

# **Universidad Rey Juan Carlos**

**Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología**



**INGENIERO QUÍMICO**

**Curso académico 2009/10**

## **DEGRADACIÓN DE NAPROXENO Y CARBAMAZEPINA POR TRATAMIENTOS MICROBIOLÓGICOS**

**Autor: CINTIA CASADO MERINO**

**Directores: NATALIA GONZÁLEZ BENÍTEZ**

**EMANUELE SCHIAVI**

**Julio 2010**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Natalia y M<sup>a</sup> Carmen, por permitirme trabajar con ellas, por la paciencia conmigo durante el desarrollo y redacción del proyecto, por mostrarme todo su apoyo y, como no, por haberme transmitido su inquietud investigadora. A Fernando Bautista, Emanuele Schiavi y Ana Millanes, por sus aportaciones al proyecto.

A Raquel y la Laura, por todo lo que he aprendido en el laboratorio con ellas, y sobretodo, por haber estado pendientes de mí en los momentos difíciles.

A mis compañeros del laboratorio, Anita, Belén, Cristina, Raquel, Gema, Yoli y Edi entre otros, que han vivido el desarrollo del proyecto conmigo, haciendo el día a día en la universidad mucho más ameno.

A mis amigos, Noe, Guille, Medu, y especialmente a María y a Rosa, que han sabido apoyarme en mis días de agobios, que se han ilusionado tanto como yo con los avances del proyecto, han buscado conmigo solución a los problemas, y han aportado, de una forma u otra, su conocimiento.

Y por último, pero lo más importante, a mi familia. Por haberme transmitido el amor a la cultura, por la educación, por sus valores. Por aguantarme en la convivencia de estos años de carrera, por su apoyo incondicional.



## **INDICE**

ABREVIATURAS	2
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	6
2. OBJETIVOS	9
3. METODOLOGÍA	10
3.1 Descripción del trabajo	10
3.2 Selección de los PPCPs	11
3.3 Medios de cultivo, reactivos y disolventes	13
3.4 Diseño experimental	15
3.4.1 Obtención y selección del consorcio E <sub>2</sub> E <sub>5</sub> y la colonia C <sub>17</sub> .	15
3.4.2 Experimentos con el consorcio E <sub>2</sub> E <sub>5</sub> .	16
3.4.3 Experimento ortogonal consorcio E <sub>2</sub> E <sub>5</sub> y colonia C <sub>17</sub>	16
3.5 Material y métodos	19
3.5.1 Estima del crecimiento de la población bacteriana.	19
3.5.2 Análisis de Toxicidad.	19
3.5.3 Análisis de la concentración de PPCPs durante el proceso de biodegradación.	20
3.5.4 Estimación del CO <sub>2</sub> producido en la degradación de los PPCPs.	21
3.5.5 Análisis estadísticos.	21
3.5.6. Caracterización molecular de los microorganismos y análisis DGGE.	22
4. RESULTADOS	26
4.1 Obtención y selección del consorcio E <sub>2</sub> E <sub>5</sub> y la colonia C <sub>17</sub> .	26
4.2 Experimentos con el consorcio microbiano E <sub>2</sub> E <sub>5</sub> .	28
4.3 Experimento factorial fraccionado.	32
5. DISCUSIÓN	45
6. CONCLUSIONES	49
7. LÍNEA FUTURA	50
8. BIBLIOGRAFÍA	51

## **ABREVIATURAS**

Abs600	Absorbancia a longitud de onda 600 nm
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AU	Unidades arbitrarias
BHB	Caldo Bushnell-Hass
C.	Carbamacepina
Cel	Células
CI	Índice de consistencia
CM	Concentración microorganismos
CMC	Concentración micelar crítica
CF	Concentración de fármaco
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización químico
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
E.S	Error estándar
Fig.	Figura
g	Gramo.
G	Glucosa
h	Hora
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
I	Inóculo
ITS	Espaciador Trascrito Interno (Internal Transcribed Spacer)
l	Litro
LB	Caldo Luria Bertani
LC-MS	Cromatografía líquida – Espectrometría de masas
Pm.	Peso molecular.
MPm.	Marcador peso molecular.
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N.	Naproxeno
NMP	Número más probable
n.s	No significativo

pb	Pares de bases
PBS	Tampón sodio fosfato (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PPCPs	Productos farmacéuticos y de higiene personal
Pm.	Peso molecular.
®	Marca registrada.
RAS	Random-additives-sequences
RI	Índice de retención
rpm	Revolución por minuto
SNK	Student Newman Keuls
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TBR	“Tree-bisection-reconnection”
TM	Tipo de microorganismo.
ITS	Espaciador Trascrito Interno (Internal Transcribed Spacer)
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean
v/v	Proporción volumen/volumen.
p/v	Proporción peso/volumen
μ.	Tasa intrínseca de crecimiento
μg	Microgramo
°C	Grados Centígrados

## RESUMEN

En este estudio se ha analizado el proceso de degradación de los fármacos naproxeno (antiinflamatorios no esteroideo) y carbamazepina (anticonvulsionante) mediante procesos microbianos (consorcio microbiano E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> y la Proteobacteria C<sub>17</sub>).

Se ha realizado un experimento preliminar para la obtención de un consorcio microbiano, con capacidad de crecer ante estos fármacos como única fuente de carbono, a partir de algunas muestras de agua (1, 2 y 3) de distintos enclaves de la depuradora Arroyo de la Vega. Las mayores densidades microbianas se obtuvieron a partir de la muestra de agua 2 (agua de la salida de la planta, que ha sido sometida a tratamiento secundario y descarga al Arroyo de la Vega). También se consiguieron aislar colonias de bacterias de cada una de las muestras de agua y se seleccionó la que mayor densidad bacteriana mostró, la colonia C<sub>17</sub>, aún en proceso de identificación. Esta cepa fue obtenida también a partir del agua 2.

Se realizó un segundo experimento para confirmar la capacidad degradadora de los fármacos (naproxeno y carbamazepina) con consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>, consiguiendo porcentajes de eliminación de un 77% para el naproxeno, y un 29% para la carbamazepina.

Por último, se diseñó un experimento con 6 factores (carbamazepina, naproxeno, tipo de microorganismo, concentración de microorganismo, concentración del fármaco y adición de glucosa,) y Resolución Tipo V, con el objetivo de ver la influencia de distintos parámetros (tasa de crecimiento microbiano, densidades ópticas máximas alcanzadas, respiración, incremento de la población, % de eliminación de los fármacos, toxicidad) y optimizar el proceso. Los resultados obtenidos nos mostraron que las tasas de crecimiento mayores se alcanzaron con el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> y con las concentraciones de inóculo bajas. Sin embargo, las densidades máximas alcanzadas y los valores de respiración (producción de CO<sub>2</sub>) mostraron valores significativamente mayores con la colonia C<sub>17</sub>.

Con respecto a los incrementos de las poblaciones, los resultados indicaron que los mayores valores se alcanzaron con el naproxeno, con la adición de glucosa y con la colonia C<sub>17</sub>. Sin embargo, el porcentaje de eliminación de los fármacos sólo presentó diferencias significativas dependiendo del tipo de fármaco utilizado. Los tratamientos únicamente con naproxeno fueron los que mostraron los porcentajes de eliminación significativamente mayores (80 %) que los obtenidos con carbamazepina y mezcla (< 40 %). Los valores de toxicidad no mostraron diferencias significativas con ningún tratamiento porque los valores

fueron altos y constantes durante los 16 días de incubación. Sólo el experimento con naproxeno y la colonia C<sub>17</sub> redujo en un 40% la toxicidad inicial.

A partir de técnicas moleculares identificamos el hongo *Lecanicillium lecanii* dentro del consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> como posible degradador de los fármacos. La evolución del consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> en cada uno de los tratamientos se estudió con la técnica DGGE. Las bandas obtenidas se evaluaron mediante un análisis de conglomerados por el método UPGMA. En general los tratamientos con mezcla de fármacos mostraron una diversidad diferente al resto de los tratamientos con un solo fármaco, pero similar a los tratamientos sin fármacos, lo que sugiere que la adaptación y capacidad de degradación es menor en la mezcla.

Mediante técnicas moleculares se han localizado filogenéticamente algunos microorganismos que aun no han sido identificados..Con la colonia C<sub>17</sub> sólo se llegó a una identificación preliminar como proteo-bacterias. Todas las bandas obtenidas en el DGGE están siendo analizadas a través de técnicas de clonación que aún no han sido finalizadas. Si se identificó el hongo de la especie *Lecanicillium Lecanii*. Sin duda, la identificación de este último género es un resultado muy importante, ya que son pocos los estudios que hayan relacionado a *Lecanicillium* con procesos de biodegradación. Sin embargo, no se ha conseguido reducir la toxicidad del medio y se han formado especies intermedias, tanto en los tratamientos con naproxeno como con glucosa, con una toxicidad similar al fármaco inicial.



## **1. INTRODUCCIÓN**

Los productos farmacéuticos y de higiene personal (PPCPs por sus siglas en inglés), son un amplio grupo de compuestos químicos que abarcan todos los medicamentos humanos y de animales, agentes de diagnósticos, complementos vitamínicos, y otros químicos como fragancias, protectores solares, e ingredientes inertes usados en la formulación y manufacturación de los PPCPs (Sirbu et al., 2006). Estos compuestos, están declarados contaminantes emergentes del agua, contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales. La presencia de los PPCPs en el medio ambiente no es novedosa, pero si la preocupación por su posible impacto en los distintos compartimentos ambientales (Barceló et al., 2008). Estos contaminantes aún no están incluidos en las regulaciones existentes de calidad de agua, sin embargo, el grupo formado por PPCPs está originando un gran interés tanto científico como social en los últimos años.

Aunque se conocen evidencias de fármacos en el medio acuático desde los años 70 (Barceló et al., 2008), hasta la década de los 90 no se han detectado en niveles traza, gracias a los avances tecnológicos (Ternes y Joss, 2006). Hoy en día, son numerosos los estudios que evidencian la existencia de contaminación por medicamentos en aguas superficiales, aguas subterráneas y de consumo humano (Onesios et al., 2009; Kuster et al., 2008; Gómez et al., 2006).

La entrada de estos contaminantes a las aguas superficiales o subterráneas se da por diversas vías. La principal forma de acceso es a través de las aguas residuales urbanas, por la falta de asimilación y posterior excreción por el organismo, por la eliminación directa a través del desagüe y mediante el depósito como residuos sólidos urbanos, y su posterior lixiviación hacia el medio acuático. La ganadería también es considerada una importante vía de acceso de estos productos a las aguas subterráneas o superficiales, mediante la adición de fármacos a los animales y la posterior contaminación del estiércol utilizado como fertilizante. Y por último, las aguas residuales provenientes de hospitales contribuyen también a la contaminación con mayor concentración de fármacos que las domésticas.

Son muchos los esfuerzos que se están realizando para determinar la presencia y el riesgo de estos microcontaminantes en los sistemas acuáticos y la eliminación durante el tratamiento de aguas y sus procesos de reciclado. Las concentraciones halladas se sitúan normalmente en el orden de  $\text{ng l}^{-1}$  o  $\mu\text{g l}^{-1}$ , sin embargo, incluso a bajas concentraciones, los PPCPs suponen un riesgo debido a su alto potencial de biomagnificación a través de la cadena trófica en

organismos acuáticos e incluso en la salud humana (Choong et al., 2006; Crane et al., 2006; Ankley et al., 2007). Algunos fármacos como el ibuprofeno, el diclofenaco, la carbamacepina, o el ácido clofíbrico, han llegado a encontrarse incluso en aguas potables (Bedner et al., 2006; González et al., 2010), lo que ha despertado una mayor preocupación. Se ha visto que las diferentes familias de fármacos presentan porcentajes de eliminación muy diferentes de un estudio a otro (Onesios et al., 2009) además no presentan la misma biodegradación ya que poseen estructuras químicas muy diferentes que responden a reacciones enzimáticas diferentes (Onesios et al., 2009; Kuster et al., 2008; Gómez et al., 2006)

La Unión Europea no ha fijado aún un límite máximo de estos compuestos en el agua potable, por lo que no es necesario su seguimiento, pero se está estudiando incluir alguno de ellos a la lista de contaminantes prioritarios del agua (Barceló et al., 2008) como por ejemplo el amidotrizoato (medio de contraste radiográfico), la carbamazepina (anticonvulsionante), el clotrimazol (antifúngico), diclofenaco (AINE, antiinflamatorio no esteroideo), yopamidol (medio de contraste radiográfico). El envejecimiento paulatino de la población, especialmente acusado en España, hace que sea posible prever un consumo incluso mayor de medicamentos en los próximos años y por ello el Instituto Mundial de la Salud, coloca a España en el puesto séptimo del consumo mundial de fármacos.

Las vías de actuación que disminuyan la presencia de PPCPs en el medio acuático van desde actuaciones sociales que conciencien a la población de su correcto uso y gestión del residuo, como cambios en la composición de los PPCPs que sustituyan los compuestos activos más agresivos o minimicen la fracción excretada, hasta la optimización de la tecnología y de las condiciones de operación de las EDARs. Los mecanismos de eliminación de estos PPCPs a su paso por la EDAR, son diferentes, tales como la adsorción sobre los sólidos presentes en el tratamiento, volatilización, biotransformación y mineralización. Se está estudiando la eliminación de estos compuestos mediante técnicas de post-tratamiento más sofisticadas, como la ozonización (Suárez et al., 2007), la filtración por membrana, o la adsorción sobre carbón activado. Sin embargo, el empleo de estas etapas a menudo supone un gran encarecimiento del proceso global.

Son muchos los estudios y revisiones que concluyen que son necesarias investigación más amplias sobre biodegradación, toxicidad de compuestos intermedios, y comunidades microbianas degradadoras de PPCPs (Onesios et al., 2009). Encontrar qué comunidades bacterianas son capaces de degradar PPCPs, y qué condiciones de operación son las más adecuadas permitiría optimizar parámetros comunes de operación de las EDAR para lograr

una mayor biodegradación en la planta que contribuya a la solución de esta nueva problemática.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo general del presente trabajo consiste en estudiar la degradación de dos fármacos elegidos mediante revisión bibliográfica, utilizando distintas comunidades microbianas y colonias aisladas obtenidas a partir del efluente de una EDAR, y en caso de encontrar alguna que degrade, diseñar un experimento que permita evaluar qué condiciones pueden ser más eficaces en la degradación de cara a futuras líneas de investigación aplicadas.

Esto puede desglosarse en cuatro objetivos parciales.

**Objetivo 1** - Revisión bibliográfica y selección de dos PPCPs interesantes para el estudio de su biodegradación, en función de su consumo, concentración en efluentes de las plantas depuradoras, degradabilidad y toxicidad.

**Objetivo 2** - Aislamiento de las colonias y/o consorcios capaces de metabolizar PPCPs como única fuente de energía y carbono.

**Objetivo 3** - Diseño de experimentos que permita optimizar el proceso de eliminación de los fármacos.

**Objetivo 4** - Seguimiento de diversos parámetros durante el proceso de degradación de los contaminantes y su análisis estadístico.

### **3. METODOLOGÍA**

#### ***3.1 Descripción del trabajo***

En el desarrollo de mi Proyecto Fin de Carrera llevé a cabo las siguientes labores:

Desde Agosto a Noviembre del 2009 realicé una búsqueda, recopilación, lectura y análisis de bibliografía relacionada con los PPCPs y su bioremediación, con el objetivo de conocer las recientes investigaciones en este campo, y seleccionar los medicamentos idóneos para el desarrollo del proyecto, teniendo en cuenta su concentración en efluentes de las plantas, su toxicidad, su biodegradabilidad en los estudios ya realizados, y su consumo.

De Noviembre de 2009 a Febrero de 2010 realicé la experimentación necesaria para encontrar los consorcios microbianos y colonias aisladas presentes en aguas de una planta depuradora con capacidad degradadora de PPCPs. A partir de estos experimentos se obtuvo un consorcio (E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>) y una colonia aislada (C<sub>17</sub>) que parecía presentar buenos resultados de degradación ante los fármacos escogidos (Carbamazepina y Naproxeno). Posteriormente, se realizó un experimento con el consorcio seleccionado comprobando la capacidad degradadora a través de técnicas microbiológicas, moleculares y químicas.

Durante Febrero y Marzo de 2010 leí bibliografía sobre análisis de datos estadísticos, y sobre diseños factoriales fraccionales de experimentos, así como sobre la utilización del programa Statistica 7.0 para estos propósitos. Diseñé una nueva tanda de experimentos que, con el menor número de combinaciones, permitiera repetir la experimentación, optimizándola y obteniendo la máxima información para la degradación óptima de los PPCPs escogidos.

En Abril y Mayo se llevo a cabo este experimento ortogonal. Los factores que se eligieron fueron los fármacos (naproxeno vs. carbamazepina), el tipo de microorganismo (consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> vs. una colonia aislada C<sub>17</sub> aun sin identificar), la concentración de inóculo ( $70 \pm 20 \cdot 10^3$  cel ml<sup>-1</sup>,  $20 \pm 4 \cdot 10^3$  cel ml<sup>-1</sup>), la concentración del fármaco, tomando como la alta la máxima que se solubiliza en agua y siendo la baja 10 veces menor ( $62,5 \text{ mg l}^{-1}$  y  $6,25 \text{ mg l}^{-1}$  para el naproxeno,  $12,5 \text{ mg l}^{-1}$  y  $1,25 \text{ mg l}^{-1}$  para la carbamazepina), y la adición de una fuente de carbono lábil como la glucosa ( $4 \text{g l}^{-1}$ ).

Los parámetros que se analizaron fueron, la densidad óptima, la toxicidad, el recuento de bacterias a través del número más probable, la producción de CO<sub>2</sub> durante la degradación del fármaco y el porcentaje de eliminación de los fármacos. Además se realizaron técnicas moleculares para la identificación de los microorganismos tanto cultivables como no

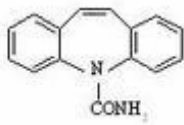
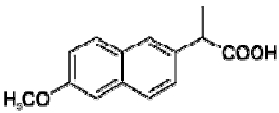
cultivables mediante la técnica del DGGE. Se analizaron estadísticamente los resultados durante el mes de Junio.

