
Actividad metanogénica específica de una solución acuosa de amoxicilina

Yuly Vanessa Torres Arévalo, Tatiana R. Chaparro*

Programa de Ingeniería Civil, Laboratorio de Saneamiento Ambiental,
Universidad Militar Nueva Granada, Cra 11 No 101-80, Bogotá-Colombia

Specific methanogenic activity of an aqueous solution of amoxicillin

Activitat metanogènica específica d'una solució aquosa d'amoxicil·lina

Recibido: 1 de enero de 2015; revisado: 25 de junio de 2015; aceptado: 6 de agosto de 2015

RESUMEN

La amoxicilina es uno de los antibióticos más prescritos para tratar diferentes tipos de infecciones y se han encontrado niveles en mg/L en aguas residuales urbanas. Los procesos anaerobios son conocidos por su alto rendimiento y tolerancia hacia compuestos tóxicos; sin embargo, su utilización en aguas que contienen antibióticos y otros compuestos farmacéuticos es aún escasa y no conclusiva. El propósito de este trabajo consistió en determinar la actividad metanogénica específica (AME) del lodo anaerobio procedente de la planta de tratamiento de aguas residuales El Salitre (Bogotá – Colombia), utilizando como sustrato amoxicilina en concentraciones de 5, 60 y 120 mg/L. El ensayo tuvo una duración de 480 horas bajo agitación intermitente. Los resultados mostraron que los valores de AME para 5, 60 y 120 mg/L de amoxicilina fueron de 0.163 gDQO/gSTV.d, 0.218 gDQO/gSTV.d y 0.485 gDQO/gSTV.d respectivamente y en el etanol fue de 0.614 gDQO/gSTV.d. Se observó adicionalmente un buen ajuste del modelo modificado de Gompertz a los resultados experimentales en las condiciones estudiadas.

Palabras clave: Antibiótico; digestión anaerobia; modelo Gompertz.

SUMMARY

The amoxicillin is one of the most prescribed antibiotics for treating different type of infections, and it has been found levels in mg/L in urban wastewater. Anaerobic processes are known for their high performance and tolerance to toxic compounds; however, their utilization in water that contains antibiotics and other pharmacist compounds is still scarce and inconclusive. The purpose of this study was to determine the specific methanogenic activity (SMA) of anaerobic sludge from the wastewater treatment plant El Salitre (Bogotá – Colombia), using amoxicillin as substrate in concentrations of 5, 60 y 120 mg/L. The test

had a duration of 480 hours under intermittent agitation. The results showed that SMA values for 5, 60 y 120 mg/L of amoxicillin were 0.163 gCOD/gTVS.d, 0.218 gCOD/gTVS.d and 0.485 gCOD/gTVS.d respectively, and on the ethanol was 0.614 gCOD/gTVS.d. Further, it was observed a good adjust of the Gompertz's modified model to the experimental results in the studied conditions.

Key words: Antibiotic; anaerobic digestion; Gompertz model.

RESUM

L'amoxicil·lina és un dels antibiòtics més prescrits per tractar diferents tipus d'infeccions i s'han trobat nivells en mg/L en aigües residuals urbanes. Els processos anaerobis són coneguts pel seu alt rendiment i tolerància cap a compostos tòxics; però la seva utilització en aigües que contenen antibiòtics i altres compostos farmacèutics és encara escassa i no conclusiva. El propòsit d'aquest treball va consistir a determinar l'activitat metanogènica específica (AME) del fang anaerobi procedent de la planta de tractament d'aigües residuals El Salitre (Bogotá - Colòmbia), utilitzant com a substrat amoxicil·lina en concentracions de 5, 60 i 120 mg/L. L'assaig va tenir una durada de 480 hores sota agitació intermitent. Els resultats van mostrar que els valors d'AME per a 5, 60 i 120 mg/L d'amoxicil·lina van ser de 0.163 gDQO/gSTV.d, 0.218 gDQO/gSTV.d y 0.485 gDQO/gSTV.d respectivament i en l'etanol va ser de 0.614 gDQO/gSTV.d. Es va observar adicionalment un bon ajust del model modificat de Gompertz als resultats experimentals en les condicions estudiades.

