbidos permaneciendo en fase acuosa (Nikolaou *et al*, 2007).

La biodegradación tanto aerobia como anaerobia ya sea por tratamiento con lodos activados, biorreactores de membrana, reactores secuenciales de alimentación por lote, columnas de arena y humedales artificiales; ha sido reportada como el proceso más importante para la remoción de productos farmacéuticos en fase acuosa, la cantidad removida incrementa con el tiempo de residencia hidráulica y con la edad del inóculo de lodos activados (Nikolaou *et al*,

2007); por otro lado la transformación abiótica de productos farmacéuticos en aguas superficiales o aguas residuales ocurren principalmente por fotólisis; ya que la mayoría de los compuestos farmacéuticos, incluido el naproxeno, son resistentes a la hidrólisis (Lyman, 1985).

Por otro lado, además de los procesos fisicoquímicos y la biodegradación, también se ha reportado la participación de plantas vasculares en la remoción de varios COE mediante humedales artificiales (Park *et al*, 2009).

3.2.1. Aspectos generales sobre la biodegradabilidad aerobia rápida

De acuerdo con la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, 1992), la biodegradabilidad es “la capacidad intrínseca de una sustancia a ser transformada en una estructura química más simple por el proceso conocido como biodegradación”, en el cual los microorganismos utilizan los compuestos orgánicos para generar productos menos tóxicos que los compuestos originales, en la mayoría y en el mejor de los casos. La biodegradación puede ser “primaria” y conducir a simples alteraciones estructurales del compuesto, o bien implicar su conversión a productos inorgánicos de bajo peso molecular y constituyentes celulares, en cuyo caso se denomina biodegradación última o mineralización que resulta en una degradación secuencial por un consorcio de microorganismos e involucra acciones de sinergismo y cometabolismo (Olguín, Sánchez y Hernández, 2000). Cuando la biodegradación se lleva a cabo bajo condiciones aerobias y expresada en términos de una reacción química es la siguiente:



Para la evaluación de la biodegradabilidad, se han diseñado una serie de pruebas normalizadas que garanticen resultados confiables independientemente del laboratorio en el que sean obtenidos.

La biodegradabilidad de una sustancia se determina utilizando tres niveles sucesivos de ensayo: las pruebas de biodegradabilidad inmediata, de biodegradabilidad intrínseca y de simulación (OCDE, 1992). Para evaluarla se puede medir:

- Desaparición del compuesto de prueba medido como COD (carbono orgánico disuelto).
- Actividad metabólica bacteriana medida como DBO (demanda bioquímica de oxígeno) o DQO (demanda química de oxígeno).
- Producción de CO₂ o consumo de O₂.

En dichos niveles de ensayo, inicialmente se realizan las pruebas de biodegradabilidad inmediata, con la finalidad de clasificar a las moléculas en la categoría *fácilmente biodegradable*, en ellas un resultado positivo indicará la biodegradabilidad de la sustancia en la mayoría de los medios naturales y de los sistemas de tratamiento; por otro lado, un resultado negativo, conduce a realizar una prueba intrínseca.

Las pruebas intrínsecas utilizan condiciones experimentales más favorables a la degradación, por lo que un resultado positivo implica que la sustancia es *intrínsecamente biodegradable* bajo las condiciones empleadas. Por otra parte, un resultado negativo indica la persistencia ambiental de la sustancia.

Si en una prueba intrínseca, la sustancia mostró una poca biodegradabilidad, se llevan a cabo pruebas de *simulación*, cuyo objetivo es estudiar su comportamiento en condiciones naturales. Si el resultado de la prueba de simulación pertinente es a su vez negativo, se

presume que la sustancia persiste en el ambiente y que debe ser sujeta a restricciones para su producción y comercialización.

En el programa de evaluación de productos químicos de la OCDE, se han descrito seis métodos que permiten la estimación de la biodegradabilidad rápida de sustancias en un medio acuoso aerobio (serie 301), sin embargo preferir un método en particular depende de las características de la sustancia de prueba (Tabla 6). Este tipo de pruebas cuya duración es aproximadamente 28 días, tienen como característica que restringen al máximo las posibilidades de que la biodegradabilidad suceda, además es un ensayo inespecífico a los compuestos químicos y para realizarla se debe considerar lo siguiente: condiciones aerobias estáticas, cantidad reducida de biomasa en un medio mineral, pH neutro y temperatura 20-25 °C.

Tabla 6. Condiciones para elegir el tipo de prueba de biodegradabilidad aerobia rápida (OCDE, 1992).

Prueba		301 A	301 B	301 F	301 E	301 D	301 C
Concentraciones de sustancia de prueba							
mg/L		-----	-----	100	-----	2-10	100
mg COD/L		10-40	10-20	-----	10-40	-----	-----
mg DTO/L		-----	-----	50-100	-----	-----	-----
Concentraciones de inóculo							
SST [mg/L]		≤ 30			-----	-----	30
mL efluente/L		≤ 100			0,5	≤ 5	-----
≈UFC/mL		10 ³ -10 ⁴			10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁶	10 ⁷ -10 ⁸
pH		7,4 ± 0,2					7
Temperatura [°C]		22 ± 2					25 ± 1
Método analítico		COD	Respirometría CO ₂ producido	Respirometría consumo O ₂	COD	Respirometría O ₂ disuelto	Respirometría consumo O ₂
Apropiado para compuestos	Poco solubles	-	+	+	-	±	+
	Volátiles	-	-	±	-	+	±
	Adsorbibles	±	+	+	±	+	+

Algunas de las condiciones más importantes para aplicar un método de biodegradabilidad rápida es que la población microbiana inóculo no debe haber estado expuesta previamente al compuesto de prueba y que se añade una concentración definida de la sustancia de estudio como única fuente de carbono y energía.

El nivel límite de biodegradación exigido por estas pruebas es una disminución del 70% cuando se monitorea el COD, y del 60% de la demanda teórica de O₂ (DTO) o de la producción teórica de CO₂ (PTCO₂) cuando se trata de pruebas respirométricas, valores que deben alcanzarse en un período de 28 días. DTO y PTCO₂ se calculan a partir de la estructura química de la molécula considerando una biodegradación total de la misma (OCDE, 1992).

3.2.2. Estudios de degradación de naproxeno

El naproxeno se puede distribuir en el medio ambiente a través de diversas cadenas de residuos encontrándose en la mayoría de los casos como un anión; por tanto debido a su forma ionizada y dado que su valor de presión de vapor es de 1.89×10^{-6} mmHg a 25 °C (EPA EE.UU., 2009; Doucette, 2000), la volatilización no se presenta en aguas superficiales, ni en suelo (húmedo o seco).

En el caso de que el fármaco no ionizado sea liberado al aire por la fabricación o descomposición, puede hallarse en partículas atmosféricas que son removidas por deposición húmeda o seca (Meylan y Philip, 1993). Cuando se encuentra en fase vapor se degrada en la atmósfera por reacciones con radicales hidroxilo producidos fotoquímicamente; la susceptibilidad del naproxeno por fotólisis directa con la luz solar o indirecta con fotosensibilizadores como los nitratos, es debida a que contiene cromóforos que absorben a

longitudes de onda superiores a los 290 nm (Seeber y Hoa, 2010; EPA EE.UU., 2009; Bidleman, 1988; Lyman, 1985). Este tipo de reacciones también se han reportado en aguas superficiales concluyendo que la fototransformación es la ruta principal en la degradación abiótica (Andreozzi, Raffaele y Nicklas, 2003; Tixier, Singer, Oellers y Müller, 2003).

En cuanto a la degradación biológica del fármaco, en la Tabla 7 se muestran algunos reportes de estudios previos, no obstante el naproxeno ha sido considerado como un compuesto que no es fácilmente biodegradable ya que su porcentaje de remoción en una PTAR es del 0,14% (Jones, Voulvoulis y Lester, 2002; Richardson, 1985).

Tabla 7. Antecedentes de degradación biológica de naproxeno.

Descripción	Observaciones	Metabolitos	Organismos
Catálisis de la biotransformación de naproxeno.	El naproxeno se metabolizó por completo a las 36 h.	O-desmetil-naproxeno, 7-hidroxi-naproxeno, 7-hidroxi-O-desmetil-naproxeno.	<i>Aspergillus niger</i>
Goteo de aguas residuales a través de columnas de arena.	La eliminación de naproxeno por adsorción/biodegradación fue completa.	NR	NR
Aislamiento e identificación de metabolitos de naproxeno.	La transformación de naproxeno tiene similitudes con el metabolismo de naproxeno en mamíferos.	Desmetil-naproxeno, desmetil-naproxeno-6-O-sulfato.	<i>Cunninghamella sp</i>
Pruebas de degradación en lote con lodos activados como inóculo.	El naproxeno se degradó por cometabolismo.	Formación de O-desmetil-naproxeno.	Inóculo de lodos activados.

NR= No reportado

3.3. Procesos de inducción de la biodegradación de COE

3.3.1. Cometabolismo

Un aspecto importante que debe considerarse en los ensayos normalizados para la evaluación de la biodegradabilidad, es el uso de la sustancia de prueba como única fuente de carbono; sin embargo, esto conduce a una subestimación de su potencial de degradación ya que existen sustancias que por ellas mismas no pueden servir como única fuente de carbono pero pueden ser degradadas por una comunidad microbiana compleja en presencia de otros sustratos.

El cometabolismo es un proceso en el que un compuesto es degradado por un organismo sin obtener necesariamente energía o sustratos para el crecimiento. El fundamento de este fenómeno consiste en que enzimas del inicio de una ruta metabólica (por ejemplo las oxigenasas implicadas en el metabolismo aerobio de los hidrocarburos) pueden no tener una especificidad demasiado estricta, es decir, la misma enzima puede degradar distintos compuestos. De este modo se iniciaría la degradación de un compuesto que no sustenta el crecimiento del microorganismo en cuestión (Castillo-Rodríguez, Roldán-Ruíz y Blasco-Plá, 2005).

Los anillos aromáticos, especialmente los de tipo polinuclear condensado, como los hidrocarburos aromático policíclico (HAP) se degradan más lentamente que los alcanos, algunos con mucha dificultad y algunos en absoluto. Los efectos biológicos de los HAP están relacionados con su tamaño y estructura, que condicionan sus propiedades físicas y químicas y, por tanto su distribución en la naturaleza. Los HAP de alto peso molecular son relativamente inmóviles, de baja volatilidad y solubilidad en agua.

El naproxeno es derivado del naftaleno, que a su vez es el HAP más sencillo para ser biodegradado. De acuerdo con algunos autores (Quintana, Weiss y Reemtsma, 2005; Bouchez, Blanchet y Vandecasteele, 1995; Horvath, 1972), la biodegradación de los HAP o mezclas de ellos, generalmente es mediante cometabolismo, donde se considera que para la degradación del compuesto se requiere un co-sustrato que sea empleado como fuente de carbono y energía para mantener el incremento de biomasa, y que éste a su vez podría estimular la síntesis de enzimas necesarias para la degradación del compuesto en cuestión (Quintana *et al*, 2005; Jones *et al*, 2002; Richardson, 1985).

Quintana *et al*, (2005) reportó cometabolismo por co-sustrato cuando en un sistema con inóculo de lodos activados, el naproxeno no pudo ser utilizado como única fuente de carbono; sin embargo, al adicionar leche en polvo a una concentración de 50 mg/L, y disminuir el naproxeno a 5 mg/L, observó disminución del 60% de naproxeno en el medio acuoso después de un tratamiento de 30 días (Figura 6).

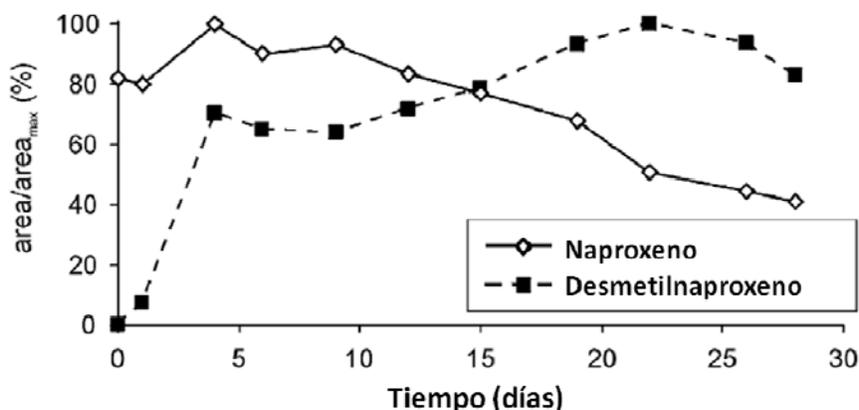


Figura 6. Degradación de naproxeno y formación de desmetilnaproxeno en presencia de leche como co-sustrato. Tomado y modificado de Quintana *et al*, 2005.

En la Figura 7, se puede observar cómo el naftaleno, estructura base del naproxeno, puede ser integrado dentro de las rutas degradativas de algunos microorganismos o conjunto de varios de ellos.

Biodegradación inducida de naproxeno bajo condiciones controladas de laboratorio

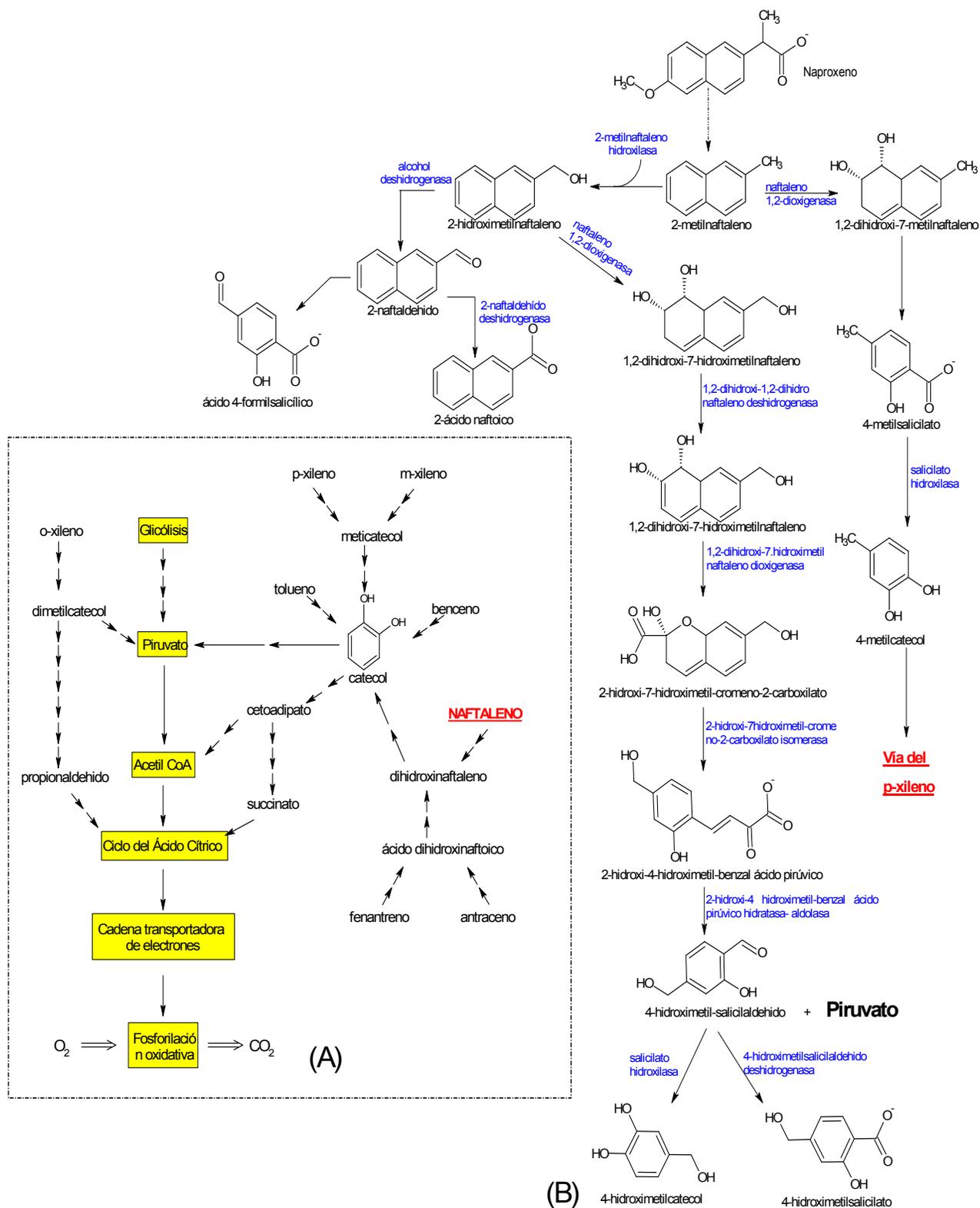


Figura 7. (A) Integración de las vías metabólicas de algunos contaminantes. (B) Vía degradativa de naproxeno a partir de metabolito 2-metilnaftaleno (Olguín et al, 2000).

3.3.2. Bioaumentación

Las prácticas de biorremediación consisten en el uso de organismos como plantas, hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente para neutralizar sustancias transformándolas en menos tóxicas o convirtiéndolas en inocuas para el ambiente y la salud humana.

La biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que afecte la degradación del xenobiótico. Cuando se emplean microorganismos como las bacterias se denomina bioaumentación, la cual fortalece la biomasa de una PTAR inoculando microorganismos aislados y adaptados selectivamente para degradar compuestos específicos. Esta técnica en conjunto con los recursos convencionales, surge debido a que la calidad de la biomasa y los microorganismos como bacterias y protozoos en distintas PTAR así como tratamientos industriales, pueden ser afectados negativamente por bajas temperaturas, sustancias tóxicas, altas cargas orgánicas o la sucesión de gran diversidad de contaminantes.

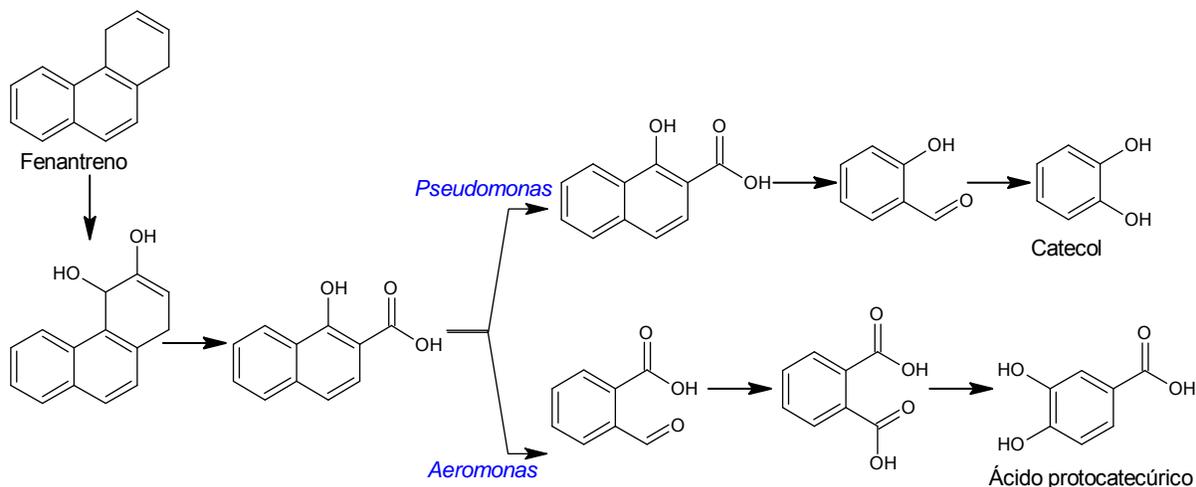


Figura 8. Mecanismo de degradación bacteriana de fenantreno (Olguín *et al*, 2000).

Se ha reportado, que algunas bacterias pueden degradar el naftaleno formando productos metabólicos que pueden ser ingresados en la vía metabólica de otros microorganismos

(Figura 8), entre ellas se encuentran: *Acidovorax* sp, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes denitrificans*, *Bordetella* sp, *Sphingomonas* sp, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp (Onesios *et al*, 2008); estas últimas son ubicuas y productoras de biosurfactantes extracelulares que solubilizan y facilitan la penetración de los hidrocarburos a través de su pared celular hidrofílica; contienen además enzimas degradadoras de hidrocarburos en la membrana citoplasmática como los ramnolípidos involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados (Benavides-López, Quintero y Guevara, 2006).

4. METODOLOGÍA

4.1. Estrategia de trabajo

En la Figura 9, se indica de modo general la metodología llevada a cabo para evaluar la biodegradación del naproxeno tanto por un método estandarizado, así como su inducción bajo condiciones controladas.

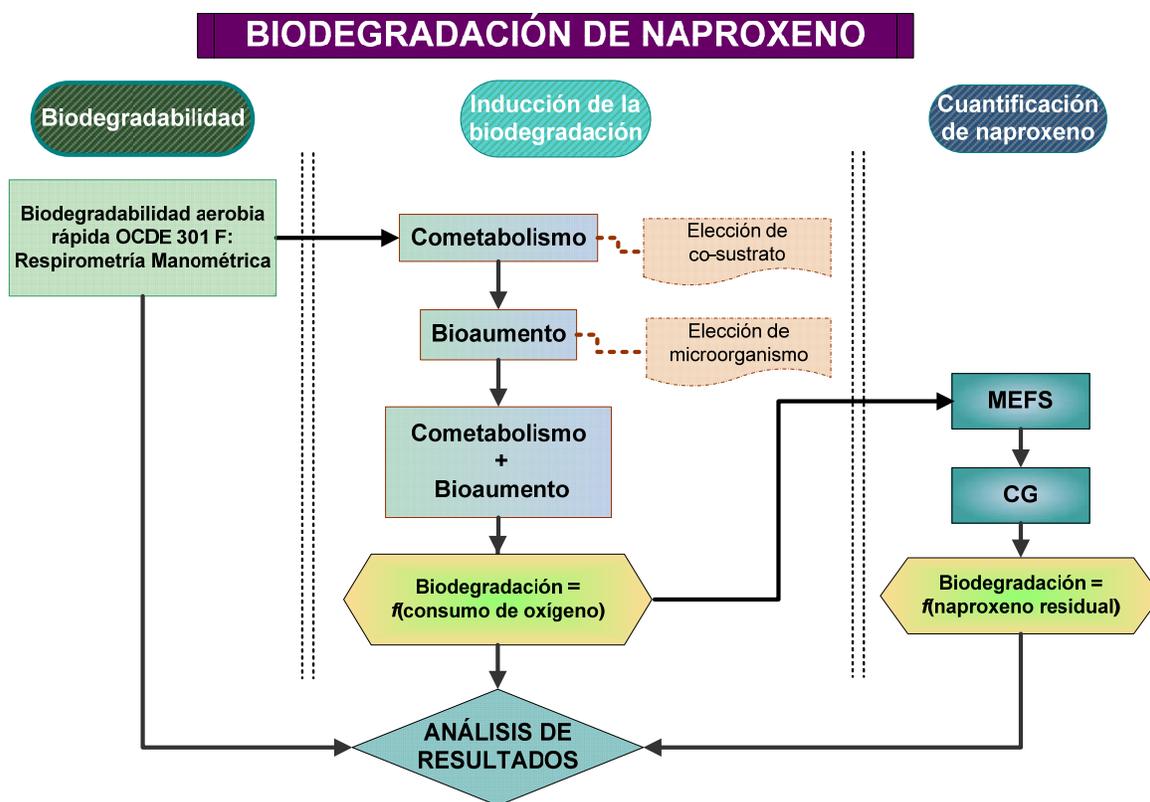


Figura 9. Diagrama de Trabajo.

Se realizaron ensayos para inducir la biodegradación de naproxeno modificando dos variables del procedimiento de biodegradabilidad aerobia rápida 301 F de la OCDE:

1. Calidad de inóculo microbiano usando la técnica de bioaumentación.
2. Concentración y tipo de fuente de carbono, adicionando un co-sustrato para promover el cometabolismo.

Los factores de inducción fueron denominados como variables independientes y como variable dependiente la remoción de naproxeno [5mg/L], que fue determinada en función del consumo de oxígeno así como de la cuantificación directa del fármaco.

El diseño experimental estuvo conformado de seis arreglos por duplicado con sus respectivos controles (Tabla 8), distribuidos en tres bloques bajo las mismas condiciones de medio de cultivo mineral, dosificación de oxígeno, velocidad de agitación y temperatura durante el periodo de ensayo. Las variables no controlables como concentración de microorganismos al inicio y al final de cada prueba se monitorearon con la finalidad de analizar posibles interferencias en la evaluación de la biodegradación de naproxeno.

Tabla 8. Tratamientos dados en los biorreactores para inducir la biodegradación.

			Bloque I		Bloque II		Bloque III	
			T1	T2	T3	T4	T5	T6
VARIABLE	Inóculo	Lodos activados	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí
		<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
	Fuente de carbono	Benzoato de sodio [720,5 mg/L]	No	Sí	No	Sí	No	Sí
		Naproxeno [5 mg/L]	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

T= Tratamiento

El análisis estadístico se realizó con varianza de una vía ($p=0,05$) seguido de comparaciones múltiples de Tukey en el programa estadístico SPSS 15 usando las siguientes hipótesis:

H_A : El sistema con los dos factores de inducción: co-sustrato y bioaumentación (T6), sería más eficiente en la remoción de naproxeno que los arreglos con una sola variable (T1-T5).

H_0 : No habría diferencia significativa entre los tratamientos (T1-T6).

4.2. Equipo y material de laboratorio

- Respirómetro *AER-200* con su aplicación *AER-ANR (AER-8U) Versión 1.02* de *Challenge Technology¹ Environmental Systems, Inc.*
- Cromatógrafo de gases *SRI 8610C* con detector FID y software *Peak Simple For Windows*.
- Recirculador de agua con control de temperatura *Polyscience 5005*.
- Centrífuga *5424 eppendorf* para realizar procedimientos de concentración de biomasa.
- Espectrofotómetro *Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 UV/Vis* para ajuste de inóculo por densidad óptica.
- Balanza analítica *Mettler*, modelo *H31AR* con capacidad máxima de 160 g y resolución de 0,1 mg.
- Balanza granataria *Sartorius*, modelo *BL 150* con capacidad máxima de 150 g y resolución de 0,01g.
- Multiparámetros *Electron Corporation. Orion Star* con electrodos para medir O₂ disuelto y pH.
- Agitador magnético *Thermolyne Cimarec 2*.
- Agitador magnético con control de velocidad de 1200 rpm.
- *Vortex Genie 2 Scientific Industries*
- Ultracongelador *Sanyo Ultra-low Temperature MDF-U32V* para conservar las cepas de los microorganismos empleados.

¹ Es un equipo que mide la “respiración” de los organismos vivos; el *AER-200 Challenge Technology* es de tipo “*headspace*”, que está diseñado para contener una muestra líquida y un espacio libre gaseoso en un sistema cerrado al que se incorpora O₂ para mantener constante su concentración en el medio. La forma en que se obtienen datos es mediante el consumo de O₂.

- Material de vidrio Pyrex: matraces volumétricos de 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 mL; matraces Érlenmeyer de 50, 150, 300, 500, 1000 y 2000 mL; embudos gravimétricos de vidrio estriados de tallo corto; pipetas volumétricas de 1, 5, 9 y 10 mL; pipetas graduadas de 10 y 25 mL; vasos de precipitados de 50, 100 y 250 mL; pipetas Pasteur; matraz Kitazato de 500 mL; viales de vidrio (12 mL de capacidad) con tapón horadado de polipropileno y septa de teflón.
- Vial de vidrio ámbar de 4 mL de capacidad con tapón horadado de polipropileno y septa de teflón.
- Barras magnéticas recubiertas de teflón de 10 mm x 3 mm y 50 mm x 8mm.

Gases empleados.

- **Respirometría.** El oxígeno suministrado al respirómetro AER-200 *Challenge Technology*, fue oxígeno extra seco UN 1072 de INFRA.
- **Cromatografía.** Los gases empleados para el empleo del detector de ionización por flama (FID) del proveedor INFRA fueron: *Hidrógeno cromatográfico* (99,998% mín) UN 1049 y *Aire comprimido* extra seco UN 1002.

Como gas acarreador se empleó *Nitrógeno cromatográfico* (99,998% mín) UN 1066.

4.3. Ensayos previos

4.3.1. Solución estándar de naproxeno

Se preparó una solución estándar de naproxeno ($C_{14}H_{14}O_3$, Sigma-Aldrich) en metanol (CH_3OH , JTBaker) a una concentración de 43,1 mg/mL (C. V. = $\pm 0,2\%$) y se conservó a 4 °C hasta su uso en un vial protegido de la luz.