### 3.2 Selección de los PPCPs

Tras la revisión bibliográfica se seleccionaron dos fármacos para la realización de este estudio, el naproxeno y la carbamazepina. Los criterios que se tuvieron en cuenta fueron, la concentración en efluentes de plantas depuradoras, especialmente en España, el consumo, la capacidad de degradación del compuesto, la toxicidad que estos productos generan en las aguas y por último, el número de estudios realizados de los compuestos hasta la fecha.

Estos dos fármacos están presentes tanto en diversos afluentes y efluentes de España en concentraciones relevantes. (Carballa et al., 2008; Kuster et al., 2008; Gómez et al., 2007). Ambos fármacos tienen un consumo elevado, hasta 20 toneladas de carbamazepina, y 42,6 toneladas de naproxeno en el año 2003 sólo en España (Carballa M et al., 2008). La estructura molecular de los fármacos seleccionados para el estudio puede verse en la Tabla 1.

**Tabla 1.** - Estructura molecular de los PPCPs estudiados (adaptado de Quintana et al., 2005)

<i>Compuesto</i>	<i>Peso molecular (g/mol)</i>	<i>Estructura molecular</i>
<i>Carbamazepina (C)</i>	236,27	
<i>Naproxeno (N)</i>	130,078	

El naproxeno (Ácido (S)-6-metoxi- $\alpha$ -metil-2-naftalenacético), es un ácido arilpropiónico, que pertenece a la clase de medicamentos llamados antiinflamatorios no esteroideos (AINE) de uso general, empleado en el tratamiento del dolor suave a moderado, la fiebre, la inflamación y en el tratamiento de la artritis osteo y reumatoide. Debido a su alta utilización como medicamento sin receta, se ha detectado en aguas superficiales, subterráneas, e incluso en agua potable (Benotti et al., 2009; Zhao et al., 2009a,b). Su degradación ha sido estudiada pero principalmente centrada en tratamientos físico-químicos como el cloro libre, la

ozonización, la fototransformación y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, que para el naproxeno ha conseguido grandes porcentajes de eliminación (Boyd et al., 2005; Nakada et al., 2007; Pereira et al., 2007; Poyatos et al., 2009). Sin embargo, una característica común de estos procesos parece ser su incapacidad para conseguir una completa eliminación, convirtiéndose algunas veces en productos intermedios más tóxicos que los originales (Isidori et al., 2005).

Aunque los estudios detallados sobre la biodegradación del naproxeno son escasos (Onesios et al., 2009), los porcentajes de eliminación encontrados son muy variables, desde casi la total eliminación (Bendez et al., 2005; Vieno et al., 2005), hasta niveles medios (Carballa et al., 2007a; Rodríguez et al., 2003; Nakada et al., 2006) incluso la no eliminación (Boyd et al., 2005). También se ha observado que el uso de lodos activados como inóculo en condiciones aeróbicas biodegradada el naproxeno cometabólicamente en EDARs (Quintana et al., 2005) aunque esta biodegradación puede sufrir variaciones estacionales (Matamoros et al., 2008).

La carbamazepina (5H-dibenz[b,f]azepino-5-carboxamida), es un fármaco antiepiléptico, utilizado en el trastorno bipolar, espasmos infantiles, alteraciones afectivas o de la conducta y esclerosis múltiple. En ocasiones también se utiliza para tratar la esquizofrenia y la neuralgia del trigémino y glosofaringéa. Este fármaco parece ser de los más resistentes a la biodegradación, y según la revisión de Onesios y colaboradores (2009) no se encuentra ningún porcentaje de eliminación en plantas a gran escala superior al 40 %. Los porcentajes de eliminación oscilan entre el 0 y el 40% (Bendz et al., 2006; Bernhard et al., 2006; Clara et al., 2005b, Ternes et al., 2007) y siempre han sido inferiores a los encontrados para el naproxeno. Incluso, se ha propuesto utilizar la carbamazepina como marcador molecular de la contaminación por aguas residuales en ríos, aguas subterráneas y zonas costeras, por su alta resistencia a la degradación. (Nakada et al., 2008).

Hasta el momento, se han identificado algunas especies como degradadores de estos PPCPS. Rodarte-Morales et al., 2010 encontró que diferentes cepas de *Bjerkandera sp.* y *Phanerochaete chrysosporium* fueron capaces de degradar la carbamazepina y el naproxeno completamente. Marco-Urrea et al., 2010 identificó al hongo *Tratametes versicolor* como capaz de degradar naproxeno en presencia de glucosa con porcentajes del 95% en medio líquido y Rodríguez-Rodríguez et al., 2010 identificó que esta misma especie también capaz de degradar naproxeno y carbamazepina en presencia de glucosa con porcentajes del 50% para ambos en lodos activados. El hongo de la especie *Cunninghamella* se encontró capaz de degradar el naproxeno en su totalidad (Zhong et al., 2003). Para la carbamazepina, se

identificó el hongos *Aspergillus Níger* y la bacteria *Rhodococcus Rhodochrou* como degradadoras, pero sólo alcanzaron porcentajes de un 20% (Hervé et al., 2010)

### **3.3 Medios de cultivo, reactivos y disolventes**

Las muestras de agua fueron recogidas de la estación depuradora de aguas residuales urbanas de Arroyo de la Vega, con una capacidad de 100.000 equivalentes – habitante. El principal suministro es el agua residual de las poblaciones de Alcobendas y San Sebastián de los Reyes. Esta planta vierte agua del tratamiento secundario al Arroyo de la Vega y tiene además un tratamiento terciario para depurar agua hasta la calidad necesaria para su uso como agua de riego. Las muestras se han obtenido en diversas tomas de la planta (Tabla 2).

**Tabla 2.** – Experimentos con consorcios microbianos. Agua1 es el agua de recogida en el cauce del río al nivel de la planta. Agua2 es el agua a la salida del tratamiento secundario agua que se vierte directamente al río). Agua3 es el agua a la salida del tratamiento terciario (agua que se utiliza para riego).

	<i>Lugar de recogida</i>	<i>Naproxeno</i>	<i>Carbamazepina</i>	<i>Mezcla</i>
<i>Agua 1</i>	<i>Cauce del río</i>	<i>E1</i>	<i>E4</i>	<i>E7</i>
<i>Agua 2</i>	<i>Salida del tratamiento 2º</i>	<i>E2</i>	<i>E5</i>	<i>E8</i>
<i>Agua 3</i>	<i>Salida del tratamiento 3º</i>	<i>E3</i>	<i>E6</i>	<i>E9</i>

Estas muestras de agua fueron conservadas bajo refrigeración. Los fármacos seleccionados para el estudio, carbamazepina (C.) y naproxeno (N.), fueron suministrados por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). Se diluyeron en agua destilada, controlando para ello el pH de la disolución, hasta las siguientes concentraciones: carb: 12,5 mg l<sup>-1</sup> ; napr: 62,5 mg l<sup>-1</sup>. El medio de cultivo BHB (Caldo Bushenll Hass) fue preparado en el laboratorio sin añadir la fuente de nitratos hasta después del proceso de autoclavado, ya que se observó que la fuente de nitratos podía sufrir modificaciones en el proceso de esterilización. El medio LB (Luria Burni) y la glucosa, se adquirieron de Panreac (Barcelona, España). La composición de dichos medios de cultivo puede consultarse en la Tabla3.



**Tabla 3.** – Composición del medio de cultivo BHB y LB, ambos con pH 7,0 ±0,2

<b>Compuesto (BHB)</b>	<b>Concentración (g/l) (BHB)</b>	<b>Compuesto (LB)</b>	<b>Concentración (g/l). (LB)</b>
MgSO <sub>4</sub>	0,2	Peptona de caseína	10
CaCl <sub>2</sub>	0,02	Extracto de levadura	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,281	Sodio cloruro	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,281		
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,195		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,02		

La glucosa, suministrada por Panreac, se utilizó en concentraciones de 4g/L. La estructura molecular de los PPCPs de este estudio tiene similitudes con los PAHs por lo que se utilizó el surfactante Tween 80 (C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>S<sub>6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>20</sub>OH) suministrado por Panreac a una concentración de 1% (v/v) de la concentración micelar crítica (0,012 mM, 25 °C), para permitir una mayor solubilidad de los PPCPs en la fase acuosa y la formación de micelas (Bautista et al., 2009). El disolvente acetonitrilo y el ácido clorhídrico empleados como fase móvil en el análisis cromatográfico fueron suministrados por Scharlau Chemie (Barcelona, España). El tampón PBS (Phosphate Buffered Saline) fue suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada de calidad Mili-Q. Con el fin de esterilizar todos los medios, soluciones y material utilizado, se les sometió a un proceso de autoclavado a 121°C y a una atmósfera de presión durante 20 minutos. Todos los reactivos utilizados tienen una pureza analítica.

### **3.4 Diseño experimental**

#### **3.4.1 Obtención y selección del consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> y la colonia C<sub>17</sub>.**

- De cada muestra de agua (Tabla 2) se inocularon 3 erlenmeyers, con 1 ml de agua cada uno y 49 ml de medio mineral BHB, Tween 80 (1 %) y como única fuente de carbono, 1 ml de carbamazepina (0,25 mg l<sup>-1</sup> concentración final.) o de naproxeno (1,25 mg l<sup>-1</sup> concentración final), o de la mezcla de ambos PPCP<sub>s</sub>. De cada muestra de agua se sembró 100µl en placas petri con LB agar + glucosa y se incubaron durante 48 horas a 25 °C y en oscuridad. De cada placa se aislaron un mínimo de 5 colonias por muestra de agua. Cada una de estas colonias se resembraron bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas para obtener biomasa. Esta biomasa de cada una de las colonias se inoculó en un erlenmeyer con 49 ml de medio mineral BHB, 1% de Tween 80 y 500 µl de carbamazepina (0,125 mg l<sup>-1</sup> concentración final.) y 500 µl de naproxeno (0,625 mg l<sup>-1</sup> concentración final.).

Se estudió la evolución de las densidades ópticas de un total de 27 erlenmeyer (colonias aisladas y muestras de agua) a lo largo de 12 días. Se refrescaron sólo los erlenmeyer en los que se observó incrementos de las densidades ópticas. Para el refresco se añadió 1 ml de inóculo del experimento anterior, biomasa de la colonia correspondiente crecida en placa petri para aumentar la biomasa del inóculo, 49 ml de medio mineral BHB con Tween 80, 500 µL de carbamazepina (0,125 mg l<sup>-1</sup>) y 500 µL de naproxeno (0,625 mg l<sup>-1</sup>). Durante 19 días se hizo un seguimiento de la densidad óptica en cada uno de los erlenmeyer.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en un agitador orbital (NewBrunswick Scientific, New Jersey USA) a 200 rpm y 25°C en oscuridad para evitar la posible influencia de la luz en la estabilidad de los fármacos. La comunidad microbiana y la colonia que mejores resultados mostraron fueron la colonia 17 (C<sub>17</sub>) y el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> obtenidos ambos del agua residual de la salida de la planta depuradora al Arroyo de la Vega (Agua 2).

### 3.4.2 Experimentos con el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>.

• Se estudió la actividad degradadora del consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> ante la carbamazepina y el naproxeno por separado, y en presencia o ausencia de glucosa (Tabla 4). Se añadió 1 ml del consorcio en 49 ml de BHB con 1% de Tween 80, 1ml del fármaco correspondiente (0,25 mg l<sup>-1</sup> de C., 1,25 mg l<sup>-1</sup> de N.), y una concentración de 4g/L de glucosa en aquellos tratamientos que la lleven. De cada uno de los tratamientos se realizaron tres réplicas y se incubaron en un agitador orbital a 200rpm, en oscuridad a 25°C durante 16 días. Se tomaron muestras diarias en las que se midió la densidad óptica (curva de crecimiento) mediante espectrofotometría, y la concentración de PPCPs mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Además, los días 1 y 16 se tomaron muestras para el análisis de la toxicidad (Microtox) y para biodiversidad bacteriana a través de DGGE (ver material y métodos).

**Tabla 4.** – Actividad degradadora del consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>

	<i>Glucosa</i>	<i>Carbamazepina</i>	<i>Naproxeno</i>
<i>CG+</i>	+	+	-
<i>NG+</i>	+	-	+
<i>CG-</i>	-	+	-
<i>NG-</i>	-	-	+

### 3.4.3 Experimento ortogonal consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> y colonia C<sub>17</sub>

Finalmente, se planteó un diseño factorial de experimentos que permitiera, en un número razonable de experimentos, repetir la experimentación con el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>, y la colonia C<sub>17</sub>, y ver la influencia del mayor número de variables que afecten a la biodegradación de los fármacos.

Los factores se eligieron en función de las conclusiones publicadas en la revisión de artículos sobre biodegradación de PPCPs de Onesios y colaboradores., 2009, en la que se planteaba que las diferencias entre los diseños experimentales de cada estudio eran las causante de las grandes variaciones entre los porcentajes de eliminación de cada PPCP. Encontraron diferencias en cuanto a si el PPCPs se está usando como única fuente de energía y carbono para los microorganismos, aunque se añada una fuente de carbono lábil en bajas concentraciones (donde los PPCPs podrían actuar como fuente de carbono principal), o bien

si se añade el PPCP en concentraciones traza y altas concentraciones de otra fuente de carbono (donde permite observarse como el microorganismo usa estos PPCPs a través de cometabolismo. Ternes y Joss., 2006). Onesios y colaboradores encontraron además que la fuente y concentración de microorganismos, también puede afectar a la eficiencia del proceso. Se incluyó la concentración de microorganismos (CM), la concentración de cada fármaco (CF) y la presencia de glucosa (G.) como factores, además de la carbamazepina (C.), el naproxeno (N.), y el tipo de microorganismo utilizado (TM).

Si los experimentos pueden asumir razonablemente que la información sobre las interacciones entre variables de tercer orden y superiores no son importantes, puede usarse un tipo de diseño factorial ortogonal que incluye sólo una fracción del diseño completo (Montgomery, 1991). Este diseño es ampliamente utilizado en estudios de bioremediación (Chen Y. et al, 2009, Chena J. et al, 2008., Mohajeri et al., 2010) y permite estudiar la influencia de los efectos principales, y la interacción entre ellos deseada. Se consideró suficiente establecer dos niveles para cada factor. Este diseño suele estar representado en la forma  $2^{(k-p)}$ , donde k es el número de factores, y  $1/2^p$  es la fracción del factorial completo de  $2^k$ . Siempre que se realice fraccionamiento de diseños  $2^k$  se producirá confusión entre efectos (Montgomery, 1991).

Según el grado de confusión que se obtiene, existen varios tipos de resoluciones para estos experimentos fraccionales. Se estudió qué tipo de reducción permitía que el número de experimentos fuese aceptable sin perder demasiada información y se eligió una Resolución Tipo IV, con la que es posible estimar todos los efectos principales, sin confundirlos con ningún otro factor o combinación. Considerando despreciables las interacciones de tercer orden, sólo se confundirán las interacciones de segundo orden entre sí. La descripción técnica de cómo son construidos los diseños fraccionales  $2^{(k-p)}$  puede encontrarse en Montgomery (1991), Jiju (1993), Deming y Morgan (1993). El programa utilizado como ayuda en la generación del diseño experimental y para el posterior análisis estadístico fue Statistica 7.0.

**Tabla 5.** – Matriz diseño 6 factores fraccionado y concentraciones para el diseño factorial fraccionado. Resolución IV

Código	C	N	TM	G	CM= C·N·TM	CF = C·N·G
	Carbamazepina (mg l <sup>-1</sup> ).	Naproxeno (mg l <sup>-1</sup> )	Tipo Microorganismo	Glucosa (g/L)	Concentración microorganismos (·10 <sup>-3</sup> )(cel/ml)	Concentración fármaco
1	NO	NO	E <sub>2</sub> E <sub>5</sub>	-	70 ± 20	-
2	NO	NO	E <sub>2</sub> E <sub>5</sub>	4	70 ± 20	-
3	0,625	3,25	E <sub>2</sub> E <sub>5</sub>	-	70 ± 20	BAJA
4	6,25	31,25	E <sub>2</sub> E <sub>5</sub>	4	70 ± 20	ALTA
5	12,5	NO	E <sub>2</sub> E <sub>5</sub>	-	20 ± 4	ALTA
6	1,25	NO	E <sub>2</sub> E <sub>5</sub>	4	20 ± 4	BAJA
7	NO	62,5	C <sub>2</sub> E <sub>5</sub>	-	20 ± 4	ALTA
8	NO	6,25	E <sub>2</sub> E <sub>5</sub>	4	20 ± 4	BAJA
9	NO	NO	C <sub>17</sub>	-	20 ± 4	-
10	NO	NO	C <sub>17</sub>	4	20 ± 4	-
11	0,625	3,25	C <sub>17</sub>	-	20 ± 4	BAJA
12	6,25	31,25	C <sub>17</sub>	4	20 ± 4	ALTA
13	12,5	NO	C <sub>17</sub>	-	70 ± 20	ALTA
14	1,25	NO	C <sub>17</sub>	4	70 ± 20	BAJA
15	NO	62,5	C <sub>17</sub>	-	70 ± 20	ALTA
16	NO	6,25	C <sub>17</sub>	4	70 ± 20	BAJA

- Se estudió la actividad degradadora del consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> y la C<sub>17</sub> ante la carbamazepina, el naproxeno, y la mezcla de ambos fármacos, en presencia o ausencia de glucosa como fuente de carbono, y con dos posibles concentraciones de fármacos y de inóculo. Se realizaron dos réplicas de cada uno de los 16 tratamientos y siempre como base 75 ml de BHB con 1% de Tween 80. Las características de cada tratamiento se muestran en la Tabla 5. Se realizaron además dos controles abióticos con dos réplicas, con glucosa (75 ml de BHB, C. 6,25 mg l<sup>-1</sup>, N 31,25 mg l<sup>-1</sup>, 4g l<sup>-1</sup> glucosa) y sin ella (75 ml de BHB, C. 6,25 mg l<sup>-1</sup>, N. 31,25 mg l<sup>-1</sup>).