Paraules clau: Antibiótic; digestió anaeròbia; model Gompertz.

*Autor para la correspondencia: *adela.rodriguez@unimilitar.edu.co; u1101056@unimilitar.edu.co

INTRODUCCIÓN

El consumo de antibióticos en el mundo ha aumentado tanto para el uso humano como para el uso veterinario. [1] indican que el uso excesivo de este tipo de compuestos, así como el mal uso y su disposición inadecuada son las principales causas de la presencia en fuentes de captación y vertimientos de aguas residuales. Hasta el momento se desconoce el destino de estos compuestos en las plantas de tratamiento de agua potable y residual, por lo que varios autores señalan que pueden pasar intactos a través de los procesos. Adicionalmente, como los antibióticos poseen características químicas diferentes, la información sobre los efectos en la salud del ser humano y en los ecosistemas es escasa [2].

La principal fuente de los antibióticos en las aguas residuales son los vertimientos de la industria farmacéutica seguido de las aguas residuales de hospitales [3] y centros de salud. En aguas residuales domésticas, [2] indica que las concentraciones se presentan en niveles de ng/L y µg/L, a pesar de esto, debido a su potencial de acumulación y persistencia pueden llegar a provocar efectos adversos en el medio ambiente. [4] señalan que en los efluentes de las industrias farmacéuticas adicional a la presencia de antibióticos hay un alto contenido de carga orgánica, del orden de aproximadamente 12500 mg/L de DQO.

La Amoxicilina (Amx) es una penicilina semi-sintética que tiene la presencia del anillo β-lactámico que inhibe la síntesis de las paredes celulares de las bacterias. La Amx se excreta del cuerpo casi sin metabolizar; autores como [5] citan que se ha encontrado cerca de un 86 ±8% en la orina humana y en los efluentes de la industria farmacéutica aparece en niveles de mg/L. Durante las últimas décadas se ha venido estudiando la aplicación de diferentes tecnologías para evaluar la capacidad de remover antibióticos en aguas potables, residuales y muestras ambientales. [6] presentan una revisión en la cual se observa que las tecnologías más aplicadas son los procesos de oxidación y separación por membranas.

El proceso anaerobio es un proceso complejo, la conversión de los compuestos orgánicos a metano involucra cuatro grupos de microorganismos, cada uno de ellos con características diferentes. Para asegurarse que haya un buen desempeño en los reactores y se mantenga estable el sistema, se debe garantizar que haya suficiente presencia de la comunidad metanogénica. Estudios sobre digestión anaerobia aplicada al tratamiento de efluentes con presencia de compuestos farmacéuticos en especial antibióticos [7-8-9] muestran que es factible utilizar esta tecnología debido a la tolerancia a tóxicos, capacidad para operar con altas cargas orgánicas y facilidad de implantación si comparado con las tecnologías de oxidación química; sin embargo, es necesario estudiar entre otros aspectos, el porcentaje de inhibición y la concentración que causa esta inhibición de compuestos presentes en estos efluentes por separado. En este sentido, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la actividad metanogénica específica en una solución que contiene como sustrato Amoxicilina en concentraciones de 5, 60 y 120 mg/L. Adicionalmente, se aplicó el modelo matemático modificado de Gompertz utilizando los datos experimentales de la producción acumulada de metano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lodo anaerobio

La muestra de lodo para esta investigación fue recolectada del biodigestor anaerobio de la planta de tratamiento de aguas residuales El Salitre localizada en la ciudad de Bogotá, Colombia. La muestra fue enviada al laboratorio donde se caracterizó en términos de sólidos totales, demanda química de oxígeno y pH, estos valores fueron: 17.25 gSTV/L, 3.06 gDQO/L y 7.69 unidades respectivamente. No hubo incubación antes de utilizar el lodo, acción que se realiza hasta que la producción de biogás cese y de esta forma se minimiza la contribución de metano por materiales orgánicos residuales.