La solución estándar fue valorada por titulación directa como se indica en la FEUM (CPFEUM, 2004), por quintuplicado, con solución de NaOH 1,7 mM preparada a partir de una solución de NaOH 0,8527 N; la estandarización de ésta se realizó con biftalato de potasio y se empleó fenolftaleína como indicador.

4.3.2. Inóculo proveniente de lodos activados en los biorreactores

Todas las muestras de lodos activados fueron obtenidas del tanque de aireación de la PTAR Chapultepec ubicada en la esquina de lateral del Periférico con Ferrocarril de Cuernavaca, Lomas de Chapultepec. Delegación Miguel Hidalgo.

El ajuste del volumen de inóculo adicionado a los biorreactores, se realizó del siguiente modo:

Para la *evaluación de la biodegradabilidad*, el volumen de inóculo empleado se tomó de acuerdo con el método recomendado por la OCDE para la determinación de sólidos suspendidos totales (SST) hasta ajustar una concentración en el intervalo de 30 a 50 mg SST/L en cada reactor (anexo 9.1).

En los ensayos de *inducción de la biodegradación*, el inóculo se tomó en función de la viabilidad celular de bacterias mesófilas aerobias totales por el método de gota o de Miles-

Misra (Ramírez-Gama *et al*, 2006), en placas de agar nutritivo. Aunque se sabía que no todos los microorganismos presentes en la muestra eran cultivables y además dan poca información acerca de las bacterias degradadoras específicas, se consideró que es una medida más representativa de la cantidad de microorganismos presentes en la muestra.

El método para la toma del inóculo a partir de lodos activados se seleccionó luego de comparar la viabilidad celular a partir del sobrenadante (SN) como recomienda Vázquez-Rodríguez, Garabétian y Rols (2007), respecto a una mezcla de lodos (MIX)

El motivo del cambio respecto al método empleado para evaluar la biodegradabilidad fue porque los SST no podrían ser suficientemente representativos de los microorganismos vivos presentes en la muestra, ya que no hay modo de diferenciarlos de elementos orgánicos, microorganismos muertos, partículas minerales y compuestos recalcitrantes presentes.

El método seleccionado para la obtención del inóculo fue el MIX realizado como se indica a continuación:

1. Colectar una muestra matutina de aproximadamente 1L de lodos activados.
2. Mantener los lodos en aireación y agitación moderada durante 4 horas.
3. Medir pH y si es necesario ajustar a la neutralidad con solución de H₂SO₄ 0,1 M.
4. Dejar sedimentar los lodos media hora.
5. Descartar el sobrenadante y adicionar medio mineral OCDE manteniendo el volumen 1:1 con respecto al sedimento de lodos.
6. Mantener en agitación hasta su uso.

El procedimiento realizado para la obtención del inóculo a partir del sobrenadante (SN) se describe en el anexo 9.2.

4.3.3. Validación del sistema respirométrico

Los ensayos de biodegradación se evaluaron respirométricamente por consumo de oxígeno y previo a cada experimento se verificó la repetibilidad de las celdas con el procedimiento descrito en el anexo 9.6.

Para validar el funcionamiento y evaluar la precisión del equipo, en cada biorreactor se realizó una curva de crecimiento de lodos activados alimentados con una mezcla de 150 mg/L de glucosa + 150 mg/L de ácido glutámico en medio mineral (Young y Cowan, 2004; APHA, AWWA y WPCF, 1998).

4.4. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia rápida del naproxeno usando el procedimiento OCDE 301-F

Se seleccionó el procedimiento normalizado OCDE 301-F: respirometría manométrica para evaluar la biodegradabilidad del naproxeno de acuerdo con las condiciones señaladas en la Tabla 6 (pág. 21), asimismo se consideraron los siguientes aspectos:

- Es una prueba adecuada para compuestos poco solubles en agua como el naproxeno (15,9 mg/L a 20 °C).
- No se manipulan las muestras durante el ensayo respirométrico, pues el equipo registra instantáneamente el consumo de oxígeno sin tener que abrir el biorreactor de modo que se puede observar el momento en que se inicia la biodegradación del naproxeno.
- Como la solución estándar del fármaco se encontraba disuelta en metanol, llevando consigo DTO propia del disolvente, en los reactores que no tenían naproxeno se colocó la cantidad de solvente equivalente al volumen de la solución estándar.

- Si bien, la sustancia de referencia sólo se utiliza para validar que el sistema está funcionando correctamente, se decidió utilizar el benzoato de sodio ($C_7H_5O_2Na$, JTBaker) ya que es estructuralmente semejante al naproxeno en cuanto a que ambas sustancias son de naturaleza aromática.

Se monitoreó durante 28 días respirométricamente el consumo de oxígeno en ocho biorreactores que se mantuvieron bajo condiciones constantes: pH neutro, temperatura 22 ± 1 °C y velocidad de agitación a 600 rpm.

Se colocaron 400 mL en cada biorreactor del medio mineral indicado por la OCDE (Tabla 25, anexo 9.5), se midió el oxígeno disuelto para asegurar condiciones aerobias en el medio de biorreacción verificando que fuera de 7 mg/L ya que es la máxima concentración que se puede tener en la Ciudad de México a temperatura ambiente, 585 mmHg de presión atmosférica y 2240 metros sobre el nivel del mar (Ambriz-Rivas, 1998).

Se agregó de cada compuesto a evaluar, la cantidad equivalente a 100 mg DTO/L (anexo 9.3) agitando hasta obtener una mezcla homogénea, se adicionó el volumen adecuado de inóculo de lodos activados obtenidos del tanque de aireación de la PTAR para tener una concentración final de 30-50 mg SST/L y finalmente se llevó a volumen de 500 mL. Los reactores se mantuvieron a temperatura y agitación constante (22 ± 1 y 600 rpm) respectivamente, su contenido se muestra en la Tabla 9 y el protocolo a detalle se describe en el anexo 9.5.

El volumen adicionado de la solución estándar de naproxeno a la mezcla de biorreacción fue de 0,5 mL para obtener 95,7 mg DTO/L. La equivalencia de naproxeno en DTO se calculó sin considerar la nitrificación debido a que por el método respirométrico el consumo de oxígeno

relacionado con dicho proceso es despreciable y porque la sustancia en estudio no contiene átomos de nitrógeno.

Tabla 9. Composición de los biorreactores para evaluar la biodegradabilidad aerobia rápida de naproxeno.

Reactor	Nombre	Contenido*
<i>MP₁</i> y <i>MP₂</i>	Prueba	Inóculo + solución estándar de naproxeno [100 mg DTO/L]
<i>MCN₁</i> y <i>MCN₂</i>	Blanco	Inóculo + metanol
<i>MR₁</i> y <i>MR₂</i>	Referencia de procedimiento	Inóculo + metanol + benzoato de sodio [100 mg DTO/L]
<i>MT</i>	Toxicidad	Solución estándar de naproxeno [100 mg DTO/L] + benzoato de sodio [100 mg DTO/L]
<i>MA</i>	Degradación abiótica	Solución estándar de naproxeno [100 mg DTO/L] + HgCl ₂

*A cada biorreactor se le adicionó medio mineral en cantidad suficiente para obtener 500 mL.

4.5. Inducción de la biodegradación de naproxeno

Como se mencionó en la sección 3.2.1, la OCDE señala que la biodegradabilidad de una sustancia es determinada en tres niveles sucesivos de ensayo, indicando que si una sustancia no es fácilmente biodegradable se debe evaluar su biodegradabilidad intrínseca (OCDE, 1992); sin embargo se decidió inducir la biodegradación modificando el procedimiento OCDE 301 F, por las siguientes razones que lejos de aumentar el potencial de biodegradación del inóculo, pueden producir más resultados negativos que otras pruebas con igual concentración de biomasa (Vázquez-Rodríguez y Beltrán, 2004).

- a. Las pruebas de biodegradabilidad intrínseca generalmente requieren largos tiempos de ensayo (hasta por 6 meses).

- b. Se debe tener contacto continuo con nuevo efluente que funge a la vez como inóculo y una fuente alterna de carbono.
- c. Para dichas pruebas se emplean concentraciones elevadas de la sustancia a evaluar que pueden ser tóxicas para los microorganismos y ya no serían representativas de lo reportado en aguas residuales, tratadas y/o superficiales.

De acuerdo a referencias bibliográficas, el naproxeno no es fácilmente biodegradable, por tanto, y con base en los resultados de la evaluación de la biodegradabilidad, se realizaron ensayos de inducción de la biodegradación, mediante el procedimiento OCDE 301 F: *Respirometría Manométrica* modificando algunas de las condiciones (Tabla 10).

Tabla 10. Variables modificadas para inducir la biodegradación aerobia de naproxeno.

VARIABLE	OCDE	INDUCCIÓN
pH	Neutro	
Temperatura	22 °C	
Medio mineral	500 mL	
Velocidad de agitación [rpm]	600	
Concentración sustancia referencia	100 mg DTO/L [60,2mg/L]	5 mM
Concentración sustancia de prueba	100 mg DTO/L [45,0 mg/L]	5 mg/L
Inóculo	Lodos activados	Lodos activados
		<i>Pseudomonas</i> sp.
		Lodos activados + <i>Pseudomonas</i> sp.

Se estableció una concentración más baja de la sustancia de prueba que la empleada en la evaluación de la biodegradabilidad considerando para ello, los valores máximos de cuantificación cromatográfica del compuesto derivatizado por la técnica MEFS y que a su vez pudiera ser detectable por el respirómetro que registra un consumo mínimo de

aproximadamente 0,060 mg O₂, por tanto, el volumen adicionado de la solución estándar fue de 60 µL para obtener la concentración de 5 mg/L en el medio de biorreacción, lo cual es equivalente a 11,5 mg DTO/L.

La actividad microbiana se monitoreó mediante consumo de oxígeno respirométricamente y por el método de cuenta de Miles-Misra (Ramírez-Gama *et al*, 2006) en agar nutritivo al inicio y al final de cada uno de los ensayos.

La degradación del fármaco se determinó por cuantificación del mismo al inicio y al final de cada tratamiento de inducción por el método de MEFS-CG (sección 4.5.7).

4.5.1. Selección del co-sustrato para la evaluación del cometabolismo

Se ha reportado que el naproxeno puede ser metabolizado en un 60% en presencia de leche como co-sustrato (Quintana *et al*, 2005); sin embargo, en dicho estudio no se justificó su elección, por ello en la presente tesis primero se realizó la elección del co-sustrato para evaluar si su adición influye en la degradación del fármaco.

Durante cinco días se monitoreó, por duplicado, el consumo de oxígeno por un inóculo de lodos activados [30 mg SST/L] en el respirómetro de tal modo que en los reactores se colocaron ≈100 mg DTO/L de tres sustancias:

- Benzoato de sodio (C₇H₅O₂Na, JTBaker), cuya estructura al igual que el naproxeno es de naturaleza aromática, además es un compuesto que la OCDE ha marcado como sustrato para un control positivo por ser fácilmente biodegradable y por su presencia en el ambiente.
- Lactosa, que es el azúcar base contenido en la leche y que fue empleado como co-sustrato por Quintana (2005).

- Almidón soluble $[(C_{12}H_{22}O_{11})_n]$, grado ISO, Merck], un carbohidrato que se encuentra muy comúnmente en efluentes y que por hidrólisis enzimática puede ser empleado como fuente de glucosa.

El blanco empleado se conformó de medio mineral inoculado con lodos activados sin fuente de carbono adicionada y el co-sustrato elegido fue el que se degradó mayormente en menor tiempo en función del consumo de oxígeno, y a su vez aquel cuyo inóculo pudo desarrollar colonias en el medio agar cetrimida (sección 4.5.2). Para los ensayos de inducción, la concentración establecida del co-sustrato fue de 5 mM (Santos, Benndorf y Sá-Correia, 2004).

4.5.2. Selección de *Pseudomonas* sp. para evaluación de bioaumentación

Una vez concluido el periodo de prueba para la selección del co-sustrato, se tomaron muestras de cada reactor y se buscó la presencia de bacterias que pudieran desarrollar colonias en tres distintos medios de cultivo:

1. Medio semisólido de tioglicolato sin indicador. Se inoculó por picadura para observar la presencia de bacterias aerobias y anaerobias. Se incubó durante 18 h a 28 °C.
2. Cultivo en placa de agar soya tripticasa, un medio rico no selectivo para observar si las sustancias empleadas (lactosa, almidón o benzoato de sodio) tuvieron algún efecto inhibitorio, lo cual se comprobaría al observar poco o nulo crecimiento en este medio.
3. Siembra por estría radial en placa de *agar cetrimida* tomada de la parte superficial del tubo con tioglicolato (bacterias mesófilas aerobias), para observar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*. Es importante considerar que si bien este medio es recomendable para el aislamiento de dichas especies, también pueden crecer organismos que pudieran 1) tolerar la

cetrimida (bromuro de cetil trimetil amonio) que es un detergente catiónico que inhibe una amplia variedad de otros organismos al liberar el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la microbiota acompañante incluidos otras determinadas especies de *Pseudomonas*, y 2) utilizar la peptona como fuente de nitrógeno, el glicerol como fuente de carbono, así como producir pigmentos (piocianina, pioverdina y/o piomelanina) estimulados por el cloruro de magnesio y el sulfato de potasio.

Una vez corroborada la sobrevivencia del inóculo y la presencia de *Pseudomonas* sp en el medio con el co-sustrato elegido, para bioaumentar los sistemas de inducción, se evaluaron las siguientes especies bacterianas que han sido reportados con capacidad de biodegradar HAP:

- a) *P. aeruginosa*, presenta una serie de actividades naturales como la degradación de sustratos alifáticos en condiciones anaerobias, y degradadora de hidrocarburos aromáticos y HAP como el pireno. Tiene la capacidad de sintetizar ramnolípidos cuando se encuentra en la fase estacionaria de su crecimiento por lo que se puede emplear en la primera fase del proceso de biorremediación, contribuyendo con la movilización y solubilización de los contaminantes durante la fase siguiente de mineralización (Benavides-López *et al*, 2006).
- b) *P. alcaligenes* tiene capacidad de usar fenoles y gasolina como fuente de carbono y tolera temperaturas de 41 °C. Se ha aislado de suelo, agua y lodos activados por lo que es posible emplearla como bioaumentación en algunos tratamientos. Se ha reportado que es capaz de remover 45±5% de fluoranteno después de 28 días. (Hickey *et al*, 2007).

- c) *P. fluorescens* se ha reportado con capacidad para metabolizar, naftaleno, fenantreno y fenoles (Hermoso-Berruecos, 2008).
- d) *Pseudomonas putida* posee la enzima tolueno dioxigenasa lo que la hace una buena candidata para aplicaciones como biorremediación. La cepa KT2440 no es patógena y es utilizada frecuentemente en estudios genéticos y fisiológicos en el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, así como también es un modelo experimental útil en el estudio de catabolismo de compuestos aromáticos (Santos *et al*, 2004). Es capaz de participar en una ruta metabólica para tolueno y xileno a través de benzoato y toluato; por lo que resulta buena candidata para inducir la biodegradación de naproxeno mediante la vía metabólica de degradación del benzoato (Regenhardt, Heuer y Fernández, 2002; Ramos-Díaz y Ramos, 1998).
- e) *Pseudomonas stutzeri* se encuentra ampliamente distribuida en suelo y agua, asimismo, muestra alta versatilidad metabólica incluyendo la mineralización de naftaleno (Onesios *et al*, 2008).

Las especies *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. fluorescens* y *P. stutzeri* fueron aisladas e identificadas en el Laboratorio de Microbiología Experimental; *P. putida* KT2440 fue donada por la Dra. Herminia de Jesús Loza-Tavera.

Las bacterias conservadas a -80 °C; se activaron en caldo BHI (infusión cerebro corazón) y previo a la selección se realizaron pruebas de pureza. Para observar si había algún tipo de contaminación se sembraron por estriado de cuadrante radial en placas de agar sangre, se observaron las características de las colonias en cuanto a su forma, elevación, bordes, textura y color; asimismo se realizaron tinciones de Gram que se observaron a detalle en el microscopio.

Para seleccionar la especie del género *Pseudomonas* empleada en los experimentos de bioaumentación, se evaluó su capacidad para utilizar el benzoato de sodio (co-sustrato seleccionado) como única fuente de carbono y energía, de modo que una vez confirmada la pureza de cada especie bacteriana, se tomó una asada de una colonia crecida en agar sangre, se dejó incubando 24 h en medio mineral con peptona y se continuó con el siguiente esquema:

- i. En un tubo eppendorf se colocó 1 mL del cultivo y se centrifugó a 4500 x g durante 2 minutos.
- ii. Para obtener una muestra concentrada 5 veces, se desechó el sobrenadante y se le adicionó otro mililitro de cultivo, se resuspendió la pastilla y se centrifugó nuevamente a 4500 x g durante dos minutos.
- iii. Se repitieron los incisos i.y ii. hasta juntar 5 mL.
- iv. Lavado del concentrado. Éste se realizó para eliminar la peptona que pudiera encontrarse aún en el medio. La pastilla final se resuspendió en 1 mL de medio mineral con co-sustrato a una concentración de 720,5 mg/L o 5 mM (MM_B); se centrifugó a 4500 x g durante 2 minutos, se desechó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de medio mineral. Este paso se realizó tres veces, en el último lavado no se eliminó el sobrenadante, sólo se resuspendió la pastilla.
- v. Se tomó 1 mL de la muestra concentrada y se adicionó a un tubo de ensayo (13x100) con 4 mL de MM_B , se mezcló en Vortex en el nivel 3 durante 10 segundos.
- vi. Por triplicado, se tomó 1 mL de muestra y se leyó en el espectrofotómetro (A_{600}) utilizando como blanco la solución de MM_B . Con la curva de McFarland (anexo 9.4,

- Gráfica 14) se calculó el volumen a tomar de la muestra para tener una concentración inicial de *Pseudomonas* sp. de $1,2 \times 10^9$ UFC/10 mL ($A_{600}=0,060$).
- vii. Una vez adicionado el inóculo al MM_B, se midió la absorbancia (A_{600}) para obtener los valores reales de absorbancia inicial.
 - viii. Se incubaron los tubos durante 48 h a 30 °C.
 - ix. Para evitar incremento de la absorbancia por pigmentos excretados de las bacterias, se lavaron las muestras como se describió en el inciso ii. y se leyó la absorbancia final.
 - x. Por último se realizó una comparación de los incrementos de absorbancia de las muestras y se eligió para los ensayos de bioaumentación la especie que creció más en el MM_B.

Para la especie del género *Pseudomonas* en las que no hubo diferencia significativa para utilizar el MM_B, se seleccionaron las que pudieran tolerar la presencia de naproxeno [10 mg/L] en vez del co-sustrato, para ello se realizó nuevamente el procedimiento pero esta vez tomando el inóculo inicial a partir de los tubos que degradaron el benzoato de sodio.

4.5.3. Efecto de diferentes dosis de naproxeno en *P. putida* KT2440

Es posible que elevadas concentraciones de naproxeno puedan inhibir el crecimiento de *P. putida* KT2440 (especie seleccionada), por lo que se realizó un ensayo para evaluar el efecto de diferentes dosis del fármaco a modo de determinar la concentración de trabajo en los experimentos de biodegradación.

En esta sección se evaluó el crecimiento de la bacteria en presencia del fármaco a tres diferentes concentraciones: baja [0,5 mg/L], media [2,5 mg/L] y alta [5 mg/L].

La concentración más alta [5 mg/L], aunque es sólo el 11% de lo empleado en el ensayo de biodegradabilidad, es comparable con las concentraciones reportadas en aguas tratadas (Boyd, Zhang y Grimm, 2005). En cuanto a la parte analítica, es lo máximo que se puede detectar por la metodología estandarizada MEFS-CG (sección 4.5.7) y es el límite de cuantificación en el sistema respirométrico, lo cual fue considerado porque con dicho sistema se indujo la biodegradación. Esa misma concentración fue reportada para evaluar la biodegradación con lodos activados del fármaco asistida con leche como co-sustrato (Quintana et al, 2005).

El experimento se realizó como se describe a continuación:

- i. Se descongeló una alícuota de 0,5 mL de *P. putida* KT2440 y se activó en 9,5 mL de caldo BHI durante 10 horas a 28 °C y 200 rpm.
- ii. Se tomaron 2 mL del cultivo y se inocularon en un matraz con 198 mL de MM_B, se incubó por 17,5 horas para obtener un cultivo en fase exponencial (A_{600} entre 0,6 - 0,8).
- iii. Con la ecuación de la curva de McFarland, se calculó el volumen a tomar para tener al final $A_{600}=0,05$ en un volumen total de 100 mL de MM_B.
- iv. Una vez inoculados los matraces, se incubaron durante 6 horas, con agitación de 200 rpm y a 28 °C, para obtener $A_{600}= 0,2$.
- v. Cuando el cultivo tuvo la densidad óptica deseada ($A_{600}=0,2$), se adicionó la solución estándar de naproxeno con sus respectivos controles como se indica en la Tabla 11.
- vi. Se registró la absorbancia de la muestra a los tiempos: 0, 0,5, 1, 2, 4, 15, 19,5, 23,5 y 28 h; considerando como t=0 h a partir de la adición del fármaco.

Tabla 11. Condiciones experimentales de la prueba de toxicidad de naproxeno en *P. putida* KT2440.

Condición	Contenido
CTRL NEG	Bacterias en MM _B
0,5 mg/L Naprox	Bacterias en MM _B + 0,5 mg naprox/L
0,5 mg/L Naprox CTRL	Bacterias en MM _B + X mL de metanol
2,5 mg/L Naprox	Bacterias en MM _B + 2,5 mg naprox/L
2,5 mg/L Naprox CTRL	Bacterias en MM _B + Y mL de metanol
5,0 mg/L Naprox	Bacterias en MM _B + 5,0 mg naprox/L
5,0 mg/L Naprox CTRL	Bacterias en MM _B + Z mL de metanol

El volumen de metanol empleado en las condiciones Naprox CTRL (X, Y y Z) fue el mismo que se adicionó de la solución estándar de naproxeno a las condiciones Naprox. La medición se realizó por cuadruplicado.

4.5.4. Biodegradación de naproxeno por inóculo de lodos activados bajo condiciones de co-sustrato

Ya que se obtuvieron todos los resultados de los puntos anteriores, se inició el *Bloque I* de inducción de la biodegradación de naproxeno evaluándola por consumo de oxígeno en el respirómetro y por cuantificación del fármaco con MEFS-CG (sección 4.5.7). Asimismo se realizó cuenta en placa de bacterias mesófilas aerobias al inicio y al final de la prueba por el método de gota de Miles-Misra (Ramírez-Gama *et al*, 2006).

El procedimiento para este bloque se describe a continuación:

- i. Se colocaron en los reactores del respirómetro los tratamientos indicados en la Tabla 12.
- ii. En condiciones de asepsia se tomaron 50 mL de muestra de cada reactor para realizar, por sextuplicado, la cuantificación de bacterias mesófilas aerobias en agar nutritivo

incubadas a 30 °C por 16 horas. Se guardó la muestra a 4 °C para posteriormente realizar la cuantificación inicial del fármaco.

- iii. Cuando ya no se observó un consumo de oxígeno significativo, se detuvo el sistema respirométrico y se tomó una muestra para la cuantificación final de bacterias. El volumen restante se filtró con papel filtro de poro medio y se mantuvo bajo las mismas condiciones que la muestra inicial.

Tabla 12. Contenido de los reactores de inducción de la biodegradación con lodos activados.

	Cometabolismo		Naproxeno		Control positivo		Control negativo
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Inóculo [mL]	10						
Co-sustrato [mg/L]	720,5		-----		720,5		-----
Naproxeno [mg/L]	5 mg/L						
Metanol [mL]	-----				El mismo que se haya adicionado de la solución estándar de naproxeno a R1, R2, R3 Y R4		
Medio mineral [mL]	En cantidad suficiente para obtener 500 mL de medio de biorreacción						

4.5.5. Biodegradación de naproxeno por inóculo de *P. putida* KT2440 bajo condiciones de co-sustrato.

En el *bloque II*, la inducción de la biodegradación de naproxeno se evaluó por consumo de oxígeno respirométrico y por cuantificación del fármaco con MEFS-CG (sección 4.5.7); este método para evaluar la inducción fue válido empleando un cultivo puro, ya que se empleó un tipo de bacteria caracterizada y con actividad degradadora comprobada. Por otro lado, se realizó la cuantificación bacteriana al inicio y al final de la prueba por el método de gota de

Miles-Misra (Ramírez-Gama *et al*, 2006) para verificar la similitud de su concentración al inicio del ensayo en todos los reactores.

El procedimiento de este bloque se realizó como se indica a continuación:

- i. Se activó en caldo BHI una alícuota conservada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de *P. putida* KT2440 incubando durante 18 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación de tipo orbital a 300 rpm.
- ii. Del cultivo obtenido se tomó una alícuota de 2 mL y se resembró en MM_B. Se incubó durante 18 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente con la curva de McFarland se ajustó la concentración del inóculo por densidad óptica (A_{600}) $\approx 1 \times 10^4$ UFC/mL.
- iii. Se colocaron en los reactores del respirómetro los tratamientos indicados en la Tabla 13.
- iv. En condiciones de asepsia se tomó una alícuota de 50 mL de cada reactor y se trató del mismo modo descrito a partir del inciso ii de la sección 4.5.4.

Tabla 13. Contenido de los reactores para inducir la biodegradación con *P. putida* KT2440.

	Co-sustrato		Naproxeno		Control positivo		Control negativo
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Inóculo [UFC/mL]	$\approx 1 \times 10^5$ UFC/mL						
Co-sustrato [mg/L]	720,5		-----		720,5		-----
Naproxeno [mg/L]	5				-----		-----
Metanol [mL]	-----		-----		El mismo que se haya adicionado de la solución estándar de naproxeno a R1, R2, R3 y R4		
Medio mineral [mL]	En cantidad suficiente para obtener 500 mL de medio de biorreacción.						

4.5.6. Biodegradación de naproxeno modificando factores bióticos y abióticos

Presencia de *Pseudomonas* sp en lodos activados

Así como se verificó la presencia de *Pseudomonas* sp y/o bacterias que pudieran tolerar la ceftrimida en muestras de los biorreactores donde se seleccionó el co-sustrato (sección 4.5.2), también se realizó un estudio en diferentes muestras de lodos activados recién recolectados para hacer una determinación aproximada de la concentración de dichos microorganismos en una PTAR.

Esta evaluación se realizó someramente por cultivo en placa considerando como representativo del 100% a la población en unidades formadoras de colonias (UFC) que pudieran desarrollarse en agar nutritivo y en función de ellos determinar la proporción de *Pseudomonas* sp presentes en lodos activados determinadas al inocularse la misma muestra en agar ceftrimida. El procedimiento de cuantificación bacteriana se realizó por el método de gota de Miles-Misra (Ramírez-Gama *et al*, 2006).

Adaptación de la comunidad microbiana

Los lodos activados están compuestos por diferentes microorganismos (protozoarios, rotíferos, etcétera), que difieren en sus velocidades de crecimiento. Este hecho establece la división de la comunidad en microorganismos de crecimiento rápido y lento cuyas proporciones son determinadas por las condiciones del sitio donde se obtuvo el inóculo.

Antes de evaluar la biodegradación del naproxeno, se realizó una prueba para averiguar si la proporción de bacterias colocadas en los reactores se mantenía constante, esto debido a que generalmente, en presencia de un sustrato en una comunidad diversa se puede presentar competencia interespecífica por consumo de sustrato, lo que puede conducir a interacciones alopáticas en donde una especie puede inhibir el desarrollo de otra. En esta parte del ensayo, se obtuvieron datos de consumo de oxígeno, por duplicado, de tres calidades de inóculos y con la misma concentración inicial de bacterias [1×10^4 UFC/mL].

- a) Lodos activados
- b) Mezcla en proporción 1:1 de lodos activados [5×10^3 UFC/mL] con *P. putida* KT2440 [5×10^3 UFC/mL]
- c) *Pseudomonas putida* KT2440.