Se tomaron muestras diarias de diferentes parámetros biológicos que se detallan en el siguiente apartado (Crecimiento población bacteriana, respiración, incremento celular NMP, concentración de PPCPs, toxicidad, y biodiversidad bacteriana).

### 3.5 Material y métodos

#### 3.5.1 Estima del crecimiento de la población bacteriana.

La curva de crecimiento bacteriano de cada cultivo se estudió a través de la densidad óptica a 600 nm. mediante espectrofotometría (Spetronic Genesys™). Para ello, se tomaron alícuotas de 1ml cada dos días de cada uno de los tratamientos. Estas muestras se centrifugaban durante 1 minuto a 13000 rpm y 21°C, eliminando de esta forma el material celular. El sobrenadante obtenido se utilizaba como blanco y se corregía el valor estimado a partir de una alícuota del mismo volumen sin centrifugar. A partir de la curva de crecimiento se calculó la tasa intrínseca de crecimiento ( $\mu$ ) como la pendiente de la fase exponencial.

La concentración de bacterias totales heterótrofas fue estimada utilizando la técnica del número más probable (NMP) mediante las placas de microtitulación (96 pocillos). Para ello, se tomaron alícuotas (100  $\mu$ l) al inicio y final del experimento de cada uno de los tratamientos y se prepararon 8 diluciones seriadas 1:10 con tampón PBS. Cada columna de 8 pocillos representa las réplicas de cada dilución y cada pocillo contiene 180  $\mu$ l de LB glucosa + 20  $\mu$ l de la dilución correspondiente. Los pocillos se tomaron como positivos cuando se produjo un cambio en la turbidez debido al aumento de la biomasa y de los productos procedentes del metabolismo microbiano. Para realizar los cálculos estadísticos se utilizó el programa informático descrito por Klee, 1993. A partir de esos datos se calculó el incremento de la población durante el tiempo de incubación.

#### 3.5.2 Análisis de Toxicidad.

La evolución de la toxicidad de las muestras, en el tiempo que duró cada experimento, se estimó mediante el test Microtox™ desarrollado por Microbics Corporation 1992. Este ensayo se basa en la disminución de la luz emitida por la bacteria marina bioluminiscente *Vibrio fischeri* al exponerla a un medio tóxico.

Un “screening” de las muestras, permitió obtener una estimación rápida de la toxicidad de las mismas, determinada por el % de inhibición de la *Vibrio fischeri*. Siguiendo el protocolo, el liofilizado comercial de *Vibrio fischeri* se hidrató con NaCl al 2% de concentración y se dejó atemperar a 15°C durante 30 minutos en un peltier (Berotza). Cada muestra a analizar fue salada con 100  $\mu$ l de NaCl (al 2%) e incubada con 100  $\mu$ l de la *V. fischeri*. Se prepararon tres blancos (200  $\mu$ l de NaCl al 2%) y tres controles (100  $\mu$ l de NaCl al 2% y 100  $\mu$ l de *V.*

*fischeri*), asumiendo que las muestras control, que contienen la *V. fischeri* presentan el 0% de inhibición, mientras que los blancos, únicamente con NaCl (2%) presentan del 100% de inhibición (no emisión de luminiscencia). Pasados 15 minutos se midió la emisión de luz de las muestras en un luminómetro (MGM Ins. Model Optocomp I®) obteniendo como resultados los porcentajes de toxicidad de cada muestra.

### ***3.5.3 Análisis de la concentración de PPCPs durante el proceso de biodegradación.***

El análisis de la evolución de las concentraciones de carbamazepina y naproxeno, durante el proceso de degradación se analizó mediante la técnica HPLC en fase reversa con un detector UV-visible (Varian Star Liquid) midiendo a 230 nm. Este equipo consta de una fase estacionaria formada por una columna C18 (Luna C18 (2), con un tamaño de partícula 7.5 cm x 4.6 mm; 3µm. Phenomenex, Torrance, CA, USA).

Se utilizaron dos métodos de diferente duración, uno para el naproxeno (30 min) y otro para la carbamazepina (15 min), ya que el naproxeno tiene un tiempo de retención de 21,1 min y la carbamazepina de 6.9 min. La fase móvil fue común para ambos métodos, y estaba formada por una mezcla de 35% de acetonitrilo: 65 % de agua ácida (disolución de HCl, pH4.0). Estas proporciones no varían con el tiempo y la fase móvil circula con un caudal de 0,5 ml/min.

Se realizó un patrón externo para cada fármaco, y el contenido en cada muestra de PPCP se calculó integrando el área de cada pico y representándolo en la curva de calibrado frente a la concentración. El porcentaje de eliminación del naproxeno y carbamazepina se estimó al final de la incubación.

Se midieron blancos abióticos para las mismas concentraciones en el tiempo inicial como en el final de cada experimento para comprobar que no se produce degradación debido a factores no biológicos y las concentraciones de los fármacos no cambiaron en ausencia de microorganismos.

### **3.5.4 Estimación del CO<sub>2</sub> producido en la degradación de los PPCPs**

Con el fin de determinar el grado de mineralización hasta CO<sub>2</sub> de los compuestos orgánicos empleados como fuente carbono (oxidación completa a CO<sub>2</sub>) se hizo un seguimiento del CO<sub>2</sub> liberado por los microorganismos. Los ensayos se llevaron a cabo en matraces erlenmeyer de 100 ml cerrados herméticamente con tapones de silicona. Este tapón contiene dos orificios conectados a dos tubos de silicona, uno de ellos para la toma de las muestras y otro de ellos que conecta con un vial de centelleo herméticamente cerrado y con 10 ml de una disolución 0,2 N de NaOH. Con una periodicidad de 2 días se cambiaba el vial de centelleo con la disolución de NaOH. A cada uno de los viales con el CO<sub>2</sub> atrapado en la disolución básica se le añaden 10 ml de BaCl<sub>2</sub> (0,1 N) para que los carbonatos que se producen precipiten en forma de carbonatos de bario. Se realizó una valoración ácido-base con una disolución de HCL 0,1 M para determinar la sosa que no había sido neutralizada con el fin de, por diferencia, calcular el CO<sub>2</sub> desprendido. El mismo proceso se realizó con controles abióticos con glucosa, y sin ella.

### **3.5.5 Análisis estadísticos.**

Los experimentos con el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> se analizaron a través del análisis de la varianza (ANOVA; Statistica 7.0), para dos factores independientes (tipo de PPCP y presencia de glucosa). La homogeneidad de las varianzas se confirmó a través del test de Chochrman. Para discriminar la magnitud de las diferencias entre tratamientos después del test de significación de la F (significativo p<0,05), se utilizó el test a posteriori Student Newman Keuls (SNK; p<0).

El experimento factorial fraccionado, es un diseño con 6 factores, lo que permite interpretar el efecto de los factores principales, pero sus interacciones de segundo nivel se verán confundidas entre sí, siendo los alias para el diseño, 1) C·N = TM·CM = G·CF 2) C·TM = N·CM 3) C·G = N·CF 4) C·CM = N·TM 5) C·CF = N·G 6) TM·G = CM·CF 7) TM·CF = G·CM. Para evitar interpretaciones erróneas y como el número de factores es elevado, se tomó como significativo p<0,01).



### **3.5.6. Caracterización molecular de los microorganismos y análisis DGGE.**

A parte de la biodiversidad bacteriana, durante las pruebas de estima de la población bacteriana (NMP), realizadas para el experimento factorial, se observó que la turbidez en los pocillos venía dada en algunos tratamientos por un hongo (H<sub>1</sub>), que crecía desde la parte inferior. Esto ocurría en la mayoría de los tiempos finales para el consorcio, por lo que se descartó que fuera una contaminación.

Se realizó la extracción de ADN para la colonia C<sub>17</sub> y el hongo H<sub>1</sub>, de cara a su posterior identificación, y se valoró la biodiversidad en el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> mediante DGGE.

#### **1.- Extracción, amplificación por PCR e identificación de la cepa bacteriana**

La extracción de ADN de bacterias se realizó utilizando el “Kit UltraClean Microbial ADN Isolation” (MoBio Laboratories, Inc., Solano Beach, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La amplificación de la secuencia de ADN que codifica la región 16 rARN de la colonia C<sub>17</sub> fue realizada según lo descrito por Viñas et al., 2005. Los primers usados fueron el 16F27 (5'- AGA GTT TGA TCT GGC TCA G-3') y el 16R1488 (5' – CGG TTA CCT TGT TAC GAC TTC AGG- 3') descritos por Lane, 1991. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo según el protocolo ExTaq polimerasa (Promega, Madison, Wis).

La mezcla de reacción contenía 0,625 unidades de Ex Taq Hs polimerasa (Takara Bio Inc, Japón), 2 µL de tampón (20 mM, Takara Bio Inc, Japón), 2,5 µL de tdNTP, (2,5 mM, pH 7-9, Takara Bio Inc, Japón), 1,25µL de cada cebador (16F27 y 16R1488, 10 mM) (Metabion, Alemania), 2 µL de ADN molde y agua calidad miliQ hasta completar 25 µL de volumen.

Dicha reacción se llevo a cabo en un termociclador de Biorad para las reacciones de PCR desarrollando el siguiente programas: desnaturalización inicial a 94°C durante 9 minutos y 30 ciclos de: 94°C durante un minuto (desnaturalización), 55°C durante un minuto (anillamiento) y 72°C durante 1,5 minutos (extensión). Después a 72°C durante 1,5 minutos seguidos de 10 minutos finales a 72°C y el mantenimiento final de las muestras a 4°C.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, cargando en cada pocillo 3 µL de ADN y 3 µl de Syber-Green en tampón TAE (1X). La electroforesis se hizo en cubetas horizontales (Ecogen) utilizando una fuente de alimentación Apelex ps503, ps304. El tamaño molecular y la concentración se estimó utilizando el marcador de peso molecular (100 bp ADN Ladder, BioRon Internacional, 100-1000bp en incrementos de 100pb). La migración del ADN se realizó a 90-120 V en tampón TAE 1X. Los fragmentos de ADN se

observaron mediante la iluminación de los geles con un transiluminador de luz ultravioleta (ImageMaster® TFX 20.M).

El producto de PCR fue entonces purificado utilizando 1µL de EXOsap por cada 5µL de muestra y el siguiente programa del termociclador: desnaturalizar durante 15 minutos a 37°C, seguido de 80°C durante 15 minutos y el mantenimiento final de las muestras a 4°C.

La secuencia de nucleótidos se obtuvo con la colaboración del servicio de secuenciación de la Universidad Rey Juan Carlos (Unidad Genómica). Para la edición y alineamiento de las secuencias se usó la versión del software 4.8.7. BioEdit (Hall 1999) comprobando los errores de lectura y en los casos en los que fue posible se resolvieron ambigüedades de tal manera que no fue necesario excluir ninguna posición de los datos de la matriz. La identificación de la cepa se llevó a cabo comparando la secuencia con aquellas publicadas en la base de datos GenBank (<http://0-www.ncbi.nlm.nih.gov.library.vu.edu.au/BLAST/>) haciendo uso de la opción BLAST. El programa ofrece una lista indicando el tanto por ciento de similitud entre la secuencia problema y las más próximas genéticamente.

## ***2.- Extracción, amplificación por PCR y análisis filogenético del hongo.***

El protocolo de extracción de ADN es diferente según el tipo de microorganismo. Para la extracción de ADN del hongo se utilizó el “Kit DNAEasy Plan Mini QIAGEN” (MoBio Laboratories, Inc., Solano Beach, CA).

El marcador molecular que se seleccionó para identificar y estudiar filogenéticamente el hongo fue la región ITS nrDNA (Internal Transcribed Spacer), utilizando los primers ITS1F (3' – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 5') y ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'), según lo descrito por Gardes et al., (1995); White et al., (1990). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo según el protocolo ExTaq polimerasa (Promega, Madison, Wis) en un volumen final de 25µL que contenía 1 unidad de Ex Taq Hs polimerasa (Takara Bio Inc, Japón), 2,5 µL de tampón (20 mM, Takara Bio Inc, Japón), 2 µL de tdNTP, (2,5 mM, pH 7-9, Takara Bio Inc, Japón), 1,25µL de cada cebador (ITS1 y ITS4, 10 mM) (Eurofins MWG Operon), 6 µL de ADN molde y la cantidad adecuada de agua calidad miliQ.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 9 minutos y 30 ciclos de: 94°C (desnaturalización) durante un minuto y 54°C (anillamiento) durante un minuto y 72°C durante 1,5 minutos

(extensión). La extensión final se completó a a 72°C durante 10 minutos, manteniendo la muestra finalmente a 4°C.

La estimación de la concentración de ADN en el producto de reacción y el tamaño molecular del fragmento, se realizó de manera análoga a lo indicado para la colonia microbiana. C<sub>17</sub>. Las secuencias de nucleótidos se obtuvieron con la colaboración de la empresa MacroGen Inc. (Seoul, Republic of Korea).

La edición, alineamiento de las secuencias, e identificación de los organismos se llevó a cabo usando los mismos programas que para la cepa C<sub>17</sub>. Para el análisis filogenético de la secuencia de datos se realizó un análisis de Parsimonia utilizando el programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2003). Se realizó una búsqueda heurística de 100 repeticiones con adición aleatoria de taxones, RAS (randomes-additives-sequences) con intercambio de rama TBR (tree-bisection-reconnection) y manteniendo la opción “multitrees”, la cual guarda todos los árboles generados en el análisis. El análisis también ofrece el índice de confianza (CI) y de retención (RI). La medida de confianza o fiabilidad de los clados obtenidos, han sido estimadas mediante el análisis no paramétrico de “bootstrap” corriendo 1000 pseudoréplicas (Felsenstein 1985) en las mismas condiciones de análisis que la búsqueda heurística. *L. fungicola* fue utilizado como “out-group” de acuerdo con la filogenia presentada por Kouvelis et al., 2008. Los árboles filogenéticos se dibujaron utilizando el programa TREEVIEW (Page 1996).

### ***3.-Análisis DGGE del consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>***

Con objeto de comparar la dinámica de las poblaciones microbianas entre tratamientos en el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>1</sub>, se llevó a cabo la técnica molecular independiente de cultivo DGGE (electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización químico)

Tras la extracción del ADN total de cada tratamiento, se realizó la amplificación de las regiones V3 a V5 del gen 16S rARN utilizando los primers 518F (5'-CCA GCAGCC GCG GTA AT-3') (Muyzer et al. 1993) y el 338R-GC (5'- CGC CCG CCGCGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G -3') (Amman et al. 1990).

A la mezcla de reacción se añadió 1 unidad de Ex Taq Hs polimerasa (Takara Bio Inc, Japón), 2,5 µL de tampón (20 mM, Takara Bio Inc, Japón), 2 µL de tdNTP, (2,5 mM, pH 7-9, Takara Bio Inc, Japón), 1,25µL de cada cebador (518F y 338R, 10 mM) (Metabion, Alemania), 6 µL de ADN molde y agua calidad miliQ hasta completar 25 µL de volumen.

El programa de la reacción de amplificación se indica a continuación: desnaturalización inicial a 95°C durante 9 minutos y 30 ciclos de: 94°C (desnaturalización) durante un minuto y 55°C (anillamiento) durante un minuto y 72°C (extensión) durante 1,5 minutos seguidos de 10 minutos finales a 72°C y el mantenimiento de las muestras a 4°C. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, con un transiluminador de luz ultravioleta, en las mismas condiciones descritas anteriormente.

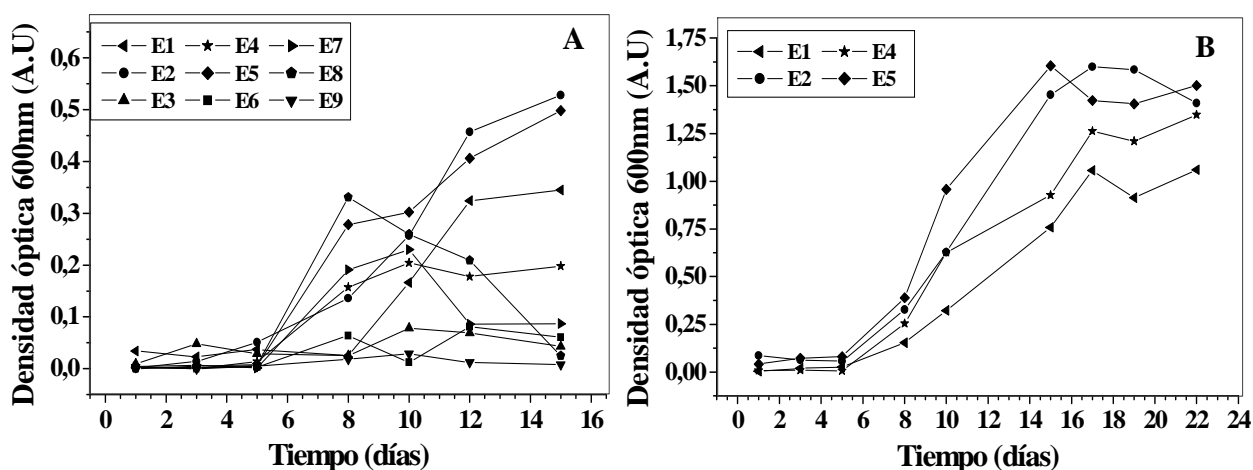
La electrofóresis en geles desnaturalizados se realizó en el sistema DGGE-2401 (CBS Scientific Company, Del Mar, CA). Los productos de PCR (20 ul) fueron cargados directamente en un gel de poliacrilamida al 10% (p/v), de 0.75 mm de grosor y con un gradiente lineal de desnaturalización 35-65% (Molina et al., 2009). El 100% de formamida-urea está definido en una concentración de urea (Fluka) de 7M y una de formamida (Fluka) desionizada del 40% (p/v). Detalles de las soluciones stock de acrilamida y preparación del gen pueden consultarse en Viñas, 2005. El gradiente se realizó en tampón TAE 1X (2.0 M Tris acetato, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7.4) a 80V durante 16h a una temperatura constante de 60°C. Posteriormente, los geles se tiñeron durante 45 min en buffer 1X TAE conteniendo Syber Gold y se visualizaron con luz UV en un transiluminador Alpha Innotech MultiImage. Para estimar la concentración (ug/ul) y el tamaño (pb) del ADN se hizo una comparación visual con un marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, BioRon Internacional, 100-1000bp en incrementos de 100pb).

