

# **Universidad Nacional del Litoral**

*Facultad de Ciencias Veterinarias*

*Laboratorio de Biofísica*

*Facultad de Ciencias Veterinarias*

*Universidad Nacional del Litoral*

Tesis presentada para optar por el grado académico de  
Doctora en Ciencias Veterinarias

Producción de biomásas a partir de lactosuero contaminado  
con antibióticos para disminuir su impacto ambiental

AUTORA: **MSc. Dafna ELUK**

DIRECTOR: **Dr. Rafael L. ALTHAUS**

CODIRECTOR: **Dr. Orlando NAGEL**

Esperanza, 3 de Agosto de 2022



# **Universidad Nacional del Litoral**

*Facultad de Ciencias Veterinarias*

*Laboratorio de Biofísica*

*Facultad de Ciencias Veterinarias*

*Universidad Nacional del Litoral*

Tesis presentada para optar por el grado académico de  
Doctora en Ciencias Veterinarias

Producción de biomásas a partir de lactosuero contaminado  
con antibióticos para disminuir su impacto ambiental

AUTORA: **MSc. Dafna ELUK**

DIRECTOR: **Dr. Rafael L. ALTHAUS**

CODIRECTOR: **Dr. Orlando NAGEL**

## DEDICATORIA

A mi viejo, gran luchador.....  
Ya podés descansar (Z"l)

*“... ¿Y qué pasa con mis alumnos, o mi propio hijo, a quienes les dicen que no pueden en lugar de decirles que sí pueden? ¿Cómo podría ayudar a la gente a superar las creencias autolimitadoras y a convertirse en lo que mundo espera de ellos? Le dije a mi director que me estaba planteando obtener el doctorado en Psicología. Pero no pude expresar mi sueño sin una reserva.*

*-No sé- dije-, cuando acabe el doctorado tendré cincuenta años.*

*Me sonrió.*

*-Tendrás cincuenta años de todas formas dijo-.*

*Durante los seis años siguientes, descubrí que tanto mi director como mi terapeuta tenían razón. No había motivo para que me impusiera límites, para dejar que mi edad restringiera mi decisión. Escuché lo que la vida me pedía y obtuve mi doctorado....”*

Extraído de: “*La bailarina de Auschwitz*”, de Edith Eger (2014)

## AGRADECIMIENTOS

Primero de todo, quiero agradecer a Rafael, mi director, por abrirme las puertas de su cátedra y darme la posibilidad de seguir haciendo lo que me gusta: Investigación & Docencia. Rafa, quizás creas que este agradecimiento es una simple formalidad, pero no lo es. Esta tesis no habría salido adelante sin tu ayuda. Por eso necesito darte un especial reconocimiento por el tiempo dedicado, por entender mi situación familiar y económica, y por saber cómo exigirme hasta en aquello que yo pensaba que no podría lograr. ¡Gracias de verdad!

A mi codirector Orlando (Pepo), que confió en mí, dedicándome tiempo y esfuerzo. Por sus oportunos consejos que me permitieron crecer en mi formación académica.

A Ana María y Ulises, por permitirme trabajar en su laboratorio (Facultad de Humanidades y Ciencias de la Universidad Nacional del Litoral) y guiarme en los ensayos con *Daphnia magna*.

A Roberto, con quien compartí horas de ensayos, y noches de desvelo al lado de los biorreactores o pensando ideas para mejorar los resultados. Debo mencionar que algunos de los datos obtenidos sirvieron para el desarrollo de una riquísima cerveza artesanal.

A mis compañeros de trabajo Moni, Lala y Cristina que cubrieron mis alocados horarios y me cambiaron turnos para que pueda cumplir con los ensayos de esta tesis.

A Eugenia, mi asesora gramatical y constante fuente de fortaleza moral.

A la Universidad Nacional del Litoral y a la Secretaría de Planeamiento Institucional de la Universidad Nacional del Litoral, por la Beca Doctoral otorgada, la cual debí abandonar luego de un año de iniciada por ganar un concurso de cargo docente, pero que me dio el puntapié para realizar este trabajo de investigación que hoy presento con orgullo.

A la Universidad Nacional del Litoral, por los proyectos de Investigación CAI+D'11 (50120110100052 LI, Res. 444/13- Lista II año 2013, Universidad Nacional del Litoral, Argentina), PICT 455-2012 (Agencia Nacional de

Promoción Científica y Tecnológica) y PICT-2017-2841 (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica).

A Diego y a mis hijas Julieta y Sofía, fuente infinita de amor y comprensión. Por entender mis ausencias y tiempos de trabajo en casa. Y sobre todo por traerme galletitas, por reponer el agua del mate para que siempre esté caliente, y por darme un abrazo cuando veían mi cansancio o frustración.

Y finalmente a mis padres, Rebe y Ari (Z"L), por estar siempre en mi vida. A vos mami, que con tu ejemplo de lucha constante, me demostraste que las metas se pueden lograr con esfuerzo y dedicación. Y a vos papi, te dedico esta tesis... ojalá hubieses llegado a verme recibida de Doctora.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS .....	III
ÍNDICE GENERAL .....	V
INDICE DE TABLAS .....	XII
INDICE DE FIGURAS .....	XIV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	XVIII
RESUMEN .....	XXI
SUMMARY .....	XXII
CAPÍTULO 1: Introducción .....	2
1.1. Descripción y clasificación de antibióticos .....	3
1.2. Uso de ATBs en medicina veterinaria .....	8
1.2.1. Frecuencia de uso de ATBs en ganado vacuno lechero.....	9
1.3. Problemas que producen los residuos de ATBs .....	10
1.3.1. Problemas para el consumidor debido a residuos de ATBs .....	11
1.3.2. Problemas para la industria láctea debido a residuos de ATBs.....	11
1.3.3. Problemas para el productor lácteo debido a residuos de ATBs .....	12
1.4. Impacto de los residuos de ATBs sobre el ambiente .....	14
1.4.1. Efectos de los residuos de ATBs sobre microorganismos .....	17
1.4.2. Efecto de los residuos de ATBs sobre microalgas.....	18
1.4.3. Efecto de los residuos de ATBs sobre microcrustáceos .....	20
1.4.4. Efecto de los residuos de ATBs sobre plantas acuáticas .....	21
1.4.5. Efecto de los residuos de ATBs sobre semillas y plantas terrestres..	21
1.4.6. Efecto de los residuos de ATBs sobre peces e invertebrados .....	23

1.5. Frecuencia de residuos de ATBs en leche.....	24
1.6. Normativas para controlar los residuos de ATBs en la leche .....	25
1.7. Obtención del lactosuero .....	27
1.8. Alternativas para el tratamiento de leche y lactosuero conteniendo residuos de ATBs a niveles superiores a los permitidos por la legislación .....	28
1.9. Alternativas para el aprovechamiento del lactosuero.....	31
1.9.1. Metabolismo de <i>K. marxianus</i> .....	32
CAPÍTULO 2: Objetivos .....	39
2.1. Objetivo general.....	39
2.2. Objetivos específicos .....	39
CAPÍTULO 3: Efecto de los residuos de antibióticos en el medio ambiente .....	41
3.1. Efecto de antibióticos sobre la germinación y elongación de raíces de semillas para cultivos de Argentina. ....	42
3.1.1. Introducción.....	42
3.1.2. Materiales y Métodos .....	43
Antibióticos .....	43
Cultivos seleccionados .....	44
Preparación del método.....	44
Mediciones y Análisis estadístico de los datos .....	45
Frecuencia de germinación de las semillas .....	45
Elongación de las raíces de las semillas .....	45
3.1.3. Resultados y Discusión.....	45
Frecuencia de germinación de las semillas .....	45
Elongación de las raíces de las semillas .....	52
3.1.4. Conclusiones.....	55



3.2. Efecto fitotóxico de residuos de antibióticos sobre semillas forrajeras.....	56
3.2.1. Introducción.....	56
3.2.2. Materiales y Métodos .....	57
Antibióticos .....	57
Semillas forrajeras .....	57
Estudios de toxicidad .....	57
Mediciones y análisis estadístico .....	58
Frecuencia de germinación.....	58
Elongación de raíces .....	58
3.2.3. Resultados y Discusión.....	59
Frecuencia de germinación.....	59
Elongación de raíces .....	65
3.2.4. Conclusiones.....	68
3.3. Toxicidad de fluoroquinolonas sobre el cladócero <i>Daphnia magna</i> .....	69
3.3.1. Introducción.....	69
3.3.2. Materiales y Métodos .....	71
Quinolonas.....	71
Cultivo del organismo de ensayo .....	71
<i>Daphnia magna</i> .....	71
<i>Chlorella vulgaris</i> .....	73
Ensayos de ecotoxicidad .....	73
3.3.3. Análisis estadístico de los datos .....	75
Ensayo de toxicidad aguda (48 horas).....	75
Ensayo de toxicidad crónica (21 días) .....	75

Cociente de riesgo.....	76
3.3.4. Resultados y Discusión.....	76
Ensayos de toxicidad aguda (48 horas):.....	76
Ensayos de toxicidad crónica (21 días): .....	78
3.3.5. Conclusiones.....	90
CAPÍTULO 4: Inhibición de <i>Kluyveromyces marxianus</i> por antibióticos.....	92
4.1. Actividad inhibitoria de antibióticos en lactosuero sobre el crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	93
4.1.1. Introducción.....	93
4.1.2. Materiales y Métodos .....	93
4.1.2.1. Levadura.....	93
4.1.2.2. Medio de cultivo con levadura.....	94
4.1.2.3. Soluciones aditivadas con antibióticos en medio de cultivo .....	94
4.1.2.4. Bioensayo de inhibición de levaduras.....	94
4.1.2.5. Análisis estadístico de los datos .....	96
4.1.3. Resultados y Discusión.....	96
4.1.4. Conclusiones.....	102
4.2. Efecto de tratamiento térmico de lactosuero contaminado con antibióticos sobre el crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	102
4.2.1. Introducción.....	102
4.2.2. Materiales y Métodos .....	103
4.2.2.1. Antibióticos .....	103
4.2.2.2. Levadura.....	103
4.2.2.3. Medio de cultivo .....	103
4.2.2.4. Diseño experimental .....	104

4.2.2.5. Determinación de biomasa .....	104
4.2.2.6. Consumo de lactosa .....	104
4.2.2.7. Análisis estadístico de los datos .....	105
4.2.3. Resultados y Discusión .....	106
Cefalosporinas.....	116
Quinolonas.....	117
Tetraciclinas.....	118
4.2.4. Conclusiones.....	118
CAPÍTULO 5: Optimización de condiciones para la inhibición de antibióticos y producción de biomasa .....	120
5.1. Introducción.....	120
5.2. Materiales y Métodos .....	122
5.2.1. Medio de cultivo .....	122
5.2.2. Levadura.....	122
5.2.3. Antibióticos .....	122
5.2.4. Determinación de biomasa .....	123
5.2.5. Determinación de la concentración de lactosa .....	123
5.2.6. Determinación de la concentración de proteína.....	123
5.2.7. Determinación de la concentración de alcohol .....	124
5.2.8. Determinación de la concentración de amoníaco .....	124
5.2.9. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) .....	124
5.3. Primera parte: Selección de la fuente nitrogenada .....	125
5.3.1. Diseño experimental .....	125
5.3.2. Resultados y Discusión.....	126

5.4. Segunda parte: Selección del pH y la Temperatura.....	128
5.4.1. Diseño experimental .....	128
5.4.2. Resultados y Discusión.....	129
5.5. Tercera parte: Optimización de producción de biomasa .....	131
5.5.1. Diseño experimental .....	131
5.5.2. Resultados y Discusión.....	136
5.6. Cuarta parte: Verificación de las mejores condiciones de trabajo.....	145
5.6.1. Diseño experimental .....	145
5.6.2. Resultados y Discusión.....	147
5.7. Conclusiones del Capítulo .....	150
CAPÍTULO 6: Discusión general .....	153
CAPÍTULO 7: Conclusión general.....	164
BIBLIOGRAFÍA .....	166
ANEXOS .....	231
Publicaciones.....	231
Anexo 1 .....	232
Eluk D, Nagel O. G, Zimmermann J, Molina M. P, Althaus R. L. 2016. Effect of antibiotics on the germination and root elongation of Argentine intensive crops. Int. J. Environ. Res. 10(4): 471-480.....	232
Anexo 2.....	243
Eluk D, Franck R, Nagel O. G, Molina M. P, Althaus R. L. 2017. Phytotoxic effect of antibiotic residues on forage seeds. Int. J. Agric. Innov. Res. 5: 828- 848. ....	243
Anexo 3.....	251
Eluk D, Nagel O, Gagneten A, Reno U, Althaus R. 2021. Toxicity of fluoroquinolones on the cladoceran <i>Daphnia magna</i> . Water Environ. Res. 1–17. <a href="http://doi.org/10.1002/wer.1631">http://doi.org/10.1002/wer.1631</a> .....	251

Anexo 4.....	273
Nagel O G, Althaus R L, Eluk D. Inhibition on <i>Kluyveromyces marxianus</i> by antibiotics. Dairy Research. Trabajo enviado para su evaluación.....	273
Anexo 5.....	281
Eluk D, Ceruti R, Nagel O, Althaus R. 2019. Effect of thermal treatment of whey contaminated with antibiotics on the growth of <i>Kluyveromyces marxianus</i> . J. Dairy Res. 86(1): 102-107.....	281
Anexo 6.....	288
Ceruti R, Eluk D, Nágel O, Molina M. P, Althaus R. 2016 Análisis de las principales variables que afectan el crecimiento y consumo de lactosa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> . VI Congreso Internacional de Ciencia y tecnología de los Alimentos. Conservación e inocuidad: trabajos completos (ISBN 978-987-45380-3-1), 42-48.....	288