Este experimento tuvo una duración de 90 h y se adicionó benzoato de sodio [720 mg/L] como fuente de carbono en todos los sistemas. La técnica para evaluar interferencias en la adaptación es descrita en el apartado “Presencia de *Pseudomonas* sp en lodos activados” de esta sección

Biodegradación con co-sustrato y bioaumentación

Para el *bloque III* de inducción de la biodegradación de naproxeno, se evaluaron simultáneamente los dos parámetros de las secciones 4.5.4 y 4.5.5 de tal modo que como factor abiótico se indujo cometabolismo con el benzoato de sodio [720 mg/L] y como factor biótico se indujo el bioaumentación con la *P. putida* KT2440.

En este experimento se evaluó el consumo de oxígeno de la mezcla de inóculos en proporción 1:1 (lodos activados + *P. putida* KT2440) en el respirómetro y se cuantificaron

bacterias mesófilas aerobias totales al inicio y al final de la prueba por el método de gota de Miles-Misra (Ramírez-Gama *et al*, 2006).

El procedimiento seguido fue el siguiente:

- i. En los biorreactores del respirómetro se colocaron los tratamientos indicados en la Tabla 14.
 - El volumen de inóculo de la especie de *P. putida* KT2440 se obtuvo de un cultivo de 18 h en MM_B y se determinó por A₆₀₀ en función de la curva de McFarland siendo el necesario para tener una concentración de $\approx 5 \times 10^3$ UFC/mL.
- ii. En condiciones de asepsia se tomó una alícuota de 50 mL de cada biorreactor y se continuó con el procedimiento descrito a partir del inciso ii de la sección 4.5.4.
- iii. La determinación de la concentración inicial y final del naproxeno se describe en la sección 4.5.7.

Tabla 14. Contenido de los reactores para el experimento de biodegradación con bioaumentación.

		Cometabolismo		Naproxeno		Control positivo		Control negativo	
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
Inóculo	<i>P. putida</i> KT2440	$\approx 5 \times 10^3$ UFC/mL							
	Lodos activados	5 mL ($\approx 5 \times 10^3$ UFC/mL)							
Co-sustrato [mg/L]		720,5		-----		720,5		-----	
Naproxeno [mg/L]		5				-----			
Metanol [mL]		-----				El mismo que se haya adicionado de la solución estándar de naproxeno a R1, R2, R3 Y R4			
Medio mineral [mL]		En cantidad suficiente para obtener 500 mL de medio de biorreacción.							

4.5.7. Cuantificación de naproxeno por MEFS-CG

El procedimiento para la cuantificación del fármaco en las muestras se realizó siguiendo el método validado por Castillo-Alanís (2009) como prosigue:

- i. Se filtraron 25 mL de muestra en un embudo gravimétrico con papel filtro Whatman No. 1 y se ajustó su pH=3 con HCl 0,1 N.
- ii. Se colocaron 5 mL de la muestra acidificada y 0,9 g de NaCl (JTBaker) en un vial de 12 mL con tapón horadado y septa de teflón; el NaCl sirvió para incrementar la fuerza iónica por efecto “*salting out*”, favoreciendo la adsorción de los compuestos en la fibra.
- iii. En el vial con la muestra se colocó un agitador magnético de 10 mm x 3 mm, se selló con teflón y se colocó sobre la parrilla de agitación manteniendo la muestra a 25 °C y 1200 rpm durante 5 minutos, para mantener la mezcla homogénea.
- iv. Microextracción en fase sólida (**MEFS**):
 - a. Se introdujo la fibra PEG (Polietilenglicol/Carbowax con aguja calibre 23 de 60 µm de espesor con soporte para inyección manual Supelco), acondicionada como indica el fabricante, en el vial quedando junto al vórtice y se mantuvo la muestra en extracción durante 15 minutos.
 - b. Se retiró la fibra PEG del vial y se colocó en el *headspace* de un vial de 4 mL con 100 µL de MTBSTFA (N-metil-N-t-butildimetilsililtrifluoroacetamida, C₉H₁₈F₃NOSi, grado derivatización >97%, Aldrich), realizando de este modo la silanización o derivatización durante 30 minutos.

- v. Cuantificación por cromatografía de gases (**CG**):
 - a. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se retiró la fibra del vial y se colocó en el inyector del cromatógrafo de gases a 240 °C dejándose desorber durante 10 minutos.

Condiciones Cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo de gases *SRI 8610C* con detector de ionización por flama (FID) a 280 °C; columna capilar *Alltech Heliflex ATTM-5* (5% fenil)- 95% metilpolisiloxano (30 m x 0,32 mm ID x 1 µm FT). Inyector en modo *splitless* a 240 °C. Flujo constante de H₂ 25 mL/min y aire 250 mL/min para el detector FID, y como gas acarreador N₂ 20 mL/min. Previo al análisis se realizó acondicionamiento de columna en isoterma a 300 °C durante 20 minutos.

Para la cuantificación del naproxeno se utilizó el siguiente programa de temperaturas: 70 °C durante 2 minutos, rampa de temperatura de 10 °C/min hasta 300 °C y se mantuvo así por 5 minutos.

Curva de calibración

- a) Se preparó una solución concentrada de naproxeno en metanol [1 mg/mL].
- b) A partir de la solución concentrada se realizaron diluciones con agua desionizada y acidificada (pH=3) para obtener las siguientes concentraciones: 0,5 ppm, 1 ppm, 2,5 ppm, 5,0 ppm y 10 ppm.
- c) Cada punto de la curva de calibración se obtuvo realizando el procedimiento de MEFS-CG, por triplicado, como se indicó anteriormente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Ensayos previos

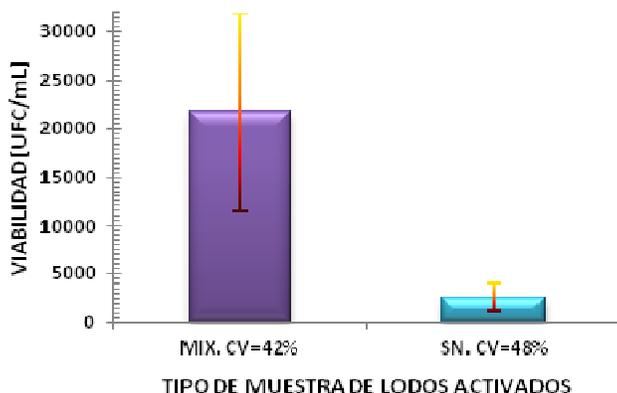
5.1.1. Inóculo de lodos activados

Como se observa en la Tabla 15, las muestras empleadas como inóculo cumplieron con lo establecido por la OCDE respecto al pH (inferiores a pH=8) ya que se sabe que está relacionado con procesos enzimáticos específicos. En la misma tabla se presentan los datos de concentración de SST y el volumen de inóculo que se adicionó a los biorreactores para tener una concentración de 30 mg SST/L (anexo 9.1).

Tabla 15. Parámetros determinados en diferentes muestras de lodos activados de la PTAR Chapultepec

Muestra	1	2	3	4	5
pH	7,29	6,67	7,12	6,85	6,73
SST [mg/L]	3 420	3 120	900	2740	3300
Volumen inóculo [mL]	4,4	4,8	16,7	5,5	4,5

En cuanto a los resultados obtenidos para seleccionar la mejor fracción de los lodos activados en la inducción de la biodegradación (Gráfica 1), se decidió tomar el inóculo a partir de MIX porque reprodujo menor error al realizar las diluciones y además se obtuvo mayor número de UFC/mL respecto a la cuenta donde se tomó sólo el SN. Aunque se ha mencionado que el SN contiene una mayor proporción de células viables (Vázquez-Rodríguez *et al*, 2007), la variación fue mayor respecto al MIX, probablemente por la presencia de numerosas cantidades de flóculos que no pueden ser controlados al tomar la alícuota.



Gráfica 1. Viabilidad microbiana en lodos activados para seleccionar la forma de toma de inóculo.

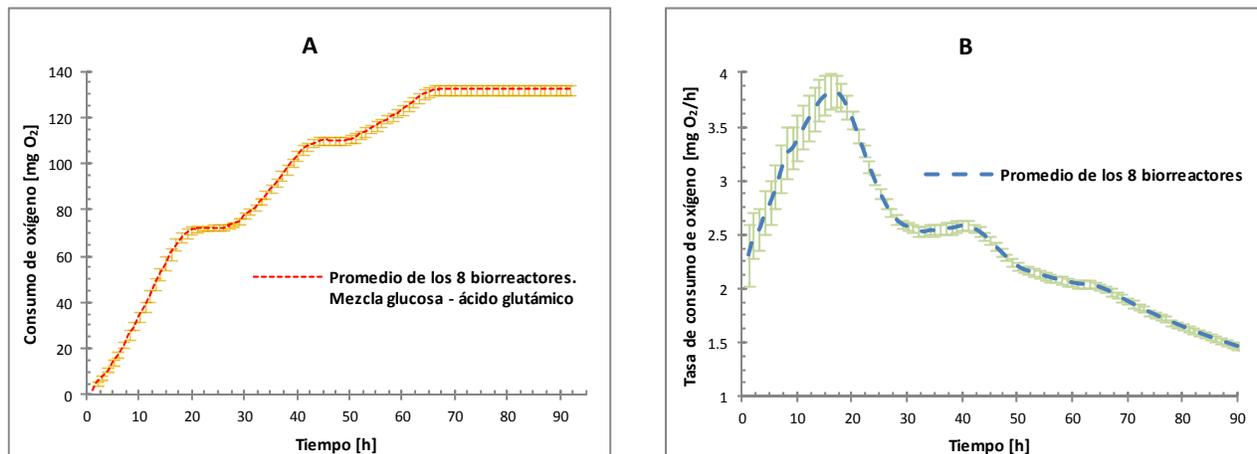
5.1.2. Validación del sistema respirométrico

Los datos de repetibilidad de las celdas en el respirómetro se encuentran en la el anexo 9.6 “Validación del Sistema Respirométrico” (Gráfica 15).

La estrategia empleada en la validación es una forma estandarizada cuyos valores de consumo de O_2 se sabe que deben encontrarse en $198 \text{ mg } O_2/L \pm 15,4\%$ (Young y Cowan, 2004; APHA, AWWA y WPCF, 1998). Por otro lado, la DTO adicionada en este ensayo fue de $152,9 \text{ mg DTO/L}$, y considerando la misma variación porcentual, el intervalo de consumo de oxígeno esperado fue entre $129,4 \text{ mgO}_2$ y $176,46 \text{ mgO}_2/L$.

Como se observa en la Gráfica 2A, el comportamiento del promedio de las curvas de consumo de oxígeno para los 8 reactores es el mismo y la desviación respecto a la media es mínima ($0,318\text{-}2,72 \text{ mg } O_2/L$). Se realizó el análisis de varianza de una vía para las curvas de cada reactor con un 95% de confianza, y se concluyó que no existe diferencia significativa. Por otro lado, el consumo de O_2 con la mezcla glucosa-ácido glutámico se encontró dentro del

intervalo calculado (132 mg O₂/L), este resultado indica que tanto el funcionamiento del sistema respirométrico como la calidad del inóculo son adecuados.



Gráfica 2. Comportamiento del inóculo de lodos activados en el respirómetro. A) Promedio de consumo de oxígeno en los reactores. B) Promedio de la tasa de consumo de oxígeno.

Sobre el comportamiento de las curvas, se esperaba que incrementaran hasta mantenerse constantes en una sola etapa, sin embargo, lo que se puede observar es que hay tres fases dentro cada una, mismo que puede apreciarse también en el promedio de las curvas de velocidad de consumo (Gráfica 2B). Este tipo de comportamiento, llamado diáuxico, es característico de la presencia de diferentes sustratos, en donde estaría indicando que los microorganismos consumen los sustratos por preferencias: glucosa > ácido glutámico > materia orgánica. Otra posibilidad es que la variabilidad de la velocidad sea debida a cambios en las condiciones del medio de reacción tales como consumo de sustratos y aparición de metabolitos.

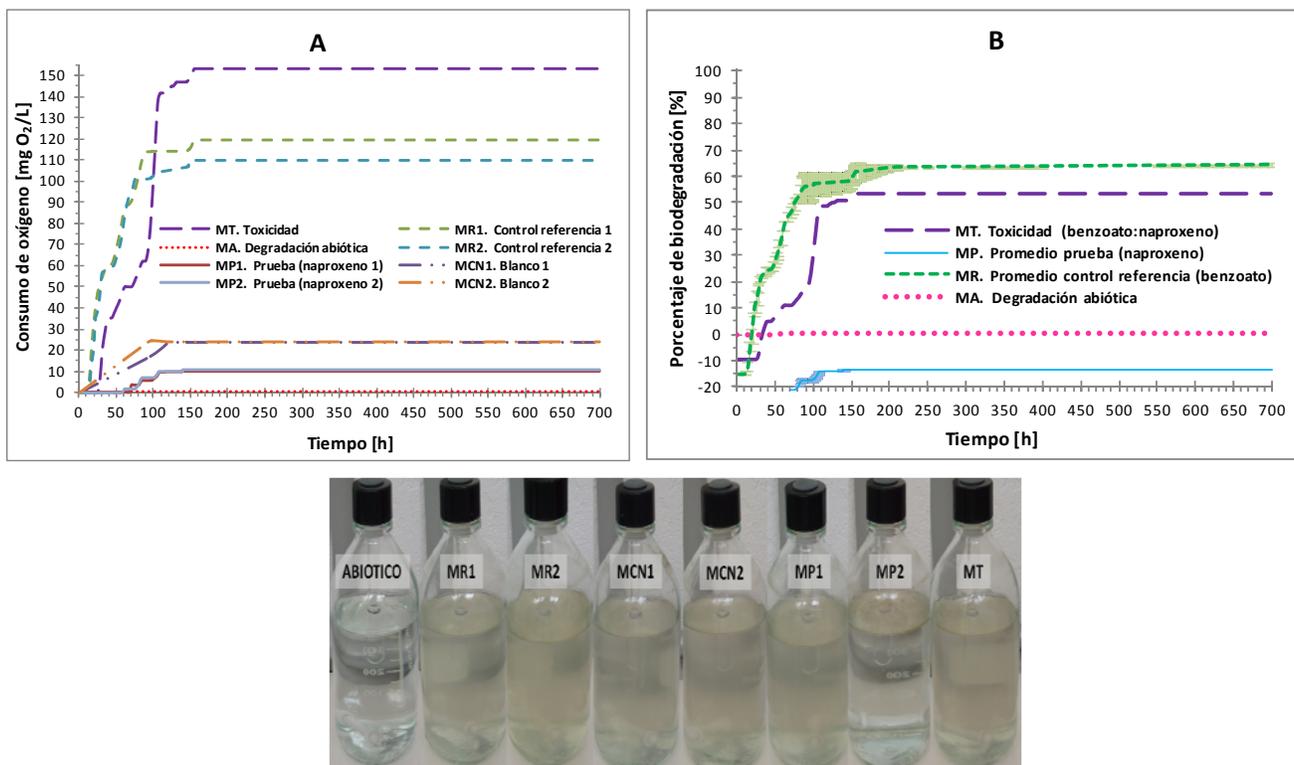
5.2. Evaluación de la biodegradabilidad de naproxeno

Las pruebas de biodegradabilidad inmediata, por su simplicidad, son las más utilizadas y referidas en la literatura especializada; como se mencionó en la sección 4.3, el procedimiento

Biodegradación inducida de naproxeno bajo condiciones controladas de laboratorio

seleccionado para evaluar la biodegradabilidad del naproxeno fue OCDE 301 F: Respirometría Manométrica.

Los datos de repetibilidad de las celdas en el respirómetro se encuentran en la Gráfica 16 del anexo 9.6 .



Gráfica 3. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia de naproxeno durante 28 días. A) Consumo de oxígeno en cada biorreactor. B) Biodegradación porcentual de las sustancias evaluadas.

En la Gráfica 3A se muestra el respirograma obtenido como datos crudos de consumo de oxígeno de los ocho reactores. Las curvas MCN₁ y MCN₂, representan el oxígeno consumido por los reactores control que contienen solamente el inóculo sin fuente de carbono, esto con la finalidad de mostrar el comportamiento basal de los lodos activados. En las curvas MR₁ y MR₂, que contienen como fuente de carbono al benzoato de sodio (sustancia de referencia), el máximo de remoción se alcanza a las 154,8 h (64,7%) y el porcentaje eliminado a los cinco días representa el 60,4% de la cantidad adicionada en función del consumo de oxígeno.

Asimismo, las curvas de crecimiento en presencia de la sustancia de referencia validan la prueba e indican que el inóculo fue adecuado, ya que se obtuvo un porcentaje de biodegradación mayor al 50% dentro de los cinco primeros días (Ambriz-Rivas, 2001) y mayor al 60% hasta finalizar el ensayo (OCDE, 1992).

Por otro lado, los reactores MP_1 y MP_2 que contienen naproxeno como sustancia de prueba a evaluar presentaron un patrón de consumo de oxígeno menor al de los reactores control, lo que se visualiza con valores de consumo negativos en la Gráfica 3B, indicando que el fármaco a concentración de 100 mg DTO/L ó 43,1 mg/L es tóxico.

En el reactor MT, de toxicidad, se consumió el 53,2% de la mezcla de sustancias (benzoato de sodio y naproxeno), lo que podría ser indicativo de que, en caso de que el benzoato de sodio se removiera del mismo modo observado en las curvas MR (64,7% de la DTO adicionada), en este biorreactor su eliminación representaría el 34,4% del valor obtenido, de modo que el naproxeno se degradó al menos el 18,77% (7,75 mg/L). Por otro lado, la curva de consumo de oxígeno MT, aunque con un desfase en tiempo de aproximadamente 16 h, es similar a la del benzoato de sodio, por lo que es posible que con la mezcla sustancias se favoreciera la degradación del naproxeno, es decir, que el benzoato de sodio sirvió como un co-sustrato, ayudando a la liberación de enzimas inespecíficas que pudieran actuar sobre el naproxeno por cometabolismo y que probablemente podrían participar en la biodegradación de otros COE.

En el reactor MA (degradación abiótica), se observó un consumo de oxígeno de 0,357 mg DTO/L, representando el 0,74% de la eliminación. Cabe señalar que el consumo de oxígeno observado en este último reactor no es dato suficiente para explicar la degradación abiótica del fármaco bajo estas condiciones, pues se colocó una cantidad tal de naproxeno

que debería consumir 100 mg DTO/L y por el momento los únicos factores que han mostrado degradación abiótica es por fotodegradación y en este caso el ensayo se realizó bajo condiciones de oscuridad (Isidori *et al*, 2005; Andreozzi *et al*, 2003).

Finalmente, el porcentaje de remoción de cada compuesto se muestra en la Gráfica 3B, con los resultados obtenidos en ella se concluyó que el naproxeno, al ser evaluado con un procedimiento normalizado, no es un compuesto fácilmente biodegradable, ya que no se degradó al menos el 60% de la DTO adicionada e incluso es tóxico en la concentración empleada [43,1 mg/L].

5.3. Inducción de la biodegradación de naproxeno

Al evaluar la biodegradabilidad del naproxeno y determinar que no puede ser eliminado fácilmente por microorganismos, se realizaron ensayos para inducir su biodegradación modificando factores bióticos y abióticos, en este sentido se implementó el co-sustrato para averiguar si la sustancia en estudio puede ser degradada cuando está con otro compuesto que sí puede ser fácilmente degradado así como la bioaumentación para averiguar si de ese modo se mejoraría el proceso de remoción.

5.3.1. Selección de co-sustrato

Los datos de verificación de la repetibilidad de las celdas en el respirómetro se encuentran en la Gráfica 17.

De entre los compuestos almidón, lactosa y benzoato de sodio que fueron evaluados para ser utilizados como co-sustrato a una concentración inicial de 100 mg DTO/L, se eligió la sustancia consumida mayoritariamente al cabo de cinco días.

Al concluir el tiempo establecido, se observó que los reactores con *benzoato de sodio* registraron mayor consumo de oxígeno (Gráfica 4A) y producción de biomasa respecto a los que contenían las otras dos sustancias

En los reactores donde se colocó el *almidón soluble*, desde el inicio se observó precipitación al adicionar el inóculo de lodos activados, lo que ocurrió probablemente por la interacción con sustancias presentes en la materia orgánica. El porcentaje de biodegradación en función del consumo de oxígeno fue menor que el de los reactores que contenían benzoato de sodio y mayor con respecto a los que se les adicionó *lactosa* como fuente de carbono (Gráfica 4B),

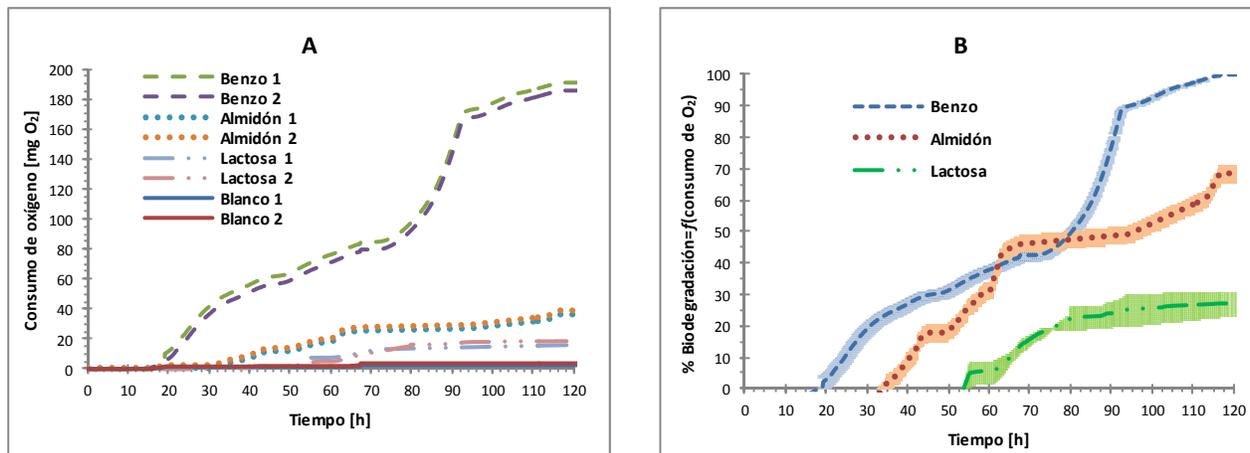
esto podría explicarse porque dentro de los principales microorganismos que participan en la biodegradación a partir de una muestra de lodos activados, son del género *Pseudomonas* sp, que no pueden fermentar la lactosa (Lewandowski, Armenante y Paka, 1990).

Además de los resultados obtenidos en el ensayo respirométrico, se eligió el benzoato de sodio porque su degradación aerobia y anaerobia se encuentra bien documentada en poblaciones bacterianas metabólicamente diversas como: microorganismos fotosintéticos, reductores de nitratos, reductores de hierro (III); y sobre todo porque el compuesto tiene convergencia dentro de las vías metabólicas de degradación de compuestos aromáticos (Crawford, Traina y Tuovinen, 1998).

Se descartaron el almidón y lactosa como co-sustratos ya que se ha reportado la inhibición de la degradación de compuestos aromáticos en presencia de carbohidratos como ocurre en *Pseudomonas putida*, que en presencia de succinato (precursor en la biosíntesis de carbohidratos) se inhibe la traducción de proteínas *BenR* que regulan la transcripción y son requeridas para la expresión de genes degradadores de benzoato. La falta de estos genes a su vez causa la represión de los operones *cat* y *pca*, que codifican para enzimas catalizadoras de reacciones en la vía de degradación de benzoato (Görke y Stülke, 2008).

Por tanto, la presencia de almidón o lactosa podría inhibir la degradación del naproxeno que también es de naturaleza aromática; asimismo, se ha reportado que en los procesos de tratamiento aerobios, las bacterias que actúan en la degradación generalmente son Gram negativas e incluyen entre otros, miembros del género *Pseudomonas* sp (Lewandowski *et al*, 1990), por lo que a partir de estas aseveraciones se planteó que es mejor utilizar como co-sustrato el benzoato de sodio para activar dicha vía degradativa.

Biodegradación inducida de naproxeno bajo condiciones controladas de laboratorio



Gráfica 4. Resultados del ensayo para la selección del co-sustrato. A) Respirograma de consumo de oxígeno. B) Porcentaje de biodegradación de las sustancias en función del consumo de oxígeno.

5.3.2. Selección de especie del género *Pseudomonas*.

Para la segunda etapa de la inducción de la biodegradación de naproxeno, se planteó bioaumentar al medio de degradación con algún género bacteriano. Como se ha mencionado, existen reportes de la presencia de bacterias ubicuas como *Pseudomonas* sp en lodos activados y con la premisa de que éstas son responsables en gran medida de la degradación de los compuestos aromáticos, se esperó que al incrementar su proporción en el inóculo, se obtendría una mayor eficiencia en la remoción del naproxeno, que podría extrapolarse a otros COE. Para dicho objetivo, tomando alícuotas de los experimentos con los diferentes posibles co-sustratos, se verificó la presencia de bacterias presentes en las mismas.

Tabla 16. Crecimiento bacteriano en diferentes medios incubados a 28 °C

Reactor	MEDIO DE CULTIVO		
	Tioglicolato	Cetrimida	Soya tripticaseina
Blanco 1	Crecimiento abundante de bacterias en la parte superficial del medio de cultivo	Sin crecimiento	Distintas colonias blancas con características distintas en cuanto a forma, borde, elevación y textura pero en general: <ul style="list-style-type: none"> - Circulares con bordes enteros y elevación plana de textura membranosa. - Rizoides con bordes filamentosos y elevación papilar de textura membranosa. - Amiboides con borde ondulado y elevación umbonada de textura cremosa.
Blanco 2			
Benzoato de sodio 1		Pigmento azulado alrededor de colonias grandes circulares amarillo verdoso.	
Benzoato de sodio 2			
Almidón 1		Sin crecimiento	
Almidón 2			
Lactosa 1			
Lactosa 2			

En la Tabla 16 se indica que únicamente en las muestras alimentadas con benzoato de sodio hubo desarrollo de colonias amarillo-verdosas con halos azulados en agar cetrimida.

Por otro lado, se observó la morfología microscópica de las colonias desarrolladas en la cetrimida y se corroboró que la presencia de bacterias Gram negativas lo cual podría ser indicativo de la presencia de *Pseudomonas* sp en los reactores (Figura 10).

	Nombre	Muestra de inóculo del biorreactor que contenía bacterias provenientes de lodos activados y benzoato de sodio como fuente de carbono.
	Tinción	Gram
	Aumento	1000 veces
	Descripción	Bacilos Gram negativos cultivados en agar cetrimida, algunos con extremos redondos y otros con extremos puntiagudos.

Figura 10. Bacterias desarrolladas en agar cetrimida presentes en una muestra tomada de un biorreactor con lodos activados y alimentado con benzoato de sodio.

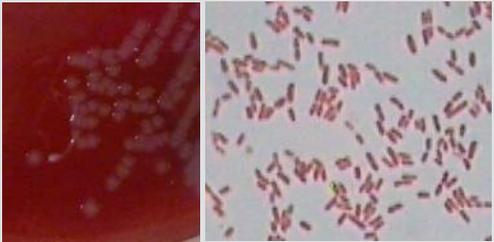
En cuanto a la verificación de la pureza de las especies bacterianas empleadas en función de sus características de cultivo y microscópicas, los resultados se muestran a continuación:

a) *Pseudomonas aeruginosa*

	Nombre	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Tinción	Gram
	Aumento	1000 veces
	Descripción	Bacilos Gram negativos con extremos redondeados cultivados en agar sangre

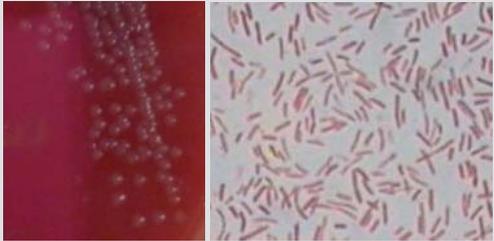
Características culturales: Todas las colonias mucosas iguales de forma circular, color gris-blanquecino, con borde entero, elevación convexa, textura viscosa y consistencia húmeda.

b) *Pseudomonas alcaligenes*

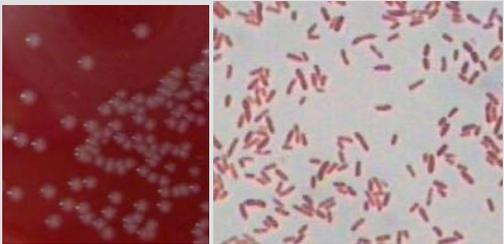
	Nombre	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
	Tinción	Gram
	Aumento	1000 veces
	Descripción	Bacilos Gram negativos de 0,5 x 2-3 µm con extremos rectos.