Para la comparación y cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas mediante DGGE se empleó el software de tratamiento de imagen UN-SCAN IT gel 6.1 (SilkScientific Inc. EE.UU.), aplicándolo sobre la imagen digitalizada del gel obtenido. El dendrograma se construyó a partir de la matriz de presencia/ausencia de bandas, con la que se realizó un análisis UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) utilizando el programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2003).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Obtención y selección del consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> y la colonia C<sub>17</sub>.

Las curvas de crecimiento microbiológico para los 9 tratamientos con los consorcios de las muestras de aguas 1, 2 y 3, en presencia de naproxeno, carbamazepina o mezcla se muestran en la Figura 1A. Se seleccionaron los tratamientos en los que se observó incremento de las densidades ópticas (E1, E2, E4, E5) y se repitió con ellos la experimentación (Figura 1B).

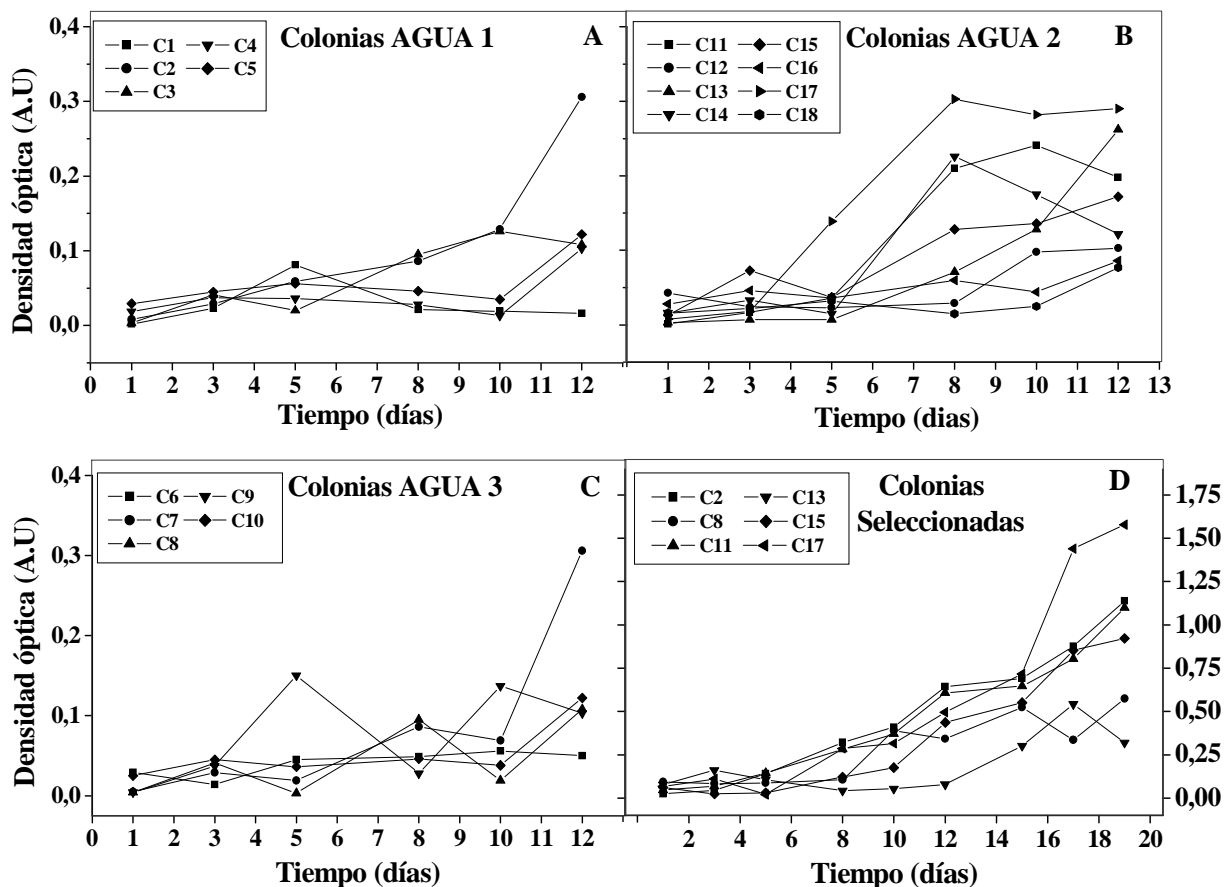


**Figura 1.-** Curvas de crecimiento microbiológico para cada una de las aguas con cada uno de los tratamientos con consorcio E1-E9 con concentración de inóculo baja (A) y curvas de crecimiento para los tratamientos que alcanzaron mayores densidades (E1, E2, E4 y E5) con concentración de inóculo alta (B).

Los tratamientos que mayor crecimiento tuvieron fueron el E2 y E5, provenientes del Agua 2, agua que ha sido sometida a tratamiento secundario y se descarga directamente al río. A partir de estos resultados se preparó el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> que es fruto de la mezcla de inóculo del tratamiento E2 y E5.

Las curvas de crecimiento microbiológico para las colonias aisladas del Agua 1 (Figura 2A), del Agua 2 (figura 2B) y del Agua 3 (Figura 2C) mostraron incrementos significativos de las densidades ópticas para las colonias C2 del Agua 1, C8 del Agua 3, y C11, C13, C15 y C17 del Agua 2. Se repitieron los experimentos con estas colonias para confirmar dichos

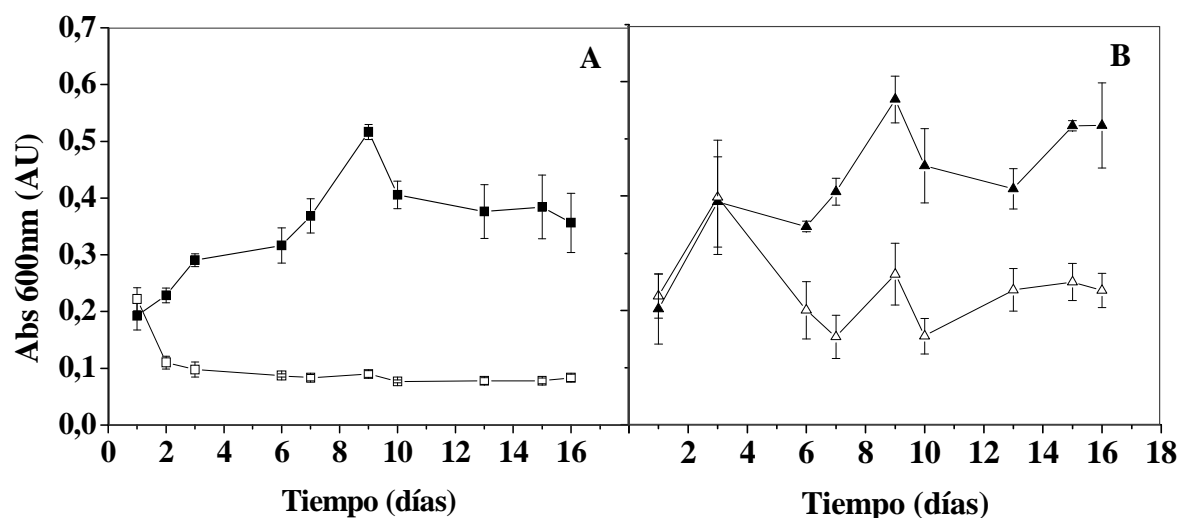
incrementos (Figura 2D). En este último experimento la C17 del Agua 2 fue la que mejor creció con naproxeno y carbamazepina como únicas fuentes de carbono y energía.



**Figura 2.-** Curvas de crecimiento de las colonias aisladas del Agua 1 (2A), del Agua 2 (2B), y del Agua 3 (2C). Curvas de crecimiento con las colonias que presentaron mejores resultados (2D).

#### 4.2 Experimentos con el consorcio microbiano E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>.

La evolución de la densidad óptica durante el proceso de biodegradación del consorcio microbiano E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> fue estudiada tanto para el naproxeno (Figura 3A), como para la carbamazepina (Figura 3B), y para ambos fármacos se estudió la influencia de la glucosa como fuente de carbono adicional o secundaria.



**Figura 3.** Evolución de la densidad óptica para el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> con naproxeno (A), con glucosa (■), y sin glucosa (□) y para la carbamazepina (B) con glucosa (▲) y sin glucosa (△). Las barras indican el error estándar.

Cuando se añade naproxeno pero no glucosa (Figura 3A), puede observarse que el consorcio no crece. Sin embargo, cuando se añade la glucosa comienza directamente una fase exponencial, en la que experimenta un aumento la densidad óptica, que duró hasta el noveno día. A partir de ese momento, el consorcio disminuye la densidad óptica pero se mantiene en niveles altos (0.35 AU) durante los últimos 6 días.

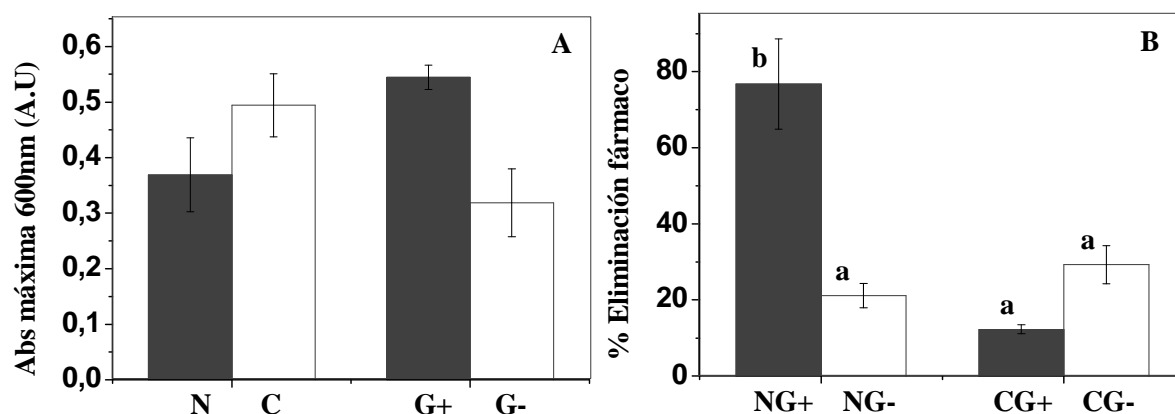
Para el caso de la carbamazepina (Figura 3B) se obtienen densidades ópticas ligeramente superiores, para ambos tratamientos (con y sin glucosa), siendo mayores los valores de densidad alcanzados cuando la glucosa es añadida. Las fases de la curva de crecimiento en presencia de glucosa coinciden con las del naproxeno y glucosa por lo que pueden estar consumiendo únicamente la glucosa. Sin embargo, el consorcio microbiano en presencia exclusivamente de carbamazepina mostró incrementos superiores a los observados con el naproxeno y sin glucosa.

Las densidades ópticas máximas alcanzadas mostraron diferencias significativas dependiendo del tipo de fármaco y de la adición de glucosa (Tabla 6), siendo mayores las obtenidas con carbamazepina, y con glucosa (Figura 4A).

**Tabla 6.** – Análisis de la varianza de las densidades ópticas máximas alcanzadas (I) y del porcentaje de eliminación final del fármaco (II).

<b>(I) ANOVA: Densidades ópticas máximas alcanzadas.</b>				
<b>FACTOR</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Tipo de fármaco.</b>	<b>0,15</b>	<b>1</b>	<b>19,0</b>	<b>**</b>
<b>Glucosa</b>	<b>0,05</b>	<b>1</b>	<b>5,9</b>	<b>*</b>
Fármaco x Glucosa	0,01	1	1,7	n.s
Error	0,01	8	19,1	**
<b>(II) ANOVA: Porcentajes eliminación final del fármaco.</b>				
<b>FACTOR</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Tipo de fármaco.</b>	<b>1022,39</b>	<b>1</b>	<b>8,4</b>	<b>*</b>
<b>Glucosa</b>	<b>2530,28</b>	<b>1</b>	<b>20,8</b>	<b>**</b>
<b>Fármaco x Glucosa</b>	<b>4139,73</b>	<b>1</b>	<b>34,0</b>	<b>**</b>
Error	121,70	8	8,4	*

\* < 0,05 y \*\* < 0,01, n.s > 0,05

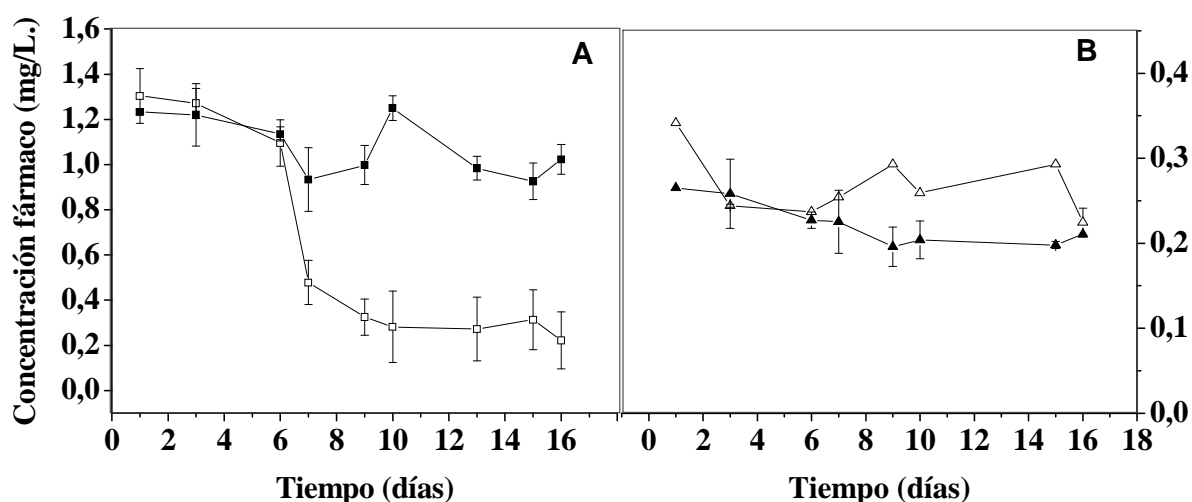


**Figura 4.-** A) Promedio de la densidad óptica máxima alcanzada con naproxeno (N) y carbamazepina (C) y con glucosa (G+) y sin ella (G-). B) Promedio del porcentaje de eliminación de fármaco naproxeno con glucosa (NG+), naproxeno sin glucosa (NG-), carbamazepina con glucosa (CG+) y carbamazepina sin glucosa (CG-) Las barras indican el error estándar. Las letras indican diferencias entre grupos ( $p < 0.05$ , SNK)



La Figura 5 muestra la concentración en  $\text{mg l}^{-1}$  de naproxeno y carbamazepina en función del tiempo, con y sin glucosa. La concentración del naproxeno disminuye hasta un 77% en el tratamiento con glucosa, mientras que en el resto de los tratamientos no se alcanzan porcentajes de eliminación superiores al 30%. (21% Naproxeno sin glucosa, 12% carbamazepina con glucosa, 30% carbamazepina sin glucosa). El porcentaje final de eliminación en función del tipo de fármaco y de la adición de la glucosa mostró diferencias significativas en la interacción (Tabla 6) de los dos factores (tipo de fármacos x adición de glucosa).

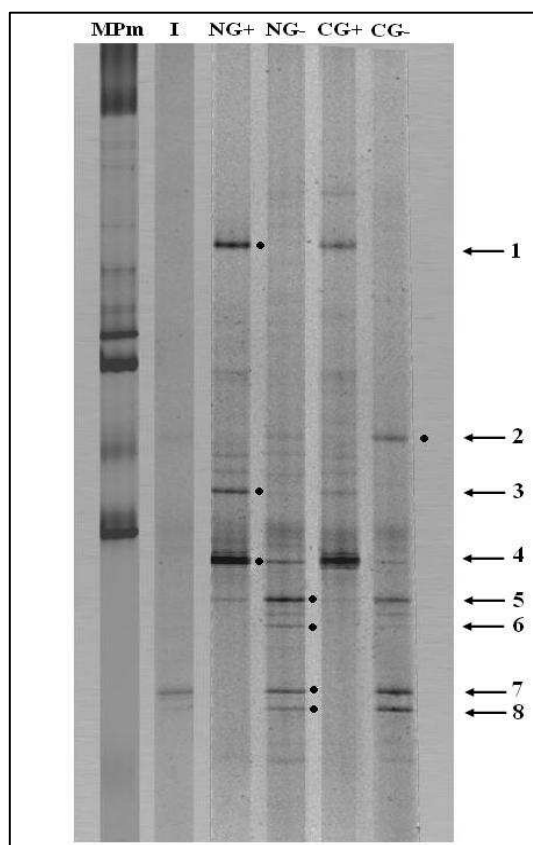
Los resultados indicaron que el porcentaje de eliminación del naproxeno con glucosa fue significativamente mayor que sin glucosa (Figura 4A) pero entre el naproxeno sin glucosa, la carbamazepina sin glucosa y la carbamazepina con glucosa, el análisis SNK no muestra diferencias significativas (Figura 4B).



**Figura 5.-A)** Concentración de naproxeno con glucosa (■) y sin glucosa (□) a lo largo del tiempo. **B)** Concentración de carbamazepina con glucosa (▲) y sin glucosa (△) a lo largo del tiempo. Las barras indican el error estándar.

Las mediciones de la toxicidad llevadas a cabo mediante el test Microtox<sup>TM</sup> se realizaron para todos los cultivos en el tiempo inicial y final de cada tratamiento. La toxicidad para el tiempo inicial de todos los tratamientos fue del 100%, mientras que los valores medios finales no mostraron grandes disminuciones siendo de un 88 % ± 12 para el NG+, un 85 % ± 10 para el NG-, un 100% ± 0,1 para el CG+ y un 82 % ± 15 para el CG-.