Diseño del experimento

El ensayo fue llevado a cabo por triplicado para cada una de las concentraciones de amoxicilina, se utilizó etanol como sustrato para el control y hubo un reactor sin sustrato, para determinar la producción endógena de metano. La digestión anaerobia fue realizada en botellas serológicas de 100mL selladas con tapón de caucho y agrafe metálico de 20mm, el volumen de trabajo de las botellas fue de 67 mL y un headspace de 33 mL, lo correspondiente a 1/3 de la capacidad del reactor.

El volumen de inóculo para cada reactor fue de 22mL, el volumen de amoxicilina para la concentración de 5mg/L, 60mg/L y 120mg/L fue de 0.44 mL, 3.6 mL y 5.4 mL respectivamente, el etanol fue adicionado en 1.34 mL, el cálculo del volumen de sustrato a adicionarse se realizó según lo indicado por [10], el cual considera la concentración deseada, el volumen de reacción y la concentración de la solución madre. Después de añadir las cantidades requeridas de inóculo y sustrato, cada reactor fue llenado con una solución de nutrientes recomendada por [10] hasta alcanzar el volumen de trabajo. El pH inicial de la mezcla no fue ajustado, ya que se encontraba entre 7.6 y 7.9 en los diferentes reactores. Los reactores fueron purgados con helio 100% puro por aproximadamente 1 minuto para asegurar las condiciones anaerobias, luego fueron conservados a una temperatura de 32°C en una cámara termocontrolada.



Figura 1. Esquema del montaje experimental

Para asegurar el contacto del inóculo con el sustrato y la solución de nutrientes, durante toda la duración del ensayo, cada reactor fue agitado manualmente por 30 segundos una vez al día antes de que el volumen del gas fuera medido. La concentración del inóculo en la mezcla fue de 5 gSTV/L, valor sugerido por [11] en la que se indica que para ensayos con agitación permanente o intermitente

este valor puede oscilar de 2 a 5 gSTV/L y entre 1 a 1.5 gSTV/L cuando el ensayo se realiza sin agitación.

Los experimentos se detuvieron cuando la producción de metano se mantuvo constante y sin variaciones significativas, la mezcla tanto al inicio como al finalizar el ensayo fueron caracterizadas con ensayos de demanda química de oxígeno (DQO), ácidos volátiles totales (AVT), Alcalinidad parcial (AP) y pH siguiendo las recomendaciones de [12]. En la Figura 1 se observa un esquema del montaje experimental.

Medición del volumen y composición del biogás

El volumen y composición del biogás producido diariamente se determinó mediante Cromatógrafo de gases (Agilent 7890A) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna capilar Carbonplot 1010 – Supelco. Se utilizó como gas de arrastre Argón con flujo de 1.5 mL/min. La toma de muestra fue con jeringa de 0.5 mL de sistema luer-gas tight cada 24 horas para cada uno de los reactores, hasta que se alcanzó la estabilidad de producción de metano en cada concentración, ésta fue lograda a las 480 horas para la concentración de 5mg/L, 432 horas para la de 60mg/L y 264 horas para la de 120 mg/L.

Tratamiento de los datos

La Actividad metanogénica específica se calculó a partir del valor de la pendiente de la curva de producción acumulada de metano y tiempo de operación [Ec.1]

$$AME, \frac{gDQO}{gSTV} \cdot d = \frac{\frac{dV_{CH_4}}{dt}}{STV} \cdot d \quad Ec.1$$

En donde: $\frac{dV_{CH_4}}{dt}$: pendiente de la curva de producción

de CH₄ expresada en, mL CH₄/L y STV: masa de lodo inicial en cada uno de los frascos, expresada en, g.

Considerando los datos experimentales de producción de metano para cada ensayo de actividad metanogénica específica, se empleó la ecuación modificada de Gompertz [Ec.2], para estimar el potencial de producción de metano, la tasa de producción

$$P_{CH_4}(t) = P_{MAX} * \exp\left\{-\exp\left[\frac{R_{MAX} * e}{P_{MAX}} * (\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad Ec.2$$

En donde: $P_{CH_4}(t)$ es la producción acumulada de metano (mL CH₄) en el tiempo t, P_{MAX} es el potencial de producción de metano (mL CH₄), R_{MAX} es la máxima tasa de producción de metano (mL CH₄, h⁻¹), y λ es el tiempo en la fase de letargo (h⁻¹) y e es el número exponencial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad metanogénica