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.2:</b> Límites máximos de residuos de antibióticos (mg/L) permitidos en leche.....	13
<b>Tabla 3.1:</b> Frecuencia relativa de germinación de semillas: resultados estadísticos de la aplicación de la opción stepwise del modelo de regresión logística para diferentes concentraciones de antibiótico. ....	46
<b>Tabla 3.2:</b> Efecto de la concentración de antibióticos sobre la elongación de las raíces (cm) de cultivos agrícolas a los siete días. ....	53
<b>Tabla 3.3:</b> Parámetros estadísticos del efecto de tiempo y la concentración de antibióticos sobre la frecuencia de germinación de semillas, calculados mediante la aplicación de la opción stepwise del modelo de regresión logística. ....	59
<b>Tabla 3.4:</b> Ecuaciones logísticas que relacionan las frecuencias de germinación de semillas forrajeras con el tiempo y las concentraciones de ATBs. ....	60
<b>Tabla 3.5:</b> Efecto de la concentración antibióticos sobre la elongación de las raíces (cm) de semillas forrajeras medidos a los 7 días.....	66
<b>Tabla 3.6:</b> Características generales de las fluoroquinolonas.....	72
<b>Tabla 3.7:</b> Concentración efectiva (mg/L) que produce el 10 y 50 de mortalidad en el estudio de toxicidad aguda a 48 h con fluoroquinolonas y <i>D. magna</i> (n=20). ....	74
<b>Tabla 3.8:</b> Concentraciones (mg/L) de fluoroquinolonas empleadas en los ensayos crónicos.....	75
<b>Tabla 3.9:</b> Mortalidad relativa acumulada y crecimiento relativo acumulado (número de mudas) de <i>D. magna</i> expuesta a seis FQs. ....	78
<b>Tabla 3.10:</b> Parámetros (µg/L) del estudio de ecotoxicidad aguda y crónica de fluoroquinolonas con <i>D. magna</i> .....	85
<b>Tabla 4.1:</b> Concentraciones de antibióticos (mg/L) empleadas en los ensayos.....	95
<b>Tabla 4.2:</b> Ecuaciones logística para el efecto de las concentraciones de antibióticos sobre la inhibición del crecimiento de <i>K. marxianus</i> . ....	97

<b>Tabla 5.1:</b> Modelos que representan el efecto de fuente nitrogenada sobre la producción de biomasa de <i>K. marxianus</i> y la lactosa residual. ....	126
<b>Tabla 5.2:</b> Modelos que representan el efecto del pH y la temperatura sobre la producción de biomasa de <i>K. marxianus</i> y la concentración de lactosa residual .....	129
<b>Tabla 5.3:</b> Criterios de optimización configurados en la función deseabilidad .	136
<b>Tabla 5.4:</b> Modelos que relacionan la producción de biomasa y los contenidos de lactosa y proteína residuales con el nivel de aireación y la concentración de peptona de caseína.....	136
<b>Tabla 5.5:</b> Valores medios de concentración alcohol, amoníaco y DQO según el Diseño Dohelert.....	142
<b>Tabla 5.6:</b> Modelos que relacionan la producción de biomasa y los contenidos de lactosa y proteína residuales con la acción de antibióticos inactivados térmicamente.....	147

## INDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.1:</b> Distribución de la producción lactea en la Región Pampeana .....	2
<b>Fig. 1.2:</b> Empleo de ATBs en medicina veterinaria a nivel Mundial .....	9
<b>Fig. 1.3:</b> Frecuencia de residuos de ATBs en muestras de leche .....	10
<b>Fig. 1.4:</b> Hidrólisis de lactosa .....	32
<b>Fig. 3.1a:</b> Efecto de la concentración de antibiótico sobre la frecuencia de germinación de <i>Glicine max</i> .....	47
<b>Fig. 3.1b:</b> Efecto de la concentración de antibiótico sobre la frecuencia de germinación de <i>S.bicolor</i> .....	48
<b>Fig. 3.1c:</b> Efecto de las concentración de antibiótico sobre la frecuencia de germinación de <i>T.aestivum</i> . .....	49
<b>Fig. 3.1d:</b> Efecto de la concentración de antibiótico sobre la frecuencia de germinación de <i>Z. mays</i> .....	50
<b>Fig. 3.1e:</b> Efecto de la concentración de antibiótico sobre la frecuencia de germinación de <i>H.annus</i> .....	51
<b>Fig. 3.2:</b> Efecto de 0,004 mg/L de penicilina en la frecuencia de germinación de la semilla de <i>Glycine max</i> .....	51
<b>Fig. 3.3:</b> Efecto de la penicilina (0,004 mg/L) sobre la elongación de la raíz de <i>G. max</i> medido el séptimo día de tratamiento.....	54
<b>Fig. 3.4:</b> Efecto de diferentes concentraciones de enrofloxacina sobre la frecuencia de germinación de <i>Medicago sativa</i> (arriba) y <i>Trifolium repens</i> (abajo) .....	61
<b>Fig. 3.5:</b> Efecto de diferentes concentraciones de kanamicina sobre la frecuencia de germinación de <i>Medicago sativa</i> (arriba) y <i>Melilotus albus</i> (abajo) .....	62



<b>Fig. 3.6:</b> Efecto de diferentes concentraciones de oxitetraciclina sobre la frecuencia de germinación de <i>Medicago sativa</i> (arriba), <i>Mellilotus albus</i> (centro) y <i>Trifolium repens</i> (abajo).....	63
<b>Fig. 3.7:</b> Efecto de 0,10 mg/L de enrofloxacin sobre la frecuencia de germinación de semillas de <i>Medicago sativa</i> . .....	64
<b>Fig. 3.8:</b> Fitotoxicidad de enrofloxacin (0,10 mg/L) sobre la elongación de raíces de <i>Medicago sativa</i> luego de 7 días de ensayo.....	68
<b>Fig. 3.9:</b> Mortalidad relativa de <i>D. magna</i> debido a la presencia de seis fluoroquinolonas a diferentes concentraciones (mg/L) .....	80
<b>Fig. 3.10:</b> Crecimiento acumulado relativo (número de mudas acumuladas) de <i>D. magna</i> debido a la presencia de seis fluoroquinolonas a diferentes concentraciones (mg/L).....	82
<b>Fig. 3.11:</b> Diagramas de caja de transformación logarítmica del cociente de riesgo (Log RQ) de seis fluoroquinolonas en río (river), lago (lake) y canal de agua (canal). .....	86
<b>Fig. 3.12:</b> Diagramas de caja de transformación logarítmica del cociente de riesgo (Log RQ) de seis fluoroquinolonas en aguas residuales urbanas (del inglés urban wastewater - UWW), aguas residuales hospitalarias (del inglés hospital wastewater - HWW) y aguas de acuicultura (del inglés aquaculture waters - AW).....	89
<b>Fig. 4.1:</b> Efecto de la concentración de cefalosporinas sobre el crecimiento de <i>K. marxianus</i> .....	98
<b>Fig. 4.2:</b> Efecto de la concentración de quinolonas sobre el crecimiento de <i>K. marxianus</i> .....	98
<b>Fig. 4.3:</b> Efecto de la concentración de tetraciclinas sobre el crecimiento de <i>K. marxianus</i> .....	99
<b>Fig. 4.4:</b> Efecto inhibitorio de oxitetraciclina sobre la fermentación de <i>K. marxianus</i> .....	99

<b>Fig. 4.5:</b> Estimación del porcentaje de degradación de antibióticos .....	105
<b>Fig. 4.6a:</b> Efecto del tratamiento térmico y cefalexina, sobre el crecimiento de <i>K. marxianus</i> y el consumo de lactosa. ....	107
<b>Fig. 4.6b:</b> Efecto del tratamiento térmico y cefoperazona, sobre el crecimiento de <i>K. marxianus</i> y el consumo de lactosa. ....	108
<b>Fig. 4.6c:</b> Efecto del tratamiento térmico y ceftiofur, sobre el crecimiento de <i>K. marxianus</i> y el consumo de lactosa. ....	109
<b>Fig. 4.7a:</b> Efecto del tratamiento térmico y ciprofloxacina sobre el crecimiento de <i>K. marxianus</i> y el consumo de lactosa. ....	110
<b>Fig. 4.7b:</b> Efecto del tratamiento térmico y enrofloxacin sobre el crecimiento de <i>K. marxianus</i> y el consumo de lactosa. ....	111
<b>Fig. 4.7c:</b> Efecto del tratamiento térmico y marbofloxacina sobre el crecimiento de <i>K. marxianus</i> y el consumo de lactosa. ....	112
<b>Fig. 4.8a:</b> Efecto del tratamiento térmico y clortetraciclina sobre el crecimiento de <i>K. marxianus</i> y el consumo de lactosa. ....	113
<b>Fig. 4.8b:</b> Efecto del tratamiento térmico y oxitetraciclina sobre el crecimiento de <i>K. marxianus</i> y el consumo de lactosa. ....	114
<b>Fig. 4.8c:</b> Efecto del tratamiento térmico y tetraciclina sobre el crecimiento de <i>K. marxianus</i> y el consumo de lactosa. ....	115
Fig. 5.1: Efecto del tipo de fuente nitrogenada sobre la producción de biomasa (arriba) de <i>K. marxianus</i> y la lactosa residual (abajo) a pH= 6,5 y T= 37°C. ....	127
<b>Fig. 5.2:</b> Efecto del pH y de la temperatura sobre la producción de biomasa (arriba) de <i>K. marxianus</i> y la lactosa residual (abajo). ....	130
<b>Fig. 5.3:</b> Diseño en matriz Doehlert empleado para la selección de condiciones de trabajo. ....	132

<b>Fig. 5.4:</b> Superficies de Respuesta Estimada para el efecto del nivel de aireación (VVM)-tiempo (h); y la concentración de proteínas (% m/V)-tiempo (h) sobre la producción de biomasa (g/L). .....	138
<b>Fig. 5.5:</b> Superficies de Respuesta Estimada para el efecto del nivel de aireación (VVM)-tiempo (h) y la concentración de proteínas (% m/V)-tiempo (h) sobre la concentración de lactosa residual (% m/V).....	139
<b>Fig. 5.6:</b> Superficies de Respuesta Estimada para el efecto del nivel de aireación (VVM)-tiempo (h) y las proteínas (% m/V)-tiempo (h) sobre la concentración de proteínas residual (% m/V).....	139
<b>Fig. 5.7:</b> Superficies de la función deseabilidad para diferentes valores de diseño.....	145
<b>Fig. 5.8:</b> Cinética de crecimiento <i>K. marxianus</i> (A) con lactosuero (previa inactivación térmica de los antibióticos) y los consumos relativos residuales, de lactosa (B) y proteína (C), durante las 36 h de fermentación a 42°C, pH 7,5 y con un nivel de aireación de 1,5 VVM. ....	149

## **ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

### **Abreviaturas**

APHA: American Public Health Association

ASTM: American Society for Testing and Materials

ATBs: antibióticos

BBM: Medio Basal Bold

CEFA: cefalosporina

DO: densidad óptica

DQO: demanda química de oxígeno

48 h EC<sub>50</sub>: concentración efectiva a las 48h de exposición

48 h NOEC: efectos tóxicos no observaron a las 48 horas

EC<sub>50</sub>/21-d: concentración de antibiótico que produce el 50% de mortalidad a los 21 días de exposición

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ENRO: enrofloxacin

EU: European Union

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Food and Drug Administration

FG: Frecuencia de Germinación

FQs: fluoroquinolonas

F-valor: indicativo de la significatividad del modelo propuesto

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

IC10: concentraciones que producen el 10% de inhibición del crecimiento

IC50: concentraciones que producen el 50% de inhibición del crecimiento

IFAH: International Federation for Animal Health

ISO: Organización Internacional de Normalización

LMRs: Límites Máximos de Residuos

LRC: consumo relativo de lactosa

MAGyP: Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca

MEC: Concentraciones Medias Ambientales  
MinAgri: Ministerio de Agroindustria de la Nación  
NA: nivel de aireación  
NOEC/21-d: efectos tóxicos no observaron a los 21 días  
OCLA: Observatorio de la Cadena Láctea Argentina  
OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
OXI: oxitetraciclina  
PC: peptona de caseína  
RQ: Coeficientes de Riesgo  
SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria  
USEPA: United States Environmental Protection Agency  
VVM: volumen de aire por volumen de medio por minuto

### **Símbolos**

$A_i$ : absorbancia  
 $P_i$ : fosfato inorgánico  
 $TT_i$ : tratamiento térmico  
C: crecimiento  
 $C_{\%}$ : concordancia porcentual  
 $C_i$ : concentración de antibiótico  
CPC: concentración de peptona de caseína  
 $CR_i$ : producción relativa de biomasa  
 $FN_j$ : fuente nitrogenada  
L: concentración de la lactosa  
 $L_R$ : concentración de lactosa residual relativa  
M: Probabilidad de mortalidad  
 $P_R$ : concentración de proteína residual relativa  
Valor P: probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula

R: coeficientes de regresión

$R^2_{aj}$ : coeficiente de regresión cuadrático ajustado

%DR: porcentaje de degradación relativa

t: tiempo

$\beta_i$ : Coeficientes estimados por los diferentes modelos

$\gamma_i$ : coeficientes estimados por el modelo

$\chi^2$ : distribución de probabilidad

## RESUMEN

Los antibióticos veterinarios son una fuente de contaminación ambiental puesto que no se metabolizan por completo y se excretan a través de las heces, la orina y la leche. Por esto, se evaluó el efecto fitotóxico de cinco familias de antibióticos sobre la frecuencia de germinación y elongación radicular de semillas de cinco cultivos y tres especies forrajeras. Se observó disminución de las raíces de *Zea mays*, *Glycine max* y *Sorghum bicolor* con 4 µg/L de penicilina, *G. max* con 50 µg/L de tilosina, *Medicago sativa*, *Melilotus albus*, *S. bicolor* y *Trifolium repens* con 100 µg/L de enrofloxacin, *M. sativa* y *T. repens* con 100 µg/L de oxitetraciclina, y *Zea mays* y *G. max* con 150 µg/L de kanamicina. También los estudios ecotoxicológicos, agudo y crónico, realizados con seis fluoroquinolonas sobre *Daphnia magna* indicaron que concentraciones comprendidas entre 56 µg/L (ciprofloxacina) y 141 µg/L (enrofloxacin) produjeron mortalidad del cladócer. Debido a que lactosuero puede ser empleado para la producción de biomasa, seguidamente se analizó el efecto de diferentes familias de ATBs sobre el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus*. Se observó que cefalosporinas (cefadroxil, cefalexina, cefoperazona, cefuroxima, ceftiofur), tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina) y quinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacin, marbofloxacina, norfloxacina) en concentraciones cercanas a los LMRs inhibieron su crecimiento. Por esto, para disminuir su actividad inhibitoria, se evaluó el efecto del tiempo de tratamiento térmico (120°C) sobre muestras de lactosuero con residuos de antibióticos pertenecientes a dichos grupos. Se determinó que 40 min y 83 min permitieron la degradación total de cefalosporinas y tetraciclinas, respectivamente, pero 91 min degradaron el 82% de las quinolonas. Finalmente, se implementó un diseño experimental secuencial, en cuatro etapas, para disminuir las concentraciones residuales de lactosa y proteínas del lactosuero mediante la producción de *K. marxianus*. Se concluyó que 1,63% m/V peptona de caseína, pH 7,5, temperatura 42°C, aireación de 1,5 VVM y fermentación de 35,6 h, permitieron obtener 4,48 g/L de biomasa y disminuir los niveles residuales de lactosa (0,09% m/V, 95% de consumo) y proteínas (0,02% m/V, 93% de consumo).