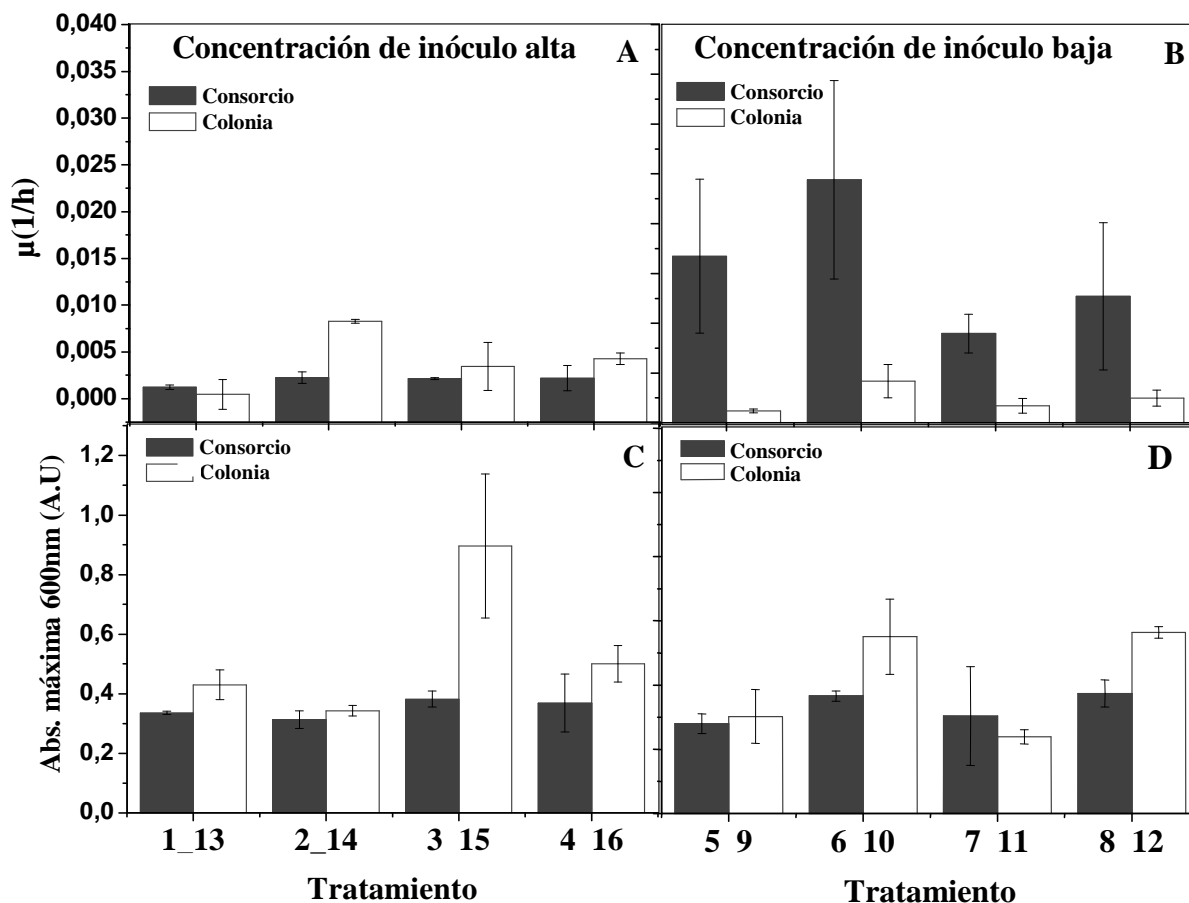
La Figura 6 muestra la diversidad de las bandas del consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> de cada uno de los tratamientos. Los tratamientos con glucosa (NG+, CG+) mostraron menos bandas (1, 3 y 4), pero más intensas (sobre todo la banda 4), que los tratamientos sin glucosa (2,4,5,6,7 y 8). La banda 5 se adapta mejor a la presencia de naproxeno sin glucosa, mientras que las bandas 7 y 8, a la carbamazepina sin glucosa.



**Figura 6:-** Análisis DGGE para los tratamientos con el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>. Marcador peso molecular (MPm), Consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> añadido a cada tratamiento en el tiempo inicial (I). Consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> tras 16 días de incubación con naproxeno y glucosa (NG+), con naproxeno (NG-), con carbamazepina y glucosa (CG+) y con carbamazepina (CG-).

### 4.3 Experimento factorial fraccionado.

La Figura 7 muestra los valores de las pendientes de la curva de crecimiento microbiológico ( $\mu$ ) y de la densidad óptica máxima alcanzada para cada tratamiento. Todos los tratamientos comienzan con la misma densidad óptica (0,2 A.U).



**Figura 7.** – Promedio de las tasas de crecimiento para los tratamientos con concentración de microorganismos alta (A) y baja (B). Densidad óptica máxima alcanzada a 600nm para cada tratamiento con concentración de microorganismo alta (C) y baja (D). Las barras de error indican el error estándar.

El análisis estadístico para el diseño factorial completo de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) encuentra significativo ( $p < 0,01$ ) el tipo de microorganismo utilizado, la concentración a la que ha sido inoculado y la interacción entre ambos fármacos (Tabla 7). El consorcio alcanza pendientes más acusadas que la cepa aislada, y para ambos microorganismos, el crecimiento es mayor cuando la concentración de inóculo es baja (Figura 8). Sobre la interacción entre el

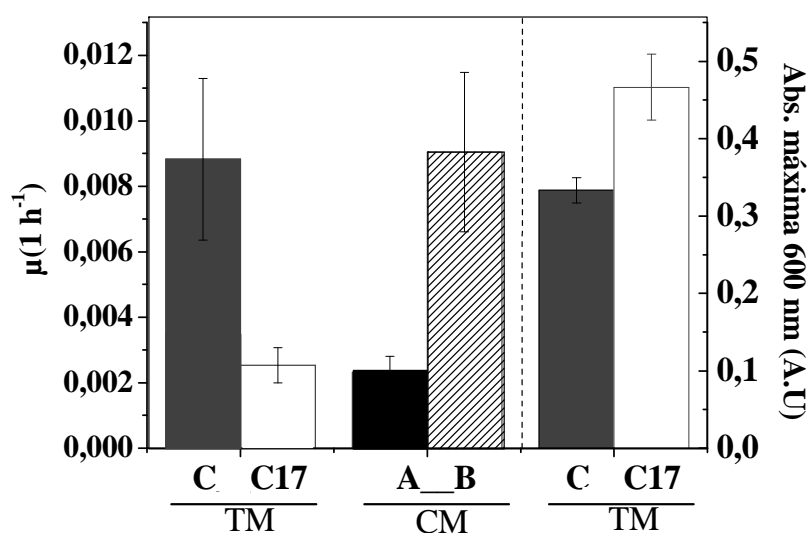
naproxeno y la carbamazepina, debido al diseño utilizado, no puede sacarse ninguna conclusión, ya que en este valor de la interacción están recogidos otras interacciones de segundo orden que son alias entre sí, como es la interacción entre el tipo de microorganismo y la concentración de inóculo; y la interacción de la glucosa y concentración de fármaco, pero sí permite decir, aunque no con total certeza, que el crecimiento es mayor cuando los fármacos están presentes como fuente de carbono (Figura 9A).

**Tabla 7.** - Análisis de la varianza para la tasa de crecimiento bacteriano (*I*) y las densidades ópticas máximas alcanzadas (*II*).

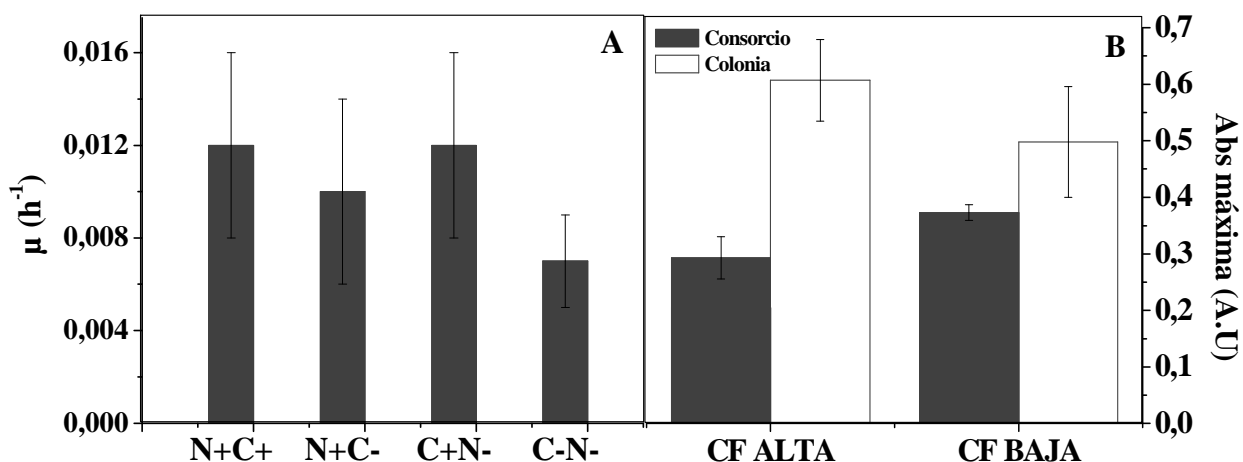
<i>FACTOR</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<b>(I) ANOVA: Tasa de crecimiento <math>\mu</math> (1/h)</b>				
C.	$3,30 \cdot 10^{-5}$	1	1,210	n.s
N.	$3,50 \cdot 10^{-5}$	1	1,304	n.s
<b>TM.</b>	<b><math>2,82 \cdot 10^{-4}</math></b>	<b>1</b>	<b>10,456</b>	<b>**</b>
G.	$5,90 \cdot 10^{-5}$	1	2,183	n.s
<b>CM.</b>	<b><math>3,26 \cdot 10^{-4}</math></b>	<b>1</b>	<b>12,063</b>	<b>**</b>
CF.	$1,80 \cdot 10^{-5}$	1	0,673	n.s
<b>C x N</b>	<b><math>4,34 \cdot 10^{-4}</math></b>	<b>1</b>	<b>16,081</b>	<b>**</b>
C x TM	$7,50 \cdot 10^{-5}$	1	2,781	n.s
C x G	$0,00 \cdot 10^{-0}$	1	0,013	n.s
C x CM	$5,20 \cdot 10^{-5}$	1	1,936	n.s
C x CF	$8,00 \cdot 10^{-6}$	1	0,304	n.s
TM x G	$1,00 \cdot 10^{-6}$	1	0,049	n.s
TM x CF	$9,00 \cdot 10^{-6}$	1	0,345	n.s
ERROR	$2,70 \cdot 10^{-5}$	18		
<b>(II) ANOVA: Densidad óptica máxima alcanzada (A.U)</b>				
C.	$4,56 \cdot 10^{-2}$	1	2,937	n.s
N.	$6,28 \cdot 10^{-2}$	1	4,046	n.s
<b>TM.</b>	<b><math>1,52 \cdot 10^{-1}</math></b>	<b>1</b>	<b>9,793</b>	<b>**</b>
G.	$5,67 \cdot 10^{-3}$	1	0,365	n.s
CM.	$4,35 \cdot 10^{-2}$	1	2,802	n.s
CF.	$9,33 \cdot 10^{-2}$	1	6,009	*
C x N	$2,41 \cdot 10^{-2}$	1	1,551	n.s
C x TM	$6,94 \cdot 10^{-2}$	1	4,468	n.s
C x G	$2,09 \cdot 10^{-2}$	1	1,347	n.s
C x CM	$2,42 \cdot 10^{-2}$	1	1,558	n.s
C x CF	$7,08 \cdot 10^{-3}$	1	0,456	n.s
TM x G	$9,80 \cdot 10^{-5}$	1	0,006	n.s
<b>TM x CF</b>	<b><math>1,96 \cdot 10^{-1}</math></b>	<b>1</b>	<b>12,598</b>	<b>**</b>
ERROR	$1,50 \cdot 10^{-2}$	18		

\* < 0,05 y \*\* < 0,01, n.s > 0,05

Para las densidades ópticas máximas alcanzadas, el tipo microorganismos mostró diferencias significativa (Tabla 7) siendo los valores alcanzados con la colonia C<sub>17</sub> significativamente mayores que los alcanzados con el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>. (Figura 8). Apareció también como significativa la interacción entre el tipo de microorganismo y la concentración de fármaco usada. La colonia C<sub>17</sub> alcanza valores superiores cuando el fármaco está en concentraciones altas y el consorcio cuando las concentraciones de fármaco son bajas. Este efecto estaría solapado con la interacción de la glucosa y el tipo de microorganismo (Figura 9B).

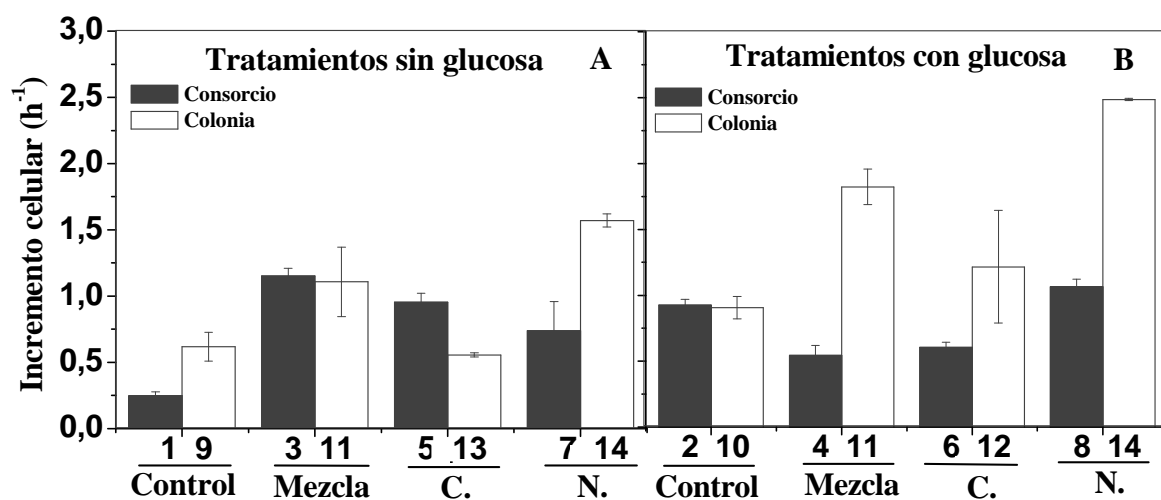


**Figura 8.** – Promedio de la tasa de crecimiento para los tratamientos. Tipo de microorganismo TM, siendo el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (C) y la colonia (C17), concentración de inóculo CM alta (A) y baja (B). Promedio de las densidades máximas alcanzadas para el tipo de microorganismo TM. (■ Alta, ▨ Baja) en la tasa de crecimiento microbiano ( $\mu$ ). Efecto del tipo de microorganismo TM (■ Consortio, □ Colonia C17) en las densidades máximas alcanzadas.



**Figura 9.** - A) Interacción del tipo de naproxeno (N) y carbamazepina (C.). (+) Indica presencia, (-) ausencia. para la tasa de crecimiento bacteriano B) Interacción del tipo de microorganismo y la concentración de fármaco usada. en las densidades ópticas máximas alcanzadas.

Los resultados del incremento de la población heterótrofa calculados a partir de los resultados del NMP se muestran en la Figura 10.



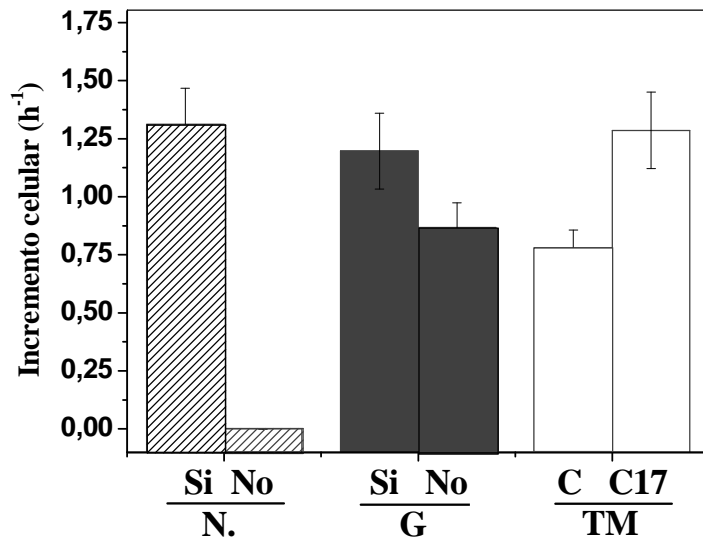
**Figura 10.** - Incremento de la población microbiana creciendo con glucosa (A) y sin glucosa (B). Las barras indican el error estándar.

El incremento de la población microbiana mostró diferencias significativas (Tabla 8) para el los tratamientos naproxeno (N), tipo de microorganismos (TM) y presencia de glucosa (G). El incremento de las poblaciones fue significativamente mayor en los tratamientos donde el naproxeno está presente, en los tratamientos con glucosa y con la colonia C<sub>17</sub> (Figura 11). También es significativa la interacción de la carbamazepina con la concentración de microorganismo, pero al ser alias de otra interacción de la que han salido efectos significativos se analizará su alias (N. x TM). La interacción de la glucosa con el tipo de microorganismo también es significativa. De estas interacciones puede sacarse que la colonia C<sub>17</sub> crece mejor que el consorcio, y mejor con naproxeno y glucosa presentes (Figura 12).