Características culturales: Todas las colonias iguales de forma circular, color grisáceo, borde lobulado, elevadas, textura viscosa y consistencia húmeda.

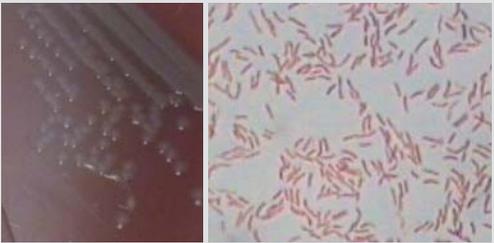
c) *Pseudomonas fluorescens*

	Nombre	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Tinción	Gram
	Aumento	1000 veces
	Descripción	Bacilos Gram negativos de 5-6 µm de largo con extremos puntiagudos.
<p>Características culturales: Todas las colonias iguales de forma circular, con bordes ondulares, color grisáceo transparente, elevación rugosa, textura viscosa y consistencia húmeda.</p>		

d) *Pseudomonas putida* KT2440

	Nombre	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
	Tinción	Gram
	Aumento	1000 veces
	Descripción	Bacilos cortos Gram negativos con extremos rectos entre 3-5 µm.
<p>Características culturales: Todas las colonias iguales de forma circular, color blanco opaco, borde ondulado, elevación umbonada, textura cremosa y consistencia húmeda.</p>		

e) *Pseudomonas stutzeri*

	Nombre	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	Tinción	Gram
	Aumento	1000 veces
	Descripción	Bacilos Gram negativos con extremos redondeados de 0,3 x 4-6 µm.
<p>Características culturales: Todas las colonias iguales fusiformes, color gris opaco, borde entero, elevación rugosa con textura cremosa y consistencia seca.</p>		

Con las características culturales y microscópicas de los cultivos bacterianos se corroboró la pureza de cada especie y se prosiguió con la adaptación de las mismas al benzoato de sodio en un ensayo de aproximadamente 21 h.

Como se observa en la Tabla 17, las cepas que lograron utilizar significativamente el benzoato de sodio a una concentración de 720 mg/L fueron *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* KT2440 con incremento de $A_{600} = 0,117$ y $0,121$ respectivamente.

Tabla 17. Utilización de benzoato de sodio [720 mg/L] como fuente de carbono por *Pseudomonas* sp.

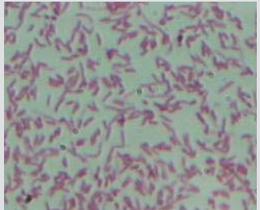
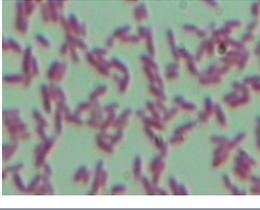
	Bacteria	A_{600}		
		t=0 h	t=21 h	ΔA_{600}
	<i>P. aeruginosa</i>	0,627	0,669	0,042
	<i>P. alcaligenes</i>	0,173	0,173	0,000
	<i>P. fluorescens</i>	0,427	0,544	0,117
	<i>P. putida</i> KT2440	0,209	0,330	0,121
	<i>P. stutzeri</i>	0,216	0,244	0,028

A los tubos que contenían ambas especies se les realizó una tinción de Neisser y de Gram para observar si en el proceso de adaptación no se habían contaminado y por ende se pudieran obtener resultados erróneos (Tabla 18).

Finalmente, para discernir cuál de las dos especies sería seleccionada en los ensayos de bioaumentación, ambas se dejaron adaptando en naproxeno a una concentración de 10 mg/L; sin embargo, se observó que después de siete días, ninguna hizo evidente incremento de biomasa, por lo que la especie seleccionada para realizar los ensayos de inducción de la biodegradación de naproxeno fue *Pseudomonas putida* KT2440 debido a que existen numerosos reportes en los que se describe a esta especie como un microorganismo no

patógeno que además puede participar en fitorremediación y que es buena candidata para poder ser liberada al ambiente (Regenhardt *et al*, 2002).

Tabla 18. Tinciones de muestras con *P. fluorescens* y *P. putida* KT2440 en MM_B.

<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
	Tinción	Neisser
	Aumento	1000 veces
	Descripción	Bacilos Neisser negativos –cápsula color amarillo- en su mayoría rectos y algunos ligeramente curvos entre 1-5µm de largo y 0,5µm de ancho.
	Tinción	Gram
	Aumento	1000 veces
	Descripción	Bacilos Gram negativos en su mayoría rectos y algunos ligeramente curvos entre 1-5µm de largo y 0,5- 1 µm de ancho.
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440		
	Tinción	Neisser
	Aumento	1000 veces
	Descripción	Bacilos Neisser negativos –cápsula color amarillo-, cultivados en MM _B . No se observan gránulos de polifosfatos.
	Tinción	Gram
	Aumento	1000 veces
	Descripción	Bacilos Gram negativos rectos entre 1 – 4 µm de largo. cultivados en MM _B .

5.3.3. Efecto de distintas dosis de naproxeno en *Pseudomonas putida* KT2440

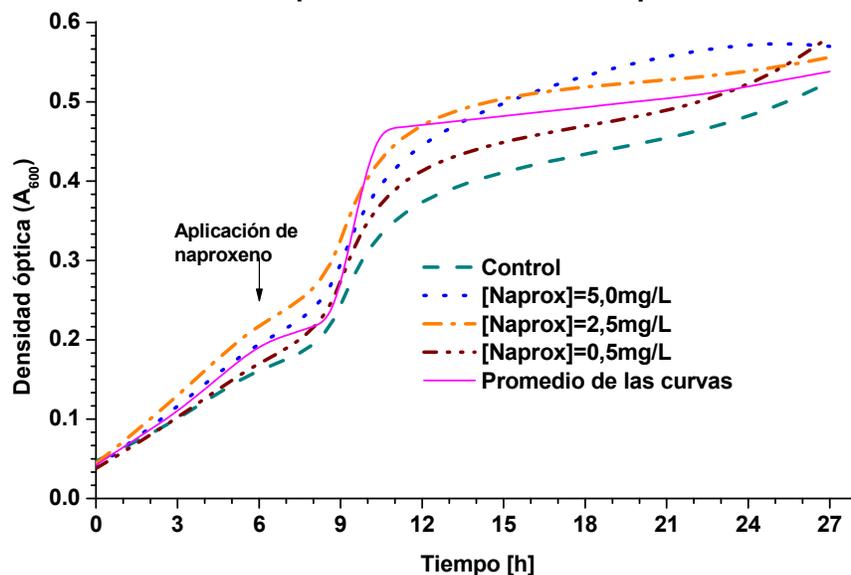
Muchos compuestos ejercen un efecto negativo en los procesos de oxidación biológica parcial o pueden ocasionar inhibición dependiendo de la sustancia y su concentración. La inhibición puede ser consecuencia de la interferencia con el equilibrio osmótico o con el sistema enzimático de los organismos. Las sustancias pueden ser tóxicas en altas concentraciones, pero biodegradables en bajas concentraciones como es el caso del fenol o formaldehído (Milenko, 1996).

El efecto inhibitorio por alta concentración se pudo presentar en la evaluación de la biodegradabilidad del naproxeno (43,1mg/L), por lo que una vez seleccionada *P. putida* KT2440 como bacteria para bioaumentar el sistema, se realizó una prueba a diferentes dosis de para seleccionar la concentración de trabajo del fármaco que a su vez no inhibiera el desarrollo celular de las bacterias, ya que como se mencionó en la sección 5.3.2, por sí mismo no pudo ser utilizado como fuente de carbono a una concentración de 10 mg/L.

Las concentraciones de naproxeno evaluadas en *P. putida* KT2440 fueron: 5 mg/L, 2,5 mg/L y 0,5 mg/L (Figura 11). En la Gráfica 5, se muestran las curvas de crecimiento y se observa que la concentración más alta de naproxeno (5 mg/L) no fue tóxica, sin embargo no se puede concluir que puedan biotransformar o biodegradar al compuesto ya que los cultivos también contenían benzoato de sodio [720 mg/L]; por otro lado, el control sin naproxeno, tuvo menor absorbancia que los tratamientos dados. Hasta este momento sólo se puede decir que con la máxima concentración empleada la sustancia es tolerada, pues no se inhibe la duplicación celular, ya que se sigue observando un incremento en la absorbancia.

Biodegradación inducida de naproxeno bajo condiciones controladas de laboratorio

Con los resultados obtenidos se estableció utilizar la concentración más alta [5 mg/L], para aplicarla a los sistemas de biorreacción.



Gráfica 5. Evaluación del efecto del naproxeno a distintas concentraciones en *P. putida* KT2440.

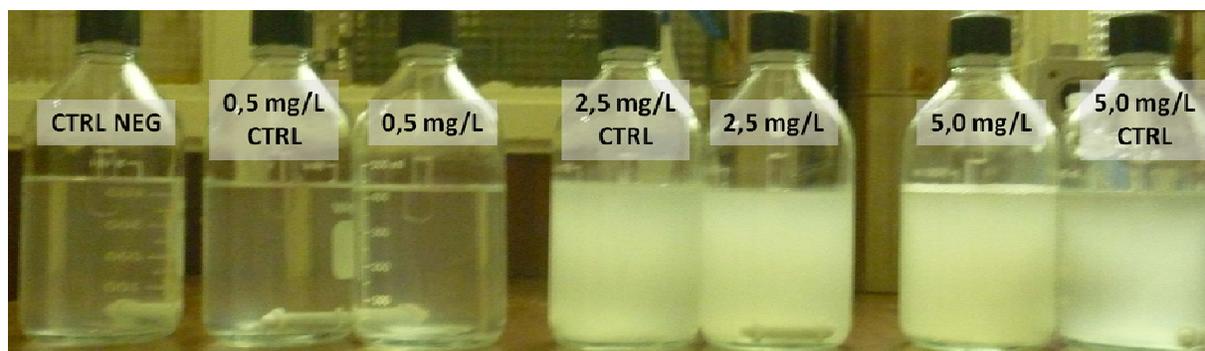


Figura 11. Crecimiento de *P. putida* KT2440 en MM_B expuesta a diferentes concentraciones de naproxeno.

5.3.4. Evaluación de la biodegradación de naproxeno por co-sustrato conteniendo inóculo de lodos activados

Para este bloque se realizaron cuatro tratamientos respirométricos, por duplicado, como se indicó en la sección 4.5.4 (Tabla 12). La verificación de la repetibilidad de las celdas del respirómetro se presenta en la Gráfica 18 y los datos crudos en la Gráfica 22.

Comparando los resultados obtenidos de biodegradación empleando un co-sustrato (Gráfica 6A), con los del ensayo de la evaluación de la biodegradabilidad (Gráfica 3C, página 57), se fortalece la idea de que el naproxeno es un compuesto orgánico tóxico en altas concentraciones, pero biodegradable en baja concentración del mismo modo que los fenoles o formaldehidos (Milenko, 1996).

En la Gráfica 6A se muestran las curvas de biodegradación para cada condición evaluada, este ensayo tuvo una duración de 800,8 h (≈ 33 días); se puede observar en función del consumo de oxígeno que al finalizar el experimento, el fármaco pudo ser biodegradado al $79,1 \pm 2,2\%$ con el tratamiento usando benzoato de sodio como co-sustrato, y del $97 \pm 0,14\%$ empleando solamente naproxeno; es decir, el fármaco puede ser considerado biodegradable a la concentración de 5 mg/L, ya que la OCDE indica que debe haber una remoción de al menos el 60% por un método respirométrico a los 28 días (OCDE, 1992) y éste se obtuvo a las 372 h ($\approx 15,5$ días).

Se puede observar que si bien, el naproxeno se removió mayoritariamente con el tratamiento donde se adicionó como única fuente de carbono y el intervalo de tiempo en el que se degradó el 90% fue de 120 h, para que iniciara la degradación tuvieron que transcurrir 300 h (12,5 días) lo que hace probable pensar que los microorganismos presentes en los reactores se adaptaron al sustrato de prueba y pudieron utilizarlo como nutriente.

Asimismo, para el caso del sistema de naproxeno adicionado con benzoato de sodio (cometabolismo), el 60% de biodegradación se alcanzó a las 97,7 h (≈ 4 días), lo que representa el 26,3% del tiempo alcanzado por el inóculo que sólo tuvo naproxeno como fuente de carbono.

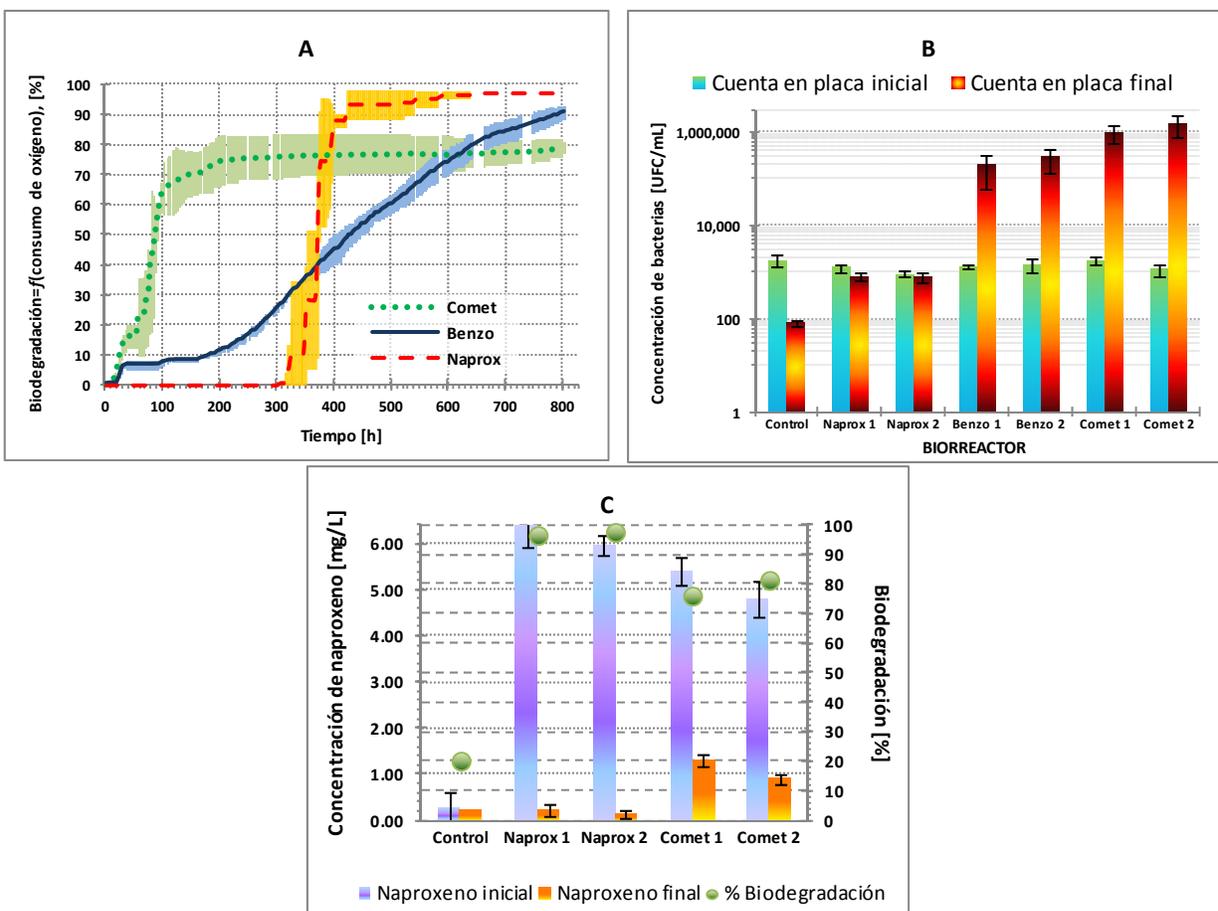
Debido a que en este trabajo se asumió que la mayor parte de la biodegradación se está llevando a cabo por bacterias, se realizaron cultivos en placa de mesófilas aerobias para verificar que la concentración inicial se encontrara en el mismo orden de magnitud en todos los reactores [10^3], al final del ensayo se realizó para verificar la viabilidad bacteriana en los sistemas y descartar el consumo de oxígeno debido a otros factores. En la Gráfica 6B se muestran los datos de concentración de bacterias en cada tratamiento, como es de esperarse, el sistema control disminuyó en 10 veces su concentración inicial dado que a éste no se le adicionó un sustrato.

Los reactores que sólo contenían naproxeno al final del ensayo mantuvieron la concentración de bacterias respecto a las condiciones iniciales, lo que puede explicarse de tres formas: a) las bacterias cuantificadas fueron en su mayoría aquellas que finalmente fueron capaces de degradar el fármaco, b) dado la baja cantidad de sustrato [5 mg/L], no se permitió la división celular, por lo que no pudo observarse incremento significativo de biomasa o c) la baja concentración de bacterias, fue debida a la muerte celular ya que el consumo del 95% de la sustancia se reportó a las 578,8 h, es decir, 9 días antes de finalizar el ensayo.

Para el caso de los sistemas que contenían benzoato de sodio y naproxeno (cometabolismo), hubo un incremento de biomasa de casi tres órdenes de magnitud [$\approx 10^6$], este dato es indicativo de que hay bacterias degradando el fármaco, pues los tratamientos de referencia

que tienen solamente el co-sustrato, presentan una concentración bacteriana diez veces menor [$\approx 10^5$].

Una vez finalizado el ensayo respirométrico, se cuantificó por MEFS-CG la concentración de naproxeno inicial y residual en los biorreactores evaluados y en ellos también se observó la remoción del fármaco del siguiente modo: $97,0 \pm 0,8\%$ para los tratamientos con naproxeno como única fuente de carbono y $78,6 \pm 3,8\%$ (4 mg/L de un total de 5,1 mg/L) para el caso de los tratamientos con benzoato de sodio como co-sustrato (Gráfica 6C).



Gráfica 6. Biodegradación de naproxeno con lodos activados y benzoato de sodio como co-sustrato. A) Porcentaje de biodegradación de naproxeno en cada tratamiento. B) Cuenta en placa de bacterias mesófilas aerobias al inicio y al final del ensayo. C) Concentración de naproxeno inicial y residual determinada por MEFS-CG.

5.3.5. Evaluación de la biodegradación de naproxeno por co-sustrato conteniendo *P. putida* KT2440.

Continuando con los objetivos, en esta sección se muestran los resultados obtenidos empleando un inóculo axénico de *P. putida* KT2440, para este bloque se realizaron cuatro tratamientos respirométricos, por duplicado, como se indicó en la sección 4.5.5; asimismo, en cada biorreactor se cuantificaron bacterias mesófilas aerobias para verificar su concentración inicial y final. La verificación de la repetibilidad de las celdas del respirómetro se presenta en la Gráfica 19 y los datos crudos en la Gráfica 23.

Los resultados de la biodegradación por respirometría se muestran en la Gráfica 7A, en ella se puede observar que la preferencia para degradar los sustratos adicionados fue en el siguiente orden decreciente: (1) los sistemas que además del naproxeno también contenían el co-sustrato, presentaron consumo de oxígeno equivalente al $34,1 \pm 2,4\%$ de biodegradación; (2) el benzoato de sodio se consumió el $29,8 \pm 0,9\%$ en un lapso de 293 h (12,2 días), y (3) los sistemas que tuvieron naproxeno como exclusiva fuente de carbono apenas tuvieron consumo de oxígeno superior al control ($0,9\% \pm 0,5$).

De acuerdo con los antecedentes, la cepa de *P. putida* KT2440 es considerada como buena degradadora de compuestos aromáticos (Kanehisa Laboratories, 2011); sin embargo, los resultados obtenidos son opuestos a lo esperado, puesto que los reactores inoculados con el cultivo puro no fueron más eficientes que los inoculados con lodos activados. Al respecto, se argumentan dos posibles explicaciones relacionadas con:

- a. La cepa empleada de *P. putida* KT2440 fuera tipo Tc, cuyo cromosoma tiene un marcador de resistencia a la tetraciclina y no tiene capacidad para degradar el naftaleno (Park, Jeon y Cadillo, 2004).

b. La toxicidad del metanol adicionado en todos los biorreactores; este efecto puede observarse a partir del reactor control (anexo 9.7), donde el consumo de oxígeno alcanzado por éste fue tan sólo del 40% de la DTO adicionada (47,5 mg DTO equivalente a 0,06 mL de metanol). Aunque esta observación podría parecer opuesta a los resultados presentados en la evaluación de la toxicidad del fármaco en *P. putida* KT2440. Es importante señalar que entre este experimento y los de toxicidad, hubo dos diferencias; la primera relacionada con el tiempo de tratamiento, y la segunda con la densidad de microorganismos. En este sentido, cuando se evaluó la toxicidad aguda del naproxeno y del metanol (sección 5.3.3), el periodo de evaluación fue de 28 h, representando la décima parte del tiempo en el que se realizó el ensayo del *bloque II* (toxicidad crónica, de la presente sección). Por otro lado, la evaluación de la toxicidad se realizó por densidad óptica en la cual, la concentración inicial de bacterias vivas y muertas, de acuerdo con la curva de McFarland, fue de 10^7 UFC/mL ($A_{600}=0,05$), que representa cuatro órdenes de magnitud superior a la concentración bacteriana inicial en el ensayo de biodegradación con el cultivo axénico [10^3 UFC/mL] (Gráfica 7B); por tanto, es posible que la alta densidad bacteriana, en el corto tiempo de evaluación (sección 5.3.3), pudiera enmascarar el efecto tóxico del metanol, esta hipótesis concuerda con el trabajo de Zachritz, Lundie y Wang, (1996) quienes observaron un efecto negativo en la degradación del ácido benzoico en presencia del solvente metanol, los autores explican que el efecto se debe a la modificación de la comunidad microbiana presente, de modo que se favoreció la proliferación de bacterias degradadoras del metanol en vez de las degradadoras de ácido benzoico; para el caso de esta tesis, al tener un cultivo puro con características metabólicas

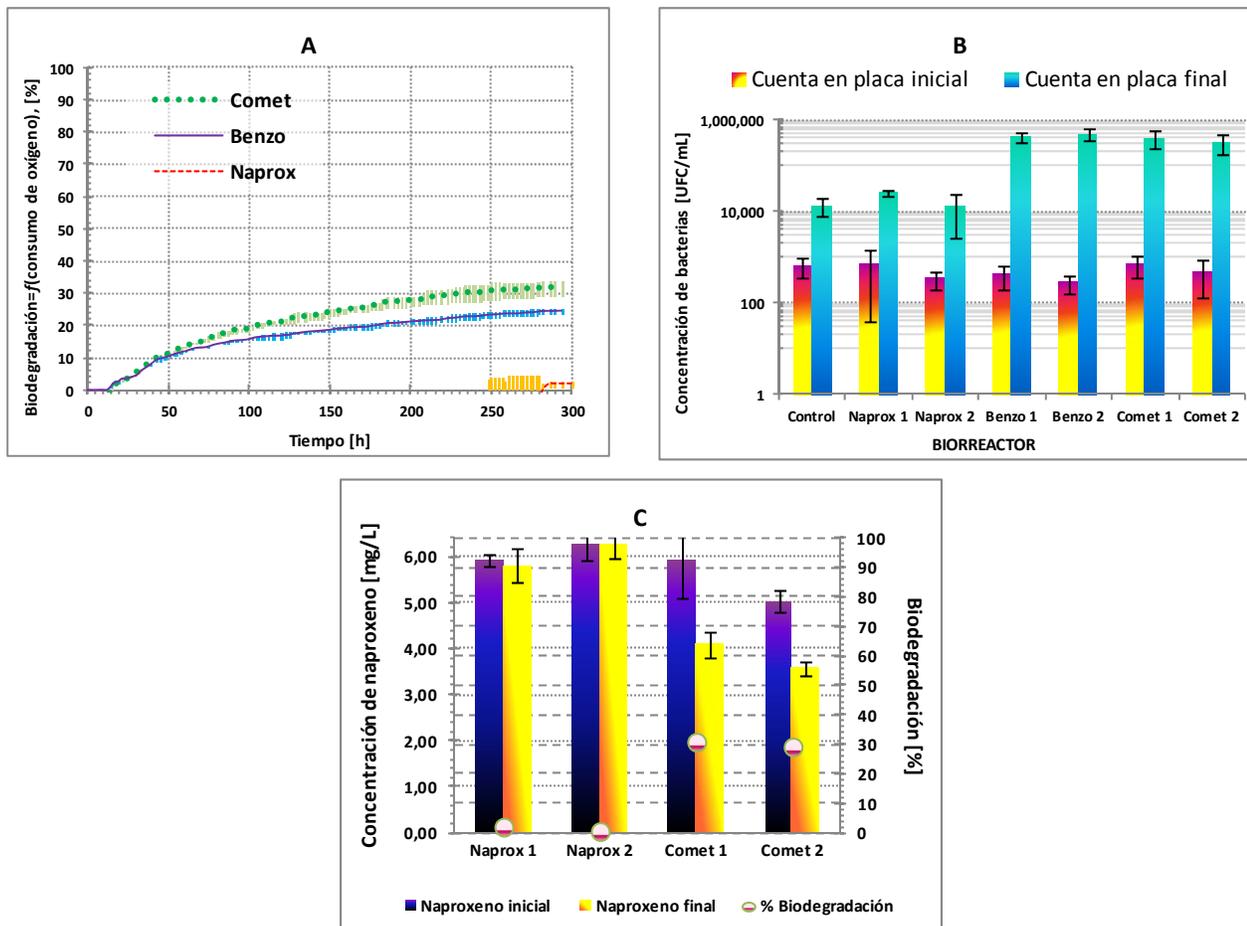
particulares, no hubo otra microbiota que degradara el metanol y por lo tanto se inhibió el desarrollo de *P. putida* KT2440.

En cuanto a la viabilidad del inóculo, en la Gráfica 7B se puede observar incremento en el número de bacterias en todos los reactores que fueron inoculados con la misma densidad [$\approx 10^3$ UFC/mL].

Finalmente, con el consumo de oxígeno y con la concentración residual de naproxeno (Gráfica 7C), se observa que la cepa de *P. putida* KT2440 no pudo degradar el naproxeno como única fuente de carbono ya que se encontró la misma cantidad de fármaco tanto en las muestras iniciales ($6,1 \text{ mg/L} \pm 0,3 \text{ mg/L}$) como en las finales ($6,0 \text{ mg/L} \pm 0,3 \text{ mg/L}$). Sin embargo, se observó que estas bacterias fueron capaces de degradar el $29,9 \pm 1,2 \%$ de naproxeno cuando se mantuvieron en presencia de benzoato de sodio ($1,6 \text{ mg/L}$ de un total de $5,5 \text{ mg/L}$). Estos resultados sugieren fuertemente, que el naproxeno puede ser biodegradado por cometabolismo.

En cuanto a la verificación de la viabilidad, el número de bacterias en los reactores con sólo naproxeno es casi por completo similar al control negativo [$\approx 10^4$]; el incremento de sólo diez veces en la población final respecto a la inicial podría atribuirse a residuos de benzoato de sodio que fue la sustancia que en medio mineral sirvió para cultivar a las bacterias antes de someterse a los ensayos respirométricos y definitivamente no debido a la degradación del fármaco; se ha descartado la idea de que el problema con el consumo de oxígeno en estos reactores sea la calidad del inóculo, ya que como se mencionó anteriormente, el control positivo, es decir aquel que contenía como sustancia de referencia el benzoato de sodio, sí se degradó de acuerdo a la cinética previamente establecida.

Biodegradación inducida de naproxeno bajo condiciones controladas de laboratorio



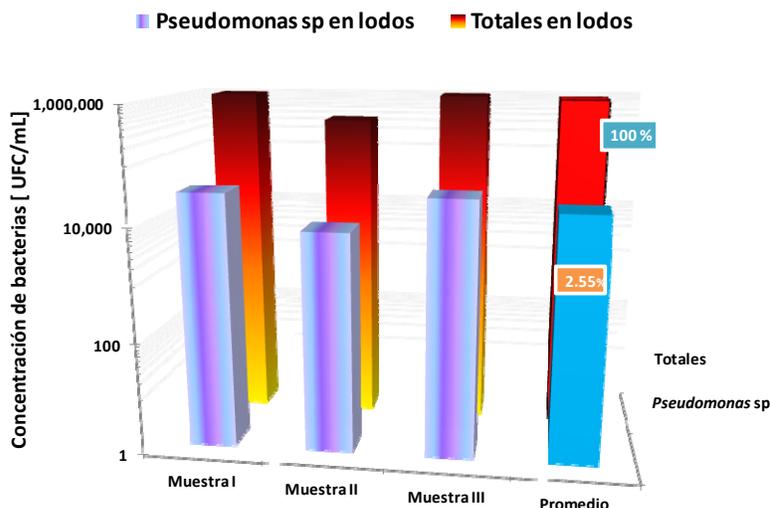
Gráfica 7. Biodegradación inducida de naproxeno con *P. putida* KT2440 y benzoato de sodio como co-sustrato. A) Porcentaje de biodegradación de naproxeno. B) Cuenta en placa de bacterias al inicio y al final del ensayo. C) Concentración de naproxeno inicial y residual determinada por MEFS-CG.