## SUMMARY

Veterinary antibiotics are a source of environmental contamination since they are not fully metabolized and are excreted through feces, urine and milk. Therefore, the phytotoxic effect of five families of antibiotics on the frequency of germination and root elongation of seeds of five crops and three forage species was evaluated. A decrease was observed in the roots of *Zea mays*, *Glycine max* and *Sorghum bicolor* with 4 µg/L of penicillin, *G. max* with 50 µg/L of tylosin, *Medicago sativa*, *Melilotus albus*, *S. bicolor* and *Trifolium repens* with 100 µg/L of enrofloxacin, *M. sativa* and *T. repens* with 100 µg/L of oxytetracycline, and *Zea mays* and *G. max* with 150 µg/L of kanamycin. The acute and chronic ecotoxicological studies carried out with six fluoroquinolones on *Daphnia magna* also indicated that concentrations between 56 µg/L (ciprofloxacin) and 141 µg/L (enrofloxacin) produced cladoceran mortality. Since whey can be used for biomass production, the effect of different families of ATBs on the growth of *Kluyveromyces marxianus* was analyzed. Cephalosporins (cefadroxil, cephalexin, cefoperazone, cefuroxime, and ceftiofur), tetracyclines (chlortetracycline, oxytetracycline, and tetracycline) and quinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, and norfloxacin) inhibited its growth at concentrations close to the MRLs. Therefore, to reduce this inhibitory activity, the effect of heat treatment time (120°C) on whey samples with antibiotic residues belonging to these three groups was evaluated. It was determined that 40 min and 83 min allowed complete degradation of cephalosporins and tetracyclines, respectively, but 91 min degraded 82% of quinolones. Finally, a sequential experimental design, in four stages, was implemented to reduce the residual concentrations of lactose and whey proteins through the production of *K. marxianus*. It was concluded that 1.63% m/V casein peptone, pH 7.5 and temperature 42°C, aeration of 1.5 VVM and 35.6 hours of fermentation allowed to obtain 4.48 g/L of biomass and decrease residual levels of lactose (0.09% m/V, 95% consumption) and protein (0.02% m/V, 93% consumption).

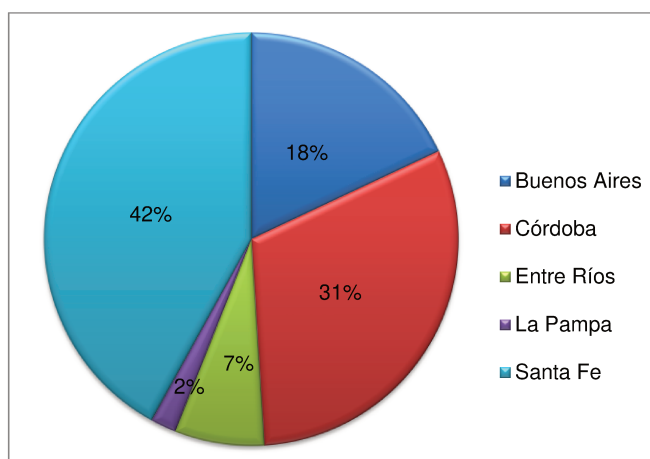


# Capítulo 1

---

## CAPÍTULO 1: Introducción

En Argentina el 84% de la producción de leche se centraliza en la región pampeana, abarcando una superficie aproximada de 5105 km<sup>2</sup>. En Fig. 1.1 se observa que la producción láctea se distribuye principalmente en Buenos Aires (18%), Santa Fe (42%), Córdoba (31%), Entre Ríos (7%) y La Pampa (2%) (Gastaldi et al., 2015). Según el Ministerio de Agroindustria de la Nación (MinAgri, 2016) y el Observatorio de la Cadena Láctea Argentina (OCLA), en 2015 la producción Nacional alcanzó los 10097 millones de litros de leche, lo que representa el 1,5% de la producción láctea mundial (OCLA, 2016).



**Fig. 1.1:** Distribución de la producción láctea en la Región Pampeana (Gastaldi et al., 2015)

En los últimos años, las inversiones tecnológicas realizadas en el sector lácteo argentino, muestran una tendencia a ocupar un lugar importante en los mercados mundiales de exportación (Cuervo González y Guerrero, 2018). Sin embargo, la misma se encuentra amenazada por la aparición de enfermedades infecciosas del ganado bovino lechero, que requieren el uso de medicamentos (antimicrobianos, antiparasitarios, etc.).

Los antibióticos (ATBs) son medicamentos que se emplean para el tratamiento de enfermedades en humanos y animales. El uso en medicina veterinaria es complejo e incluye diferentes formas de aplicación, dependiendo del contexto y del tipo de animal. Por ejemplo, para el caso de animales destinados a la producción de alimentos, la terapia de enfermedades bacterianas se puede llevar a cabo mediante tratamientos terapéuticos metafilácticos (cuando el tratamiento se realiza en animales clínicamente sanos) o profilácticos (para

prevenir infecciones en los momentos de riesgo), según indicación del médico veterinario (Schwarz et al., 2001; Garcia et al., 2020). Aunque desde 2006 la Unión Europea prohibió el empleo de ATBs veterinarios como promotores del crecimiento, en Argentina (SENASA, 2009) y en EEUU (FDA, 2019), su uso sólo se ha visto reducido.

No hay duda de que el empleo de ATBs en medicina veterinaria da como resultados animales más saludables y, en el caso de especies productoras de alimentos, animales más productivos. Sin embargo, el mal uso o el uso excesivo de antimicrobianos, puede generar la proliferación de bacterias resistentes y genes de resistencia (Munk et al., 2018). En este sentido, la resistencia microbiana se ha convertido en un problema a nivel mundial, lo que lleva a replantear el concepto de salud pública (Piddock, 2016).

### **1.1. Descripción y clasificación de antibióticos**

Los ATBs son sustancias químicas naturales (cuando son producidos por ciertos hongo y bacterias) o artificiales (cuando son sintetizados en laboratorios), capaces de inhibir o prevenir el desarrollo de microorganismos.

Las sustancias antimicrobianas, se pueden clasificar en *bacteriostáticas*, cuando inhiben el crecimiento de los microorganismos, o *bactericidas*, cuando causan lisis o muerte bacteriana. Además, existe otra clasificación de los antimicrobianos basada en su eficacia clínica, que está en relación con el espectro de los microorganismos que inhiben: *espectro reducido*, cuando actúan sobre un pequeño grupo de gérmenes, o *amplio espectro*: actúan sobre una gran variedad de microorganismos. Además de principios bactericidas y bacteriostáticos, están los bacteriolíticos. Estos últimos actúan en esencia como bactericidas, pero además de matar las bacterias, impide su proliferación y crecimiento mediante la destrucción de la pared celular, lo que lleva a una pérdida de material interno.

En el caso del ganado lechero, el empleo de ATBs, tiene tres objetivos principales: *terapéutico*, que permite el tratamiento de las enfermedades infecciosas buscando entonces destruir los patógenos tan rápidamente como sea posible con mínimos de efectos adversos para el animal; *metafiláctico*, para el tratamiento con antibiótico de un lote de animales clínicamente sanos del cual

se sospecha que podrían sufrir una infección bacteriana; o *profiláctico*, para prevenir enfermedades infecciosas en los momentos de riesgo, tales como en el secado (Schwarz et al., 2001; Garcia et al., 2020).

Un mismo antibiótico puede ser clasificado de diferentes maneras: a) según sea su estructura química, ya que confiere ciertas semejanzas en propiedades farmacológicas (Kanh y Line, 2007); b) según sea su mecanismo o sitio de acción, es decir, si por ejemplo algunos actúan sobre la pared celular (bacitracina, penicilina, cefalosporinas, etc.); c) si afectan directa o indirectamente la integridad de la membrana celular al inhibir la síntesis de sus constituyentes (polimixinas, gramicidina A, etc.); d) según sea su modo de bloqueo de la síntesis del ADN, ARN, ribosomas, ácidos nucleicos o las enzimas que participan en la síntesis de las proteínas, resultando en proteínas defectuosas (mitomicina, actinomicina, sulfamidas, quinolonas, etc.) (Harrison y Fauci, 2009). Se presenta a continuación la clasificación general de los antibióticos considerando su estructura química, y en Tabla 1.1 se incluyen, además, ejemplos de cada grupo.

- *Aminoglucósidos*: Este grupo presenta estructuras químicas similares, son azúcares aminados con un anillo llamado aminociclitol. Tienen efecto bactericida reducido o amplio deteniendo el crecimiento bacteriano. Su modo de acción es muy rápido, siendo su sitio diana los ribosomas bacterianos. Actúan en la subunidad 30S bacteriana, interfiriendo en su síntesis proteica, creando porosidades en la membrana externa de la pared celular bacteriana. Se utilizan en el tratamiento de una gran variedad de infecciones entéricas, respiratorias e infecciones en animales (Adams, 2003). Como consecuencia de la alta solubilidad y su reducido pasaje a través de la glándula mamaria, su eliminación en leche proveniente de tratamientos parenterales es muy limitada (Gilbert y Leggett, 2000). Sin embargo, se debe evitar su uso prolongado debido a que pueden producir nefrotoxicidad, elevación reversible de la creatinina y la urea, y ototoxicidad, alteración de las neuronas de manera irreversible porque producen una muerte neuronal (Katzung, 2007).

**Tabla 1.1:** Clasificación de los diferentes agentes antimicrobianos según su estructura química

Grupo	Familia	Antimicrobiano
Aminoglucósidos	Espectro reducido	Estreptomina,
	Amplio espectro	dihidroestreptomina
	Diversos	Neomicina, kanamicina, gentamicina Apramicina
<hr/>		
Betalactámicos		
Penicilinas	Naturales	Penicilina G, penicilina V
	Aminopenicilinas	Amoxicilina, ampicilina
	Resistentes a $\beta$ -lactamasas	Oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina
	Amplio espectro	Ticarcilina, carbencilina
Cefalosporinas	Primera generación	Cefalotina cefapirina, cefalexina
	Segunda generación	Cefuroxima, ceforanida, cefamandol
	Tercera generación	Ceftiofur, ceftriaxona, cefotaxima
	Cuarta generación	Cefepima, cefquinoma
<hr/>		
Macrólidos	Anillo de 12 constituyentes	Eritromicina, oleandomicina,
	Anillo de 14 constituyentes	troleandomicina
	Anillo de 16 constituyentes	Tilosina, espiramicina
<hr/>		
Quinolonas	Primera generación	Ácido nalidíxico, pipemídico,
	Segunda generación	oxocínico
	Tercera generación	Flumequina, ciprofloxacina, norfloxacina Enrofloxacina, danofloxacina
<hr/>		
Sulfonamidas	Uso habitual	Sulfatiazol, sulfametazina, sulfadiacina
	Muy solubles (urinarias)	Sulfisoxazol, sulfasomidina
	Poco solubles (entericas)	Sulfaguanidina, succinilsulfatiazol
	Potenciadas	Sulfonamidas + diaminopirimidinas
	Uso tópico	Sulfacetamida, sulfadiacina de plata
<hr/>		
Tetraciclinas	Acción corta	Tetraciclina, oxitetraciclina
	Acción intermedia	Demetilclortetraciclina, metaciclina
	Acción prolongada	Doxiciclina, minociclina

- *Betalactámicos*: sustancias relacionadas estructural (poseen en su fórmula un anillo betalactámico) y funcionalmente. Actúan impidiendo la formación de la pared de la célula bacteriana e inhibiendo la actividad de las transpeptidasas. Estas enzimas catalizan la formación de los enlaces peptídicos cruzados en la fase de unión de los polímeros a glucopéptido de la pared celular. Se diferencian en cuanto a su espectro antibacteriano y su farmacocinética (Marín y Gudiol, 2003; Suárez y Gudiol, 2009). Entre los betalactámicos podemos encontrar dos grupos de ATBs con diferente actividad: las penicilinas y las cefalosporinas.