En la Figura 2 se muestra la producción acumulada de metano para las concentraciones de 5, 60 y 120 mg/L de Amx durante el tiempo de operación (horas). Como se observa la producción de metano fue baja en todos los casos, el máximo valor fue 0.50 mL en las primeras 100 horas para una concentración de Amx de 5 mg/L. A partir de este momento, para todas las concentraciones la producción de gas mostró estabilidad. Lo anterior puede indicar dos cosas, la primera que hay inhibición en la producción de metano debido a la presencia del antibiótico o que el lodo utilizado como inóculo tiene una actividad muy baja debido a su origen. En relación con esta última hipótesis, se encontró que el valor de la AME para la concentración de 5 mg/L de Amx fue 0.163 gDQO/gSTV.d, para la concentración de 60 mg/L fue de 0.218 gDQO/gSTV.d y para 120

mg/L fue de 0.485 gDQO/gSTV.d, en el caso del Etanol que fue utilizado para el control el valor de la AME fue 0.614 gDQO/gSTV.d valor próximo al citado en la literatura que está entre 0.35 gDQO/g SSV.d – 0.60 gDQO/g SSV.d [11]. Estos resultados confirman que el lodo proveniente de la PTAR “El salitre” tiene una alta actividad metanogénica y que la baja producción de metano se debe a la presencia del antibiótico. [13] evaluaron el efecto de cuatros clases de antibióticos en la producción de biogás y su degradación durante la digestión anaerobia. En el caso de la penicilina analizaron concentraciones desde 0.35 hasta 350 mg/L. Los resultados mostraron que la producción de biogás se redujo con el incremento de la concentración del antibiótico durante los primeros 30 días de incubación. Sin embargo, estos autores observaron que a pesar de la inhibición en la actividad bacteriana del consorcio anaerobio, las bacterias lograron aclimatarse y se alcanzó la degradación del compuesto.

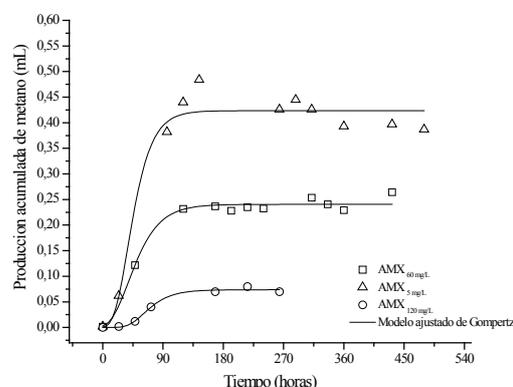


Figura 2. Producción acumulada de metano vs Tiempo para concentraciones de 5, 60 y 120 mg/L de Amx.

En este estudio, se encontró una remoción de DQO para la concentración de Amx de 60 mg/L de 96%, lo que corrobora que a pesar de la inhibición hubo degradación del compuesto, para 5 y 120 mg/L no se observaron resultados similares. [14] encontraron una producción baja de metano, 10% y 20% con 12.3 mg/L y 95.9 mg/L de amoxicilina, respectivamente después de 7 días de incubación y [15] muestran que el metano se reduce en 25% y 32% para concentraciones de Amx de 60 y 120 mg/L después de 10 días. Es decir, no hay un rango aún establecido en el cual se pueda decir que hay inhibición total de la actividad bacteriana. Por ejemplo en este estudio, se observó que la reducción en la producción de metano cuando se incrementó la concentración de Amx de 5 a 60 mg/L fue cercana al 50% y cuando se aumentó a 120 mg/L la reducción fue casi de un 100%. Vale la pena resaltar que para todas las concentraciones estudiadas el pH de la solución final se mantuvo en un rango de 7.6 a 7.8, la alcalinidad parcial aumento ligeramente hasta un valor promedio de 1600 mg/L y en el caso de los ácidos volátiles totales no hubo una disminución importante, inclusive se observó que para la concentración de 120 mg/L los AVT aumentaron ligeramente. [9] observaron que después de 154 días de digestión anaerobia en una solución de Cefalexina con concentraciones variando desde 0 a 400 mg/L ocurrió acumulación de ácidos, los valores se incrementaron de 750 mg/L a más o menos 3500 mg/L.