5.3.6. Evaluación de la biodegradación de naproxeno por efecto de bioaumentación y co-sustrato

En esta sección experimental se evaluó la biodegradación de naproxeno bioaumentando *P. putida* KT2440 y adicionando benzoato de sodio como co-sustrato. Para ello se realizaron dos ensayos previos, el primero para determinar la presencia y proporción de *Pseudomonas* sp en lodos activados, y el segundo para verificar la adaptación de la mezcla de inóculos.

Presencia de *Pseudomonas* sp en lodos activados

En cuanto a la determinación de la proporción de bacterias resistentes a la ceftriaxona presentes en una muestra de lodos activados (Gráfica 8), se concluyó que el 2,55% de bacterias mesófilas aerobias ($7,94 \times 10^5 \pm 4,73 \times 10^5$ UFC/mL) pertenecen al género *Pseudomonas* sp, o a bacterias con capacidad metabólica para resistir el detergente ($2,02 \times 10^4 \pm 1,29 \times 10^4$ UFC/mL). Es decir, aunque existe la presencia de la bacteria mencionada, su concentración es muy baja, por lo que bioaumentar la especie del género *Pseudomonas* seleccionada podría mejorar el proceso de remoción del fármaco.

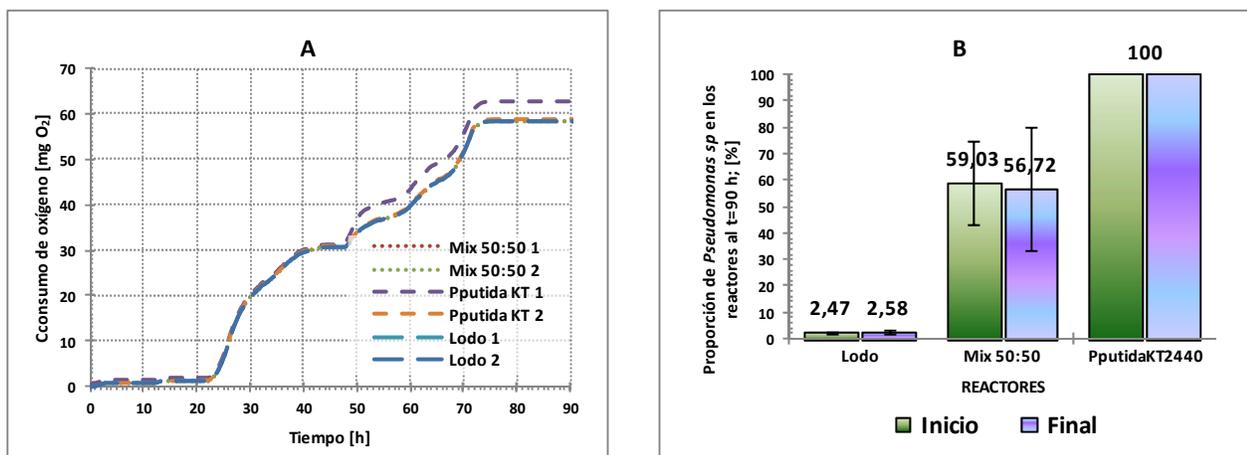


Gráfica 8. Presencia de bacterias degradadoras de ceftriaxona (*Pseudomonas* sp) en lodos activados.

Adaptación de la comunidad microbiana

La verificación de la repetibilidad de las celdas del respirómetro se presenta la Gráfica 20. La prueba en la cual se valoró si la proporción de bacterias se mantenía constante al mezclar los dos tipos de inóculos, indicó que no hubo antagonismo entre ellos ya fue muy similar el comportamiento del crecimiento bacteriano en todos los tratamientos (Gráfica 9A).

Al finalizar las 90 h de duración del ensayo (≈ 4 días), se cuantificaron las bacterias mesófilas aerobias y las degradadoras de cetrimida, estas últimas probablemente *Pseudomonas sp*, mantuvieron su proporción inicial tanto en los lodos activados ($2,5 \pm 0,1\%$) como en la mezcla de inóculos ($57,9 \pm 1,6\%$). Con estos resultados se concluyó que se podía emplear la mezcla para realizar los ensayos de biodegradación del fármaco con bioaumento ya que no se observó un efecto alopático (Gráfica 9B).



Gráfica 9. Adaptación de la comunidad microbiana. A) Consumo de oxígeno en cada biorreactor usando benzoato de sodio como fuente de carbono. B) Proporción de *Pseudomonas sp* en los reactores al inicio y final del ensayo.

Evaluación de la biodegradación de naproxeno por bioaumentación conteniendo co-sustrato.

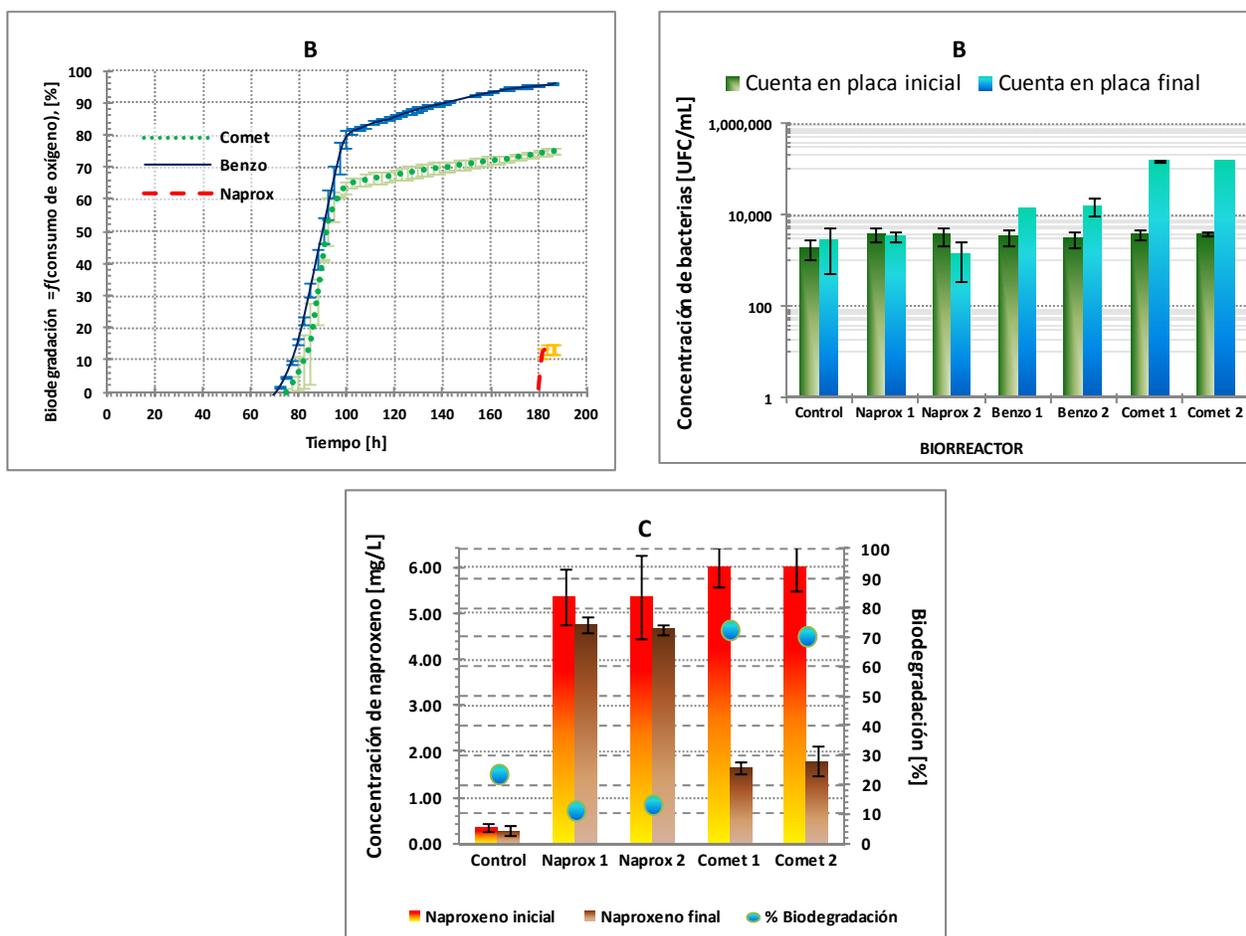
Una vez que se corroboró que la mezcla de inóculos no afectaba las proporciones de la composición bacteriana, se realizó el ensayo de inducción de la biodegradación de naproxeno bajo condiciones de co-sustrato y bioaumentación con una duración de 186 h (≈ 8 días). La verificación de la repetibilidad de las celdas del respirómetro se presenta en la Gráfica 21 y los datos crudos en la Gráfica 24.

Como se observa en la Gráfica 10A, la calidad del inóculo fue adecuada ya que se logró consumir $96,3 \pm 0,2\%$ de benzoato de sodio (control positivo) en un lapso de 186 h, que fue la duración del ensayo respirométrico. A ese mismo tiempo, el naproxeno como única fuente de carbono sólo se degradó en un $13,3 \pm 1,7\%$, mientras que en los tratamientos donde se empleó benzoato de sodio como co-sustrato, se removió el $75,1 \pm 0,9\%$.

Los sustratos adicionales fueron utilizados para la generación de biomasa como se muestra en la Gráfica 10B. Al principio, en todos los biorreactores se colocó una concentración de $\approx 10^3$ UFC/mL. Al finalizar la prueba (186 h), tanto los reactores control como los que contenían naproxeno, no incrementaron su viabilidad, sin embargo, en los reactores con sustancia de referencia (benzoato de sodio) sólo hubo un incremento de diez veces, lo que puede sugerir que en ese tiempo ya no habían suficientes bacterias metabólicamente activas de acuerdo con la curva de consumo de oxígeno; en cambio, los biorreactores que contenían el fármaco y el co-sustrato se encontraban en la fase estacionaria teniendo una concentración bacteriana de casi 100 veces mayor a la inicial.

Biodegradación inducida de naproxeno bajo condiciones controladas de laboratorio

Por otro lado como se indica en la Gráfica 10C, la remoción obtenida al cuantificar el fármaco, indica que en el tratamiento con el co-sustrato, se biodegradó el $75,7 \pm 1,5\%$ del naproxeno (4,6 mg/L de un total de 6 mg/L), mientras que en el que únicamente se encontraba el compuesto farmacéutico, se obtuvo un porcentaje del $12,1 \pm 1,4\%$ (0,7 mg/L de un total de 5,4 mg/L).



Gráfica 10. Biodegradación inducida de naproxeno bioaumentando *P. putida* KT2440 a lodos activados. A) Porcentaje de biodegradación de naproxeno. B) Cuantificación de bacterias mesófilas aerobias por cultivo en placa. C) Concentración de naproxeno determinada por MEFS-CG.

Figura 12. Evaluación de la biodegradación de naproxeno empleando un co-sustrato y bioaumentando el sistema. A) Biorreactores antes de iniciar la dosificación de oxígeno. B) Biorreactores al final de la prueba.

5.4. Análisis integral

Una vez obtenidos los resultados de los tres ensayos bajo distintas condiciones de sustrato y de inóculo bacteriano, se comparó la biodegradación obtenida por las dos técnicas empleadas (respirometría y MEFS-CG), como se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Comparación de los porcentajes de biodegradación obtenidos por el método respirométrico y por MEFS-CG

	Lodos activados h) (t=801		<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (t=294 h)		Bioaumentación h) (t=187	
	Respirometría	MEFS-CG	Respirometría	MEFS-CG	Respirometría	MEFS-CG
Naprox 1	96,9	96,5	1,3	1,9	12,1	11,1
Naprox 2	97,1	97,5	0,5	0,4	14,4	13,1
Comet 1	77,6	75,9	33,4	30,8	75,7	76,8
Comet 2	80,6	81,3	30,2	29,1	74,5	74,7

Al observar que no hay grandes diferencias entre la respirometría y la cuantificación directa del fármaco por MEFS-CG, se determinó que como ambos métodos son correspondientes, se pueden homogeneizar los resultados y establecer el mejor tratamiento para biodegradar el fármaco.

Se obtuvo la cinética de degradación de cada curva con el modelo de Gompertz (Zwietering, Jongenburger y Rombouts, 1990) empleando el programa estadístico *Origin 7.0*, para posteriormente determinar en cualquier tiempo el porcentaje de biodegradación y comparar los tratamientos realizados en un tiempo dado.

La ecuación general para una cinética de Gompertz está dada por:

$$B(t) = ae^{-e^{-k(t-tc)}}$$

donde:

$B(t)$ = Biodegradación [%]

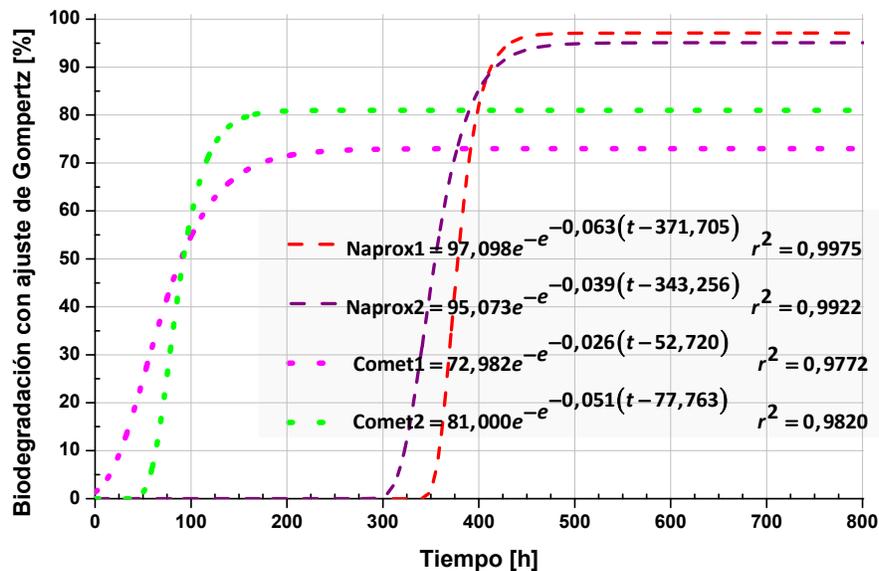
a = Valor asintótico superior [%]

k = Tasa de consumo de oxígeno en el tiempo

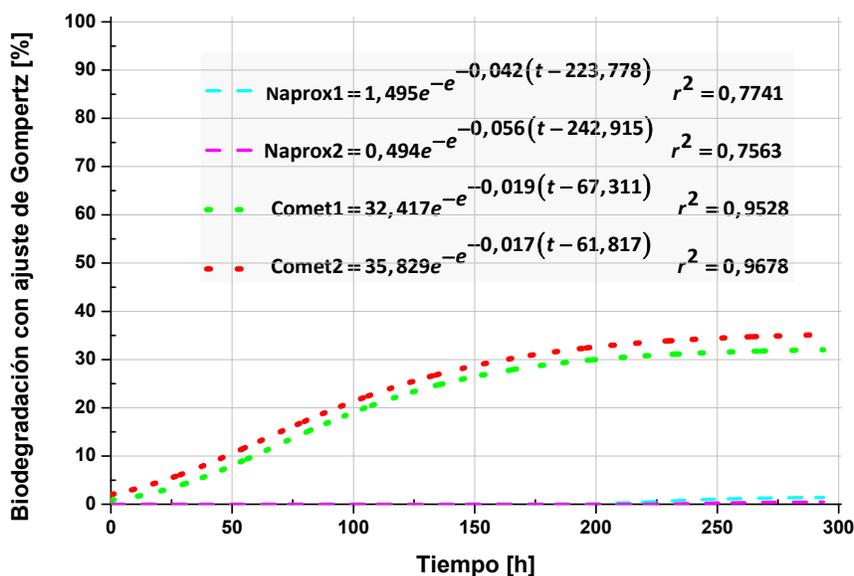
t = Tiempo [h]

tc = Tiempo en el punto de inflexión [h].

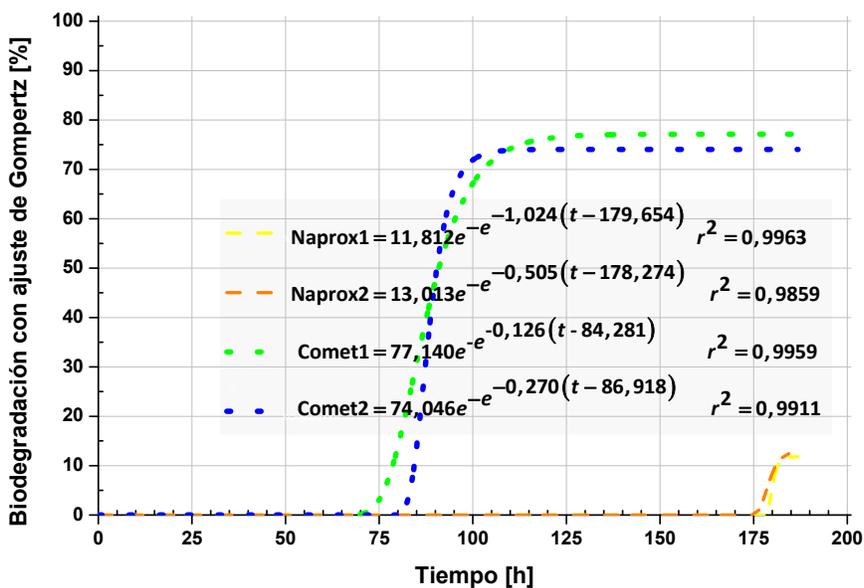
El modelo de crecimiento sigmoideal obtenido en cada tratamiento realizado se muestra a continuación:



Gráfica 11. Cinética modelada de la biodegradación de naproxeno por inóculo de lodos activados



Gráfica 12. Cinética modelada de la biodegradación de naproxeno por *P. putida* KT2440



Gráfica 13. Cinética modelada de la biodegradación de naproxeno por lodos activados y *P. putida* KT2440

La elección del tratamiento más eficiente se seleccionó con base en la mayor cantidad de fármaco removida en menor tiempo, lo cual se obtuvo con las cinéticas de biodegradación generadas con el modelo de Gompertz (Gráfica 11, Gráfica 12 y Gráfica 13).

El tiempo en el que se evaluaron todos los tratamientos para realizar las comparaciones fue de 185 h, que fue el correspondiente al ensayo de menor duración. Los resultados se resumen en la Tabla 20.

Tabla 20. Biodegradación calculada con las cinéticas obtenidas a partir del modelo de Gompertz al t=185h.

	Biodegradación [%]		
	Lodos activados	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Bioaumentó
Naprox 1	0,0	0,0	11,8
Naprox 2	0,0	0,0	12,6
Comet 1	70,7	29,1	77,1
Comet 2	80,7	31,7	74,0

Análisis estadístico.

Las poblaciones estudiadas (tratamientos), cumplieron con los requisitos de distribución normal, muestras independientes y homocedasticidad (Figura 13).

Comprobación de la homogeneidad de varianzas. El estadístico de Levene obtenido $p=6,78$ es mayor que $\alpha=0,05$ por lo que se acepta la igualdad de varianzas.

Verificación de la población normal. Los puntos en las gráficas individuales Q-Q se encuentran sobre sus respectivas líneas diagonales, con lo que se asegura que las poblaciones se encuentran normalmente distribuidas.

Biodegradación inducida de naproxeno bajo condiciones controladas de laboratorio

Estadístico de Levene	Grados de libertad		p
	Entre grupos	Dentro de grupos	
$1,18 \times 10^{16}$	5	6	6,78

Graficos Q-Q para verificar la normalidad de la población agrupados por tratamientos

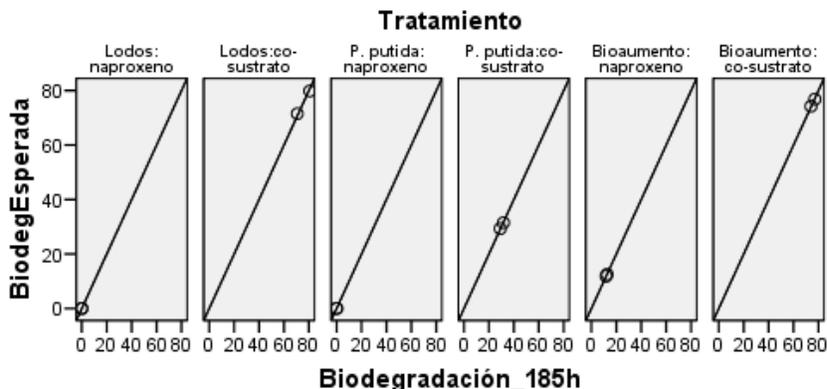


Figura 13. Verificación de la normalidad e igualdad de varianza en los ensayos realizados.

Con los resultados de biodegradación indicados en la Tabla 20, se realizó un análisis de varianza de una vía.

Hipótesis. $H_0 = \mu_{A1} = \mu_{A2} = \mu_{A3}$

$H_A =$ Al menos una media difiere del resto.

Nivel de significancia. $\alpha = 0,05$

Valores críticos y regiones de rechazo. Se rechaza la hipótesis nula (H_0) si el valor obtenido (p) es $\leq 0,05$.

Tabla 21. Resultados de ANOVA de una factor. Variable dependiente: Remoción_185h

	Suma de cuadrados	g. l.	Cuadrados medios	F	Valor p
Entre grupos	12496,644	5	2499,329	256,320	$6,60 \times 10^{-7}$
Intercepto	58,505	6	9,751		
Total	12555,149	11			

En la Tabla 21 se aprecia que la F observada con 5 y 6 grados de libertad proporciona un valor $p = 6,60 \times 10^{-7} < 0,05 = \alpha$, por tanto, se rechaza la H_0 , es decir, en este nivel de significancia se puede concluir que existen diferencias en el valor medio del porcentaje de biodegradación de al menos uno de los tratamientos evaluados.

Tabla 22. Comparaciones múltiples de Tukey HSD.

Tratamiento		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	p	Intervalo de confianza al 95%	
[I]	[J]				L. Inf	L. Sup
Lodos : naproxeno	Lodos : co-sustrato	-75,70	3,12263	0,000	-88,1276	-63,2724
	<i>P. putida</i> : naproxeno	0,00		1,000	-12,4276	12,4276
	<i>P. putida</i> : co-sustrato	-30,40		0,010	-42,8276	-17,9724
	Bioaumentación : naproxeno	-12,20		0,054	-24,6276	0,2276
	Bioaumentación : co-sustrato	-75,55		0,000	-87,9776	-63,1224
Lodos : co-sustrato	Lodos : naproxeno	75,70	3,12263	0,000	63,2724	88,1276
	<i>P. putida</i> : naproxeno	75,70		0,000	63,2724	88,1276
	<i>P. putida</i> : co-sustrato	45,30		0,000	32,8724	57,7276
	Bioaumentación : naproxeno	63,50		0,000	51,0724	75,9276
	Bioaumentación : co-sustrato	0,15		1,000	-12,2776	12,5776
<i>P. putida</i> : naproxeno	Lodos : naproxeno	0,00	3,12263	1,000	-12,4276	12,4276
	Lodos : co-sustrato	-75,70		0,000	-88,1276	-63,2724
	<i>P. putida</i> : co-sustrato	-30,40		0,001	-42,8276	-17,9724
	Bioaumentación : naproxeno	-12,20		0,054	-24,6276	,2276
	Bioaumentación : co-sustrato	-75,55		0,000	-87,9776	-63,1224
<i>P. putida</i> : co-sustrato	Lodos : naproxeno	30,40	3,12263	0,001	17,9724	42,8276
	Lodos : co-sustrato	-45,30		0,000	-57,7276	-32,8724
	<i>P. putida</i> : naproxeno	30,40		0,001	17,9724	42,8276
	Bioaumentación : naproxeno	18,20		0,008	5,7724	30,6276
	Bioaumentación : co-sustrato	-45,15		0,000	-57,5776	-32,7224
Bioaumentación : naproxeno	Lodos : naproxeno	12,20	3,12263	0,054	-,2276	24,6276
	Lodos : co-sustrato	-63,50		0,000	-75,9276	-51,0724
	<i>P. putida</i> : naproxeno	12,20		0,054	-,2276	24,6276
	<i>P. putida</i> : co-sustrato	-18,20		0,008	-30,6276	-5,7724
	Bioaumentación : co-sustrato	-63,35		0,000	-75,7776	-50,9224
Bioaumentación : co-sustrato	Lodos : naproxeno	75,55	3,12263	0,000	63,1224	87,9776
	Lodos : co-sustrato	-0,15		1,000	-12,5776	12,2776
	<i>P. putida</i> : naproxeno	75,55		0,000	63,1224	87,9776
	<i>P. putida</i> : co-sustrato	45,15		0,000	32,7224	57,5776
	Bioaumentación : naproxeno	63,35		0,000	50,9224	75,7776

El color rojo de los valores obtenidos de p hace referencia a que la comparación de medias es diferente.

Con los datos obtenidos del análisis de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer HSD (diferencia honestamente significativa), mostrado en la Tabla 22, se determinó qué medias fueron similares y cuáles fueron diferentes con el 95% de seguridad, asimismo, se obtuvieron los valores de homogeneidad por subgrupos para concluir qué tratamiento fue más adecuado para remover el fármaco.

Tabla 23. Resultados de homogeneidad por subgrupos con un 95% de intervalo de confianza.

Tratamiento	N	Subconjunto $\alpha = 0,05$		
		1	2	3
Lodos : naproxeno	2	0,00 %		
<i>P. putida</i> KT2440: naproxeno	2	0,00 %		
Bioaumentado : naproxeno	2	12,20 %		
<i>P. putida</i> KT2440: co-sustrato	2		30,40 %	
Bioaumentado : co-sustrato	2			75,55 %
Lodos : co-sustrato	2			75,70 %
p		0,054	1,000	1,000

Como se observa en la Tabla 23, con los resultados evaluados a las 185 h se crearon tres subconjuntos; en el primero, los tratamientos que tuvieron naproxeno como única fuente de carbono evidencian que el fármaco no se puede degradar como única fuente de carbono a corto plazo ya que con el 95% de seguridad se muestra que las medias de las poblaciones son similares. Por otro lado, el subconjunto 2 indica que el naproxeno pudo ser degradado en un 30,4% por *Pseudomonas putida* KT2440 cuando estuvo en presencia del benzoato de sodio como co-sustrato, del mismo modo, en el subconjunto 3 se muestran los resultados empleando el co-sustrato pero con los inóculos de bioaumentado y lodos activados (75,55% y 75,7% respectivamente) y se obtuvo que ambos métodos aportan resultados que no son diferentes estadísticamente pero que fueron el mejor tratamiento para biodegradar el naproxeno al tiempo establecido.

6. CONCLUSIONES

Se evaluó la biodegradabilidad aerobia rápida del naproxeno con el procedimiento normalizado OCDE 301 F: respirometría manométrica, obteniendo cero por ciento de biodegradación a los 28 días, lo que permite catalogarlo como un compuesto no fácilmente biodegradable. Sin embargo, con esta prueba se pudo evidenciar que el fármaco puede ser biodegradado al menos 18,77% mediante cometabolismo (7,75 mg/L).

Se determinó que el benzoato de sodio [720 mg/L] es el mejor compuesto para ser empleado como co-sustrato para la degradación del naproxeno cuando se emplea un inóculo de cultivo microbiano mixto de lodos activados. Lo anterior, debido a que fue la sustancia que mayor favoreció el incremento de biomasa. Asimismo, se observó que el consumo de oxígeno fue mayor respecto al de lactosa y el almidón.

Se eligió la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 para realizar el bioaumentación de los sistemas de biorreacción por ser la bacteria que degradó con mayor facilidad el benzoato de sodio [720 mg/L] como co-sustrato, al ser comparada con *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* y *P. alcaligenes*.