Las penicilinas, en su mayoría, derivan del ácido 6-aminopenicilánico, difiriendo entre sí según la sustitución en la cadena lateral de su grupo amino. Tiene efecto bactericida. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana activando enzimas que la destruyen. Debido a la acción de penicilinasas y amidasas, se genera la ruptura del anillo betalactámico que lleva a la escisión de la cadena lateral provocando una pérdida la actividad antibacteriana. Las penicilinas pueden producir efectos adversos o colaterales importantes, tales como reacciones alérgicas o hipersensibilidad (Stone et al., 2020).

Las cefalosporinas, derivados semisintéticos de la cefalosporina C, son similares a las penicilinas pero con ácido-7-cefalosporánico en lugar de ácido 6-aminopenicilánico. Se clasifican en generaciones (primera, segunda, tercera y cuarta). Son más estables ante muchas betalactamasas bacterianas, por lo cual, tienen un espectro de actividad más amplio. Tiene efecto bacteriolítico. Su mecanismo de acción consiste en interferir la síntesis de peptidoglucano de la pared celular bacteriana, inhibiendo de esta manera la transpeptidación final, necesaria para la reticulación. Las cefalosporinas pueden producir efectos tales como diarreas o reacciones hematológicas (Capurso y Koch, 2021).

- *Macrólidos*: Compuestos estructuralmente emparentados que poseen un anillo lactónico al que se unen diversos desoxiazúcares. Se clasifican de acuerdo al número de anillos constituyentes (12, 14 o 16 anillos por molécula). Se obtienen a partir de productos metabólicos de cultivos de cepas de *Streptomyces* (Sádaba y Azanza, 2005). Tienen efecto bacteriostático o bactericida, según la especie bacteriana atacada, la concentración alcanzada en el sitio de infección

o la fase de crecimiento de las bacterias durante el ataque con el macrólido. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad ribosomal 50S, inhibiendo la translocación del aminoacil ARNt (Katzung, 2007). Se emplean preferentemente para combatir infecciones de las vías respiratorias superiores, enteritis bacteriana, metritis, pododermatitis, infecciones urinarias y artritis, entre otras. En forma específica, eritromicina se utiliza para el tratamiento de la mastitis clínica y subclínica en vacas en lactancia. Su uso incorrecto, por ejemplo no respetando el tiempo o período de retiro, aumenta la probabilidad de encontrar sus residuos en productos de origen animal, tales como leche y carne.

- *Quinolonas*: Son un grupo de agentes quimioterapéuticos (agentes con actividad antimicrobiana con toxicidad selectiva) sintéticos, derivados del ácido carboxílico. Se clasifican en generaciones (primera, segunda y tercera). La mayor parte de las quinolonas usadas en la clínica son del grupo de las fluoroquinolonas, caracterizadas por tener un grupo fluoruro en el anillo central, normalmente en posición 6 (Drlica et al., 2019). Actúan en dos etapas, en la primera inhibe la ADN-girasa bacteriana, responsable del enrollamiento del ADN con la consiguiente alteración de su conformación espacial, y en la segunda etapa inhibe la enzima topoisomerasa, que participa en la relajación de la doble hélice del ADN (Martinez et al., 2006). Las quinolonas se absorben rápidamente al ser ingeridas y se distribuyen fácilmente en los diversos tejidos corporales. La dosis depende de la quinolona administrada. Su uso está indicado para tratamiento de infecciones locales y sistémicas causadas por microorganismos sensibles, especialmente por patógenos intracelulares. Se prescriben para el tratamiento de infecciones pulmonares, urinarias y digestivas (Lara et al., 2006).
- *Sulfamidas*: Son sustancias químicas sintéticas con un núcleo básico, el p-amino-benceno-sulfonamida. Se clasifican en varios grupos, con base en sus indicaciones de empleo y en la duración de su acción en el organismo. Tienen efecto bacteriostático y de amplio espectro. Se emplean como antibióticos y antiparasitarios en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Pese a su antigüedad, se siguen utilizando en medicina veterinaria como terapia y/o profilaxis (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001). La mayoría de las sulfonamidas se excretan principalmente a través de la orina (Kanh y Line, 2007).

- *Tetraciclinas*: Son un grupo de ATBs naturales u obtenidos por semisíntesis, derivados de la naftaceno-carboxamida policíclica, con un núcleo tetracíclico de donde deriva el nombre del grupo. Abarcan un amplio espectro en su actividad antimicrobiana. Se las clasifica en compuestos de acción corta, acción intermedia y acción prolongada (Litterio, 2009). Tienen efecto fundamentalmente bacteriostático, aunque resultan bactericidas a altas dosis. Actúan por varios mecanismos: desacoplan la fosforilación oxidativa de las bacterias; provocan una inhibición de la síntesis proteica en el ribosoma de la bacteria al unirse a la subunidad 30S del ribosoma (Kanh y Line, 2007). Se utiliza mundialmente en producción animal, por ejemplo, para el tratamiento de mastitis en ganado vacuno lechero (Siljanoski et al., 2018).

## **1.2. Uso de ATBs en medicina veterinaria**

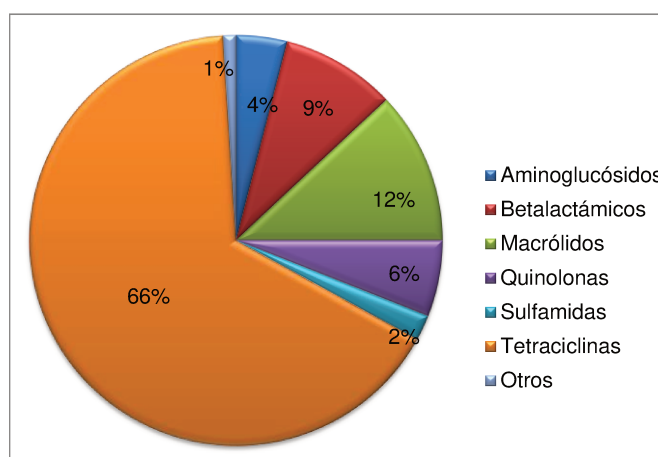
Los ATBs se emplean frecuentemente para el tratamiento de enfermedades en animales (Zwald et al., 2004; Sawant et al., 2005; Mathew et al., 2007), de las cuales la mastitis es la enfermedad que genera mayores pérdidas económicas para ganado vacuno lechero (Gruet et al., 2001; Sawant et al., 2005). De acuerdo con Diserens et al. (2005) el 75% de las vacas lecheras sufre mastitis, mientras que 10% padecen de infecciones posparto, otro 10% problemas del tracto digestivo, seguidas en menor medida por tratamientos para enfermedades pulmonares. Con la intención de evitarlas, los ganaderos emplean ATBs como medida profiláctica, pero residuos de los mismos se excretan a través de la leche después del parto (Erskine et al., 2003; Calderón et al., 2007).

En caso de no respetarse los protocolos correspondientes, esta leche llega a la industria pudiendo inhibir algunos procesos fermentativos microbianos necesarios para la elaboración de queso, yogurt, etc. (Máttar et al., 2009; Berruga et al., 2011). Además, si la leche conteniendo residuos de ATBs alcanza al consumidor, puede ocasionar problemas tales como alergias, alteración de la microbiota intestinal y reducción de la síntesis de vitaminas, entre otros (Khachatryan et al., 2006).



### 1.2.1. Frecuencia de uso de ATBs en ganado vacuno lechero

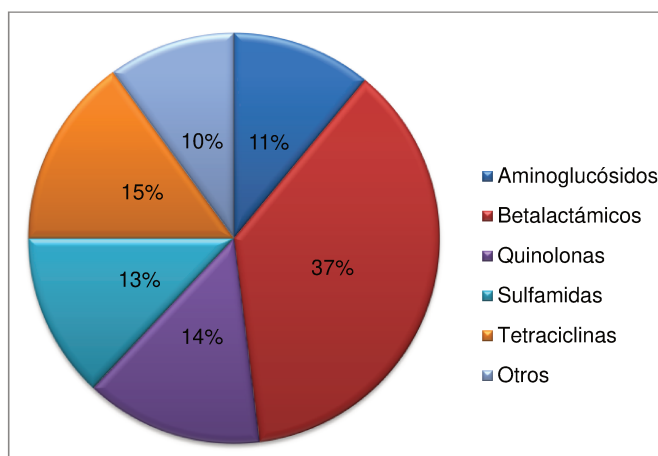
La Federación Internacional de Sanidad Animal (International Federation for Animal Health - IFAH, 2006) presentó un estudio en el cual se destaca el empleo a nivel mundial (Fig. 1.2) de la tetraciclina (66%), macrólidos (12%) y betalactámicos (9%), seguidos por quinolonas (6%), aminoglucósidos (4%), sulfamidas (2%) y otros tipos en menor cantidad (1%). Para el tratamiento de mastitis, resalta el uso de cloxacilina (33%), penicilina (23%), ampicilina (16%) y neomicina (15%), seguidas en menor medida por estreptomicina (10%) y cefalexina (5%) (Diserens et al., 2005). Para otras enfermedades de ganado vacuno se plantea el uso de penicilina (23% en metritis), oxitetraciclina (37% en la metritis y 28% en neumonías), ceftiofur (27% en metritis y 22% en infecciones podales), cefalexina y tilosina (29% y 27%, respectivamente, en infecciones podales) y enrofloxacina (23% para otras infecciones menos frecuentes) (Zorraquino, 2008).



**Fig. 1.2:** Empleo de ATBs en medicina veterinaria a nivel Mundial (IFAH, 2006).

La Fig. 1.2 muestra la distribución porcentual de ATBs empleados en medicina veterinaria a nivel mundial, mientras que la Fig. 1.3 expone su frecuencia de hallazgo en leche. En la primera puede observarse la prevalencia en el empleo de betalactámicos, tetraciclinas y aminoglucósidos, seguidos por quinolonas y sulfamidas, mientras que la segunda, expone la prevalencia de aminoglucósidos y porcentajes similares del resto de los antibióticos. En efecto, en la Fig. 1.3 se observan los resultados relevados por Sachi et al. (2019) destacándose la presencia de residuos de betalactámicos (37%), tetraciclinas 15%, quinolonas (14%), sulfamidas (13%) y aminoglucósidos (11%), en las

muestras de leche. No obstante, residuos de aminoglucósidos, betalactámicos y tetraciclinas, no se considera un problema ya que pueden ser inactivadas en procesos de esterilización (120°C durante 20 min). Este tratamiento, no es efectivo para residuos de quinolonas y sulfamidas debido a su elevada termoestabilidad (Zorraquino et al., 2008a, Roca, 2008; Roca et al., 2010), convirtiéndose en un riesgo potencial para el consumidor y el medio ambiente.



**Fig. 1.3:** Frecuencia de residuos de ATBs en muestras de leche (Sachi et al., 2019).

### 1.3. Problemas que producen los residuos de ATBs

La explotación ganadera está evolucionando hacia sistemas más industrializados, generando así el hacinamiento de animales en espacios más reducidos. Esto trae como consecuencia sistemas intensivos de producción láctea los cuales, para prevenir y combatir el contagio de enfermedades del ganado, trae aparejado un incrementado en el uso de ATBs (Bencini, 2001).

En efecto, los ATBs suelen emplearse para el tratamiento de la mastitis, lo que genera la aparición de sus residuos en la leche incluso varios días después de terminar el tratamiento (Zorraquino, 1996). Por ejemplo, estudios realizados por Turquía exponen que el 44% de las muestras de leche cruda testeadas contenían diferentes concentraciones de betalactámicos dentro del Límites Máximos de Residuos (LMRs), pero otro 9% contenían residuos en un rango 10 veces superior al admisible (Aycan e Ince, 2018).

El consumo de alimentos con residuos de ATBs puede causar inconvenientes en la industria láctea y problemas de salud en humanos. En este sentido, cuando los mismos están presentes en concentraciones superiores a los LMRs

establecidos por la Regulación EU N°37/2010 (EU, 2010), el Codex Alimentarius (2011), el Código Alimentario Argentino (2011) y la Food and Drug Administration (2015), se suponen un riesgo desde el punto de vista de la seguridad alimentaria.

### **1.3.1. Problemas para el consumidor debido a residuos de ATBs**

Algunos ATBs son termorresistentes, por lo que no se inactivan completamente durante el proceso de pasteurización de la leche (Zorraquino et al., 2008a, 2009; Roca, 2008), pudiendo al consumidor.

Residuos de ATBs en leche podrían generar en humanos reacciones alérgicas, que en casos extremos llevan a anafilaxia (Demoly y Romano, 2005; Wang y Leung, 2007; Khaskheli et al., 2008; Graham et al., 2014). En EEUU, entre 1997 y 2011, las alergias alimentarias debidas al consumo de lácteos con residuos de ATBs aumentó un 50% (Hirsch et al., 2017).

La presencia de residuos de ATBs en la leche también tiene implicancias negativas para la salud del consumidor debido a perturbaciones en la microbiota intestinal normal. En el intestino coexisten diferentes tipos de microorganismos que lo colonizan, para evitar que los microbios patógenos lo ocupen produciendo enfermedades. Algunos residuos de ATBs en el alimento afectan la microbiota normal del intestino, facilitando la aparición de enfermedades microbianas (Graham et al., 2014; Beyene, 2016).

Además, ciertos gérmenes pueden generar resistencia a los ATBs, provocando infecciones difíciles de tratar por ser resistentes a los medicamentos (Gupta et al., 2004; Iovine et al., 2004). Estas complicaciones son más graves en los sectores vulnerables, niños y ancianos, los cuales tradicionalmente son los mayores consumidores de productos lácteos (Tollefson y Karp, 2004; Marjan et al., 2014).