Este comportamiento puede indicar que la presencia de Amx reduce a bajas concentraciones el metano producido obstaculizando la utilización de los AVT por las bacterias homoacetogénicas y las metanogénicas acetoclásticas en el proceso normal a aminoácidos, azúcares a través de la fermentación.

Aplicación del modelo modificado de Gompertz

Los modelos predictivos son una herramienta valiosa que permite describir y entender el comportamiento de los microorganismos bajo diferentes condiciones. Existen varios modelos de crecimiento en la literatura, por ejemplo, Gompertz, Richards modelo logístico entre otros. En particular el modelo de Gompertz modificado describe la hidrólisis de la materia orgánica particulada [16]. La producción de metano acumulado y el modelo de Gompertz se observan en la Figura 2. Los parámetros λ , RMAX, PMAX, R2 se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros del modelo modificado de Gompertz

| Parámetros | Amx 5 mg/L | Amx 60 mg/L | Amx 120 mg/L |
|---|------------|-------------|--------------|
| Coefficiente de correlación R ² | 0.959 | 0.976 | 0.976 |
| R _{MAX} (mL _{CH₄} ·h ⁻¹) | 0.049 | 0.038 | 0.044 |
| P _{MAX} (mL _{CH₄}) | 0.423 | 0.240 | 0.073 |
| λ (h) | 37.25 | 38.17 | 61.07 |

Los valores de la Tabla 1 indican que el modelo de Gompertz modificado tal como señala [17] se ajusta adecuadamente en las curvas “s” de crecimiento. Adicional a esto, como en este modelo solo se tienen que ajustar tres parámetros, la estimación tiene más grados de libertad, lo cual es importante porque permite ser utilizado en curvas de crecimiento con un número pequeño de datos experimentales. Los valores bajos de RMAX para todos los casos se deben principalmente a la baja actividad microbiana que se presenta como resultado de las condiciones poco favorables para el metabolismo que tiene como base, utilizar el antibiótico como sustrato. El tiempo de la fase de letargo para 5 y 60 mg/L de Amx está alrededor de las 37 horas y para 120 mg/L está cerca de 61 horas, lo que indica que el material soluble está siendo consumido lentamente por la biomasa en todos los casos. El tiempo de digestión (T90) se define según [18] como el tiempo que se necesita para alcanzar el 90% de la producción acumulada de metano y el tiempo efectivo de la producción de metano (Tef) es la resta entre el T90 y el tiempo de la fase de letargo λ . Así, para este estudio se tiene que el T90 en las tres condiciones estudiadas es de 90 horas, luego el tiempo efectivo de la producción de metano es para 5 mg/L de 52,75 h, para 60 mg/L de 51.83 h y para 120 mg/L de 28.93 h. La utilización de procesos anaerobios para la degradación de compuestos farmacéuticos en especial antibióticos es factible. Hay varios estudios citados en la literatura que muestran que la biomasa después de un tiempo consigue aclimatarse y que la toxicidad varía dependiendo el tipo de antibiótico. Con base en los resultados de este estudio, no se puede predecir aún como la Amx influye en la comunidad microbiana, por ejemplo, si aumentando los tiempos de experimentación se puede conseguir resistencia o definitivamente hay inhibición con las concentraciones ensayadas. En este sentido, se hace necesario que se investigue más en este campo, para poder identificar en primer lugar cual es la verdadera influencia de la Amx o de

cualquier otro antibiótico en la generación de metano por parte de los inóculos utilizados.

CONCLUSIONES

Se estudió la actividad metanogénica específica de un lodo proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas en una solución con presencia de Amoxicilina. Los resultados mostraron que la actividad metanogénica del lodo es alta, los valores de 0.163 gDQO/gSTV.d para 5 mg/L, 0.218 gDQO/gSTV.d para 60 mg/L y 0.485 gDQO/gSTV.d así lo muestran. Sin embargo, la producción de metano fue baja en los dos casos. Se observó que aumentar la concentración de Amx reduce la producción de metano en casi un 100%. Adicionalmente, se encontró que el modelo modificado de Gompertz se ajustó adecuadamente a los resultados experimentales, mostrando que los modelos predictivos de crecimiento son una herramienta útil que permite obtener parámetros para evaluar el desempeño de los procesos biológicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al apoyo financiero de la Universidad Militar Nueva Granada con el Proyecto ING-1184 y a los Laboratorios de Saneamiento Ambiental y Calidad de Aguas del Programa de Ingeniería Civil por el apoyo técnico.