La técnica analítica de MEFS-CG aplicada a las muestras de cada tratamiento, indican que el porcentaje de biodegradación de naproxeno fue de 75,7% (4,6 mg/L de un total de 6 mg/L) y 78,6% (4 mg/L de un total de 5,1 mg/L), respectivamente, para los tratamientos con bioaumentación y lodos activados usando el co-sustrato, es decir 47% más que sólo empleando el cultivo axénico (1,6 mg/L de un total de 5,5 mg/L).

Se determinó que la cepa empleada de *Pseudomonas putida* KT2440 [10^7 UFC/mL] puede tolerar el naproxeno a concentración de 10 mg/L en corto plazo y puede biodegradar al naproxeno [1,6 mg/L] cuando se adiciona un inóculo pequeño [10^3 UFC/mL]. Sin embargo el metanol como disolvente del fármaco es tóxico para el inóculo, con lo cual se ve abatido el potencial de biodegradación de los compuestos químicos evaluados: mezcla de sustancias (34,1%), benzoato de sodio (29,8%) y naproxeno (0,9%).

El tratamiento en el que se degradó la mayor cantidad de fármaco fue en el que se empleó un inóculo de cultivo microbiano mixto de lodos activados sin adición de una fuente alterna de carbono (96,99%), sin embargo el tiempo requerido para removerlo fue de 639,5 h.

Con las cinéticas obtenidas a partir del modelo de Gompertz, se evaluó la degradación del naproxeno en todos los tratamientos a las 185 h y se obtuvo que en todos los casos, la adición de un co-sustrato disminuye el tiempo de biorreacción para la remoción del fármaco: 30,4% usando un cultivo axénico de *Pseudomonas putida* KT2440 (1,6 mg/L de un total de 5,5 mg/L), 75,7% para los tratamientos con inóculo microbiano de lodos activados (3,86 mg/L de 5,1 mg/L) y 75,5% para los sistemas donde se empleó la técnica de bioaumentación (4,53 mg/L de 6 mg/L), no obstante, la diferencia porcentual entre los dos últimos tratamientos no fue estadísticamente significativa.

7. RECOMENDACIONES

Para realizar el ensayo de inducción con bioaumento, se puede aclimatar la mezcla de inóculos durante una semana a modo de evitar la fase de adaptación (lag) y así disminuir el periodo de biodegradación por 80 h.

Para constatar la biodegradación del compuesto farmacéutico es necesario monitorear su transformación con la formación de metabolitos hasta su mineralización.

Otra forma para inducir la biodegradación del naproxeno es tomar los microorganismos del reactor de toxicidad (naproxeno : benzoato de sodio) presentes al final de los ensayos de biodegradabilidad o de los tratamientos con lodos activados y emplearlos como inóculo para bioaumentar los sistemas de inducción, es decir, con microorganismos pre adaptados.

Se puede adicionar más co-sustrato en el punto de inflexión de la curva de crecimiento (fase log) de modo que se puedan seguir sintetizando las enzimas para incrementar la biodegradación del naproxeno.

8. GLOSARIO

Bioaugmentación. Práctica de incrementar la población de bacterias nativas de un sistema de tratamiento de aguas con la adición de bacterias adaptadas selectivamente, las cuales han sido desarrolladas para aumentar los rangos de reducción orgánica o proporcionar la habilidad de degradar compuestos previamente considerados como difíciles o no biodegradables. Esta técnica no sustituye la población de bacterias existentes, pero aumenta su habilidad de responder a ciertas situaciones o degradar compuestos de la corriente de desechos, dando como resultado una mejora del tratamiento. Las minorías bacterianas juegan un papel muy importante en el tratamiento biológico del agua. (SOLBIO, 2010).

Biodegradación aerobia. Degradación biológica que se realiza con condiciones de concentración de O₂ libre de al menos 2 mg/L.

Bioestimulación. Adición de nutrientes como fósforo o nitrógeno que limitan la degradación del contaminante para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos *in situ*.

Biorremediación. Biotecnología diseñada para corregir o evitar los efectos de la contaminación química sobre el medio ambiente en la cual se aprovecha la capacidad catalítica de los seres vivos (enzimas) para aumentar la velocidad de degradación de un contaminante, asimismo, con esta tecnología se estudian los factores limitantes de la biodegradación y se actúa sobre ellos para acelerar el proceso.

Biotransformación con co-sustrato. Se trata de añadir un compuesto orgánico (análogo del contaminante), normalmente natural, que permita la inducción de las enzimas necesarias

para la degradación del compuesto no deseado, así como el mantenimiento de suficiente masa celular.

Cometabolismo. Proceso en el que un compuesto es degradado por un organismo sin proporcionar energía o sustratos para el crecimiento. Este término se utiliza con una doble definición: (1) proceso desarrollado fortuitamente por enzimas que son inducidas por una molécula diferente de aquella que se metaboliza, (2) procesos en los que los miembros de una comunidad microbiana metabolizan los subproductos metabólicos de otros.

Co-sustrato. Compuesto químico natural que induce el proceso biodegradativo de un compuesto orgánico.

Inducción. Proceso por el que un gen inactivo o con una actividad basal pasa a ser transcrito intensamente.

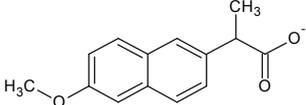
Repetibilidad. Indica el grado de acuerdo entre resultados mutuamente independientes de un ensayo, obtenidos utilizando el mismo método, en idénticos materiales, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y en un corto intervalo de tiempo.

Sintrofia. Situación nutricional que se da en un consorcio de organismos cuyas actividades metabólicas actúan de forma secuencial en la degradación de un compuesto sin que ninguno por separado sea capaz de degradarlo completamente. Un requisito importante de este fenómeno es la proximidad física, que minimiza la distancia a la que los compuestos difunden entre las células que establecen una relación sintrófica, las cuales se benefician mutuamente. (UGR, 2011).

9. ANEXOS

9.1. Características del naproxeno

Tabla 24. Propiedades físicas, químicas, seguridad y entrega del naproxeno

Nombre	Naproxeno. Ácido (S)-6-Metoxi-a-metil-2-naftalenacético. Ácido d-2-6-metoxi-2-naftil) propiónico	
Fórmula molecular	$C_{14}H_{14}O_3$	
Peso molecular	230,26	
Color y forma	Polvo cristalino blanco (AHFS, 2009; CPFEUM, 2004; McEvoy, 1993). Cristales de acetona-hexano (Merck & Co., 2006).	
Olor	Prácticamente inodoro (AHFS, 2009; CPFEUM, 2004; McEvoy, 1993).	
Punto de fusión	155 °C (Lide, 2007).	
Constante de acidez	pKa = 4,15 ± 0,3 (Seeber y Hoa, 2010).	
Coefficiente de partición: Octanol/agua (Kow)	3,18 (Seeber y Hoa, 2010; Hansch, Leo y Hoekman, 1995).	
Solubilidad	Ligeramente soluble en éter; soluble en metanol, cloroformo (Lide, 2007). Soluble en 25 partes de etanol (96%), 20 porciones de metanol, 15 partes de cloroformo. Prácticamente insoluble en agua y soluble en alcohol (Merck & Co., 2006; McEvoy, 1993). En agua, 15,9 mg/L a 25 °C (Yalkowsky y He, 2003). Soluble en metanol 60,8mg/mL y 46,7 mg/mL en etanol a 30 °C (Lefler, Bhagdeo y Villeneuve, 2007).	
Propiedades espectrales	Rotación específica: 66° a 25°C en cloroformo (Merck & Co., 2006).	
Presión de vapor	$1,89 \times 10^{-6}$ mmHg a 25°C (Seeber y Hoa, 2010; EPA EE.UU., 2009; Doucette, 2000; Bidleman, 1988; Lyman, 1985).	
Constante de Henry	$3,39 \times 10^{-10}$ atm*m ³ /mol a 25 °C (Seeber y Hoa, 2010; EPA EE.UU., 2009).	
Descomposición peligrosa	Emisión de humo acre y vapores cuando se calienta hasta la descomposición (Sax y Feiner, 1984).	
Condiciones de almacenamiento	Comprimidos convencionales, de liberación prolongada (con cubierta entérica) y tabletas deben guardarse en recipientes ámbar bien cerrados a 15 - 30°C. Suspensión oral debe ser almacenada en recipientes resistentes a la luz de 15 - 30°C, deben evitarse temperaturas superiores a 40°C (AHFS, 2009).	
Métodos de eliminación	Relleno sanitario, aunque las prácticas de eliminación están sujetas a revisión significativa. Antes de implementar la eliminación de la tierra residual (incluidos los lodos residuales), se debe consultar con agencias normativas ambientales para la orientación sobre las prácticas de eliminación aceptable.	
Métodos de fabricación	Tres consecutivas reacciones de catálisis de transferencia de fase (esterificación, alquilación, e hidrólisis) se utilizan para convertir los derivados del ácido fenilacético a naproxeno (Ullmann, 2003). El naproxeno, es preparado a partir de 2-naftol por la acilación de Friedel-Crafts, de 2-metoxinaftaleno y posterior reacción Willgerodt-Kindler. La configuración S que se obtiene de la mezcla racémica con el alcaloide cinchonidina es el isómero eficaz (Kirk-Othmer, 2001).	

9.2. Protocolo para la obtención de muestra e inóculo de lodos activados

Determinación de sólidos suspendidos totales (SST)

La materia suspendida o disuelta que está contenida en un lugar residual recibe el nombre de sólidos, éstos se pueden distinguir en tres categorías: sólidos totales, sólidos disueltos totales y sólidos disueltos volátiles. Con la finalidad de conocer el volumen de inóculo que debe adicionarse a los reactores, se determinaron solamente los sólidos totales.

Fundamento

Los Sólidos suspendidos totales (SST) miden elementos particulados, minerales (que corresponden en promedio al 30% de los lodos activados) y elementos orgánicos (microorganismos vivos y muertos). Los SST son la porción de los sólidos totales retenida por un filtro, por lo tanto es necesario hacer pasar una muestra bien mezclada por un filtro estándar de fibra de vidrio y el residuo contenido en el mismo se seca a peso constante a 103-105 °C. El aumento de peso con respecto al crisol vacío representa los sólidos totales.

Material

Crisoles Gooch, horno de secado a 103-105 °C, desecador, aparato de filtración a vacío, pinzas para crisol, balanza analítica con resolución de al menos 0,1 mg.

Procedimiento

- Colectar una muestra de aproximadamente 1L de lodos activados del tanque de aireación de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR).
- Mantener los lodos en aireación y agitación moderada durante 4 horas.

- Medir pH y si es necesario ajustar a la neutralidad con solución de H₂SO₄ 0,1 M.
- Dejar sedimentar los lodos media hora.
- Descartar el sobrenadante.
- Adicionar 1L de medio mineral para lavar los lodos.
- Dejar sedimentar, dejar poco medio mineral en los lodos, de tal manera que sean accesibles a futuros estudios.
- Lavar crisoles Gooch y secarlos.
- Insertar un disco de papel Whatman de microfibra de vidrio GF/A de 2,1 mm de diámetro (1,6 µm de tamaño de poro) con la cara rugosa hacia arriba del crisol.
- Colocar el crisol con el papel en la fuente de vacío y lavarlo con agua destilada.
- Eliminar toda el agua e introducir los crisoles en la estufa a 103 -105 °C durante 1 hora.
- Sacar los crisoles y conservarlos en el desecador. Dejar enfriar aproximadamente 40 minutos.
- Pesar los crisoles en la balanza analítica y comprobar que se encuentran a peso constante (Peso A)

Peso constante. Es la masa alcanzada cuando la diferencia entre dos pesadas sucesivas de la muestra a temperatura ambiente, después del proceso de secado, con un intervalo de 2 horas entre ellas, no exceda 0,0005 g (0,5 mg) (CPFEUM, 2004).

- Montar el aparato de filtración e iniciar la succión. Filtrar un volumen medido de muestra (5 o 10 mL). Retirar el crisol del aparato de filtrado.
- Secar en la estufa a 103-105 °C durante 1 ó 2 horas dependiendo de la cantidad de muestra.

- Sacar los crisoles y conservar en el desecador. Enfriar 40 minutos aproximadamente. Pesar en balanza analítica (Peso B). Repetir el ciclo de secado, enfriado, desecación y pesado hasta obtener un peso constante.

$$SST = \frac{(\text{peso B} - \text{peso A}) [\cancel{g}]}{\text{Volumen de muestra} [\cancel{mL}]} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 [\cancel{g}]} \times \frac{1000 \cancel{mL}}{1 \text{ L}} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

Nota: El lodo del inóculo debe de tener máximo 3- 5 g SST/L en su concentración final, es decir la de los reactores. Si la concentración de SST es alta, diluir con medio mineral hasta obtener la concentración adecuada.

Preparación del inóculo a partir de sobrenadante

El inóculo también puede obtenerse del sobrenadante de la sección sedimentable de los lodos activados.

Fundamento

Ésta técnica se apoya en que en esta fracción se encuentra la mayor cantidad de bacterias cultivables (Vázquez-Rodríguez y Beltrán, 2004).

Procedimiento

- Se toma una muestra de de 1L de lodos activados del tanque de aireación de una planta de tratamiento de aguas residuales.
- Dejar airear 4 horas inmediatamente después del muestreo.
- Centrifugar las muestras 4 minutos a 500 x g o dejar sedimentar 30 minutos.
- Recuperar el sobrenadante en otro matraz, mantener en agitación.
- Tomar una alícuota que represente el 1% del volumen total del medio de biorreacción y adicionarla al contenedor donde se realizará el ensayo experimental.

9.3. Cálculo de la demanda teórica de oxígeno (DTO)

El procedimiento OCDE 301 F indica que la sustancia de prueba se debe adicionar como única fuente de carbono a una concentración de 100 mg/L ó de 50 – 100 mg DTO/L, si es que se conoce la composición de la sustancia y su pureza (OCDE, 1992).

Para el caso del naproxeno, la DTO se calculó sin considerar la nitrificación, debido a que el compuesto no contiene ningún átomo de nitrógeno:

$$DTO_{NH_3} = \frac{16 \left[2C + \frac{1}{2}(H - Cl - 3N) + 3S + \frac{5}{2}P + \frac{1}{2}Na - O \right]}{PM}; mg_{O_2} / mg_{sustancia}$$

Donde:

C = Número de átomos de carbono

H = Número de átomos de hidrógeno

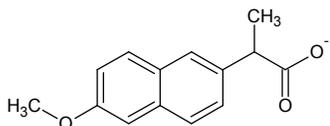
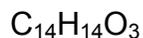
Cl = Número de átomos de cloro

N = Número de átomos de nitrógeno

Na= Número de átomos de sodio

O = Número de átomos de oxígeno

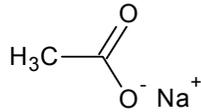
a) Naproxeno:



C=14; H=14 y O=3

$$DTO_{NH_3} = \frac{16 \left[2(14) + \frac{1}{2}(14) - 3 \right]}{230,27} = 2,22 mg_{O_2} / mg_{naproxeno}$$

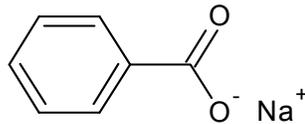
b) **Acetato de sodio:** CH_3COONa



C=2; H=3; O=2; Na=1

$$DTO_{\text{NH}_3} = \frac{16 \left[2(2) + \frac{1}{2}(3) + \frac{1}{2}(1) - 2 \right]}{82} = 0,78 \text{ mgO}_2 / \text{mg}_{\text{acetato de sodio}}$$

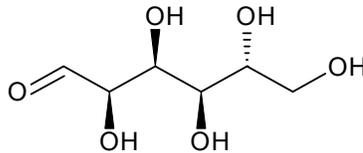
c) **Benzoato de sodio:** $\text{NaC}_6\text{H}_5\text{CO}_2$



C=7; H= 5; O=2 y Na=1

$$DTO_{\text{NH}_3} = \frac{16 \left[2(7) + \frac{1}{2}(5) + \frac{1}{2}(1) - 2 \right]}{144,1} = 1,66 \text{ mgO}_2 / \text{mg}_{\text{benzoato de sodio}}$$

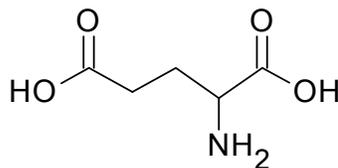
d) **Glucosa:** $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$



C=6; H=12, O=6

$$DTO_{\text{NH}_3} = \frac{16 \left[2(6) + \frac{1}{2}(12) - 6 \right]}{180,16} = 1,06 \text{ mgO}_2 / \text{mg}_{\text{glucosa}}$$

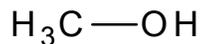
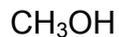
e) **Ácido glutámico** $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$



C=5; H= 9; N=1; O=4

$$DTO_{\text{NH}_3} = \frac{16 \left[2(5) + \frac{1}{2}(9-3) - 4 \right]}{147,1} = 0,98 \text{ mgO}_2 / \text{mg}_{\text{ácido glutámico}}$$

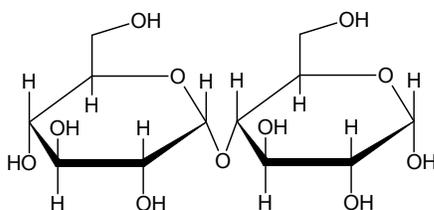
f) Metanol



C=1; H= 4; O=1

$$DTO_{NH_3} = \frac{16 \left[2(1) + \frac{1}{2}(4) - 1 \right]}{32} = 1,5 mg_{O_2} / mg_{\text{metanol}}$$

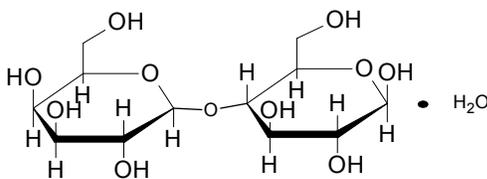
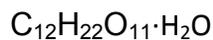
g) Almidón soluble (maltosa) C₁₂H₂₂O₁₁



C=12; H= 22; O=11

$$DTO_{NH_3} = \frac{16 \left[2(12) + \frac{1}{2}(22) - 11 \right]}{342,3} = 1,12 mg_{O_2} / mg_{\text{almidón soluble}}$$

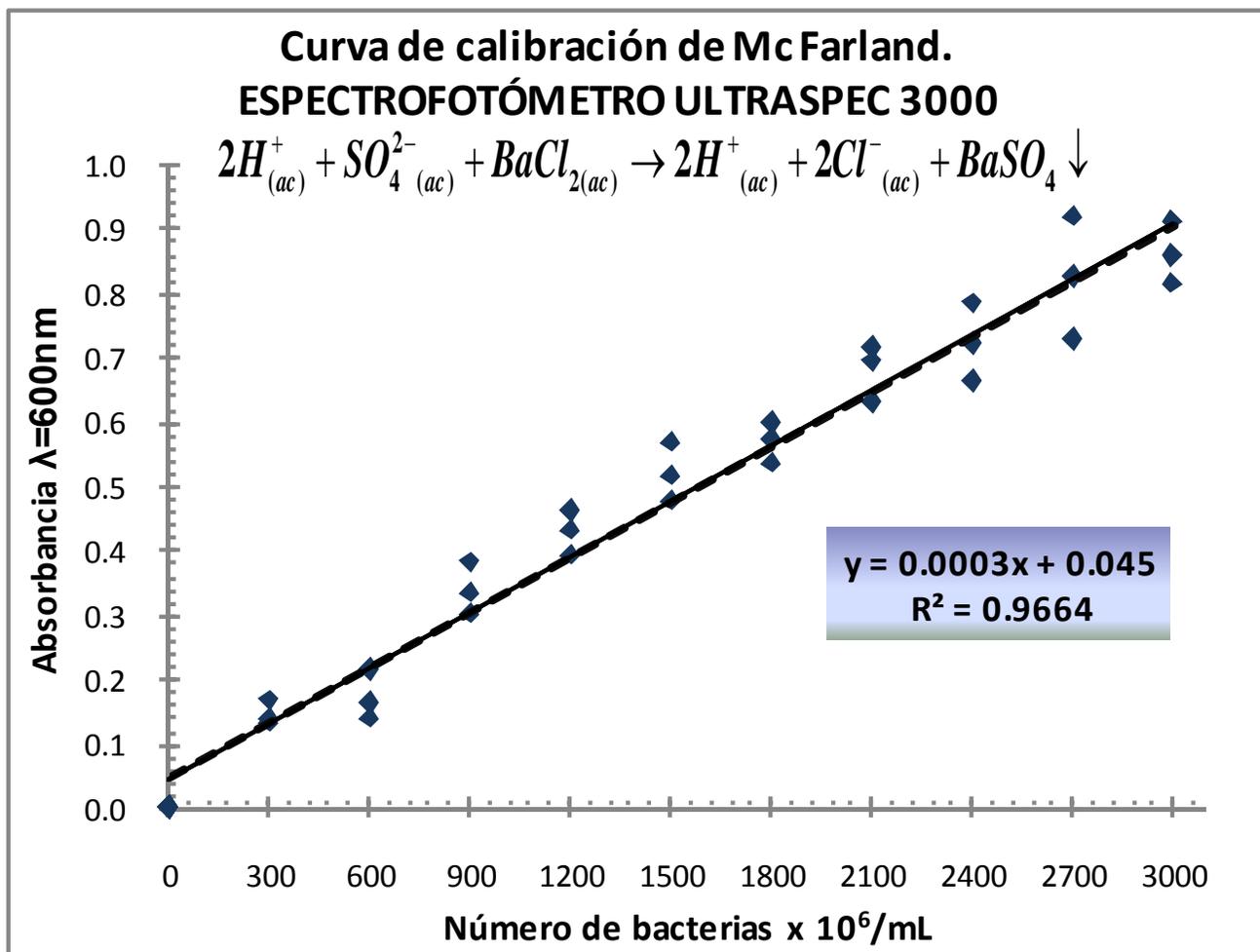
h) Lactosa monohidratada



C=12; H= 24; O=12

$$DTO_{NH_3} = \frac{16 \left[2(12) + \frac{1}{2}(24) - 12 \right]}{360,31} = 1,06 mg_{O_2} / mg_{\text{lactosa monohidratada}}$$

9.4. Curva de calibración de McFarland



Gráfica 14. Curva de Mc Farland realizada en espectrofotómetro (A_{600}).

$$x = \frac{y - 0,0462}{0,0003}$$

Donde:

$x = \text{No. bacterias} \times 10^6 / mL$

$y = \text{Absorbancia } \lambda_{600nm}$

9.5. Procedimiento OCDE 301 F: respirometría manométrica

Tomado y modificado de APHA *et al*, 1998

Introducción

Para emplear este método, se debe conocer la fórmula de la sustancia de prueba y su pureza o proporción relativa de los principales componentes, por tanto se debe calcular la demanda teórica de oxígeno. Si la DTO no puede ser calculada se debe determinar la DQO, pero si se obtienen altos valores de biodegradación, éstos pueden ser obtenidos si la sustancia de prueba es oxidada incompletamente en la prueba de DQO. Las sustancias insolubles y volátiles pueden ser evaluadas considerando las debidas precauciones.

Principio de la prueba:

Un volumen de medio mineral inoculado conteniendo una concentración conocida de sustancia de prueba (100 mg sustancia de prueba/L; dando al menos 50-100 mg de DTO/L), como única fuente de carbono, es agitada en un frasco cerrado a temperatura constante (± 1 °C) durante 28 días. El consumo de O₂ es determinado ya sea por medir la cantidad de oxígeno (generado electrolíticamente) requerido para mantener constante el volumen del gas en el frasco del respirómetro, o por el cambio en el volumen o presión (o una combinación de los dos). El CO₂ generado es absorbido en una solución de KOH 30% (m/v). La cantidad de O₂ tomado por la población microbiana durante la biodegradación de la sustancia de prueba (corregida por la incorporada por

el inóculo solo corriendo en paralelo) es expresada como un porcentaje de la DTO o, menos satisfactoriamente como DQO. Opcionalmente, la biodegradación primaria puede ser calculada también de análisis químicos específicos suplementarios hechos al inicio y al final de la incubación, y la biodegradación última por análisis de DQO.

Descripción del método:

- Equipo de laboratorio: respirómetro, recirculador de agua con control de temperatura (± 1 °C) y analizador de carbono (opcional).
- Debe de utilizarse *agua desionizada o destilada*, libre de concentraciones inhibitorias de sustancias tóxicas. No debe de contener más de un 10% de carbono orgánico disuelto, pues introduciría un error a la sustancia de prueba. Se requiere agua con alta pureza para eliminar valores altos del blanco. La contaminación del agua puede ser causada por impurezas propias, por las resinas de intercambio iónico y material lisado de bacterias y algas. Para cada corrida de pruebas, usar un sólo lote de agua a la que previamente se le habrá determinado la concentración de COD presente.
- Las *soluciones patrón* para medio mineral se describen en la Tabla 25. Considerar que se deben esterilizar las soluciones A, C y D con calor húmedo. Para el caso de la solución de CaCl_2 (B), esterilizar por filtración por membrana ya que con el calor el compuesto precipita. Conservar en refrigeración hasta su uso.
- La *preparación del medio mineral* se realiza del siguiente modo: mezclar 10 mL de la solución (A) con 800 mL de agua, enseguida agregar 1 mL de las soluciones (B), (C) y (D) y aforar a un litro con agua.

- Solución estándar para la sustancia de prueba. En caso de tratarse de una sustancia poco soluble, ver más adelante: Evaluación de la biodegradabilidad de compuestos poco solubles.
- *Inóculo.* Puede ser obtenido de diferentes fuentes: lodos activados, efluente de lodos, aguas superficiales, suelos o de una mezcla de éstos.
- Preacondicionamiento del inóculo. El inóculo puede ser preacondicionado al medio mineral o temperatura pero nunca a la sustancia de prueba.

Tabla 25. Composición de las soluciones estándar para preparar el medio mineral

Solución A pH = 7,4	Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)	8,50 g
	Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)	21,75 g
	Fosfato dibásico de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	33,40 g
	Cloruro de amonio (NH_4Cl)	0,50 g
Solución B	Cloruro de calcio (CaCl_2)	27,50 g
	o cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	36,40 g
Solución C	Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22,50 g
Solución D	Cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,25 g
*Aforar cada solución a 1L. .		

Preparación de los reactores

- Preparar una solución de prueba y de sustancias de referencia, en frascos separados, en medio mineral equivalente a una concentración normalmente de 100 mg de sustancia química/L (dando de 50-100 mg DTO/L), usar soluciones estándar. Calcular la DTO en base a la formación de sales de NH_4^+ a menos que la nitrificación sea anticipada, cuando el cálculo sea basado en la formación de

NO₃⁻. Determinar los valores de pH y ajustar a 7.4 ± 0.2 si es necesario. Las sustancias pobremente solubles deberán de ser agregadas al final.

- Cuando se determine la toxicidad de la sustancia de prueba, preparar solución mineral que contenga la sustancia de prueba y la de referencia en las mismas concentraciones que las soluciones individuales.
- Si se requiere medición de la degradación abiótica, preparar un biorreactor con solución de sustancia de prueba normalmente de 100 mg de DTO/L que ha sido esterilizada con la adición de una sustancia tóxica a una concentración apropiada como el HgCl₂ [10 mg/L].
- Introducir el volumen necesario de solución de sustancias de prueba y referencia, respectivamente. En reactores respirométricos al menos por duplicado. Adicionar un frasco con medio mineral (para el control del inóculo) y si se requiere una mezcla de sustancia de Sref+SPba en una solución esterilizada con HgCl₂. Si la sustancia es pobremente soluble, agregarla directamente en esta etapa en base a peso/volumen.

Número de reactores

En una corrida típica, el número de matraces serán:

- Frasco 1 y 2 Sustancia de prueba e inóculo (prueba de sustención);
- Frasco 3 y 4 Sólo inóculo (blanco del inóculo);
- Frasco 5 Sustancia de referencia e inóculo (control de procedimiento);
- Frasco 6 Sustancia de prueba y agente esterilizante (control abiótico estéril)
- Frasco 7 Sustancia de prueba, compuesto de referencia e inóculo (control de toxicidad).