### **1.3.2. Problemas para la industria láctea debido a residuos de ATBs**

Los residuos de ATBs también constituyen un problema en los procesos tecnológicos de las industrias lácteas. Así, por ejemplo en la elaboración de queso, pueden ralentizar la acidificación dificultando el cuajado y la maduración, lo que lleva a productos de menor calidad (Packham et al., 2001). Concentraciones residuales de eritromicina en la leche cercanas a 0,3 mg/L

impiden la acidificación necesaria para que el proceso alcance su pH final (Quintanilla et al., 2018). Concentraciones de oxitetraciclina de 0,1 mg/L causa ralentización en el proceso de acidificación de quesos duros (Cabizza et al., 2017), lo cual a su vez resulta ser un riesgo porque aumenta la posibilidad del crecimiento de microorganismos patógenos (Fox y McSweeney, 2017).

En la elaboración de yogur la presencia de residuos de ATBs también tiene efecto negativo. En efecto, aún en bajas concentraciones, los antimicrobianos pueden provocar cambios en las propiedades físico-químicas del producto (Berruga et al., 2007, 2008, 2011). Más aún cuando la concentración de residuos de ATBs es elevada, la fermentación del yogur se ve directamente interrumpida (Cabizza et al., 2017).

### **1.3.3. Problemas para el productor lácteo debido a residuos de ATBs**

En los últimos años el concepto de calidad evolucionó, adquiriendo gran protagonismo. En este contexto social y económico, la calidad pasó a ser un elemento básico dentro del sector empresarial dedicado a las actividades agroalimentarias, tomando cada vez mayor interés los conceptos de “seguridad alimentaria”, “inocuidad”, “trazabilidad” y “confiabilidad” (MinAgri, 2018).

En este marco la Organización Internacional de Normalización (del inglés International Organization for Standardization - ISO), define calidad para productos alimenticios, y en particular los lácteos, en función de tres atributos: a) “inocuidad”, es decir, que el producto no cause daño a la salud de las personas que lo consumen; b) “aspecto nutricional”, el cual refiere a la aptitud del alimento para satisfacer las necesidades del organismo en términos de energía y nutrientes; y c) “atributos de valor”, los cuales diferencian los productos de acuerdo con sus características organolépticas, de composición, etc. (MinAgri, 2018).

Mediante la Resolución Conjunta N° 739 y N° 495 (MinAgri y MAGyP, 2013) Argentina creó un sistema de pago para la leche cruda, otorgando una distribución en la bonificación del 80% para los atributos de calidad e inocuidad. Entre los atributos de inocuidad evaluados se encuentran los residuos de ATBs que son regulados mediante la Regulación EU N°37/2010 (EU, 2010) y el

Código Alimentario Argentino (2011) que establecen los LMRs permitidos para leche (Tabla 1.2). Por lo tanto, cuando un productor lácteo comercializa leche conteniendo residuos de ATBs puede recibir penalizaciones. Existen diferentes clasificaciones en función de la cantidad de residuos encontrados en la leche. Por ejemplo, esta puede ser considerada “no apta para consumo humano por contener residuos de medicamentos contemplados en la ley N° 18,284”. O peor aún, si se confirma la presencia de residuos de ATBs en concentraciones muy superiores a los permitidos por la legislación, puede ser considerada “no apta para su comercialización” y por ende debe ser decomisada.

**Tabla 1.2:** Límites máximos de residuos de antibióticos (mg/L) permitidos en leche.

Grupo	Antibiótico	EU	Codex	CAA	FDA
Aminoglúcidos	Gentamicina	0,100			0,030
	Neomicina	1,500	0,500		0,150
	Espectinomicina	0,200			
	Kanamicina	0,150	0,150		
	Neomicina	1,500	1,500		
Betalactámicos	Penicilina G	0,004	0,004		0,005
	Amoxicilina	0,004			0,010
	Ampicilina	0,004			0,010
	Cloxacilina	0,030			0,010
	Oxacilina	0,030			
	Cafadroxilo	0,100	0,100		
	Cefalexina				
	Ceftiofur®	0,100	0,100		0,050
Macrólidos	Cefquinoma	0,020			
	Eritromicina	0,040			0,050
	Tilmicosina	0,050	0,050		
Quinolonas	Tilosina	0,050	0,050		0,050
	Ciprofloxacina	0,100	0,100		0,100
	Enrofloxacina	0,100	0,100		0,100
	Marbofloxacina	0,075			
Sulfamidas	Norfloxacina	0,100			
	Sulfonamidas	0,100			
	Sulfadimetoxina	0,100		0,100	0,010
Tetraciclinas	Sulfatiazol	0,100		0,100	0,010
	Clortetraciclina	0,100		0,100	0,300
	Oxitetraciclina	0,100	0,100	0,100	0,300
	Tetraciclina	0,100		0,100	0,300

EU: European Union (2010), Codex: Codex Alimentarius (2011), CAA: Código Alimentario Argentino (2011), FDA: Food and Drug Administration (2015).

En este sentido, la presencia de residuos de ATBs en leche afecta de manera directa al propio tambero o productor, quién debe afrontar una penalización en el precio por parte de la industria láctea. Un tambero que entrega leche y contamina un camión cisterna, es penalizado por la totalidad del contenido del camión, llegando inclusive a afrontar los costos económicos de la producción de leche entregada por los otros tambos que completan el volumen de la cisterna contaminada.

#### **1.4. Impacto de los residuos de ATBs sobre el ambiente**

ATBs no metabolizados durante el tratamiento o para la prevención de enfermedades en animales se eliminan por la orina, heces y leche (Finley et al., 2013; Topp et al., 2013, Zhang et al., 2019). Por ello, pueden encontrarse el estiércol animal empleado como compost y fijarse a partículas del suelo (Halling-Sørensen et al., 2000; Hamscher et al., 2002; Kemper, 2008), afectando el crecimiento y desarrollo de cultivos (Jjemba 2002a; Liu et al., 2009). Efectivamente, para degradar el 65% de los ATBs en estiércol son necesarios alrededor de 171 días, durante la denominada fase termofílica del tratamiento (en la segunda semana). El 35% restante se realiza en la siguiente etapa, que es aún más larga. La tasa de eliminación de algunos ATBs (por ejemplo, lincomicina, trimetoprima y macrólidos) durante el compostaje es mayor al 89%, mientras que para otros (como sulfonamidas, tetraciclinas y fluoroquinolonas) es inferior al 63% (Zhang et al., 2019). Esto se debe principalmente a la capacidad disipativa de estos ATBs en el suelo como consecuencia de sus propiedades fisicoquímicas, especialmente la humedad y la relación carbono/nitrógeno. Esto demuestra que residuos de ATBs en el estiércol pueden conducir a la contaminación del suelo, representando un riesgo de selección y resistencia para el ecosistema natural del mismo.

Por otro lado, la producción de leche es una de las actividades ganaderas que mayor cantidad de agua demanda. La fuente de provisión de agua suele ser subterránea, debido a deficiencias en la construcción y manejo de las perforaciones, la presencia de corrales cerca de los pozos y lagunas, o el desconocimiento de los productores sobre el manejo del agua y los efluentes, las mismas pueden estar contaminadas con ATBs (Herrero et al., 2000). También, el agua proveniente de las lagunas de almacenamiento de efluentes

de establecimientos ganaderos, pueden contener moléculas de ATBs o sus residuos, arrastrándolos a aguas superficiales como ríos (Azanu et al., 2018; Guruge et al., 2019; Hanna et al., 2018; Huang et al., 2019; Huang et al., 2020; Lyu et al., 2020; Mirzaei et al., 2018; Pan et al., 2020; Teglia et al., 2019), lagos (Sodré et al., 2010; Duong et al., 2021; Fick et al., 2009; Rao et al., 2008; Sturini et al., 2009; Tong et al. (2011), y áreas costeras (Qiao et al., 2018) o subterráneas (Campagnolo et al., 2002; Batt et al., 2006; Zhang y Li, 2011). Así los residuos de ATBs pueden afectar el crecimiento de diferentes especies tales como microalgas (Robinson et al., 2005; Dang et al., 2007; Nie et al., 2008; Shakil et al., 2008; Ebert et al., 2011; Martins et al., 2012; González-Pleiter et al., 2013; Fu et al., 2017; Cartagena 2011; Deng et al., 2016), microcrustáceos (Rand et al., 1995; McLoughlin et al., 2000; Guilhermino et al., 2000; Jones et al., 2004; Lampi et al., 2006; Kemper, 2008; Navarro et al., 2008; Lattuada et al., 2009; Regaldo et al., 2009, 2014; Reno et al., 2014, 2018; Eluk et al., 2021), plantas acuáticas (Brain et al., 2004; Ebert et al., 2011; Singh et al., 2018, 2019), peces e invertebrados (Liu et al., 2014; Rico et al., 2014; Zhou et al., 2020).

En Argentina, Nosetti et al. (2002) señalan que alrededor del 58% de los tambos eliminan los residuos acuosos (aguas de limpieza y leche contaminada) a lagunas artificiales que, por lo general, no fueron diseñadas a tal fin y que suelen desembocar en algún curso de agua. También mencionan que aproximadamente el 20% de los productores derraman sus efluentes sin previo tratamiento a las aguas de arroyos o lagunas naturales cercanas, mientras que un 17% los vuelcan directamente en campos cercanos.

Las concentraciones de antibióticos halladas en matrices ambientales son variables y causan deterioro de los distintos compartimentos ambientales, tales como el agua, el suelo y los sedimentos, como así también en la biota asociada y por ende en el ecosistema. Para evaluar los riesgos que presentan diferentes ATBs se emplea el Cociente de Riesgo (del inglés *Risk Quotient* - RQ) utilizando la Concentración Prevista Sin Efecto (del inglés *Predicted No Effect Concentration* - PNEC) y las Concentraciones Ambientales Medidas (del inglés *Measured Environmental Concentrations* - MEC). Estos efectos dependen de la concentración en la que se encuentren estas sustancias, de su persistencia y de su biodisponibilidad, pudiendo ocasionar desde efectos no letales, como el

desplazamiento temporal de algunas especies, hasta la muerte de poblaciones enteras.

Muchos países de la Unión Europea y EEUU iniciaron programas para la caracterización de la distribución e impacto de los ATBs en el ambiente (Sarmah et al., 2006). Alrededor del mundo se han desarrollado ejercicios buscando estandarizar pruebas de toxicidad (ASTM, 2009; OECD, 2004), así como seleccionar grupos con distintas especies para integrar lo que se conoce como “baterías de pruebas”, con la intención de identificar los efectos de los contaminantes y de nuevas sustancias sobre un grupo de organismos que representen distintos grupos taxonómicos de importancia ecológica y cuyas sensibilidades sean complementarias.

La principal herramienta de estandarización consiste en el establecimiento de condiciones de crecimiento controladas tanto en lo que refiere a nutrientes (empleo de medios de crecimiento sintéticos) como de climatización (ensayos *in vitro* en el laboratorio). Esto permite diferenciar los efectos directos de los xenobióticos sobre los organismos de prueba de los que podrían generar por ejemplo debido a la microbiota del agua, suelo, etc.

Por otra parte, se debe destacar la propagación de genes de resistencia a los ATBs a través de la microbiota ambiental (Bhutani et al., 2014; Forsberg et al., 2012), por lo tanto identificar la microbiota afectada por la presencia de ATBs requeriría comprender la distribución y diseminación de los genes de resistencia a los antibióticos entre varios entornos (Zhou et al., 2018).

Harnisz (2013) analizó los perfiles de resistencia total (intrínseca y adquirida) de bacterias autóctonas en un río receptor de residuales tratadas (Polonia). Sus resultados muestran que la distribución media de grupos bacterianos es similar entre grupos de bacterias resistentes a diferentes ATBs. En este sentido, destacan primero el conteo de patógenos resistentes a macrólidos (eritromicina y roxitromicina), seguidos de betalactámicos (amoxicilina, cefuroxime y oxitetraciclina) y en menor para bacterias resistentes a quinolonas (norfloxacina y enrofloxacina) y tetraciclinas (doxicilina). Además, observaron que el contenido de bacterias resistentes a los macrólidos fue mayor antes de la descarga del efluente tratado, lo que indica que su presencia en aguas superficiales no está correlacionada con la descarga de aguas residuales



tratadas. En lo que respecta a amoxicilina (penicilina) fueron muy similares en las muestras de agua de río pre y post descarga, mientras que el cefuroxima (cefalosporina) presentó decrecimiento en su concentración corriente abajo, lo que sugiere que las bacterias resistentes a betalactámicos están presentes en los cuerpos de agua superficiales. El porcentaje de bacterias resistentes a los betalactámicos en aguas tratadas varía de 40% a 60%, las resistentes a tetraciclina entre el 2-9% (Huang et al., 2012; Harnisz, 2013), mientras que las resistentes a tetraciclina dependen estrechamente de factores de estrés antropogénicos (Harnisz, 2013). En efecto, el contenido de organismos resistentes a ATBs depende de su concentración y el tiempo durante el cual los mismos han estado en el ambiente.

#### **1.4.1. Efectos de los residuos de ATBs sobre microorganismos**

Cuando los ATBs y/o sus productos de biotransformación llegan al suelo son arrastrados por episodios de lluvia a las aguas superficiales provocando alteraciones ambientales o bioacumulación en algunos de los niveles de la cadena trófica (Kümmerer, 2010; Bártíková et al., 2016). Al mismo tiempo, estos compuestos se unen a lodos y sedimentos formando coloides, o interactuando con los minerales, favoreciendo su persistencia en el ambiente. Se cree que la sorción de ATBs para formar coloides o componentes polares dependería principalmente de la cantidad de materia orgánica, del pH, de la concentración de minerales, como así también de la composición y temperatura del suelo (Batchelder, 1982; Thiele, 2000).