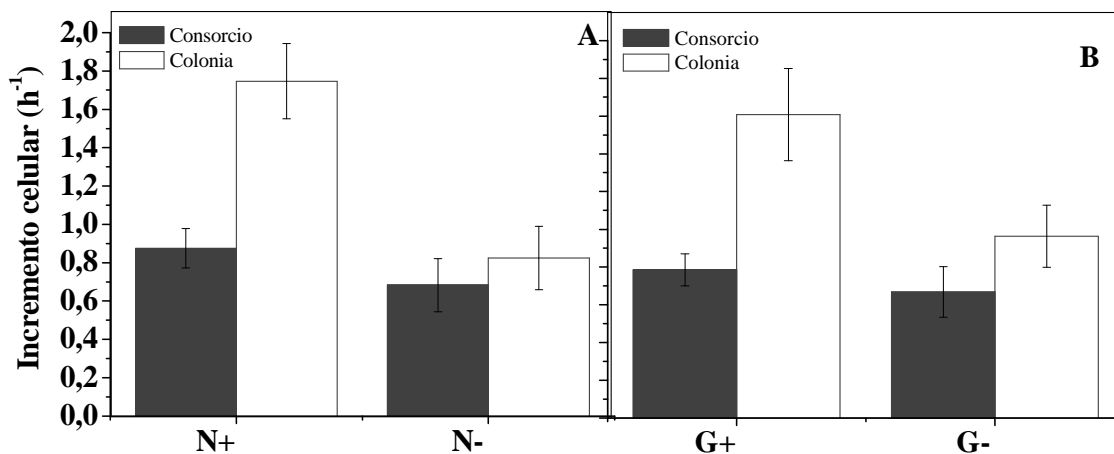
**Tabla 8.** - Análisis de la varianza para el incremento de la población microbiana.

<i>ANOVA: Incremento celular (NMP)</i>				
<i>FACTOR</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
C.	$4,57 \cdot 10^{-2}$	1	0,549	n.s
N.	<b><math>2,48 \cdot 10^{-0}</math></b>	<b>1</b>	<b>29,848</b>	<b>**</b>
TM.	<b><math>2,05 \cdot 10^{-0}</math></b>	<b>1</b>	<b>24,619</b>	<b>**</b>
G.	<b><math>8,62 \cdot 10^{-1}</math></b>	<b>1</b>	<b>10,358</b>	<b>**</b>
CM.	$9,70 \cdot 10^{-2}$	1	1,166	n.s
CF.	$2,82 \cdot 10^{-2}$	1	0,338	n.s
C x N	$4,35 \cdot 10^{-1}$	1	5,231	*
C x TM	$1,66 \cdot 10^{-1}$	1	1,996	n.s
C x G	$3,98 \cdot 10^{-1}$	1	4,781	*
<b>C x CM</b>	<b><math>1,07 \cdot 10^{-0}</math></b>	<b>1</b>	<b>12,846</b>	<b>**</b>
C x CF	$6,41 \cdot 10^{-4}$	1	0,008	n.s
<b>TM x G</b>	<b><math>8,01 \cdot 10^{-1}</math></b>	<b>1</b>	<b>9,615</b>	<b>**</b>
TM x CF	$5,56 \cdot 10^{-2}$	1	0,668	n.s
ERROR	$1,50 \cdot 10^{-9}$	18		

\* < 0,05 y \*\* < 0,01, n.s > 0,05



**Figura 11.-** Promedio del incremento de la población microbiana para los tratamientos Naproxeno (N), Glucosa (G) y tipo de microorganismos (TM).



**Figura 12.-** A) Interacciones entre el naproxeno (N.) y el tipo de microorganismo. B) Interacción entre la glucosa (G.) y el tipo de microorganismo. Presencia (+) y ausencia (-), en el incremento celular.

Los porcentajes de eliminación de cada fármaco se muestran en la Figura 13. Hay 4 tratamientos (1, 2, 9 y 10), que no contienen ningún fármaco y por lo tanto el valor no existe. Por el contrario, existen otros 4 tratamientos (3, 4, 11, y 12) que contienen la mezcla de ambos tratamientos y tienen dos valores, uno correspondiente a cada fármaco. Debido a la ortogonalidad del diseño, para los tratamientos con mezcla, se ha calculado tanto el porcentaje



global de eliminación de la concentración de fármacos (Figura 13A), como la eliminación de cada fármaco dentro de la mezcla (Figura 13B y Figura 13C). Se alcanzaron valores muy próximos a la completa eliminación del naproxeno en los tratamientos 13 y 8. Para la carbamazepina se obtuvieron porcentajes de eliminación máximos del 65% (tratamiento 5).

Para poder incluir el porcentaje de degradación de cada fármaco dentro de la mezcla, el análisis de la varianza para el porcentaje de degradación no se realizó multifactorialmente sino para cada factor por separado. Sólo fue significativamente diferente el tipo de fármaco degradado ( $F(3,28) = 6,5, p = 0,002$ ) siendo mejor degradado el naproxeno (Figura 14). No se observan diferencias entre la degradación del fármaco solo y dentro de la mezcla (Figura 14, los tratamientos que comparten letra no son significativamente diferentes).

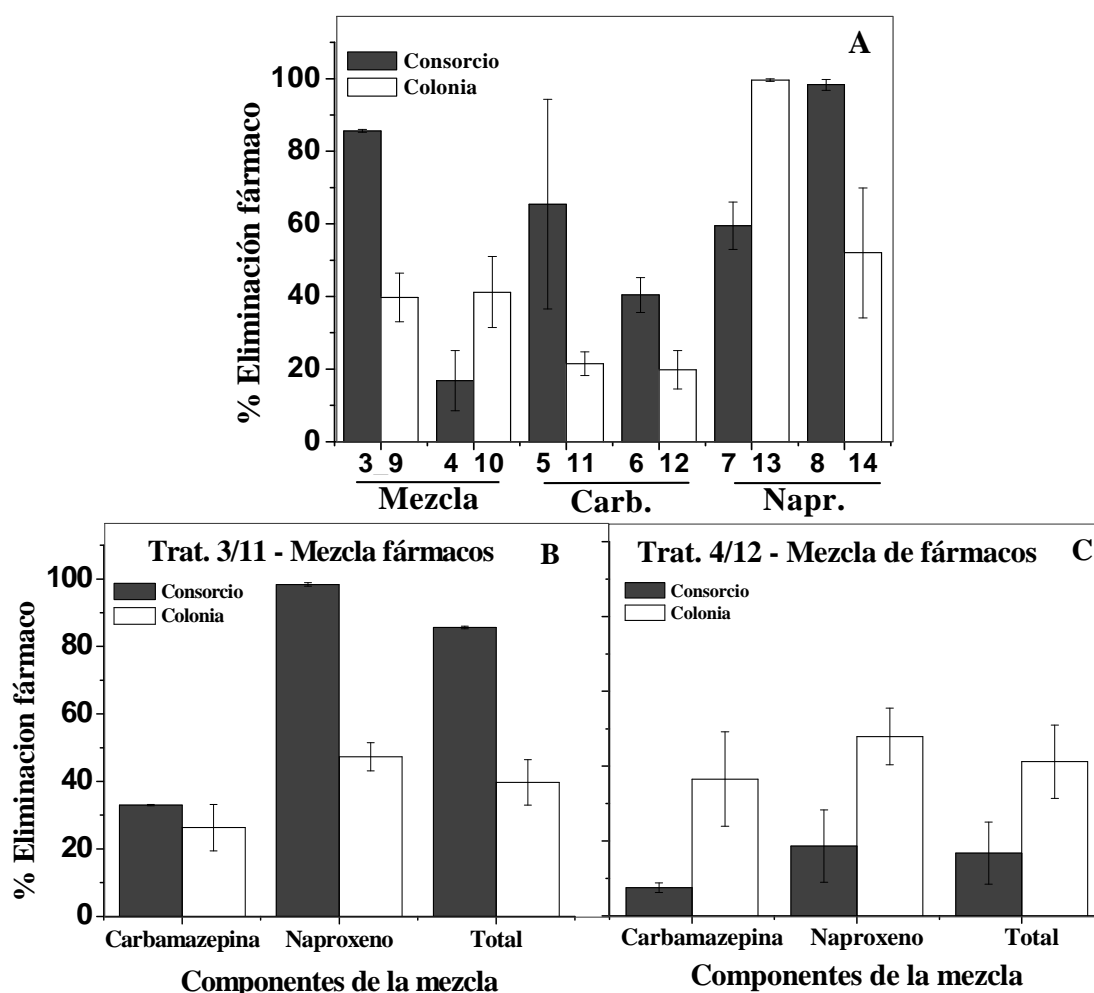


Figura 13. - Porcentaje de eliminación global de la concentración de fármacos para cada tratamiento (A), y porcentaje de eliminación de cada fármaco en los tratamientos con mezcla (B, C).

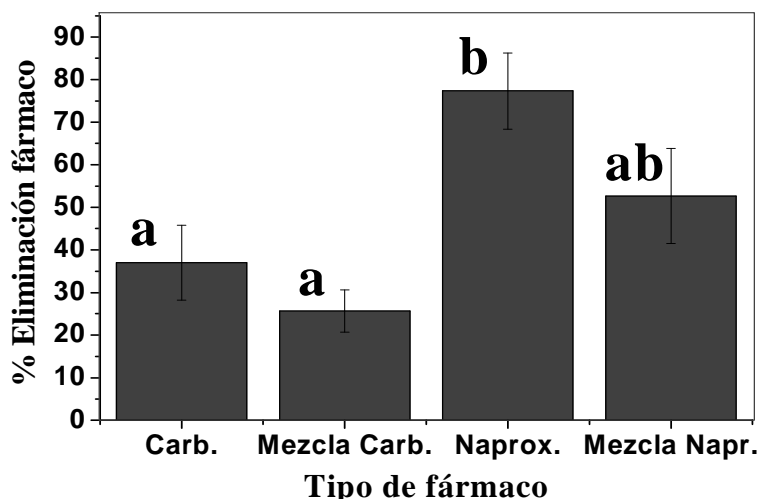


Figura 14. - Influencia del fármaco utilizado en los porcentajes de eliminación.

Los resultados obtenidos para la evaluación del  $\text{CO}_2$  emitido en la respiración se muestran en la Figura 15. Los resultados del análisis de varianza para esta medida se encuentran en la Tabla 9. El único factor principal significativo ha resultado el tipo de microorganismo, siendo mayores los valores para la colonia C<sub>17</sub>. Es significativa la interacción de la carbamazepina y el naproxeno. Se analizará su alias (TM x CM), puesto que incluye un factor principal significativo. También es significativa la interacción de la carbamazepina y la concentración de fármaco (Figura 16).

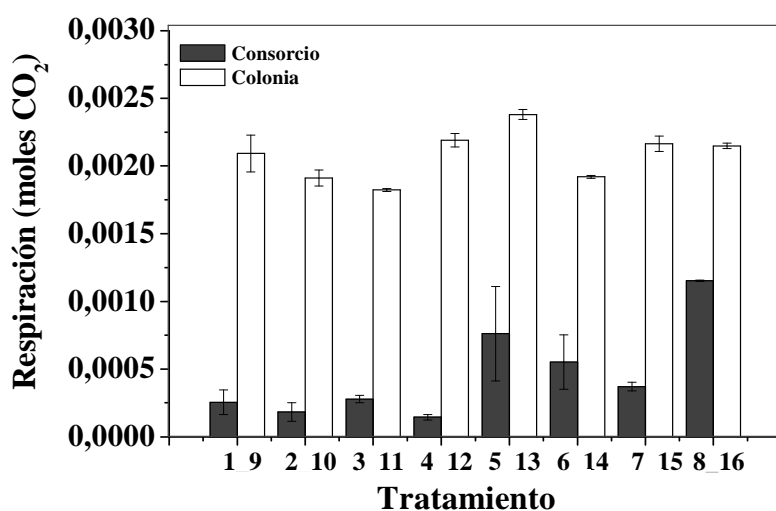
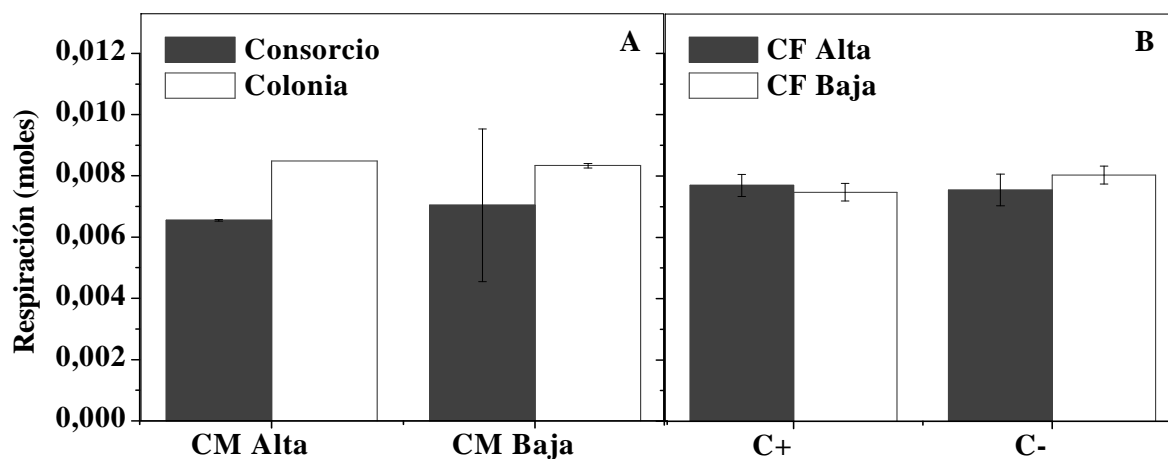


Figura 15. – Respiración microbiológica para cada tratamiento (moles  $\text{CO}_2$ ).

**Tabla 9.** – Resultados del análisis de la varianza la respiración microbiana.

<i>FACTOR</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<b>ANOVA: Respiración (moles)</b>				
C.	0,00·10 <sup>-0</sup>	1	0,148	ns
N.	0,00·10 <sup>-0</sup>	1	0,135	ns
<b>TM.</b>	<b>2,10·10<sup>-5</sup></b>	<b>1</b>	<b>477,058</b>	<b>**</b>
G.	0,00·10 <sup>-0</sup>	1	2,415	ns
CM.	0,00·10 <sup>-0</sup>	1	5,443	*
CF.	0,00·10 <sup>-0</sup>	1	0,039	ns
<b>C x N</b>	<b>1,00·10<sup>-6</sup></b>	<b>1</b>	<b>18,896</b>	<b>**</b>
C x TM	0,00·10 <sup>-0</sup>	1	0,138	ns
C x G	0,00·10 <sup>-0</sup>	1	2,582	ns
C x CM	0,00·10 <sup>-0</sup>	1	0,089	ns
<b>C x CF</b>	<b>0,00·10<sup>-0</sup></b>	<b>1</b>	<b>10,548</b>	<b>**</b>
TM x G	0,00·10 <sup>-0</sup>	1	1,217	ns
TM x CF	0,00·10 <sup>-0</sup>	1	5,902	*
ERROR	0,00·10 <sup>-0</sup>	18		

\* < 0,05 y \*\* < 0,01, n.s > 0,05



**Figura 16**.- A) Interacciones entre el tipo de microorganismo (TM.) y la concentración de microorganismo inoculada. B) Interacción entre la carbamazepina (C) y la concentración de fármaco. Presencia (+) y ausencia (-).

Para la toxicidad no se encuentran diferencias significativas entre ningún factor o interacción. Todos los tratamientos comienzan con una toxicidad del 100%, y no disminuyen en de valores del 90%, salvo el tratamiento 16, con la colonia C<sub>17</sub> que ha alcanzado toxicidades finales del 60%.

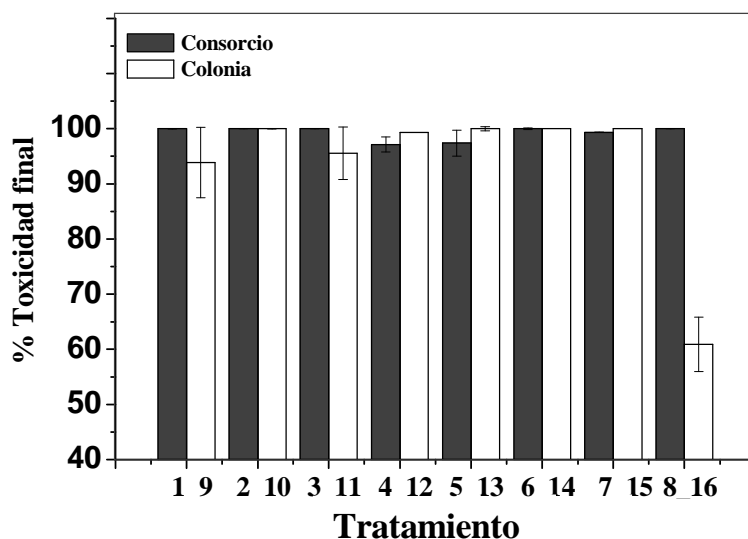
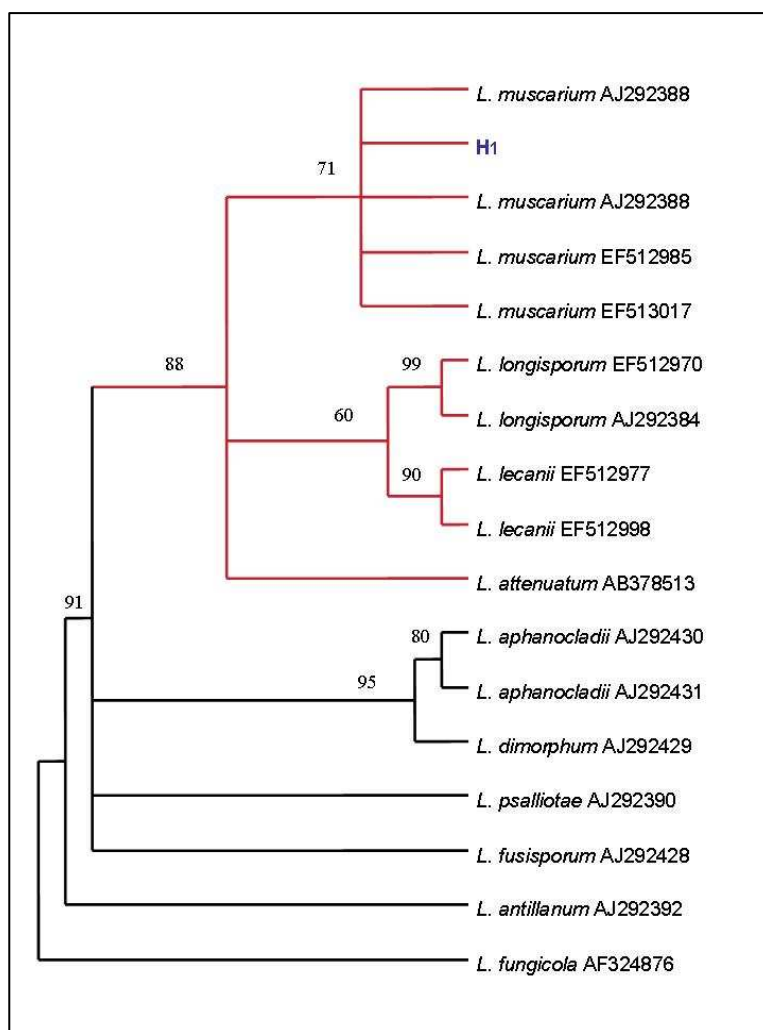


Figura 16.- Porcentajes de toxicidad final alcanzados para cada tratamiento.