Procedimiento

- Permitir a los frascos alcanzar la temperatura deseada y posteriormente inocular los reactores adecuadamente con lodos activados preparados u otra fuente de inóculo para dar una concentración de SST no mayor a 30 mg/L. Ensamblar el equipo, comenzar la agitación, revisar que el equipo esté suministrando oxígeno y empezar con la medición de incorporación de O₂. Usualmente no se requiere mayor atención que tomar las lecturas necesarias y monitorearlas diariamente para confirmar la temperatura y agitación constantes.
- Cuando se utiliza un respirómetro automático, se obtiene un registro de incorporación de O₂ continuo de tal modo que la ventana de 10 días se reconoce fácilmente. Para respirómetros no automáticos, es conveniente realizar lecturas diariamente.
- Calcular la incorporación de O₂ de las lecturas tomadas en intervalos regulares y frecuentes de tiempo usando los métodos dados por el fabricante del equipo. Al final de la incubación, normalmente de 28 días, medir el pH del contenido de los frascos, especialmente si la incorporación de O₂ es menor o mayor que la DTO de NH₄⁺ para los compuestos químicos que contienen nitrógeno.
- Si se requiere, retire muestra de los reactores, sólo al inicio o al final del experimento, para análisis de carbono orgánico disuelto (COD) y/o de la sustancia específica. En el retiro inicial, asegúrese que el volumen restante de la solución que contiene la sustancia de prueba sea conocido. Cuando el O₂ es tomado por una sustancia de prueba que contiene nitrógeno, determine el incremento en concentración de NO₂⁻ y NO₃⁻ después de los 28 días y calcule la corrección de O₂ consumido por la nitrificación.

Evaluación de la biodegradabilidad de compuestos poco solubles

- Mientras los líquidos homogéneos raramente presentan problemas, se recomienda que los materiales sólidos sean homogeneizados por un medio adecuado para evitar errores debidos a la no homogeneidad. Se debe tomar especial cuidado cuando se requieren pocos miligramos de muestras representativas provenientes de la mezcla de sustancias con grandes cantidades de impurezas.
- Se pueden utilizar varias formas de agitación durante la prueba. Se debe tener cuidado de utilizar sólo una agitación para mantener a las sustancias dispersas, y evitar un sobrecalentamiento, espuma excesiva y fuerzas de corte.
- Un emulsificador que provea una adecuada dispersión de la sustancia química. Éste no debe ser tóxico para las bacterias y lo más importante es que no debe causar espuma bajo las condiciones de prueba.
- Los mismos criterios aplican para solventes emulsificantes.
- No es recomendable que se utilicen acarreadores sólidos para la sustancia de prueba sólida, pero éstos pueden ser usados para sustancias oleosas.
- Cuando son utilizadas sustancias auxiliares, emulsificadores, solventes y acarreadores, se debe de correr un blanco que contenga las sustancias auxiliares.
- Cualquiera de las cuatro pruebas respirométricas (301 B, 301 C, 301 D o 301 F) pueden ser utilizadas para el estudio de biodegradabilidad de compuestos poco solubles.

DATOS Y REPORTE

Tratamiento de resultados

- Los datos deben ser incorporados en una hoja de datos adjunta.
- Primero, calcular DBO (mg O₂/mg sustancia de prueba) ejercido después de cada periodo de tiempo al dividir la incorporación de O₂ (mg) de la sustancia de prueba corregida por la obtenida en el blanco, por el peso de la sustancia de prueba usada.

Ejemplo.

$$DBO = \frac{mg_{O_2} \text{ incorporado por la sustancia de prueba} - mg_{O_2} \text{ incorporado por el blanco}}{mg \text{ sustancia de prueba en el reactor}}$$

- Calcular el % de biodegradación.
- Cuando se hacen determinaciones opcionales de la sustancia específica y/o el COD, calcular el porcentaje de degradación.

Validación de resultados

- La incorporación de O₂ del inóculo blanco es normalmente 20 – 30 mg O₂/L y no deberá ser mayor a 60 mg/L en 28 días. Los valores mayores a 60 mg/L requieren una examinación crítica de los datos y la técnica experimental. Si el valor de pH se sale del rango 6,0 – 8,5 y el consumo de oxígeno por la sustancia de prueba menor al 60% de la DTO, la prueba deberá ser repetida con una concentración más baja de la sustancia de prueba.

9.5.1. Uso del Respirómetro AER-200 *Challenge technology*

El respirómetro *AER-200 Respirometer (Challenge technology)* está diseñado para contener en un sistema cerrado, una muestra líquida y un espacio libre (*headspace*) en el cual se incorpora una cantidad conocida O_2 con la finalidad de mantener constante su concentración en el medio.



Figura 14. Componentes del Respirómetro AER-200 Challenge Technology

El oxígeno se suministra a un colector múltiple (*manifold*), que distribuye el gas a 8 celdillas comunicadas a 8 reactores; si en éstos no hay requerimiento de O_2 , entonces se liberará un frasco de salida que a su vez sirve para compensar la presión atmosférica.

En la Figura 14 se muestra de manera general, la secuencia de procesos dentro del respirómetro.

Funcionamiento del respirómetro AER-200 Challenge Technology

El Respirómetro AER-200 utiliza unas celdillas que contienen aceite a través del cual pasan burbujas de O₂ de volumen constante ($\approx 0,06$ mgO₂/burbuja), que son atraídas hacia los reactores en respuesta a una caída de presión causada por su consumo. Para evitar cambios de presión debido al CO₂, producto de la respiración, éste es removido con una trampa de solución de KOH al 30%. El registro del consumo de O₂ se realiza cuando cada burbuja atraviesa el aceite e interfiere con un haz de luz que pasa a través de las celdas cuyo volumen es proporcional al O₂ consumido considerando las constantes obtenidas de la calibración realizada por el fabricante (Tabla 26).

Se deben establecer las condiciones basales del equipo respirométrico antes de iniciar los ensayos:

- Verificar que el flujo de oxígeno sea el adecuado (2 burbujas/s en el frasco de salida de O₂ que mantiene la presión constante);
- Confirmar que el volumen de aceite de las celdillas, en su región de salida, tenga una altura tal que en cada celda salga el mismo número de burbujas cuando en todas se mantiene la misma presión dada por el frasco de salida de O₂; de no ser así, se debe de regular adicionando o quitando aceite a cada celdilla.

Previo a la realización de cualquier ensayo respirométrico, debe realizarse una curva de verificación de la repetibilidad de las celdas del equipo como se indica en el anexo 9.6.

Procedimiento

- i. Encender el sistema respirométrico y durante ≈ 20 minutos, verificar la repetibilidad de las celdas (anexo 9.6) a razón de 2 burbujas/s.
- ii. Colocar en el respirómetro los biorreactores tapados con el contenido adecuado de medio de cultivo e inóculo y permitir durante que alcancen la temperatura deseada y velocidad de agitación hasta la formación del vórtice (aproximadamente 600 rpm).
 - Si se adicionará algún compuesto como fuente de carbono, reducir la agitación a 300 rpm, y agregarla dejando mezclar durante 5 minutos (si la sustancia es poco soluble, realizar el procedimiento indicado en el anexo 9.5. “*Evaluación de la biodegradabilidad de compuestos poco solubles*”. Tapar los reactores
 - Si se requiere realizar cuantificación microbiana, destapar y tomar una alícuota de 50 mL de cada reactor.
 - Si se desea, en este paso se puede verificar que la concentración de oxígeno disuelto en todos los reactores sea de ~ 7 mg/L en la Ciudad de México.
- iii. Colocar las trampas de CO₂ (KOH al 30%) y dejar que los biorreactores se nivelen a presión atmosférica colocando una aguja en la septa de la tapa y establecer la velocidad de agitación deseada durante 5 minutos.
- iv. Quitar las agujas e iniciar la dosificación y monitoreo de oxígeno.
- v. Cuando ya no se observa consumo de oxígeno significativo, detener el sistema respirométrico.
 - Si se desea, al final de la incubación, medir el pH del contenido de los reactores, especialmente si el consumo de O₂ fue bajo o mayor que la DTO.

9.6. Repetibilidad de las celdas del Respirómetro *AER-200*

Challenge Technology previo a cada ensayo.

Antes de iniciar cualquiera de los ensayos de consumo de oxígeno, se verificó que bajo las mismas condiciones de presión, por todas las celdas pasa la misma cantidad de oxígeno a razón de 2 burbujas/s (repetibilidad). Para tal efecto, se debe realizar el siguiente procedimiento:

- a) Encender el equipo respirométrico y la computadora, abrir la aplicación AER-8U.
- b) Abrir el tanque de oxígeno hasta observar en el regulador una presión entre 2-3 psi.
- c) Colocar un tapón en el sitio donde se compensa la presión atmosférica del frasco de salida de oxígeno residual de tal modo que todo el gas sea liberado por las celdas de flujo con aceite (Figura 14).
- d) Comenzar a registrar el paso de oxígeno por las celdas en un archivo nuevo de la aplicación AER-8U y realizar la compilación de datos de consumo durante al menos 20 minutos.

Si se observa que el número de burbujas que pasan a través de la celda es mayor a lo esperado (2 burbujas por segundo en el frasco de salida de O₂) se debe cerrar un poco la llave reguladora del paso de oxígeno y comenzar un nuevo archivo. Si se observan claras diferencias entre las pendientes de cada celdilla, es conveniente balancerlas adicionando o quitando aceite de tal modo que: (1) si alguna celda tiene pendiente mayor a las otras, se debe disminuir para emparejarla con las celdas adyacentes adicionando un poco de aceite a la misma; y (2) si la pendiente para alguna(s) celdas

es menor que las otras y se desea incrementar su valor, entonces se debe quitar un poco de aceite para nivelarla con las otras.

IMPORTANTE. Debido a que cada celda es independiente entre sí, no es suficiente colocar el mismo volumen de aceite en cada una, ya que el nivel adecuado, sólo depende de la presión necesaria para que en todas las celdillas pase la misma cantidad de burbujas del gas bajo las mismas condiciones.

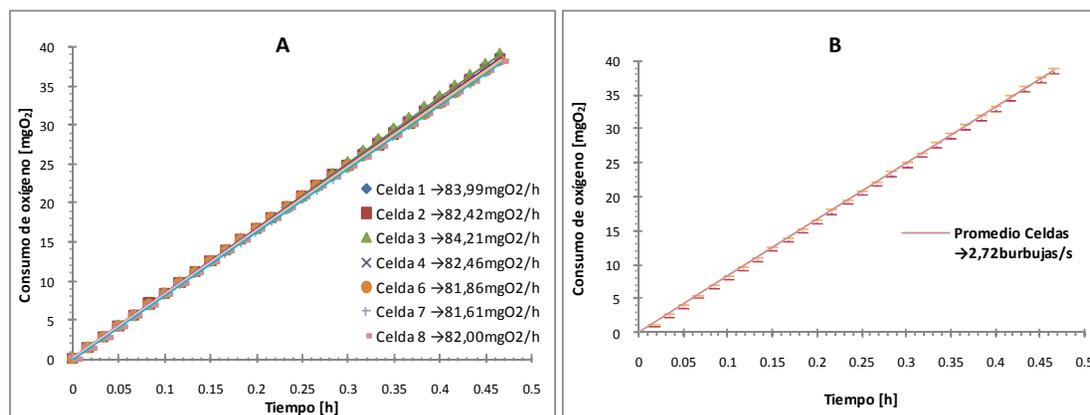
Tabla 26. Datos de certificado de calibración otorgado por el fabricante. Las celdas fueron calibradas con C.V. $\pm 0,01\%$ de acuerdo con los estándares de calibración de *Challenge Technology*.

NOMBRE		Celda 1 2425	Celda 2 2426	Celda 3 2427	Celda 4 2428	Celda 5 2429	Celda 6 2430	Celda 7 2431	Celda 8 2432
F. C.*	mL/burbuja (15 °C-35 °C)	0,0453	0,0457	0,0456	0,0457	0,0451	0,0455	0,0444	0,0455
	mg O ₂ /burbuja (25 °C, 1 atm)	0,0589	0,0595	0,0593	0,0594	0,0587	0,0591	0,0577	0,0592

* F. C. = Factor de Calibración

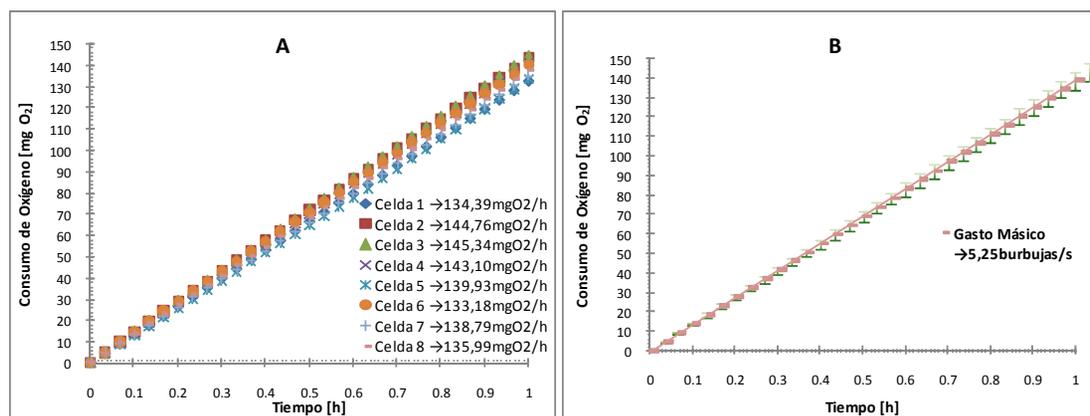
Para la obtención del gasto de oxígeno en cada celda [mg O₂/h ó burbujas/s], se debe considerar el factor de calibración dado por el fabricante (Tabla 26). En las gráficas (A) se indica la tasa de consumo en mgO₂/h para cada celda empleada; en las gráficas (B) se muestra el promedio de las curvas individuales con sus respectivas barras de desviación estándar, también se indica el gasto másico real que está siendo suministrado por el regulador que está conectado al tanque de oxígeno.

Validación del sistema respirométrico.



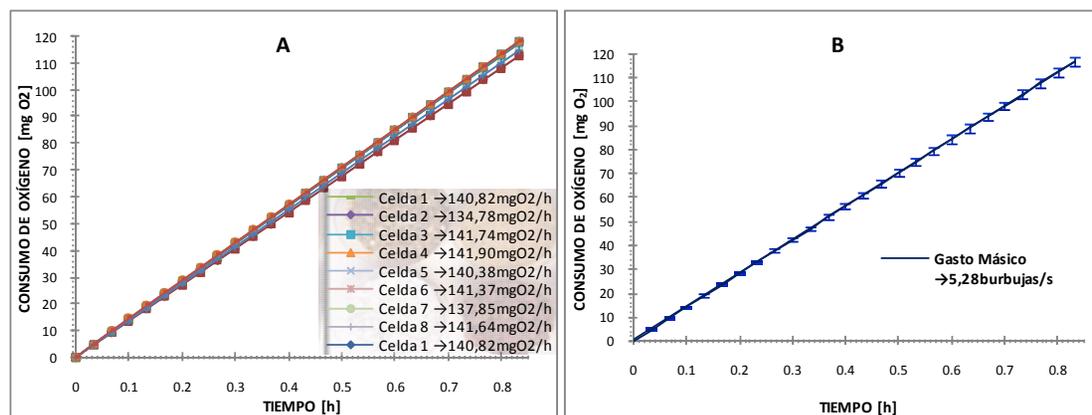
Gráfica 15. Verificación de la repetibilidad previo a la validación del sistema respirométrico. A) Consumo de oxígeno por cada celda con su respectiva tasa de suministro del gas; B) Promedio de consumo de oxígeno de las ocho celdas empleadas.

Evaluación de la biodegradabilidad del naproxeno empleando el procedimiento OCDE 301F: Respirometría manométrica.



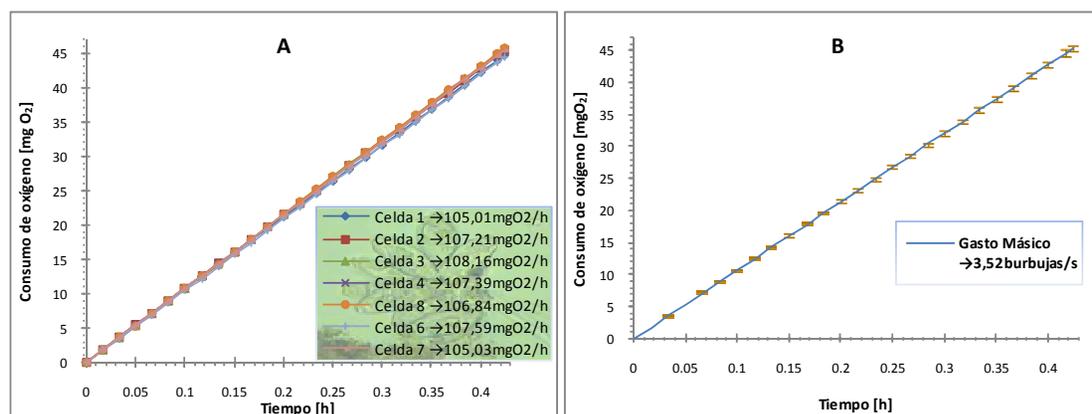
Gráfica 16. Verificación de la repetibilidad previo a la evaluación de la biodegradabilidad de naproxeno. A) Consumo de oxígeno por cada celda con su respectiva tasa de suministro del gas. B) Promedio de consumo de oxígeno de las ocho celdas empleadas.

Selección de co-sustrato.



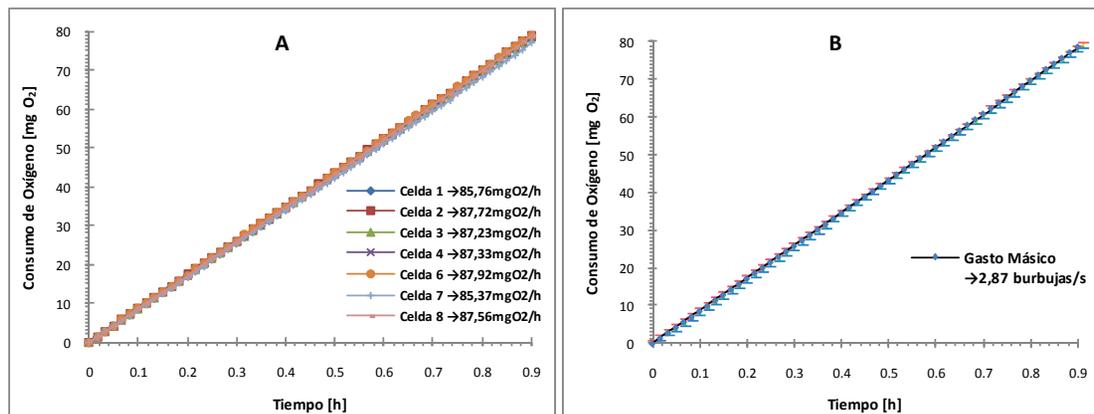
Gráfica 17. Verificación de la repetibilidad previo a la selección del co-sustrato. A) Consumo de oxígeno por cada celda con su respectiva tasa de suministro del gas. B) Promedio de consumo de oxígeno de las ocho celdas empleadas.

Inducción de la biodegradación de naproxeno por cometabolismo con inóculo de lodos activados.



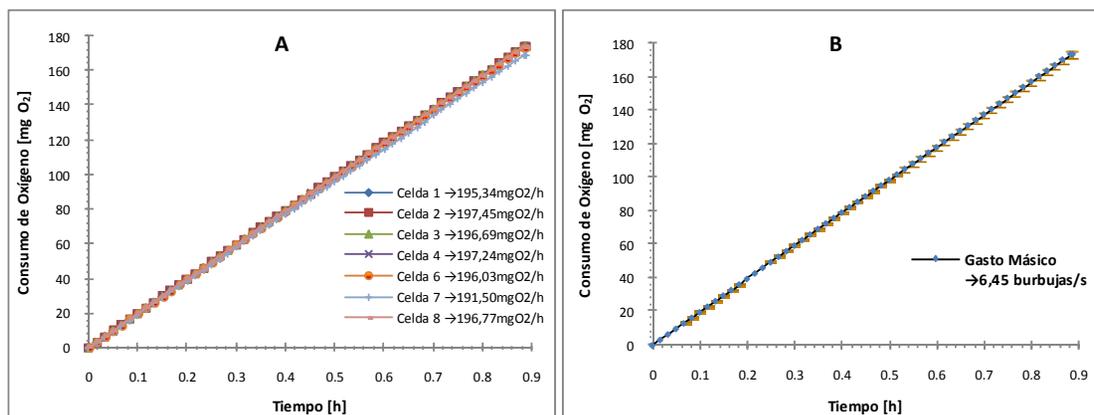
Gráfica 18. Verificación de la repetibilidad previo al ensayo de inducción de la biodegradación de naproxeno por cometabolismo con inóculo de lodos activados. A) Consumo de oxígeno por cada celda con su respectiva tasa de suministro del gas. B) Promedio de consumo de oxígeno de las ocho celdas empleadas.

Inducción de la biodegradación de naproxeno por co-sustrato con inóculo de *Pseudomonas putida* KT2440.



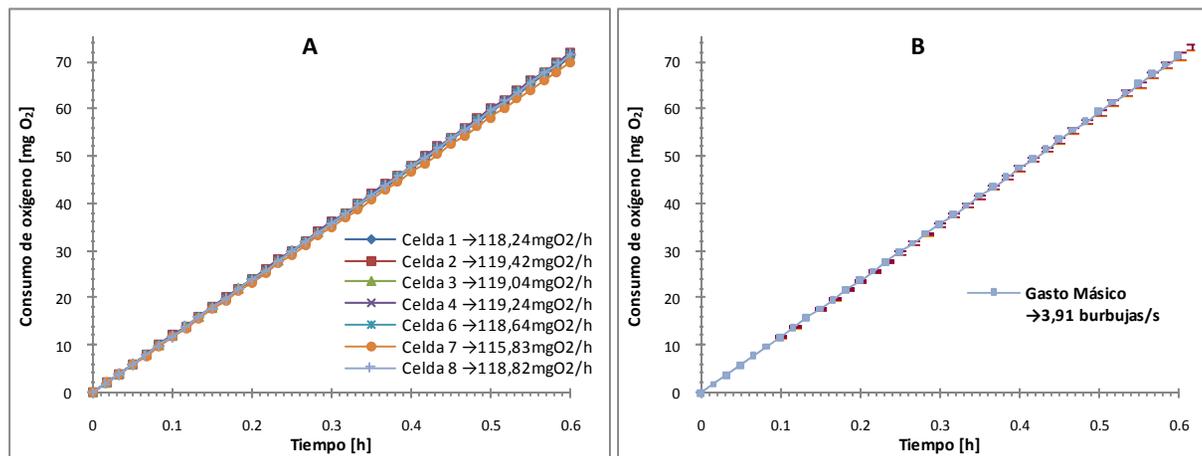
Gráfica 19. Verificación de la repetibilidad previo al ensayo de inducción de la biodegradación de naproxeno por cometabolismo por co-sustrato con *Pseudomonas putida* KT2440. A) Consumo de oxígeno por cada celda con su respectiva tasa de suministro del gas. B) Promedio de consumo de oxígeno de las ocho celdas empleadas

Adaptación de la comunidad microbiana.



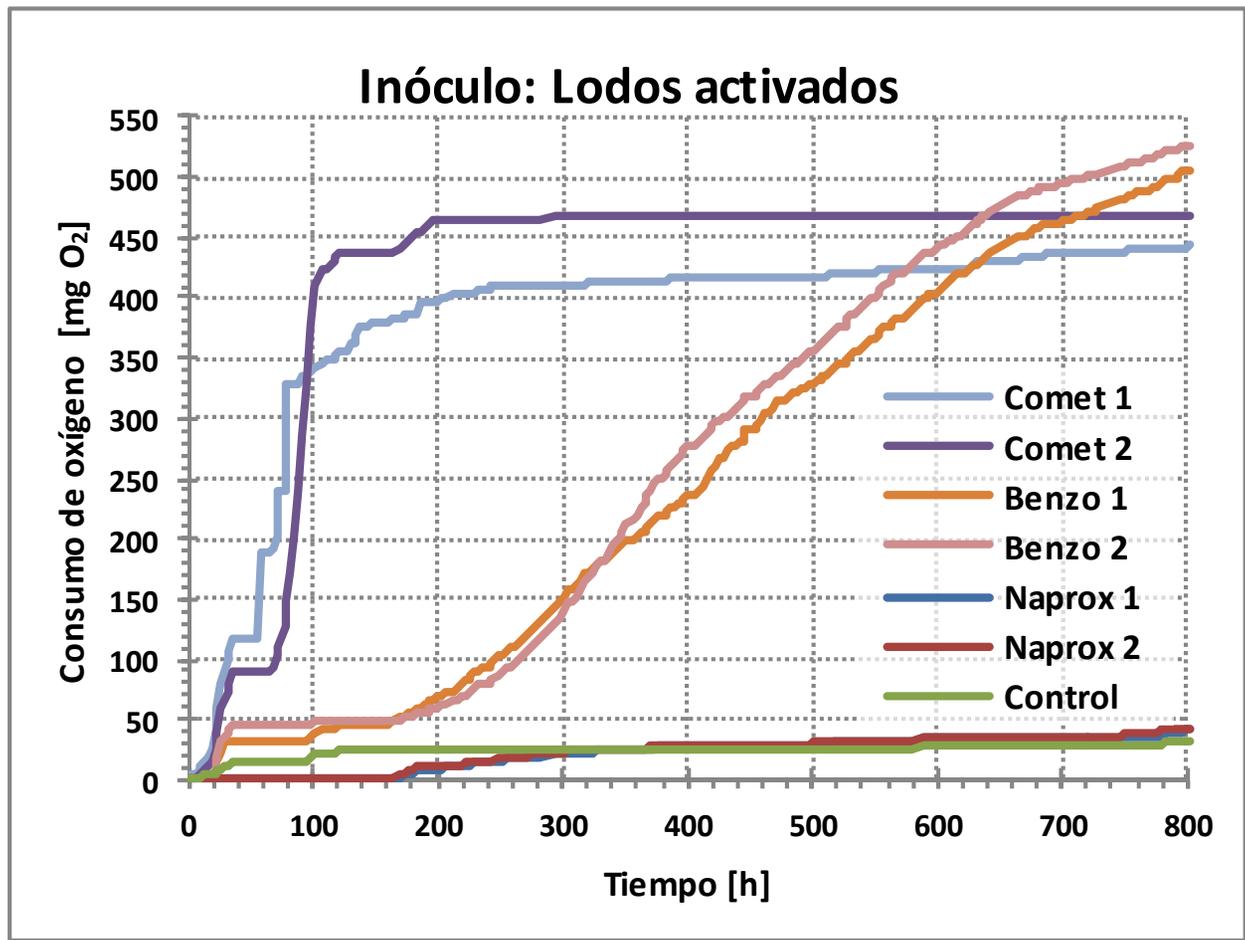
Gráfica 20. Verificación de la repetibilidad previo al ensayo de adaptación de la comunidad microbiana. A) Consumo de oxígeno por cada celda con su respectiva tasa de suministro del gas. B) Promedio de consumo de oxígeno de las ocho celdas empleadas.

Inducción de la biodegradación de naproxeno por cometabolismo y bioaumentación.