Numerosos estudios señalan la presencia de ATBs en suelo, sedimentos y aguas superficiales, y cómo logran inhibir comunidades bacterianas que tienen funciones prioritarias en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Roberts et al., 1999; Dang et al., 2007; Shakil et al., 2008; Deng et al., 2016). También mencionan que los procesos de degradación de la materia orgánica, de nitrificación y desnitrificación del suelo se ven afectados (Jechalke et al., 2014; Duchene et al., 2017), constituyendo esto un riesgo para organismos *no target* presentes en diferentes compartimientos ambientales (Kümmerer, 2003, 2009a).

##### **1.4.1.1 Uso de microorganismos como bioindicadores**

Los bioensayos con bacterias brindan un enfoque directo, rápido y sensible del estrés bioquímico. Las bacterias empleadas en los bioensayos se clasifican

según el parámetro medido. Existen así pruebas basadas en la inhibición del crecimiento, con bacterias tales como *Geobacillus stearothermophilus* (Nagel et al., 2009), *Bacillus cereus* (Nagel et al., 2011), *Bacillus subtilis* (Nagel et al., 2013), *Bacillus pumilus* (Tumini et al., 2015), *Bacillus megaterium* (Tumini et al., 2016), *Bacillus licheniformis* (Tumini et al., 2017), *Microcystis aeruginosa* (Robinson et al., 2005; Ebert et al., 2011; González-Pleiter et al. 2013) o la inhibición de la bioluminiscencia con *Vibrio fischeri* (Backhaus y Grimme, 1999) o *Photobacterium phosphoreum* (Zou et al., 2012), entre otros. Por ejemplo Nagel et al. (2013), utilizando un bioensayo de *B. subtilis*, investigaron la acción inhibitoria de 25 ATBs indicando la detección de enrofloxacin (0,151 mg/L), ciprofloxacina (0,160 mg/L) y marbofloxacina (0,160 mg/L) en leche. En forma similar, en un bioensayo con *B. licheniformis* para la detección de quinolonas, Tumini et al. (2015) informan el hallazgo de danofloxacina (0,063 mg/L), enrofloxacina (0,109 mg/L), ciprofloxacina (0,092 mg/L), marbofloxacina (0,101 mg/L) y sarafloxacina (0,095 mg/L).

#### **1.4.2. Efecto de los residuos de ATBs sobre microalgas**

Análisis de muestras de aguas revelaron la presencia de residuos de aminoglucósidos en Italia (Shakil et al., 2008), macrólidos en EEUU (Roberts et al., 1999), quinolonas (Tabla 1.3) y tetraciclinas (Dang et al., 2007) en China.

Como es de esperar, la forma de actuar de cada ATB tiene un rol clave en su mecanismo de acción sobre diferentes tipos de organismos. Por ejemplo, empleando *Pseudokirchneriella subcapitata* (algas verdes), Fu et al. (2017) notaron efectos significativamente tóxicos con azitromicina, doxiciclina y oxitetraciclina (inhibidores de la síntesis proteica en bacterias), pero sólo observaron efectos tóxicos relativamente bajos con amoxicilina y cefotaxima (inhibidoras de la síntesis de la pared celular).

González-Pleiter et al. (2013) también estudiaron *P. subcapitata* señalando que concentraciones elevadas de enrofloxacina (80 mg/L) y norfloxacina (120 mg/L) afectan su normal desarrollo, de manera similar a Martins et al. (2012) indican que una elevada concentración de ciprofloxacina afecta el crecimiento de esta alga. También, Robinson et al. (2005) evaluaron los efectos tóxicos agudos (3 días) con elevadas concentraciones de quinolonas (entre 11-23 mg/L) destacando problemas de crecimiento y reproducción. Para otras microalgas

también se reportaron efectos negativos de ATBs, por ejemplo, Nie et al. (2008) estudiando *Chlorella vulgaris* observan que concentraciones superiores a 12 mg/L de ciprofloxacina causan disminución en el crecimiento y que 21 mg/L afectan la producción de clorofila. Por su parte Ebert et al. (2011) estudiaron *Desmodesmus subspicatus* subrayando alteraciones en el desarrollo con elevadas concentraciones de enrofloxacin y ciprofloxacina (44 mg/L).

**Tabla 1.3:** Concentraciones ambientales medidas (MEC) de quinolonas reportadas en en la literatura para agua de río

Países	CPX	EFX	LFX	MFX	NFX	OFX	Autores
Argentina	0,003 0,020	0,003				0,001	Teglia et al. (2019) Valdés et al. (2014)
Australia	0,023 1,300	0,476			0,032 1,150		Costanzo et al. (2005) Watkinson et al. (2009), Hanna et al. (2018) Yao et al. (2017)
		0,136 0,003				0,308	Huang et al (2019)
	0,005 0,009 0,050 0,043 0,003	0,008 0,002			0,004 0,029	0,355 0,009	Huang et al. (2020) Li et al. (2012)
China	0,012 0,024	0,098 0,004			0,056	0,079	Luo et al. (2011) Lyu et al. (2020) Wei et al. (2012)
			0,010	0,008	0,036 0,026 0,132 0,327 0,174	0,320 0,011 0,062 0,129 0,081	Xiao et al. (2008) Xu et al. (2020) Xu et al. (2007) Yan et al. (2013) Yang et al. (2011)
	0,346 0,005 0,110 0,010	0,039 0,004		0,002	0,572 0,021 0,460 0,010	0,045 0,034 0,390 0,049	Zang et al. (2012) Zheng et al. (2021) Zou et al. (2011) Tong et al. (2011)
Finlandia	0,024				0,024 0,017	0,003	Vieno et al. (2006) Coetsier et al. (2009) Feitosa-Felizzola y Chiron (2009)
Francia	9,660	0,016			0,060	0,055 0,003	Tamam et al. (2008) Vulliet y Cren-Olivé (2011)
	0,017				0,037	0,023	Dinh et al. (2011)
Alemania	0,009					0,020	Christian et al. (2003)
Ghana	1,1680						Azanu et al. (2018)
Hong Kong	0,182				0,014 0,008	0,096	Minh et al. (2009) Gulkowska et al. (2007)
India					0,048		Rao et al. (2008)
Irán	0,657						Mirzaei et al. (2018)

CPX: ciprofloxacina, EFX: enrofloxacin, LFX: levofloxacin, MFX: marbofloxacina, NFX: norfloxacina, OFX: ofloxacina

**Tabla 1.3** (continuación): Concentraciones ambientales medidas (MEC) de quinolonas reportadas en la literatura para agua de río

Países	CPX	EFX	LFX	MFX	NFX	OFX	Autores
Italia		0,059					Sturini et al. (2009)
	0,014					0,306	Zuccato et al. (2005)
Kenia			0,040				Madikizela et al. (2017)
Nigeria	0,9000						Olaitan et al. (2014)
Portugal	0,099	0,134					Pena et al. (2007)
Rumania	0,006						Chitescu et al. (2015)
Sudáfrica	14,300						Agunbiade y Moodley (2016)
España							García-Galán et al. (2011)
						8,770	Ginebreda et al. (2010)
						0,040	Gros et al. (2010)
						1,904	López-Roldán et al (2010)
	0,115	0,283			0,085	0,105	López-Serna et al. (2011)
	0,224					0,198	Valcárcel et al. (2011)
Sri Lanka	0,036						Guruge et al. (2019)
	0,036						
Suiza					0,029		Golet et al. (2009)
EE.UU.	0,029		0,033				Conley et al. (2008)
	0,054		0,059				Wolfe et al. (2015)

CPX: ciprofloxacina, EFX: enrofloxacina, LFX: levofloxacina, MFX: marbofloxacina, NFX: norfloxacina, OFX: ofloxacina

### 1.4.3. Efecto de los residuos de ATBs sobre microcrustáceos

Para evaluar el impacto de residuos de ATBs en el ambiente se pueden emplear bioindicadores de la comunidad zooplanctónica (Jones et al., 2004; Kemper, 2008), los cuales son sensibles al estrés ambiental, son abundantes en la naturaleza y poseen ciclos biológicos conocidos.

Entre estos, los cladóceros representan un grupo ideal para la evaluación de toxicidad a nivel global, debido a su amplia distribución geográfica, facilidad de cultivo, elevada sensibilidad ante diferentes xenobióticos, reproducción partenogenética y corto ciclo de vida. Por ejemplo, *Daphnia magna*, se utiliza frecuentemente en los ensayos ecotoxicológicos para estudios de sustancias químicas (Guilhermino et al., 2000; Lampi et al., 2006; Lattuada et al., 2009; Regalado et al., 2009, 2014; Reno et al., 2014, 2018). Los mismos se realizan tesis siguiendo los lineamientos del protocolo propuesto por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (del inglés *Organization for Economic Cooperation and Development* - OECD, 2004), que incluye el empleo de un medio de cultivo sintético compuesto, con ajuste de pH y concentración

de oxígeno disuelto, condiciones constantes a temperatura y fotoperiodo estandarizado.

Los estudios de letalidad suministran información valiosa para determinar la toxicidad de los compuestos de interés. No obstante, los estudios subletales mediante ensayos crónicos permiten obtener información de mayor relevancia ecológica. Estos estudios son útiles para predecir desbalances en las poblaciones naturales y efectos a largo plazo, ya que suministran información acerca de la estabilidad de una población y de su capacidad potencial para mantenerse en el tiempo en los ecosistemas (McLoughlin et al., 2000). Los ensayos crónicos, incluyen el análisis de los parámetros de mortalidad (sobrevivencia), crecimiento y fecundidad de los organismos bioindicadores. A tal efecto, considerando que los mecanismos de toxicidad de los ATBs pueden ser diferentes en las pruebas agudas y crónicas, la complementación de estudios de letalidad y subletalidad, a corto y largo plazo, es una herramienta sumamente valiosa (Navarro et al., 2008).

#### **1.4.4. Efecto de los residuos de ATBs sobre plantas acuáticas**

Otros bioindicadores del efecto de ATBs en el ambiente son las plantas acuáticas. Al respecto, Singh et al. (2018) evaluaron la toxicidad potencial de amoxicilina (0,0001–1 mg/L) sobre *Spirodela polyrhiza* (perteneciente al grupo de las lentejas de agua) durante 7 días de exposición y observaron disminución tanto en el crecimiento de la fronda como en la tasa de crecimiento. Posteriormente notaron fitodegradación pero con ofloxacina (Singh et al., 2019).

Por su parte, Brain et al. (2004) analizaron sulfametoxazol (0,038 mg/L) y clortetraciclina (0,114 mg/L) sobre *Lemna gibba* indicando que afectan su desarrollo. Mientras que Gomes et al. (2017) con *Lemna minor* y ciprofloxacina observaron efectos tóxicos (1,0 mg/L) y hórmesis (0,75 mg/L). Asimismo, Ebert et al. (2011) destacan que ciprofloxacina (0,008 mg/L) y enrofloxacina (0,107 mg/L) generan toxicidad aguda.

#### **1.4.5. Efecto de los residuos de ATBs sobre semillas y plantas terrestres**

Para evaluar el impacto ambiental de los ATBs se puede analizar su acción fitotóxica sobre la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas. En

general, los ensayos de fitotoxicidad refieren a ensayos *in vitro*, en los cuales los efectos fitotóxicos de los ATBs se evalúan de manera directa (sin tierra) sobre las semillas sin intervención de la comunidad microbiana de la rizósfera. Así dependiendo de si se estudian semillas o plantas terrestres es posible evaluar diferentes parámetros tales como la tasa de germinación, elongación de las raíces, foliación, peso de la biomasa, etc. (Farré y Barceló, 2003; Liu et al., 2009).

Precisamente, Motwani y Mehta (2018) estudiaron el efecto de tres antibióticos (tetraciclina, amoxicilina y trimetoprima) sobre arroz (*Oryza sativa*) y empleando 100 mg/L de dichos ATBs observaron un impacto significativo sobre la tasa de germinación de las semillas y ausencia de plúmula en concentraciones de 1000 y 10000 mg/L. De esta manera, sus resultados revelan diferencias en el índice de vigor de las plántulas, los brotes, la longitud total, destacando como propiedad más sensible la elongación de la raíz.

Pan y Chu (2016), evaluaron el efecto fitotóxico de tetraciclina, sulfametazina, norfloxacin, eritromicina y cloranfenicol, sobre la germinación y la elongación de raíces de lechuga, tomate, zanahoria y pepino en placas de Petri. Sus resultados revelan que estos ATBs inhibieron significativamente la elongación de la raíz ( $p < 0,05$ ), con el siguiente orden de toxicidad: tetraciclina (14,4 mg/L) > norfloxacin (49,4 mg/L) > eritromicina (68,8 mg/L) > sulfametazina (157 mg/L) > cloranfenicol (204 mg/L).

Por su parte, Hillis et al. (2011) estudiaron el efecto de algunos ATBs sobre la germinación de semillas y elongación de raíces de lechuga (*Lactuca sativa*), alfalfa (*Medicago sativa*) y zanahoria (*Daucus carota*) mediante un ensayo de fitotoxicidad ( $10^{-3}$  y 10 mg/L) en placas de Petri. Sus resultados revelan mayor fitotoxicidad para clortetraciclina, levofloxacin y sulfametoxazol ( $3,9 \cdot 10^{-3}$ - $10 \cdot 10^3$  mg/L) y a *D. carota* como la especie más sensible, seguida por *L. sativa* y *M. sativa*. En forma similar, Bowman et al. (2011) evaluaron la toxicidad de tetraciclinas en *Arabidopsis thaliana*, exponiendo clortetraciclina (20 mg/L) generó ralentización del crecimiento, reducción de la expansión de las hojas y amarillamiento a partir del tercer día de exposición.