REFERENCIAS

1. Homem, V., & Santos, L. (2011). Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices – a review. *J. Environ. Manage.* 92, 2304-2347.
2. Kummerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review-Part I. *Chemosphere.* 75, 417-434.
3. Muñoz, C., & Chaparro, T. (2014). Combinación de procesos de oxidación avanzada y procesos anaerobios para tratamiento de aguas residuales hospitalarias. *Afinidad.* 565, 63-67.
4. Du, J., Hu, Y., Qj, W., Zhang, Y., Jing, Z., Norton, M., & You li, Y. Influence of four antimicrobials on methane-producing archae and sulfate-reducing bacteria in anaerobic granular sludge. *Chemosphere.* In press.
5. Dimitrakopoulou, D., Rethemiotaki, I., Frontistis, Z., Xekoukoulotakis, N., Venieri, D., & Mantzavinos, D. (2012). Degradation, mineralization and antibiotic inactivation of amoxicillin by UV-A/ ATiO2 photocatalysis. *J. Environ. Manage.* 98, 168-174.
6. Homayoonfal, M., & Mehrnia, M. (2014). Amoxicillin separation from pharmaceutical solution by pH sensitive nanofiltration membranes. *Sep. Environ. Manage.* 130, 74-83.
7. Chelliapan, S., Sallis, T., P.J. (2006). Performance of an up-flow anaerobic stage reactor (UASR) in the treatment of pharmaceutical wastewater containing macrolide antibiotic. *Water Res.* 40, 507-516.
8. Oktem, Y., Ince, O., Sallis, P., Donnelly, T., & Ince, B., Pérez, M. (2007). Anaerobic treatment of a chemical synthesis-based pharmaceutical wastewater in a hy-

-
- brid upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Biore-sour. Technol.* 99, 1089-1096.
9. Lu, X., Zhen, G., Liu, Y., Hojo, T., Ledezma Estrada, A., & You-Li, Y. (2014). Long-term effect of the anti-biotic cefalexin on methane production during waste activated sludge anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 169, 644-651.
 10. Chernicharo, C.A. (2007). *Principios do tratamento biológico de águas residuárias*. UFMG. 2° ed. Belo horizonte. Brasil. 379.
 11. Torres Lozada, P., & Pérez, A. (2010). Actividad meta-nogénica específica: una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*. 9, 5-14.
 12. APHA. (2005). *Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewaters*. 25th. Ed American Public Health Organization. Washington, D.C., USA;: American Public Health Organization.
 13. Mitchell, S., Jeffrey, U., Teel, A., Richard, W., & Frear, C. (2013). The effects of the antibiotics ampicillin, flor-fenicol, sulfamethazine and tylosine on biogas pro-duction and their degradation efficiency during anaer-obic digestion. *Bioresour. Technol.* 149, 244-252.
 14. Gartiser, S., Urich, E., Alexy, R., & Kummerer, K. (2007). Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes. *Chemosphere*. 66, 1839-1848.
 15. Lallai, A., Mura, A., & Onnis, N. (2002). The effects of certain antibiotics on biogás production in the anaer-obic digestion of pig waste slurry. *Bioresour. Technol.* 82, 205-208.
 16. Zhang, W., Quanyuan, W., Shubiao, W., Danan, Q., Wei, I., Zhuang, Z., & Renjie, D., (2014). Batch anaer-obic co-digestión of pig manure with dewatered sewage sludge under mesophilic conditions. *Appl. Energy*. 128, 175-183.
 17. Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., and Van T, R., (1990). Modelling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875-1881.
 18. Kafle, G., & Kim, S. (2013). Anaerobic treatment of apple waste with swine manure for biogas pro-duction: Batch and continuous operation. *Appl. Energy*. 2013, 61-72.