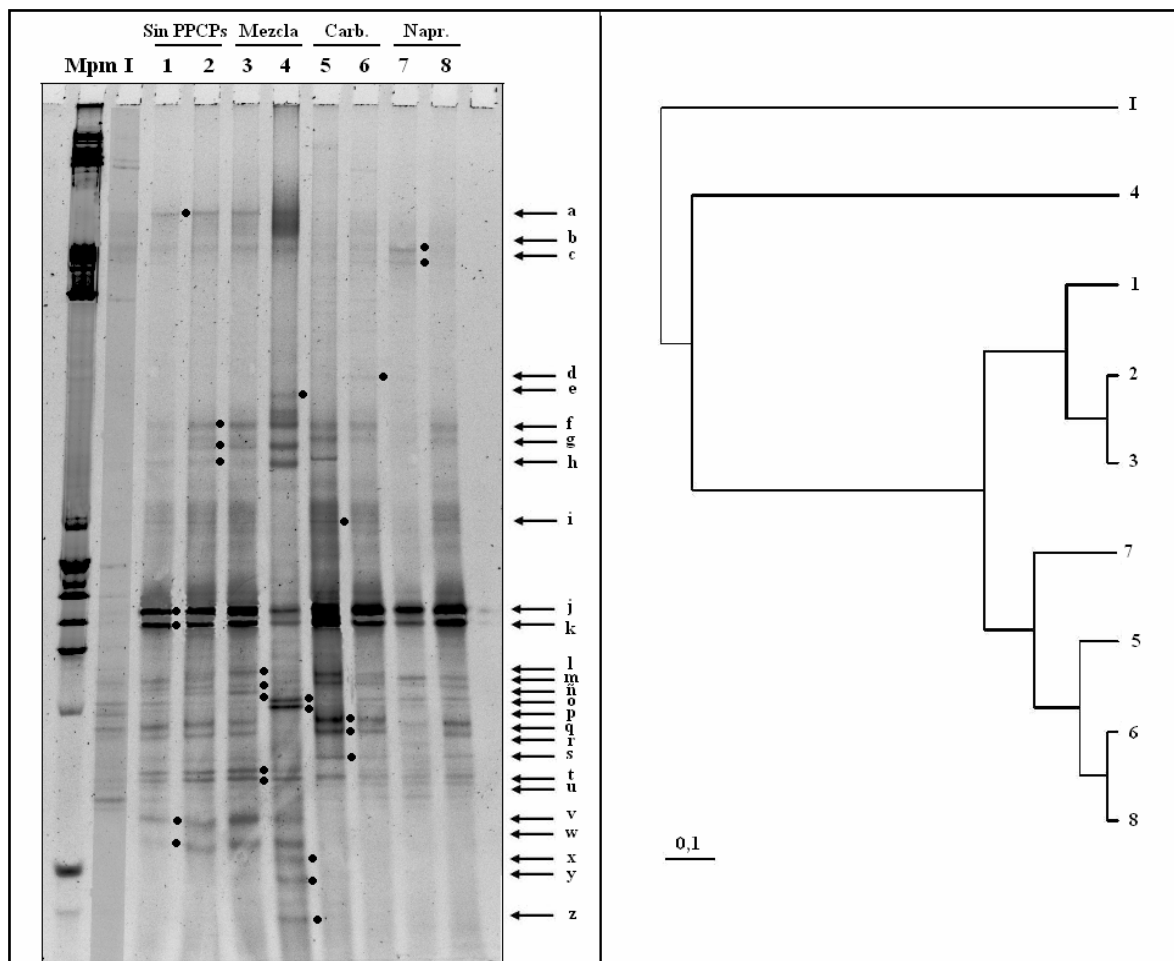
La figura 17 contiene los resultados del árbol filogenético obtenido para el hongo H<sub>1</sub>. La secuenciación de la región 16S del hongo aislado del consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> rindió una secuencia de 582 pb. Esta secuencia fue comparada con las disponibles en el genbank ofreciendo un 100% de identidad con *Lecanicillium lecanii* EF512977. La secuencia H<sub>1</sub> y 16 secuencias genéticamente próximas procedentes del genbank fueron alineadas obteniéndose una matriz cuya longitud fue 601 nucleótidos de los cuales 45 fueron parsimonicamente informativos. Tras el análisis filogenético se produjeron 4 árboles igualmente parsimónicos, cuyo árbol consenso tuvo un índice de consistencia (CI) y de retención (IR) de 0.833 y 0.971 respectivamente. En este árbol todos los clados estuvieron soportados por valores de "bootstrap" mayores o iguales al 50%. (Figura x). El hongo H<sub>1</sub> quedó circunscrito en el clado correspondiente a *L. muscarium* con un valor de bootstrap del 71%. Por tanto, se observa una incongruencia entre la identificación inicial por comparación entre secuencias y el árbol filogenético tras el análisis por parsimonia.



**Figura 17.** - Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del fragmento ITS que identifica al hongo. Los valores de “Bootstrap” superiores al 50% se muestran en la rama del árbol. El árbol tiene como raíz *L. fungicola*)

La identificación de la colonia bacteriana capaz de mineralizar los fármacos es de momento preliminar debido a dificultades en la lectura del cromatograma, por lo que en este momento nos aventuramos a decir que pertenece al grupo proteobacteria. No obstante es necesario una reamplificación y secuenciación mejorada.

Los cambios en la estructura de las comunidades con el consorcio microbiano E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> se chequearon con el análisis DGGE. La Figura 18A muestra el resultado de este análisis.



**Figura 18.-** (A) Bandas del análisis DGGE correspondientes a fragmentos amplificados de la región 16S rARN de ADN aislado de los tiempos finales de los tratamientos 1-8 (composición en Tabla 4). Mpm: marcador peso molecular, I: Consorcio inoculado en el tiempo inicial ( $t_0$ ) (B) Dendrograma del análisis de conglomerados por el método UPGMA . Las longitudes de las ramas son proporcionales a los cambios o diferencias genéticas (0,1).

Existen dos bandas predominantes (bandas j, k.), que se han desarrollado con mucha intensidad para todos los tratamientos (Figura 18A), incluidos lo que no contienen PPCPs como fuente de carbono (1,2), y que parecen ser las que han desarrollado mayor capacidad de degradar los fármacos, ya que son considerablemente más intensas en los tratamientos con PPCPs presentes. Para identificar los perfiles del DGGE que tienen similitudes entre las bandas presentes, se realizó un análisis de conglomerados por el método UPGMA. Una ventaja de este análisis es que las coincidencias entre tratamientos pueden observarse fácilmente (Fromin et al., 2002). El resultado obtenido en forma de dendrograma (Figura 18B) nos permite ver cuál es la bondad de la separación en la agrupación jerárquica de

conglomerados. Todos los tratamientos han sabido adaptarse a las fuentes de carbono y han continuado su crecimiento (el dendograma muestra el inóculo separado del resto, y el primero en incorporarse al cluster). El tratamiento 4 ha salido muy diferente a todos los demás, la distancia que presenta con el resto de los tratamientos es muy grande. Este tratamiento corresponde a la mezcla de fármacos en presencia de glucosa, y es el tratamiento que menores porcentajes de degradación presenta. Las bandas j, k (Fig. 18A), aparecen con menor intensidad, y han crecido especies que no están en ningún otro tratamiento (e,x,y,z), que no deben presentar capacidad de degradación, y posiblemente utilizan como fuente de carbono la glucosa.

El dendograma distingue dos grupos más, las ramas obtenidas para los tratamientos 2 y 3, han salido muy similares entre si, y cercanas a la banda 1. Esto sugiere que cuando carbamazepina y naproxeno se encuentran en la mezcla, las cepas microbianas que se desarrollan y predominan son diferentes, y más parecidas a los tratamientos sin fármacos, por lo que puede deducirse que la adaptación y capacidad de degradación es menor en la mezcla y que por alguna razón no pueden consumir los fármacos.

El otro grupo estaría formado por las bandas 6 y 8 que son muy similares entre si (carbamazepina y naproxeno, ambas con glucosa), y que no difieren mucho tampoco del tratamiento con carbamazepina sin glucosa 5. El tratamiento con naproxeno sin glucosa (7) es el que más diferente dentro del grupo. En estos tratamientos las comunidades microbianas son muy parecidas y capaces de degradar moléculas complejas como son los PPCps.

## 5. DISCUSIÓN

En este estudio se ha analizado el proceso de degradación de los fármacos naproxeno y carbamazepina por la comunidad microbiana E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> y por la cepa bacteriana aún no identificada C<sub>17</sub> (filo *proteobacteria*), mediante parámetros químicos y biológicos (tasa de crecimiento microbiano, densidades ópticas máximas alcanzadas, respiración, incremento de la población, % de eliminación de los fármacos y toxicidad). Todos los microorganismos utilizados en los experimentos han sido obtenidos de muestras de aguas provenientes de la planta de tratamiento de aguas Arroyo de la Vega, ya que las comunidades microbianas expuestas de manera permanente a una determinada contaminación, tienden a ser dominadas por organismos capaces de utilizar esos contaminantes como únicas fuentes de carbono y energía (Gallego et al. 2007).

Los factores como una fuente primaria de carbono (glucosa), la concentración del PPCP, o la concentración a la que el microorganismo ha sido inoculado, son factores que pueden influir en la optimización del proceso (Onesios et al., 2009). La simulación en laboratorio de los procesos degradadores de contaminantes orgánicos usando diferentes microorganismos y compuestos químicos es absolutamente necesaria antes de su introducción en el ambiente para biorremediar zonas contaminadas.

Mediante el experimento con el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>, se consiguieron porcentajes de eliminación de un 77% para el naproxeno, y un 29% para la carbamazepina. Con los experimentos del diseño factorial se consiguió optimizar la degradación, obteniéndose la eliminación completa del naproxeno, y porcentajes de eliminación de la carbamazepina de hasta el 65%. Estos resultados son novedosos, ya que la carbamazepina es de los fármacos más resistentes a la biodegradación. En revisiones recientes (Onesios et al., 2009) se ha descrito que la eliminación de este fármaco en plantas de tratamiento de aguas nunca ha sido superior al 40 %. Los porcentajes encontrados a escala de laboratorio (0-50 %) han sido también inferiores a los resultados obtenidos en este trabajo (Bendz et al., 2006; Bernhard et al., 2006; Clara et al., 2005b, Rodríguez-Rodríguez et al. 2010, Ternes et al., 2007) siendo los valores más altos en fangos y fase sólida. El rango de porcentajes de eliminación para el naproxeno encontrados en bibliografía es muy amplio (desde el 45 % hasta el 100 %) tanto en fase líquida como sólida. (Bendez et al. 2005, Carballa et al. 2007<sup>a</sup>, Nakada et al. 2006, Rodríguez et al. 2003, Rodríguez-Rodríguez et al. 2010, Vieno et al. 2005).



Las tasas máximas de crecimiento ( $\mu$ ) fueron significativamente mayores cuando las concentraciones del inóculo fueron bajas. También, las densidades máximas, los incrementos celulares y la respiración fueron mayores en los tratamientos con la colonia C<sub>17</sub>. Estos resultados, contradicen los obtenidos por Szabó et al., 2007 en la que los inóculos más diluidos eliminan las especies menos abundantes afectando negativamente el funcionamiento de los ecosistemas. Estudios previos (Loreau et al., 2001) mantienen que la riqueza de especies aumenta la función del sistema, en nuestro caso sería la capacidad de degradación de los fármacos. Sin embargo, nuestros resultados mostraron, que la eliminación de los fármacos era independiente del tipo de microorganismo (comunidad microbiana E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> vs. cepa bacteriana C<sub>17</sub>). El hecho de que un proceso de degradación no sea independiente de si es una comunidad microbiana o una sola cepa bacteriana quien lo realice es muy interesante desde el punto de vista eficaz del proceso (Onesios et al., 2009) sobretodo con respecto a los procesos de aplicación enzimática. Estos resultados sugieren que cuando se alcanzan determinadas densidades críticas las interacciones de competencia por los recursos pueden afectar negativamente los procesos (Pritchard., 1992).

Los porcentajes de degradación obtenidos en el experimento previo con el consorcio son superiores para el naproxeno en presencia de glucosa (un 86% frente al 21% sin glucosa), pero no ocurre así con la carbamazepina (12% con glucosa, 30% en ausencia de ésta). Para el experimento factorial, la presencia de glucosa resultó significativa sólo en el crecimiento de la población evaluada mediante el NMP, mejorando el crecimiento de la población de microorganismos, pero no afectó a los porcentajes de eliminación de los PPCPs. En los análisis de DGGE, la presencia de glucosa disminuyó la biodiversidad del consorcio. Sólo en el caso del naproxeno dentro del experimento factorial se obtienen más bandas y más intensas en presencia de glucosa. A falta de información que sugiera otra cosa sobre los mecanismos de degradación de PPCPs, actualmente se asume que cuando se añade una fuente de carbono de fácil asimilación, y un compuesto tóxico en cantidades traza, los microorganismos están degradando los contaminantes a través de cometabolismo. (Onesios et al., 2009; Ternes y Joss, 2006), pero no se ha encontrado bibliografía en la que se estudie el efecto de añadir esa fuente de carbono lábil en el caso de la carbamazepina y el naproxeno. Vroumsia et al., 1999 observó que con concentraciones de 5g/L de glucosa, *Verticillium lecanii* era capaz de degradar compuestos orgánicos xenobióticos de estructura similar a los PPCPs de este estudio, y el porcentaje de degradación era superior al obtenido en ausencia de glucosa. Sin embargo, cuando usó concentraciones de 10 g/L, el porcentaje de degradación era inferior incluso al de la ausencia de glucosa. Muchos hongos tienen la capacidad de secretar enzimas

oxidativas que son las responsables de la degradación, y la producción de estas enzimas está asociada al metabolismo secundario ante bajas concentraciones de nutriente (Lopez et al., 2004, Eibes et al., Feijoo et al., 2008). La degradación se ha observado incluso cuando no hay glucosa en el medio, lo que parece indicar que la aclimatación al medio es suficiente para empezar la degradación, y que la glucosa puede inhibir la producción de enzimas capaces de degradar el fármaco. En el caso del naproxeno, pueden estarse dando efectos de cometabolismo (Quintana et al., 2005).

Se decidió determinar la toxicidad para los tratamientos previos con el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> y para el diseño factorial, ya que la mera desaparición del compuesto estudiado no tiene porqué significar la completa biodegradación. Si bien se conocen los porcentajes de eliminación de estos fármacos por algunas especies, muy poco se sabe sobre la evolución de la toxicidad en este tipo de consorcios (Onesios et al., 2009). A excepción del tratamiento 16, no se han encontrado disminuciones de la toxicidad significativas, pese a estar produciéndose la eliminación de los fármacos. Es debido a que se están generando compuestos intermedios, cometabolitos, que pueden ser incluso más tóxicos que los productos iniciales (Rodríguez-Rodríguez., 2010, Zhong et al., 2003, Quintana et al., 2005), y está pendiente su identificación mediante LC-MS.

Se identificó durante las pruebas de estima de la población bacteriana (NMP), realizadas para el experimento factorial, que aparte de la biodiversidad bacteriana, el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> estaba compuesto también por un hongo (H<sub>1</sub>). Esto ocurría en la mayoría de los tiempos finales para el consorcio, por lo que se descartó que fuera una contaminación. Se realizó la extracción de ADN para la colonia C<sub>17</sub> y el hongo H<sub>1</sub>, de cara a su posterior identificación.

Para la identificación del hongo se replicó la región Nu-rDNA, la más popular en los estudios moleculares filogenéticos, que contiene los genes 18S, 5.8s y 28s altamente conservados, las variables ITS1 y ITS2 y la región IGS no transcrita. Esta región suele proveer datos adecuados para determinar el estado taxonómico de un hongo (Li et al., 1994, Min y Hickey, 2007). La primera identificación del hongo por comparación con la base de datos del genbank reveló una identidad del 100% con *L. lecanii* (AB079127). Sin embargo, el análisis filogenético localizó al hongo dentro del grupo *L. muscarium* con un valor de bootstrap aceptable. Esta incongruencia se debe a dificultades en la identificación morfológica dentro de este grupo de hongos, de tal manera que muchas secuencias enviadas al genbank son erróneas en su identificación. Además, hay que agregar que sólo cuando se ha llevado a cabo un estudio multigénico de este grupo se ha verificado la monofilea del género (Kouvelis et al., 2008, Sung et al., 2007). Por tanto, el hongo aislado pertenece al clado de *L. muscarium*

dentro del complejo de especies *L. lecanii* s. lat. de acuerdo con Kouvelis et al., 2008) y Diaz et al., 2009.

*Lecanicillium muscarium* (*Verticillium Lecanii*), es un hongo entomopatógeno y lignolítico que ha sido usado con éxito como agente de control de plagas (Butt et al, 2001). Los hongos lignolíticos son microorganismos capaces de degradar lignina, que es un polímero amorfo y complejo, cuya estructura aromática es similar a la estructura molecular de muchos contaminantes como los PAHS, pesticidas, policlorobifenilos y tintes sintéticos (Cajthaml et al., 2001) Esta capacidad está relacionada con la secreción de enzimas oxidativas como lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), peroxidasa versátil (VP) y laccasa.