También, Liu et al. (2009) reportaron fitotoxicidad de diversos ATBs sobre el crecimiento de semillas de arroz (*Oryza sativa* L), cúrcuma (*Cucumis sativus* L)

y avena dulce (*Cichorium endivia*) mediante el uso de una prueba de germinación de semillas en papel de filtro. Aunque sus resultados muestran efectos fitotóxicos variados entre los antibióticos y entre las especies vegetales, destacan que el arroz fue más sensible al sulfametoxazol (0,1 mg/L). Por su parte, Migliore et al. (1995, 1998) evaluaron el efecto de sulfadimetoxina, enrofloxacina y oxitetraciclina sobre plantas de mijo (*Panicum miliaceum*), arvejas (*Pisum sativum*) y maíz (*Zea mays*). Sus resultados revelan que sulfadimetoxina altera tanto el desarrollo post-germinativo normal como el crecimiento de raíces, hipocotilos y hojas en las tres especies; dependiendo este efecto de su tasa de bioacumulación siendo mayor para *P. miliaceum* y *Z. mays*) que para *P. sativum*.

Los efectos fitotóxicos de los ATBs dependen no solo del compuesto en análisis sino también de las especies de semillas o plantas elegidas y de la composición fisicoquímica del suelo (Farkas et al., 2007; Kong et al., 2007). Por esto, al estudiar hortalizas cultivadas en tierra, Sun et al. (2021) plantearon que tanto la adsorción de los ATBs en los suelos como su acción sobre la microbiota variaban con las características del suelo. Mientras que Berg y Smalla (2009) dijeron que la comunidad microbiana de la rizósfera modifica las propiedades microbiológicas y fisicoquímicas del suelo.

#### **1.4.6. Efecto de los residuos de ATBs sobre peces e invertebrados**

Zhou et al. (2020) evaluaron la distribución tisular de ATBs en peces, su bioacumulación y la transferencia trófica en alimentos. Sus estudios revelan una repartición de ATBs en el siguiente orden: músculo de pescado ( $32,8 \cdot 10^4$  mg/kg) < hígado de pescado ( $76,1 \cdot 10^4$  mg/kg) < invertebrados ( $130 \cdot 10^4$  mg/kg). Siendo la ciprofloxacina el ATB más comúnmente detectado. Mencionan que las concentraciones de ATBs en el hígado de los piscívoros (peces que se alimentan de otros peces) fueron mayores que las de los omnívoros (peces que se alimentan tanto de carne como vegetales) y planctívoros (peces que se alimentan exclusivamente de plancton). Asimismo, sus resultados indican baja capacidad de bioacumulación de sulfonamidas, macrólidos y lincomicina en peces. Pero detectaron frecuentemente fluoroquinolonas en hígado de peces, invertebrados y plancton, lo que indica su elevado potencial de bioacumulación.

En *Carassius auratus* (pez dorado), Liu et al. (2014) investigaron los efectos subletales de norfloxacin sola y en combinación con sulfametoxazol. Señalan que norfloxacin (3-10 mg/L) produce inhibición de la acetilcolinesterasa (a nivel cerebral) y aumento de las enzimas hepáticas (glutati3n-S-transferasa y super3xido dismutasa) despu3s de 4 y 7 d3as de exposici3n. Asimismo, se observa que concentraciones mayores producen un da3o significativo en el ADN, el cual depende de la concentraci3n y del tiempo de exposici3n. Esto indica que norfloxacin, sola y en combinaci3n con sulfametoxazol, poseen potencial citot3xico y genot3xico contra *C. auratus*.

Por otra parte, Rico et al. (2014) luego de su estudio realizado en microcosmos al aire libre, se3alan efectos t3xicos agudos (48 horas) de enrofloxacin (entre 202 mg/L y 520 mg/L) sobre cinco especies de invertebrados: un oligoqueto acu3tico (*Limnodrilus hoffmeisteri*), dos moluscos (*Physella acuta* y *Melanooides tuberculata*), un insecto (*Micronecta sp.*) y un crust3ceo (*Macrobrachium lanchesteri*). Adem3s, se3alan adem3s que enrofloxacin, en concentraciones similares a las halladas en el ambiente, se disipa relativamente r3pido en el agua (11,7 h) y que aproximadamente el 11% de la dosis aplicada se transforma en ciprofloxacin despu3s de 24 h.

## **1.5. Frecuencia de residuos de ATBs en leche**

Con el paso del tiempo la incidencia de residuos de ATBs en la leche est3 disminuyendo satisfactoriamente, debido en primera instancia a la implementaci3n de las buenas pr3cticas ganaderas y en segunda instancia, al aumento en el n3mero de controles mediante la utilizaci3n de m3todos de *screening* (Zorraquino et al., 2007). Por ejemplo, en EEUU la presencia de residuos de ATBs en leche disminuy3 de un 15% en el a3o 1977 (Jones y Seymour, 1988) a menos del 0,1% en el a3o 2002 (van Schaik et al., 2002).

En Brasil, Novaes et al. (2017) realizaron un an3lisis de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal en el que incluyeron los principales betalact3micos, tetraciclinas, aminogluc3sidos, quinolonas y sulfonamidas. Aunque los resultados mostraron residuos de ATBs dentro de los LMRs, llam3 su atenci3n el amplio uso de norfloxacin y doxiciclina (tetraciclina, no apta para uso en ganado lechero).



La FDA (2015) publicó un estudio en el cual evaluaron 1918 camiones con leche cruda para detectar la presencia de betalactámicos (penicilina, ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, cefapirina y ceftiofur) comúnmente empleados para el tratamiento de mastitis. No obstante esto, también evaluaron la presencia de otros ATBs como ciprofloxacina (residuo marcador de otras quinolonas como la enrofloxacina) y sulfametazina (no apta para vacas lecheras en lactancia). Esto muestra la necesidad de ampliar los grupos de ATBs a testear de manera rutinaria en leche cruda.

En Alemania mediante el empleo de métodos microbiológicos para el análisis de residuos de ATBs en leche cruda, lograron disminuir la incidencia de casos positivos del 3% (Suhren et al., 1994) a menos del 0,05% (Kress et al., 2007).

En China se hallaron residuos de ATBs en el 80% de las muestras analizadas (Cortesana, 2002) y en México un 61% resultaron positivas (Ramírez et al., 2001). De manera más alarmante, en regiones como Kenia (Baynes et al., 1999), el Caribe (Shitandi y Sternesjö, 2004) e India (Kumarswamy et al., 2018), en los que el control de residuos de ATBs en leche no está regulado, la frecuencia de casos positivos es aún mayor.

## **1.6. Normativas para controlar los residuos de ATBs en la leche**

De acuerdo con los organismos internacionales de referencia, la leche y sus derivados, por tratarse de alimentos básicos y de amplio consumo, pertenecen al grupo de alimentos de gran riesgo en salud pública. Esto se debe no solo a la presencia de patógenos que pueden transmitir enfermedades, sino también a la existencia de contaminantes tales como hormonas, plaguicidas y antibióticos (World Health Organization, 2011).

Es por esto que la Regulación EU N°37/2010 (EU, 2010), el Codex Alimentarius (2011), el Código Alimentario Argentino (2011) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés *Food and Drug Administration* – FDA, 2015) precisaron “el contenido máximo” (concentración) de residuos resultantes de la utilización de medicamentos veterinarios autorizados por la legislación o reconocidos como admisibles en productos alimenticios”, es decir los Límites Máximo Residuales (LMR, Tabla 1.2). Entendiéndose por residuos de medicamentos veterinarios a “todas las sustancias farmacológicas activas, es

decir sus principios activos, excipientes o productos de degradación y sus metabolitos, que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiere administrado el medicamento veterinario del que se trate” (Máttar et al., 2009).

La Regulación EC N°470/2009 (EU, 2009) establece los procedimientos para fijar los LMRs de ATBs en alimentos de origen animal. De hecho, en diferentes normativas (EU, 2010; Codex Alimentarius, 2011; Código Alimentario Argentino, 2011; FDA, 2015) se establecen límites para diversas especies (vacas, cerdos, pollos, conejos, etc.) y tipos de matrices en las cuales es posible encontrar los ATBs (músculo, hígado, riñón, piel, grasa y leche).

En Argentina, el Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos (plan CREA) establecido por el Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, 2015) prioriza los residuos químicos, aditivos, toxinas y microorganismos que se controlarán mediante un programa anual. Además, determina aquellos que constituyen un mayor riesgo para la salud pública, cumpliendo así con las exigencias y los LMRs establecidos en el Codex Alimentarius (2011). Por su parte SENASA exige a las empresas lácteas el análisis de residuos de antibióticos, para los que a modo de screening, autoriza el empleo de métodos microbiológicos, inmunoenzimáticos, colorimétricos o de receptores (Código Alimentario Argentino, 2011). De manera similar, para la confirmación de los resultados, recomienda técnicas más sensibles tales como cromatografía en capa fina, HPLC, electroforesis, ELISA, bioensayos, métodos microbiológicos, entre otros. Luego de lo cual se debe contrastar los resultados obtenidos con los establecidos en la legislación para aceptar o un su uso (ver Tabla 1.2).

Cuando subproductos animales y sus derivados son considerados “no aptos para el consumo humano”, el Reglamento UE N°1069/2009 (EU, 2009) dicta normativas, en las que especifica lineamientos para al vertido de los mismos de manera controlada bajo el respaldo de la legislación ambiental zonal. En efecto, el descarte de leche cruda conteniendo elevadas cantidades de residuos de ATBs tiene un impacto negativo en los sistemas de tratamiento de efluentes de tambos e industrias. Por esto, para el caso puntual de leche cruda y lactosuero “no aptos para el consumo humano”, pero que no representen riesgo de

propagación de enfermedades transmisibles graves, la legislación menciona la posibilidad de su vertido en la tierra, sin procesamiento previo. No obstante, en función del tipo y concentración de ATBs presentes en estas matrices se puede producir acumulación y persistencia de dichas moléculas en el suelo y potencialmente en los cursos de agua, lo que afectaría ecosistemas acuáticos y terrestres (Kemper, 2008).

## **1.7. Obtención del lactosuero**

Cuando la leche cruda con residuos de ATBs, dentro de los LMRs permitidos por la legislación, llega a la industria láctea puede ser empleada en la producción de lacto derivados. Sin embargo su procesamiento no siempre garantiza la eliminación o inactivación de los mismos (Quintanilla et al., 2019b), especialmente en lo que refiere a las quinolonas (Zorraquino et al., 2008a; Roca et al., 2010). La transferencia potencial de ATBs de la leche a los lacto derivados depende de numerosos factores tales como la concentración del fármaco en la leche cruda, la naturaleza del ATB, y el tipo de proceso tecnológico, entre otros. Los ATBs permanecen en uno o más fracciones de leche, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas como la lipo e hidrofiliidad, capacidad de unión a proteínas, interacciones fármaco-fármaco y fármaco-nutriente, etc. (Giraldo et al., 2017; Giraldo Gómez, 2020).

Para el queso elaborado a partir de leche conteniendo residuos de ATBs dentro de los LMRs, estos fármacos pueden unirse a la caseína (Rusoff et al., 1957; Price et al., 1957; Khan y Marshallm, 1969; Dantas et al., 2020) o permanecer en el lactosuero (Berruga y Molina, 2005; Sniegocki et al., 2015; Giraldo et al., 2017; Gadjia et al., 2018; Quintanilla et al., 2018; Hassan et al., 2021). En efecto, en quesos de pasta blanda se reportó la presencia de residuos de tetraciclinas (Tona y Olusola, 2014; Cabizza et al., 2017; Gadjia et al., 2018), bencilpenicilina (Adetunji, 2011; Quintanilla et al., 2018, 2019a,b), y estreptomicina (Adetunji, 2011) y macrólidos y quinolonas (Quintanilla et al., 2018, 2019a,b). Además, en lactosuero se detectó la presencia de residuos de tetraciclinas (Gadjia et al., 2018), tilosina (Hassan et al., 2021), cloranfenicol (Sniegocki et al., 2015) y betalactámicos (Berruga y Molina, 2005).

## **1.8. Alternativas para el tratamiento de leche y lactosuero conteniendo residuos de ATBs a niveles superiores a los permitidos por la legislación**

Entre las diferentes alternativas que suelen utilizar los tambos o que brindan algunas industrias lácteas a los productores para el tratamiento de leche cruda o lactosuero “no aptos para el consumo humano”, se destacan:

- *Uso de landfarming como técnica de biorremediación:* Esta técnica se fundamenta en la disposición de efluentes líquidos sobre el suelo, con el propósito de lograr la biodegradación de la materia orgánica (*United States Environmental Protection Agency - USEPA, 1997; Silva-Castro et al., 2015*). Para esto, se debe remover y excavar las capas de tierra de forma regular (Parween et al., 2018). Si bien este proceso necesita menos energía que otras tecnologías de remediación, al ser un proceso microbiano, la eficacia de biodegradación es sensible a la concentración de los compuestos tóxicos y a parámetros como el contenido de humedad, la aireación y el pH (Thassitou et al., 2001; Lukić et al., 2015). Otra ventaja del *landfarming* es que se podría usar para la degradación de algunos xenobióticos, puesto que el proceso no implica la transferencia de contaminantes a otro medio (Batayneh, 2012).

Además, aunque ofrece la posibilidad de descomposición, degradación y mineralización de contaminantes orgánicos en otras sustancias menos tóxicas, a veces, los niveles residuales de productos intermedios son nocivos y/o tóxicos, persistentes, y tienen mayor movilidad que el contaminante original. Esto puede tener efectos perjudiciales para el ambiente, y los microorganismos, al afectar el proceso de mantenimiento de la vida y desequilibrar la integridad ecológica (Vidali, 2001; Sharma y Reddy, 2004).