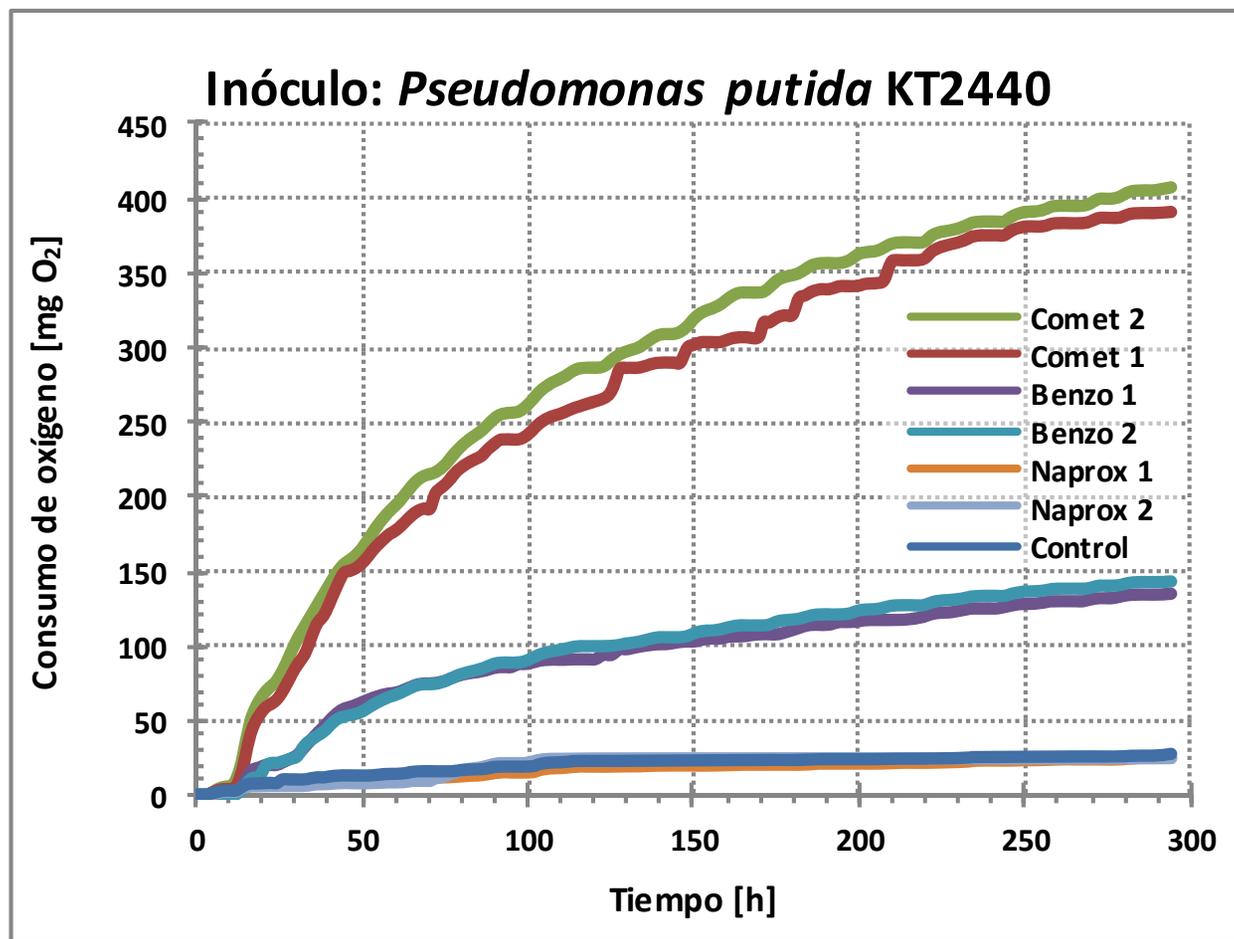


Gráfica 21. Verificación de la repetibilidad previo al ensayo de inducción de la biodegradación de naproxeno por cometabolismo y bioaumentación. A) Consumo de oxígeno por cada celda con su respectiva tasa de suministro del gas. B) Promedio de consumo de oxígeno de las ocho celdas empleadas.

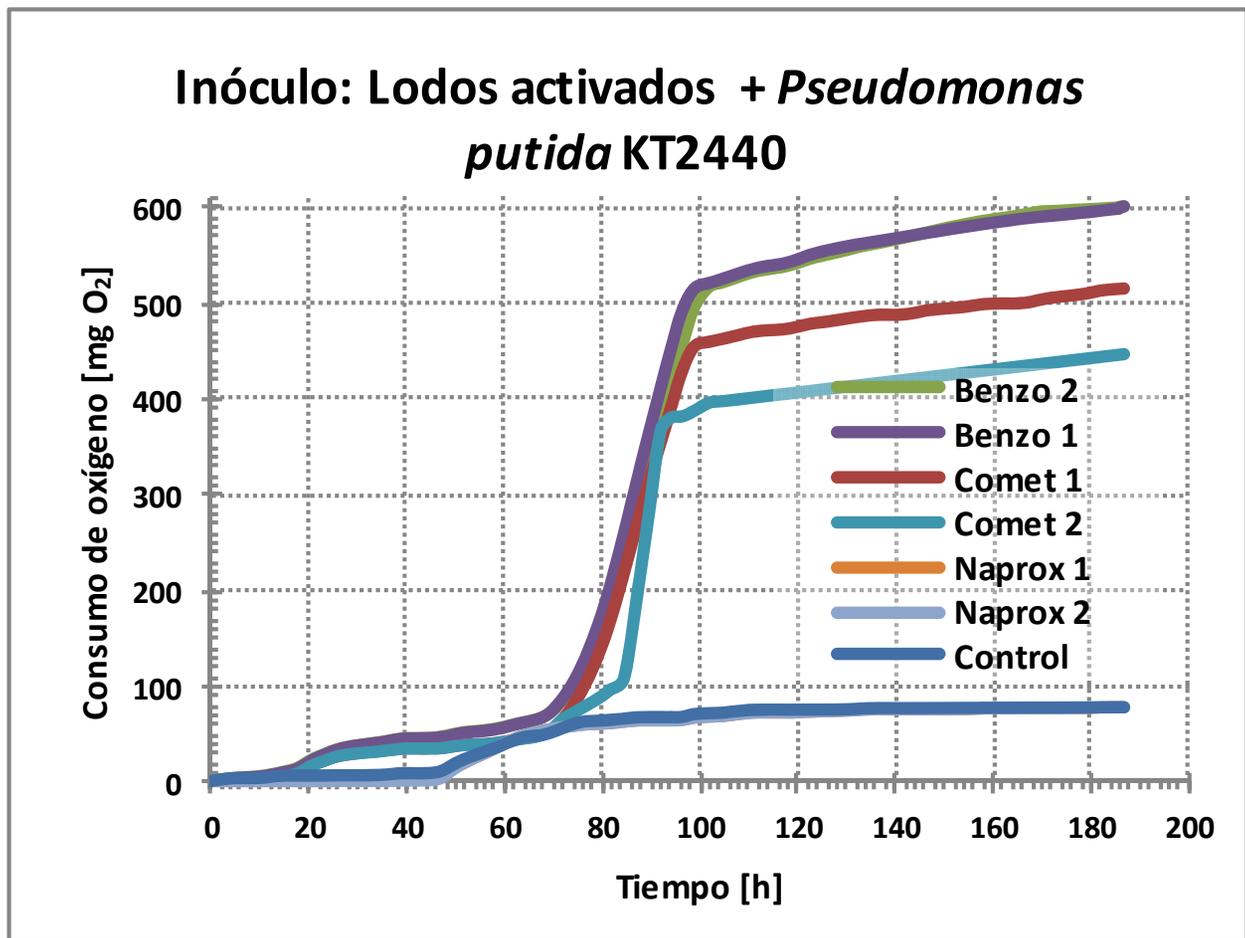
9.7. Respirogramas de la biodegradación inducida de naproxeno.



Gráfica 22. Datos crudos de consumo de oxígeno de la evaluación de la biodegradación de naproxeno por cometabolismo con inóculo de lodos activados.



Gráfica 23. Datos crudos de consumo de oxígeno en la evaluación de la biodegradación de naproxeno por cometabolismo con inóculo de *Pseudomonas putida* KT2440.

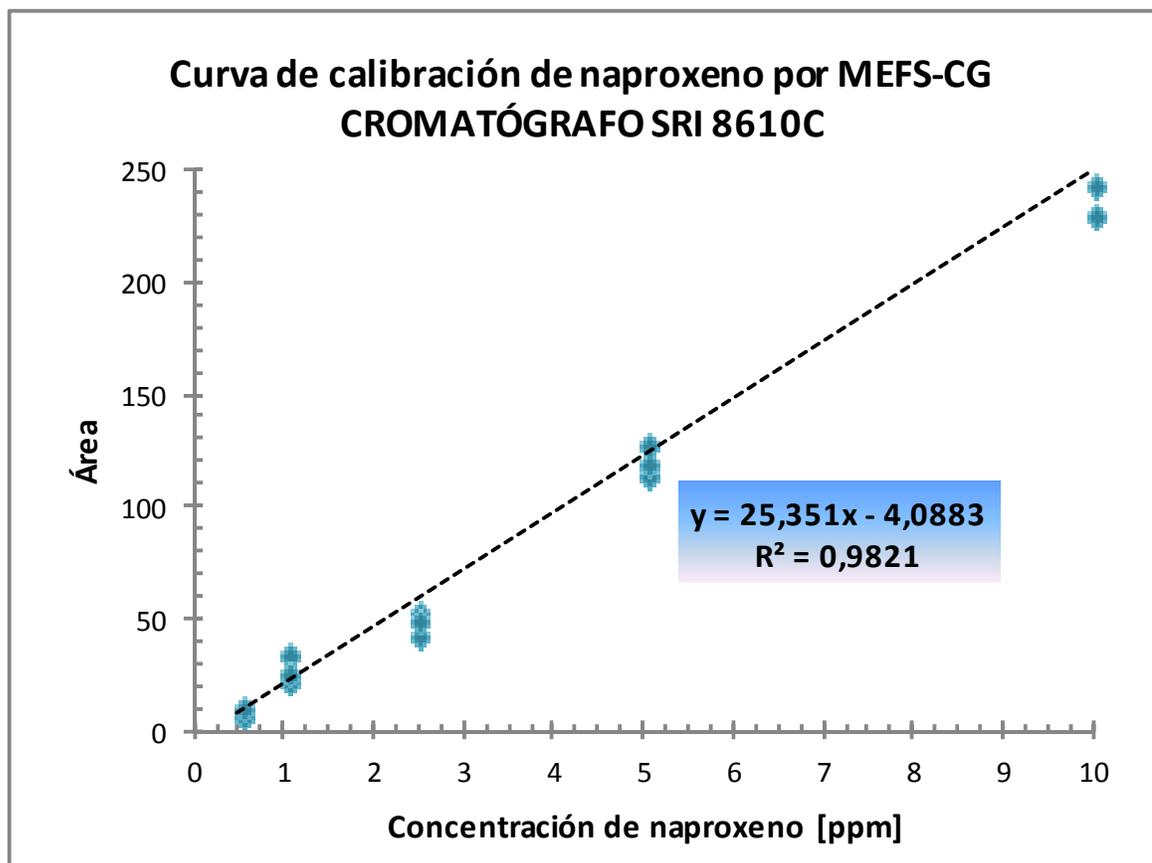


Gráfica 24. Datos crudos de consumo de oxígeno en la evaluación de la biodegradación de naproxeno bioaumentando *Pseudomonas putida* KT2440 a lodos activados aunado al efecto de cometabolismo.

9.8. Cuantificación del naproxeno por MEFS-CG

Preparación de material de vidrio empleado para las microextracciones.

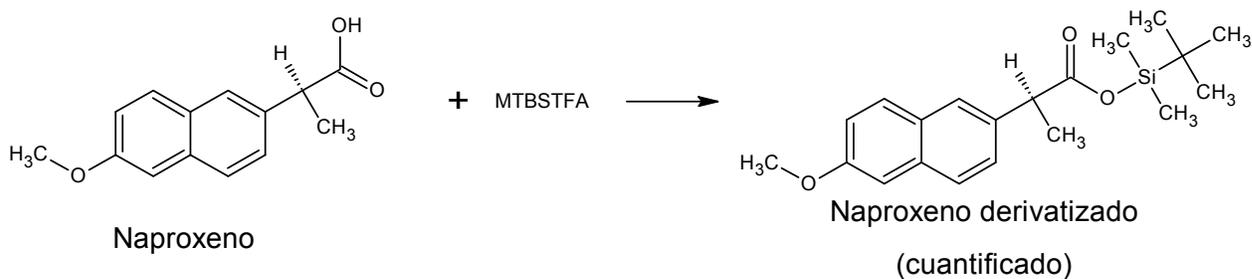
- Lavar con jabón Extrán libre de fosfatos y enjuagar con abundante agua.
- Dejar el material toda la noche en una mezcla hexano-diclorometano (1:1).
- Colocar la mezcla en los residuos, lavar con jabón Extrán y enjuagar con abundante agua.
- Adicionar solución de KOH al 5% en metanol.
- Enjuagar con agua corriente y posteriormente con agua destilada.
- Secar inmediatamente con acetona y tapar con cinta de teflón el material limpio.



Gráfica 25. Curva de calibración del naproxeno silanizado por cromatografía de gases

Tabla 27. Concentraciones determinadas de naproxeno al inicio y al final de cada ensayo.

		INICIO [$\mu\text{g/L}$]	FIN [$\mu\text{g/L}$]	% BIODEGRADACIÓN
Lodos activados	CN	$0,5 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	92,0%
	Naprox 1	$6,4 \pm 0,5$	$0,2 \pm 0,1$	96,5%
	Naprox 2	$6,0 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,1$	101,3%
	Comet 1	$5,4 \pm 0,8$	$1,3 \pm 0,1$	75,8%
	Comet 2	$4,8 \pm 0,9$	$0,9 \pm 0,1$	81,4%
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Naprox 1	$5,9 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,4$	1,9%
	Naprox 2	$6,3 \pm 0,4$	$6,2 \pm 0,3$	0,4%
	Comet 1	$5,9 \pm 0,8$	$4,1 \pm 0,3$	30,8%
	Comet 2	$5,0 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,2$	29,1%
Bioaumento	CN	$0,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	23,5%
	Naprox 1	$5,4 \pm 0,6$	$4,8 \pm 0,2$	11,1%
	Naprox 2	$5,4 \pm 0,9$	$4,7 \pm 0,1$	13,1%
	Comet 1	$6,0 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,1$	72,5%
	Comet 2	$6,0 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,3$	62,9%



10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHFS. (2009). *American Society of Health System Pharmacists. Drug Information.*
AHFS Drug Information.
- Allen, R., Rogers, M. y Humphrey, I. (1991). Naproxen induced pseudoporphyria in juvenile chronic arthritis. *J RHEUMATOL*, 18 (6), 893-896.
- Alun-Jones, E. y Williams, J. (1986). Hyponatremia and fluid retention in a neonate associated with maternal naproxen overdose. *J TOXICOL-CLIN TOXIC*, 24 (3), 257-260.
- Ambriz-Rivas, K. T. (2001). *Estudio fisicoquímico y microbiológico de la biodegradabilidad aerobia rápida de inhibidores de hidratación de arcillas empleados en la formulación de fluidos de perforación.* Coyoacán, Distrito Federal, México: Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM.
- Ambriz-Rivas, K. T. (1998). *Estudio y aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301 A.* Coyoacán, Distrito Federal, México: Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Andreozzi, R., Raffaele, M. y Nicklas, P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *CHEMOSPHERE*, 50 (10), 1319-1330.
- APHA, AWWA y WPCF. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater.* Washington, D.C., USA.

- Aresta, A., Carbonara, T., Palmisano, F. y Zambonin, C. G. (2006). Profiling urinary metabolites of naproxen by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J PHARMACEUT BIOMED*, 41, 1312-1316.
- Benavides-López, J., Quintero, G. y Guevara, A. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Revisión. *NOVA HEDWIGIA*, 4 (5), 1-116.
- Bidleman, T. F. (1988). Atmospheric processes: wet and dry deposition of organic compounds are controlled by their vapor-particle partitioning. *ENVIRON SCI TECHNOL*, 22, 361-367.
- Bouchez, M., Blanchet, D. y Vandecasteele, J. P. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *APPL MICROBIOL BIOT*, 43(1).
- Boyd, G., Zhang, S. y Grimm, D. (2005). Naproxen removal from water by chlorination and biofilm processes. *WATER RES*, 39 (4), 668-676.
- Briscoe-Dwyer, L. y Etzel, J. (1994). Dyspnea and periorbital edema following an increase in naproxen dose. *ANN PHARMACOTHER*, 28 (9), 1110.
- Brooks, B., Chambliss, C. K., Stanley, J. K., Ramírez, A., Banks, K. E. y Holmes, C. (2003). *Antidepressants delay fish, frog development*. University of Georgia. The University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences.
- Brun, G. L., Bernier, M., Losier, R., Doe, K., Jackman, P. y Lee, H. (2006). Pharmaceutically active compounds in atlantic canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as

- measured by acute and chronic aquatic toxicity. *ENVIRON TOXICOL CHEM*, 25 (8), 2163-2176.
- Buscaglia, A., Cowden, F. E. y Brill, H. (1984). Pulmonary infiltrates associated with naproxen. *JAMA-J AM MED ASSOC*, 251 (1), 65-66.
- Castillo-Alanís, L. A. (2009). *Identificación y cuantificación de PPCP's en aguas residuales por microextracción en Fase Sólida-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (MEFS-CG-EM)*. Tesis de Maestría. Coyoacán, D.F., México: UNAM.
- Castillo-Rodríguez, F., Roldán-Ruiz, M., Blasco-Plá, R. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Madrid:Tébar.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *ECOTOX ENVIRON SAFE*, 59 (3), 309-315.
- CPFEUM. (2004). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (8a ed., Vol. I). México, D. F., México: Secretaría de Salud.
- Crawford, J. J., Traina, S. J. y Tuovinen, O. H. (1998). Biodegradation of benzoate with nitrate as electron acceptor at different redox potentials in sand column microcosms. *BIOL FERT SOILS*, 27 (1), 71-78.
- Daughton, C. y Ternes, T. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *ENVIRON HEALTH PERSP*, 107 (Supplement 6), 907-938.

- Daughton, G. C. (2004). Non regulated water contaminants: emerging research. *REV ENVIRON IMPACT ASSES* (24), 711-732.
- Doucette, W. (2000). Soil and sediment sorption coefficients. En B. B. Mackay, *Handbook of property estimation method for chemicals: environmental and health sciences*. Boca Ratón, London, Florida, NY, Washington DC: Lewis Publishers. pp. 141-188.
- Durán, A. J. (2009). *Cuantificación de doce contaminantes emergentes, provenientes del agua residual empleada para riego, en suelos del Distrito de Riego 03 "Tula", Hidalgo. Tesis de Maestría*. Coyoacán, D. F., México: Facultad de Química, UNAM.
- EPA EE.UU. (22 de Abril de 2009). *U. S. Environmental Protection Agency*. Recuperado el 30 de Junio de 2010, de <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedl.html>.
- Fent, K., Weston, A. A. y Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *AQUAT TOXICOL*, 76 (2), 122-159.
- Fun-Choong, A. M., Lay-Ming, T. S., Leow, H. L., Koh, H. L. y Ho, P. C. (2006). A preliminary ecotoxicity study of pharmaceuticals in the marine environment. *J TOXICOL ENV HEAL A*, 69, 1959–1970.
- Gagné, F., Blaise, C. y Andre, C. (2006). Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *ECOTOX ENVIRON SAFE*, 64, 329–336.

- Gibson, R., Becerril-Bravo, E., Silva-Castro, V. y Jiménez, B. (2007). Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *J CHROMATOGR A* (1169), 31-39.
- Görke, B. y Stülke, J. (2008). Review: Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *NATURE*, 6, 613-624.
- Hansch, C., Leo, A. y Hoekman, D. (1995). *Exploring QSAR: hydrophobic, electronic, and steric constants*. Washington, DC: American Chemical Society.
- Hermoso-Berruecos, S. (2008). *Biodegradación aerobia de fenol en agua y aguas residuales de refinería, empleando reactores de flujo cerrado*. Coyoacán, Distrito Federal, México: Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Henry, TB, Kwon, J., Armbrust, K. L. y Black, M. C. (2004). Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *ENVIRON TOXICOL CHEM*, 23 (9), 2229-2233.
- Hickey, A. M., Gordon, L., Dobson, A., Kelly, C. y Doyle, E. (2007). Effect of surfactants on fluoranthene degradation by *Pseudomonas alcaligenes* PA-10. *APPL MICROBIOL BIOT* (74), 852-856.
- Horvath, R. S. (1972). Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *BACTERIOL REV*, 36 (2), 146-155.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardella, A., Parrella, A., Previter, L. y Rubinob, M. (2005). Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *SCI TOTAL ENVIRON*, 348 (1-3), 93-101.

- Jones, O. A., Voulvoulis, N. y Lester, J. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 english prescription pharmaceuticals. *WATER RES*, 36 (20), 5013-5022.
- Kahn, C. (2005). *Manual Merck Veterinario* (9 ed.). Whitehouse Station: Merck & Co.
- Kanehisa Laboratories. (2011). *KEGG Pathway Maps*. Recuperado el 04 de 10 de 2011, de KEGG Pathway Maps: http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?ppu00626
- Kirk-Othmer. (2001). *The Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (5^a ed., Vol. I). Nueva York, NY: John Wiley & Sons.
- Lefler, J. L., Bhagdeo, M. y Villeneuve, M. S. (2007). Solubility studies utilizing a phase monitor. *COMP ANAL STRUCT SCI*, 1-8.
- Lewandowski, G. A., Armenante, P. M. y Paka, D. (1990). Reactor design for hazardous waste treatment using a white rot fungus. *WATER RES*, 24 (1), 75-82.
- Lewis, R. J. (2004). *Sax's dangerous properties of industrial materials* (11 ed.). Nueva Jersey: Wiley-Interscience.
- Lide, D. R. (2007). *Handbook of chemistry & physics* (88 ed.). Florida: CRC.
- Lyman, W. J. (1985). *Estimation of physical properties* (Vol. I). Florida: CRC Press Inc.
- Maerker, J. M., Harm, A., Foeldvari, I. y Höger, P. (2001). Naproxen-induced pseudoporphyria. *HAUTARZT*, 52 (11), 1026-1029.
- Martínez, R., Smith, D. W. y Frankel, L. R. (1989). Severe metabolic acidosis after acute naproxen sodium ingestion. *ANN EMERG MED*, 18 (10), 1102-1104.

- Matamoros, V., Arias, C., Brix, H. y Bayona, J. M. (2009). Preliminary screening of small-scale domestic wastewater treatment systems for removal of pharmaceutical and personal care products. *WATER RES*, 43, 55-62.
- McEvoy, G. (1993). *Drug information the american hospital formulary service*. American Society of Health-System Pharmacists, Inc.
- Merck & Co. (2006). *The Merck Index: An Encyclopaedia of Chemicals, Drugs and Biologicals* (14th ed., Vol. 1). (M. J. O'Neil, S. Budavari, A. Smith, & P. E. Heckelman, Edits.) Merck Publications.
- Meylan, W. M. y Philip, H. H. (1993). Computer estimation of the atmospheric gas-phase reaction rate of organic compounds with hydroxyl radicals and ozone. *CHEMOSPHERE*, 26 (12), 2293-2299.
- Milenko, R. (1996). *Respirometry of activated sludge*. (L. Basel, Ed.) Ljubljana, Slovenia, Slovenia: Technomic Publishing Co., Inc.
- Moldovan, Z. (2006). Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *CHEMOSPHERE*, 64 (11), 1808-1817.
- Musson, S. y Townsend, T. (2009). Pharmaceutical compound content of municipal solid waste. *J HAZARD MATER*, 162, 730–735.
- Nikolaou, A., Meric, S. y Fatta, D. (2007). Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *ANAL BIOANAL CHEM*, 387, 1225–1234.
- Oaks, J., Gilbert, M., Virani, M., Watson, R., Meteyer, C. y Rideout, B. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *NATURE*, 427 (6975), 630-633.

- OCDE. (1992). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 301: Ready Biodegradability. En OCDE, *OECD Series on Testing and Assessment*. Paris, Francia, pp 1-62.
- Olguín, E., Sánchez, G. y Hernández, E. (2000). *Environmental biotechnology and clear bioprocesses*. Londres, Inglaterra: Taylor & Frances.
- Onesios, K., Yu, J. y Bouwer, E. (2008). Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *BIODEGRADATION*, 20 (4), 441,466.
- Park, N., Vanderford, B. J., Snyder, S. A., Sarper, S., Kim, S. D. y Cho, J. (2009). Effective controls of micropollutants included in wastewater effluent using constructed wetlands under anoxic condition. *ECOL ENG*, 35, 418–423.
- Park, W., Jeon, C. O., Cadillo, H. y DeRito, C. (2004). Survival of naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 in naphthalene-amended soils: toxicity of naphthalene and its metabolites. *APPL MICROBIOL BIOT*, 64 (3), 429-435.
- Quinn, B., Gagné, F. y Blaise, C. (2008). An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *SCI TOTAL ENVIRON*, 389, 306–314.
- Quintana, J. B., Weiss, S. y Reemtsma, T. (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *WATER RES* (39), 2654-2664.

- Ramírez-Gama, R. M., Luna-Millán, B., Mejía-Chávez, A., Velázquez-Madrado, O., Tsuzuki-Reyes, G., Vierna-García, L., Hernández-Gómez, L., Müggenburg-Rodríguez, I., Camacho-Cruz, A. y Urzúa-Hernández, M. (2006). *Manual de prácticas de microbiología general* (5 ed.). (R. M. Gama, Ed.) México, D. F., México: Facultad de Química.
- Ramos-Díaz, M. Á. y Ramos, J. L. (1998). Combined physical and genetic map of the *Pseudomonas putida* KT2440 chromosome. *J BACTERIOL*, 180 (23), 6352-6363.
- Ray, P., Rigolizzo, D., Wara, D. y Piel, C. (1988). Naproxen nephrotoxicity in a 2-year-old child. *AM J DIS CHILD*, 142 (5), 524-525.
- Regenhardt, D., Heuer, H. y Fernández, D. U. (2002). Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *ENVIRON MICROBIOL*, 4 (12), 912-915.
- Richardson, M. L. (1985). The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J PHARM PHARMACOL*, 37 (1), 1-12.
- Rumack, B. H. y Hall, A. H. (2010). POISINDEX. *Sistema de información de Micromedex, Inc., Englewood*, 146.
- Sanal, S. y Gur-Lavi, M. (1992). Reversible bone marrow aplasia induced by naproxen. *ANN HEMATOL*, 65 (1), 59-60.
- Santos, P., Benndorf, D. y Sá-Correia, I. (2004). Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *PROTEOMICS*, 4 (9), 2640-2652.

- Sax, N. y Feiner, B. (1984). *Dangerous properties of industrial materials* (6 ed.). Nueva York: Van Nostrand Reinhold.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H. y Negele, R. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *AQUAT TOXICOL*, 68 (2), 141-150.
- Seeber, K. y Hoa, E. (2010). *Integration and consolidation of information on pharmaceutical residues in the urban water cycle*. Berlín, Alemania.
- SEMARNAT. (1996). NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
- Siemens, J., Huschek, G. y Siebe, C. (2008). Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City–Mezquital Valley. *WATER RES*, 2124 – 2134.
- SOLBIO. (2010). *Soluciones biotecnológicas*. Recuperado el 10 de 05 de 2011, de <http://www.solbio.com/Soluciones.asp?seccion=Plantas%20de%20tratamiento%20de%20liquidos%20cloacales>.
- Stockton, D. L. y Paller, A. S. (1990). Drug administration to the pregnant or lactating woman: a reference guide for dermatologists. *J AM ACAD DERMATOL*, 23 (1), 87-103.

- Talati, A., Salim, M. y Korones, S. (2000). Persistent pulmonary hypertension after maternal naproxen ingestion in a term newborn: a case report. *AM J PERINAT*, 17 (2), 69-71.
- Tixier, C., Singer, H., Oellers, S. y Müller, S. (2003). Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *ENVIRON SCI TECHNOL*, 37 (6), 1061-1068.
- Tribskorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, H., Köhler, H. y Schwaiger, J. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *AQUAT TOXICOL*, 68 (2), 151-166.
- UGR. (2011). *Universidad de Granada*. Recuperado el 13 de 08 de 2011, de <http://www.ugr.es/~pomif/pom-amb/pa-i/pa-i-2-introduccion.htm>
- Ullmann. (2003). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (6 ed., Vol. I). República Federal de Alemania: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.2003.
- Vázquez-Rodríguez, G. y Beltrán, H. R. (2004). Pruebas normalizadas para la evaluación de la biodegradabilidad de sustancias químicas. Una revisión. *INTERCIENCIA*, 29 (10), 568-573.
- Vázquez-Rodríguez, G., Garabétian, F. y Rols, J. L. (2007). Inocula from activated sludge for ready biodegradability testing: homogenization by preconditioning. *CHEMOSPHERE*, 68, 1447-1454.
- Vree, T. B., Biggelaar-Martea, M. V., Wissen, V.V., Vree M., L. y Guelen, P. J. (1993). The pharmacokinetics of naproxen, its metabolite O-desmethylnaproxen, and

their acyl glucuronides in humans. Effect of cimetidine. *BR J CLIN PHARMACOL*, 35 (5), 467–472.

Waugh, P. K. y Keatinge, D. W. (1983). Hypoprothrombinemia in naproxen overdose. *DRUG INTELL CLIN PHARM*, 17 (7-8), 549-550.

Yalkowsky, S. y He, Y. (2003). *Handbook of aqueous solubility data: an extensive compilation of aqueous solubility data for organic compounds extracted from the AQUASOL database*. Boca Ratón, FL.: CRC Press LLC.

Young, J. C. y Cowan, R. M. (2004). *Respirometry for environmental science and engineering*. Springdale, Arkansas, United States of America: SJ Enterprises.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. y Van't Riek, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *APPL ENVIRON MICROB*, 56 (6), 1875-1881.