Son varios los estudios que demuestran el efecto degradador de *L.lecanii* sobre contaminantes. Vroumsia et al., 1999, encontró que es este hongo es capaz de degradar químicos xenobióticos provenientes de fuentes químicas e industriales en medios líquidos. Krivobok et al., 1998, también encontró que esta especie degradaba antraceno entre un 70 y 90%. Para PAHs de elevado peso molecular (4-7 anillos), se ha encontrado una máxima degradación por *Lecanicillium sp.* en condiciones de bajo oxígeno.(Silva et al., 2009). Clemente et al., 2000, encontró también que *Lecanicillium sp.* era capaz de degradar PAHs de suelos contaminados hasta porcentajes superiores al 70%.

Hasta donde nosotros sabemos no se ha descrito ningún hongo de este grupo capaz de degradar PPCPs aunque si otros tipos de hongos. Por ejemplo, Rodarte-Morales et al., 2010 encontraron que diferentes cepas de *Bjerkandera sp.* y *Phanerochaete chrysosporium* fueron capaces de degradar la carbamazepina y el naproxeno completamente. Rodríguez-Rodríguez et al., 2010 encontraron que la especie *Tratametes versicolor* es igualmente capaz de degradar naproxeno y carbamazepina en presencia de glucosa con porcentajes del 95% para el naproxeno en medio líquido, y del 50% para ambos en lodos activados. La especie *Cunninghamella* también se encontró capaz de degradar el naproxeno en su totalidad (Zhong et al., 2003). Por tanto, esta sería la primera vez en que se describe un hongo del genero *Lenanicillium* con capacidad para degradar PPCPs. De la colonia C<sub>17</sub> sólo hemos podido aventurarnos a decir que pertenece al grupo *proteobacteria*.

Nuestros resultados cumplen los objetivos fijados al inicio del proyecto al haber podido obtener microorganismos degradadores de PPCPs aislados directamente de un agua sometida permanentemente a contaminación. Es aún más importante y novedoso el hecho de que se hayan conseguido porcentajes de degradación de la carbamazepina del 65%, y la completa degradación del naproxeno. Sin embargo, no se ha conseguido reducir la toxicidad del medio.

Mediante técnicas moleculares se ha identificado y localizado filogenéticamente a estos microorganismos en una colonia del género de las proteo-bacterias, y un hongo del género *Lecanicillium Lecanii*. Sin duda, la identificación de este último género es un resultado muy importante, ya que son pocos los estudios que hayan relacionado a *Lecanicillium* con procesos de biodegradación.

## 6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se destacan las siguientes conclusiones:

1. Se encontró un consorcio microbiano (E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>) y una colonia aislada (C<sub>17</sub>) del filo proteo-bacterias capaces de degradar naproxeno y carbamazepina. La eliminación de los fármacos resultó independiente de si es la comunidad microbiana o la cepa bacteriana quien la realice.

2. A través de los experimentos del diseño factorial se han conseguido altos porcentajes de eliminación tanto de la carbamazepina (65 %) como del naproxeno (100 %).

3. Los factores glucosa, concentración de microorganismo y concentración de fármaco han condicionado el crecimiento microbiano, pero no afectaron a los porcentajes de degradación de PPCPs.

4. A pesar de que existió eliminación de naproxeno y carbamazepina, no disminuyó significativamente la toxicidad dentro de los tratamientos debido a que se han formado compuestos intermedios y no se producido la conversión total a CO<sub>2</sub>.

5. Se ha identificado el género *Lecanicillium Lecanii* como integrante del consorcio microbiano E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>, Este género, hasta ahora, no se había relacionado con procesos de degradación de PPCPs.

## 7. LÍNEA FUTURA

Todos los resultados obtenidos en este trabajo resultan relevantes y novedosos. Además permiten establecer nuevas líneas de investigación en el campo de la biotecnología y de la bioremediación, de manera que mejoren y optimicen los procesos para alcanzar mejores resultados, y que centren la atención no sólo en la degradación de PPCPs sino también en la reducción de la toxicidad del medio en el menor tiempo posible. En este sentido resulta interesante estudiar e identificar los metabolitos que se han formado en el proceso de degradación del naproxeno, de la carbamazepina, y de la mezcla de ambos.

Sería interesante trabajar con el grupo *Lecanicillium Lecanii* de manera aislada para confirmar estos resultados y seguir trabajando en la optimización de la degradación. Una identificación más detallada de la colonia C<sub>17</sub>, y de los microorganismos presentes en el consorcio E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> está realizándose en la actualidad. Es necesario el estudio de estas comunidades microbianas con más profundidad.

Por otra parte la extracción de enzimas implicadas en el metabolismo de PPCPs capaces de neutralizar los contaminantes es una tarea todavía por desarrollar. El aislamiento e inmovilización de enzimas permiten el diseño de biorreactores que aumentan considerablemente la eficacia de los procesos. Por ello desde el punto de vista de la aplicación el identificar una única especie capaz de degradar los hidrocarburos como la colonia C<sub>17</sub> es un hallazgo importante ya que la extracción de enzimas de un único género siempre será un más rentable que si se realiza a partir de un consorcio. Sería interesante continuar seguir estudiando la degradación con esta colonia del filo proteo-bacteria.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio suponen una importante aportación a la investigación de procesos de bioremediación de ambientes contaminados, así como a su futura aplicación.

## **8.BIBLIOGRAFÍA**

- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, D y Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol.* 56(6): 1919-1925
- Ankley, G.T., Brooks, B.W., Huggett, D.B. y Sumpter, J.P. (2007) Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environ Sci Technol* 41:8211–8217
- Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Walabayashi, H. y Oyaizu, H. (2000) Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonas* based on 16S rRNA sequence. *Intern. J. System. Evol. Micro.* 50: 1569-1589.
- Barceló D (coord). (2008) Aguas continentales, Gestión de recursos hídricos, tratamiento y calidad del agua. CSIC Madrid ISBN: 978-84-00-08664-0
- Bautista, L.F., Sanz, R., Molina, M.C., González, N. y Sánchez, D. (2009) Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63: 913–922
- Bender, M. y Maccrehan, W.A. (2006). Transformation of Acetaminophen by Chlorination Produces the Toxicants 1,4-Benzoquinone and N-Acetyl-p-benzoquinone Imine. *Environ. Sci. Technol*, 40, 516.
- Bendz, D., Paxéus N.A., Ginn, T.R. y Loge, F.J. (2005) Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. *J Hazard Mater* 122:195–204. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.03.012
- Benotti, M.J., Trenholm, R.A., Vanderford, B.J., Holady, J.C., Stanford, B.D. y Snyder, S.A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ. Sci. Technol.* 43, 597–603
- Bernhard, M., Müller, J. y Knepper T.P. (2006) Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: comparison of radiolabeled 17[alpha]-ethinylestradiols continuously applied to a laboratory-scale membrane bioreactor with adapted industrial activated sludge. *Water Res* 41:4403–4412. doi:10.1016/j.watres.2007.06.022
- Boyd, G.R., Zhang, S. y Grimm, D.A. (2005). Naproxen removal from water by chlorination and biofilm processes. *Water Res.* 39, 668–676.
- Butt, T.M, Jackson, C.W, Magan, N. (2001). Fungi as biocontrol agents. Progress, process and potencial. CABI Publishing, Walingford, UK. ISBN: 0-85199-356-7
- Cajthaml, T., Pacakova, V., Sasek, V. (2001). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chem. Listy.* 95 - 404.
- Carballa, M., Omil, F. y Lema, J.M. (2007a) Calculation methods to perform mass balances of micropollutants in sewage treatment plants. Application to pharmaceutical and personal care products (PPCPs). *Environ Sci Technol* 41:884–890.

- Carballa, M., Omil, F. y Lema, J.M. (2008). Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage. *Chemosphere* 72, 1118-1123
- Chen, Y., Lin, Y., Jones., Fu., Zhan, S.H. (2009) Biodegradation of wastewater by microbial consortia with fractional factorial design. *Journal of Hazardous Materials* Volume 171 (1-3), 948-953
- Chena, J., Wongb, M.H., Wongc, Y.S y Nora F.Y.(2008) Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin* Volume 57 (6-12) 695-702
- Choong, A.M.F, Teo SL-M., Leow, J.L., Koh, H.L. y Ho, P.C.L. (2006) A preliminary ecotoxicity study of pharmaceuticals in the marine environment. *Toxicol Environ Health Part A* 69:1959–1970.
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N. y Kroiss, H. (2005b) Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Res* 39:4797–4807.
- Clemente AR, Anazawa TA, Durrant, L.R. (2001). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. *Brazilian J. Microbiol.* 32: 255-261.
- Crane, M., Watts, C. y Boucard, T. (2006) Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci Total Environ* 367:23–41.
- Deming S.N y Morgan S.L (1993), *Experimental Design: A Chemometric Approach*, 2nd ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1993, ISBN 0-444-42734-1.
- Diaz B.M., Oggerin, M., López Lastra C.C., Rubio, V., Fereres, A. (2009). characterization and virulence of *Lecanicillium lecanii* against different aphid species. *Biocontrol* 2009 54: 825-835.
- Eibes, G., Lú-Chau, T., Feijoo, G., Moreira, M.T. and Lema, J.M. (2005). Complete degradation of anthracene by Manganese Peroxidase in organic solvent mixtures. *Enzyme Microb Technol* 37, 365–372.
- Eriksson, O.E., (Ed.), 2006. *Outline of ascomycota–2006*. Myconet 12, 1– 82.
- Feijoo, G., Moreira, M.T., Álvarez, P., Lú-Chau, T. and Lema, J.M. (2008). Evaluation of the Enzyme Manganese Peroxidase in an Industrial Sequence for the Lignin Oxidation and Bleaching of Eucalyptus Kraft Pulp. *J Appl Polym Sci* 109, 1319–1327.
- Felsenstein, J.(1985) Confidence limits on phylogenies: and approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Gallego RJS, García-Martínez MJ, Llamas JF, Belloch C, Peláez AI, Sánchez J (2007). Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. *Biodegradation* 18:269–281
- Gams W., Zare R, y Culham A, (2000). A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. I. Phylogenetic studies using ITS sequences. *Nova Hedwigia* 71: 465–480.

- Gardes, M. y Bruns, T. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes, application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118.
- Gómez, M.J., Martínez, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R. y Agüera, A., (2006) Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* 66: 993-1002
- González, S., Catalá, M., Romo, R., Rodríguez, J.L., Gil, A y Varcarcel, Y.(2010) Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environment International* Volume 36 (2):2195-201
- Hervé, G., Yargeau, V., y Cooper, D.G (2010) Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism. *Science of The Total Environment* Volume 408 (7) 1701-1706.
- Hillis, D.M. y Bull, J.J. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic análisis. *Systematic Biol.* 42: 182-192.
- Hywel-Jones, N.L. (2002). Multiples of eight in *Cordyceps* ascospores. *Mycol. Res.* 106, 2–3.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtera, L. y Rubino, M. (2005) Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Sci. Total Environ.* 348, 93–101.
- Jiju, A. (2003) *Design of Experiments for Engineers and Scientists*. Elsevier Science & Technology Books. ISBN: 0750647094
- Klee A.J. (1993) A computer program for the determination of most probably number and its confidence limits. *Intern. J. Syst. Evol. Microb.* 18:91-98.
- Kouvelis, V. N., Sialakouma A. and Typas, M. A. (2008). Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS región sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecanicillium* species. *Myc. Res.* 112:829-844.
- Krovobok, S., Miriouchkine, E., Seigle-Murandi, F., Benoit-Guyod , J-L. (1998). Biodegradation of antrachene by soil fungi. *Chemosphere* 37 (3): 523-530.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, P., Martín-alonso, J. y Barceló, D., (2008) Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of hydrology* 358: 112-123.
- Li K-N, Rouse DI, German TL, 1994. PCR primers that allow intergeneric differentiation of ascomycetes and their application to *Verticillium* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4324–4331.
- López, C., Moreira, M.T., Feijoo, G., and Lema, J.M. (2004). Dye Decolorization by Manganese Peroxidase in an Enzymatic Membrane Bioreactor. *Biotechnol Prog* 20, 74-81.
- Loreau M, Naeem S, Inchausti P Bengtsson J and 12 others (2001) Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenge. *Sci* 294:804-808.



- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Blánquez, P., Caminal, G., (2010) Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD\_MS and NMR. *Bioresource Technology* 101 (2159-2166)
- Matamoros, V., García, J. y Bayona, J.M., 2008. Organic micropollutant removal in a full-scale surface flow constructed wetland fed with secondary effluent. *Water Res.* 42, 653–660.
- Min XJ, Hickey DA, 2007. Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Notes* 7: 365–373.
- Mohajer, L., Aziz, A.H., Isab M.H y Zaheda, M.A (2010) A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. *Bioresource Technology* Volume 101 (3) 893-900
- Montgomery, D.C. (1991) *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo Editorial Latinoamericano. ISBN : 9789687270609.
- Molina M.C., González N., Bautista L.F., Sanz R., Simarro R., Sánchez I. y Sanz J.L. (2009) Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation* 20(6): 789-800
- Muyzer, G., Waal, E.C. y Uitterlinden, A.G (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59(3): 695-700.
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K. y Takada, H.(2006) Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res* 40:3297–3303.
- Nakada, N., Shinohara, H., Murata, A., Kiri, K., Managaki, S., Sato, N. y Takada, H. (2007). Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Res.* 41, 4373–4382.
- Nakada, N., Kiri, K., Shinohara, H., Harada, A., Kuroda, K., Takiwaza, S. y Takada H (2008) Evaluation of pharmaceuticals and personal care products as water-soluble molecular markers of sewage. *Environ. Sci. Technol.*42:6347-6353
- Onesios, K.M. y Yu, J.T. y Bouwer, E.J. (2009) Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Biodegradation* 20:441- 466
- Pereira, V.J., Linden, K.G. y Weinberg, H.S., 2007. Evaluation of UV irradiation for photolytic and oxidative degradation of pharmaceutical compounds in water. *Water Res.* 41, 4413–4423.
- Poyatos, J.M., Muñio, M.M., Almecija, M.C., Torres, J.C., Hontoria, E. y Osorio, F. (2009). Advanced oxidation processes for wastewater treatment: state of the art. *Water, Air & Soil Pollution.* 205 (4) 187-204
- Pritchard, P.H (1992). Use of inoculation in bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 3, (3): 232-243

- 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.
- Rodarte – Morales, A., Moreira, M.T., Feijoo, G. y Lema J.M. (2010). Evaluation of two fungal strains for the degradation of pharmaceuticals and personal care products (ppcps), *Chemical Engineering Transactoins*, 20, 31-36 DOI: 10.3303/CET1020006
- Rodriguez, I., Quintana J.B., carpinteiro, J., Carro, A.M., Lorenzo, R.A. y Cela, R. et al (2003) Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *J Chromatogr A* 985:265–274.
- Rodriguez-Rodriguez, C.E., Marco-Urrea, E. y Caminal, G., (2010). Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresourse Technology* 101 (2259-2266)
- Rogerson, C.T. (1970). The hypocrealean fungi (Ascomycetes, Hypocreales). *Mycologia* 62, 865–910.
- Silva, I.S., Grossman, M., Durrant, L.R (2009) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi, *Internationa. Biodeterioration &. Biodegradation.* 63 (2) 224–229.
- Sirbu D.M., Curseu, D., Popa, M., Achimas-Cadariu, A y Moldovan, Z. (2006) Environmental risks of pharmaceuticals and personal care products in water. Tenth International Water Technology Conference, IWTC10, Alexandria, Egypt.
- Suárez, S., Dodd, M.C., Omil, F. y von Gunten, U. (2007). Kinetics of triclosan oxidation by aqueous ozone and consequent loss of antibacterial activity: relevance to municipal wastewater ozonation. *Water Res.* 41, 2481-2490
- Sung, G.-H., Spatafora, J.W., Zare, R., Hodge, K.T., Gams, W., 2001. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. II. Phylogenetic analyses of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of the Clavicipitaceae. *Nova Hedwigia* 72, 311–328.
- Sung, G.H., Sung, J.M., Hywel-Jones, N.L. y Spatafora, J.W. (2007) A multi-gene phylogeny of Clavicipitae (ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrao approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 1204-1223.
- Szabó KE, Itor P, Bertilsson S, Tranvik L and Eiler A (2007) Importance of rare and abundant populations for the structure and functional potential of freshwater bacterial communities. *Aquat Microb Ecol* 47: 1-10
- Ternes, T.A. y Joss, A. (2006) *Human pharmaceuticals, hormones and fragrances.* IWA Publishing, New York.
- Ternes, T.A., Bonerz, M., Herrmann, N., Teiser, B. y Andersen, H.R. (2007) Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: an option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere* 66:894–904.

- Vieno, N.M., Tuhkanen, T. y Kronberg, L.(2005) Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. *Environ Sci Technol* 39:8220–8226.
- Viñas, M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.
- Viñas, M., Sabaté, J., Guasp, C., Lalucat, J., y Solanas, A.M. (2005) Cultura-dependent and independent approaches establish the complexity of a PAH-degrading microbial consortium. *Can. J. Microbiol.* 51: 897-909.
- Vroumsia, T., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., y Benot-Guyod., J.L (1999). Effects of culture parameters on the degradation of 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid (2,4 -D) and 2,4-Dichlorophenol (2,4 – DCP) by selected fungi. *Chemosphere*, 39 (9): 1397-1405.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis, M.A. Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR protocols*. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Wrenn, B.A., y Venosa, A.D. (1983) Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by most probably number (MPN). *Can.J.Microbiol.* 42:252-258.
- Zare, R., Spatafora, J. y Gams W. (2001). A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. *Nova Hedwigia* 72: 329–337.
- Zhao, J.L., Ying, G.G., Wang, L., Yang, J.F., Yang, X.B., Yang, L.H. y Li, X., (2009a). Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography–negative chemical ionization–mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* 407, 962–974.
- Zhao, X., Qu, J., Liu, H., Qiang, Z., Liu, R., Hu, C., 2009b. Photoelectrochemical degradation of anti-inflammatory pharmaceuticals at Bi<sub>2</sub>MoO<sub>6</sub>–boron-doped diamond hybrid electrode under visible light irradiation. *Appl. Catal. B Environ.* 91, 539–545.