Debido a la presencia de residuos de ATBs, el tratamiento de leche y lactosuero contaminados mediante *landfarming* puede provocar alteraciones en la flora microbiana natural, por lo cual no debería ser considerada como una alternativa viable (Roberts et al., 1999; Thiele-Bruhn, 2003; Dang et al., 2007; Shakil et al., 2008; Knapp et al., 2010; Kümmerer, 2010; De Kraker et al., 2011; Carlet et al., 2011; Leung et al., 2011; Andersson y Hughes, 2012; Finley et al., 2013; Wellington et al., 2013; Bártíková et al., 2016; Deng et al., 2016).

- *Vertido de la leche contaminada en lagunas de sedimentación*: Un estudio realizado por Nosetti et al. (2002) menciona que más de la mitad de los tambos argentinos eliminan los desechos generados en sus instalaciones de ordeño en lagunas artificiales que desembocan en algún curso de agua natural y alrededor de un cuarto de los tambos vierten sus efluentes sin tratamiento previo en cursos de agua naturales (arroyos o lagunas), mientras que el resto los elimina en algún potrero del establecimiento. Por esto, ya sea a través de la descarga directa de aguas residuales o mediante la descarga de sus efluentes, los ATBs pueden ingresar al medio acuático (Karthikeyan y Meyer, 2006).

Entre los diferentes ATBs utilizados en medicina veterinaria, las tetraciclinas, que se liberan en un 70% forma activa por orina, tienen gran carácter hidrofílico y muy baja volatilidad, significando esto elevada persistencia en el ambiente acuático (Daghrir y Drogui, 2013). También la leche y el lactosuero contaminados con residuos de ATBs, constituyen un problema serio para las lagunas de sedimentación, debido a la ralentización que generan los antimicrobianos en los procesos fermentativos que se dan en las mismas, además del desarrollo de resistencias en microorganismos naturales de las lagunas y finalmente, por el elevado impacto ambiental que generan en los cursos de agua donde desembocan (Jjemba, 2006; Kümmerer, 2009a, b).

- *Alimentación de terneros con leche contaminada con ATBs*: El 28% de las granjas lecheras de EEUU alimenta a sus terneros con leche contaminada con ATBs, considerada de desecho (Godden et al., 2005). Existen numerosos beneficios en este tipo de alimentación, tales como menor costo y un mejor rendimiento en comparación con otros sustitutos de leche. Sin embargo, también existen muchos riesgos asociados porque los residuos de ATBs pueden persistir en el intestino de los animales, causándoles diarrea como consecuencia de la alteración en su microflora intestinal (Feng et al., 2019), siendo esto más grave cuanto menor es la edad del ternero (Dethlefsen y Relman, 2011). Además, el uso de este tipo de leche para alimentación de terneros representa un problema debido especialmente a la posible aparición de bacterias resistentes a ciertos ATBs (Salisbury et al., 2002), por lo cual no debería considerarse como viable.

En este contexto, con el fin de mitigar el daño a la salud y al ambiente, toma importancia la posibilidad de degradar y/o remover los residuos de ATBs de la leche previo a su descarte.

- *Tratamiento térmico de leche contaminada:* La leche conteniendo residuos de ATBs podría ser tratada térmicamente a fin de lograr su inactivación. Muestras con residuos de betalactámicos, tratamientos térmicos de 120°C durante 20 minutos, permitieron a Zorraquino et al. (2008b) una inactivación del orden del 90% y a Roca et al. (2011) mayor al 99%. Con igual tratamiento térmico, para leche conteniendo tetraciclinas, Zorraquino et al. (2010) reportaron una inactivación del 70%, mismo porcentaje que Kurjogi et al. (2019) pero con un tratamiento térmico más largo (100°C durante 24 h). En contraposición, el calentamiento (120°C durante 20 min) de leche conteniendo residuos de quinolonas, Zorraquino et al. (2008a) informaron porcentajes de inactivación menores al 35% y Roca et al. (2010) menores al 13%. Agregado a esto, Quintanilla et al. (2019b) mostraron que residuos de la mayoría de los ATBs presentes en la leche cruda permanecen luego del calentamiento a 120°C, y que las quinolonas, debido a su elevada termoestabilidad, prácticamente no se ven afectadas. Este hecho también fue observado por Roca (2008) en su estudio con leche contaminada con ATBs, pero para residuos de sulfamidas. Otro hecho importante de mencionar es que los ATBs remanentes en la leche luego de su pasteurización pasan al queso y consecuentemente al lactosuero, siendo este otro fluido con potencialidad contaminante (Quintanilla et al., 2019b). A pesar de la basta información relacionada a la inactivación de ATBs en leche, es limitada en relación a la inactivación de ATBs en lactosuero. Por esta razón y para el uso futuro de esta matriz, es necesario profundizar el estudio de la degradación térmica de ATBs en el mismo.
- *Tratamientos fisicoquímicos:* Entre ellos la precipitación, coagulación y floculación, en general producen sobrenadantes clarificados con bajo contenido de grasas y proteínas. Sin embargo, solo eliminan parcialmente el contenido de lactosa (Rivas et al., 2010). Otros procesos, como el uso de membranas de nanofiltración o de ósmosis inversa también son viables debido a su alta eficiencia en la eliminación de contaminantes. No obstante, debido a razones

económicas, estas tecnologías no son recomendables para pequeñas y medianas industrias queseras (Yorgun et al., 2008).

- *Tratamientos biológicos*: mayoritariamente emplean la lactosa como nutriente para la producción de biomasa y subproductos de su metabolismo tales como metano, etanol, ácido láctico, etc. (Ramírez-Navas, 2013; Das et al., 2016; Bosco et al., 2018)

## **1.9. Alternativas para el aprovechamiento del lactosuero**

El lactosuero es un material altamente contaminante, debido principalmente a su elevado contenido en materia orgánica, especialmente por la lactosa que sirve de sustrato en la fermentación microbiana (Ramírez-Navas, 2013; Das et al., 2016; Bosco et al., 2018). Además, es rico en vitaminas, sales y proteínas. Debido a este gran contenido en nutrientes, no debería considerarse desecho, sino como un co-producto de la industria láctea (Macwan et al., 2016). Efectivamente, éste se puede emplear para la obtención de diversos productos con valor agregado, como por ejemplo alimentación animal mediante la suplementación nutricional de piensos (Ramírez-Navas, 2013; Kafantaris et al., 2019). También se puede emplear para la separación de lactosa por nanofiltración (Chandrapala et al., 2016), para producción de lactosuero y de proteínas en polvo (Das et al., 2016).

Asimismo, existe una amplia variedad de desarrollos tecnológicos surgidos a partir de la transformación de los componentes del lactosuero mediante procesos fermentativos por hidrólisis de lactosa. En efecto, se puede emplear para la obtención de ricota y yogur (Gyawali e Ibrahim, 2016), bebidas fermentadas (Castro et al., 2013), alcohol (Guimarães et al., 2010; Chavan et al., 2015), ácidos orgánicos (Amado et al., 2016), biogas (Maragkaki et al., 2018) y biomasa (Lavari et al., 2014; Tabanelli et al., 2016). En efecto, el lactosuero se puede usar para la producción de biomasa en procesos fermentativos con levaduras (Fonseca et al., 2008; Gutiérrez y Bastidas, 2016). Estas, debido a su elevada termoestabilidad, alta capacidad reproductiva y la capacidad de metabolizar lactosa, hacen de las levaduras de género *Kluyveromyces* una especie muy atractiva para este tipo de procesos (Fonseca

et al., 2008; Morrissey et al., 2015; Huang et al., 2016; Díaz-Vergara et al., 2017; Saini et al., 2017; Löser et al., 2018).

### 1.9.1. Metabolismo de *K. marxianus*

#### 1.9.1.1. Respiración celular

El proceso por el cual las células degradan la glucosa para obtener dióxido de carbono, agua y energía recibe el nombre de respiración celular. La respiración celular consiste en una serie de reacciones de óxido-reducción en las cuales las moléculas se oxidan y degradan paulatinamente liberando energía (ATP). La respiración ocurre en distintas estructuras celulares. La primera etapa, glucólisis, ocurre en el citoplasma, mientras que la segunda dependerá de la presencia o ausencia de oxígeno en el medio. En presencia de oxígeno, respiración aeróbica, ocurre en las mitocondrias, y en ausencia de oxígeno, respiración anaeróbica o fermentación, ocurre en el citoplasma (Khan, 2016).

Algunas levaduras, como *Kluyveromyces marxianus* asimilan lactosa como fuente hidrocarbonada para la producción de biomasa (Fig. 1.4). En lactosuero, esta conversión lactosa en proteína unicelular, etanol o enzimas genera una disminución del 75% la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) (Mawson, 1994). Para el empleo de la lactosa *K. marxianus* cuenta con una enzima intracelular, la  $\beta$ -D-galactosidasa (Barberis y Segovia, 2002).



**Fig. 1.4:** Hidrólisis de lactosa

#### Glucolisis

Consiste en nueve reacciones, cada una catalizada por una enzima específica, que transforman la glucosa en dos moléculas de ácido pirúvico, con la producción de ATP. La ganancia neta es de dos moléculas de ATP, y dos de NADH por cada molécula de glucosa.





### **Vía aeróbica: respiración**

En presencia de oxígeno, la etapa siguiente de la degradación de la glucosa es la respiración, es decir la oxidación escalonada del ácido pirúvico a  $\text{CO}_2$  y agua con generación de ATP y biomasa.

La respiración aeróbica se cumple en tres etapas: el ciclo de Krebs, el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (estos dos últimos procesos transcurren acopladamente). En las células levaduras estas reacciones tienen lugar dentro de las mitocondrias.

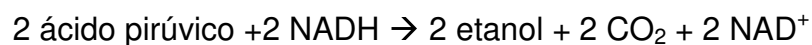
La fosforilación oxidativa es impulsada debido al movimiento de electrones a través de la cadena de transporte de electrones. Estos electrones provienen originalmente de la glucosa y se trasladan a la cadena de transporte de electrones con ayuda de los  $\text{NAD}^+$  y  $\text{FAD}$ , que se convierten en  $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$ , con la liberación de más  $\text{CO}_2$ . El  $\text{NADH}$  y el  $\text{FADH}_2$  depositan sus electrones en la cadena de transporte de electrones y revierten a  $\text{NAD}^+$  y  $\text{FAD}$ . Este movimiento de electrones libera energía que se utiliza para bomba protones fuera de la matriz y forman un gradiente. Los protones regresan hacia la matriz, unidos a ATP sintasa, para regenerar ATP. Al final de la cadena de transporte de electrones, el oxígeno recibe los electrones y recoge protones del medio para formar agua.

### **Vía anaeróbica: fermentación**

La glucólisis puede ocurrir por vía anaeróbica en un proceso llamado fermentación, ello significa que el aceptor final de los electrones del  $\text{NADH}$  producido en la glucólisis no es el oxígeno, sino un compuesto orgánico que se reducirá para poder volver a oxidar el  $\text{NADH}$  a  $\text{NAD}^+$ . El compuesto orgánico que se reduce (por ejemplo piruvato) es un derivado del sustrato que se ha oxidado. Para esto, el ácido pirúvico puede optar por la fermentación alcohólica o la fermentación láctica (Khan, 2016).

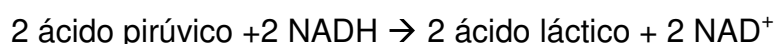
- *Fermentación alcohólica*: se lleva a cabo en particular por las levaduras que convierten los glúcidos como la glucosa en etanol y dióxido de carbono, con producción de una pequeña cantidad de energía metabólica en forma de ATP. Durante la formación del etanol, el piruvato generado se descarboxila a acetaldehído liberando dióxido de carbono, luego se reduce en etanol por el

alcohol deshidrogenasa con oxidación de una molécula de NADH en NAD<sup>+</sup>. El NADH se transforma en NAD<sup>+</sup>, lo que permite que la glucólisis continúe produciendo ATP (Chen y Wang, 2016; Khan, 2016).



Es importante mencionar que el etanol producido es un compuesto tóxico para las levaduras. Concentraciones del 12% dan inicio al proceso de muerte celular. Existen otras vías de degradación anaeróbica del piruvato las cuales llevan a la formación de compuestos característicos (CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> o SH<sub>2</sub>) que dependerán de la biomasa formada (Seluy, 2015).

- *Fermentación láctica*: es una vía metabólica en la que glúcidos -como la glucosa- se transforman en lactato y una pequeña cantidad de ATP. Durante este proceso, el ácido pirúvico de la glucólisis pasa a ácido láctico con oxidación de una molécula de NADH que produce NAD<sup>+</sup>, permitiendo que la glucólisis continúe. Esto resulta en moléculas adicionales de ATP (Khan, 2016).



Aunque este proceso generalmente es realizado por bacterias lácticas, también existen hongos y levaduras capaces de generar ácido láctico (Liu et al., 2006; Litchfield, 2009; Abdel-Rahman et al., 2013). Entre los hongos que producen fermentación láctica, el más estudiado es el género *Rhizopus*, especialmente *R. oryzae*, que además tiene capacidad amilolítica (Liu et al., 2006; Litchfield, 2009). No obstante, también las levaduras han despertado interés en la producción de ácido láctico, por ejemplo las del género *Candida* (Abdel-Rahman et al., 2013) y *Kluyveromyces* (Papapostolou et al., 2012), de las cuales *K. marxianus* destaca por su capacidad para realizar de manera simultánea con fermentación láctica y alcohólica, lo que hace muy interesante su empleo en procesos industriales (Dimitrellou et al., 2009).

La fermentación es un proceso completamente anaeróbico, el cual debido a la inclusión de oxígeno se detiene o minimiza, dando como resultado un aumento en la tasa de crecimiento celular, con la consecuente disminución de la producción de alcohol. Sin embargo, existen levaduras, como por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, que producen alcohol en condiciones aerobias. Este proceso recibe el nombre de efecto Crabtree y tiene como finalidad la producción de energía (De Deken, 1966; Petrik et al., 1983; Fiechter y Gmünder,

1989). De acuerdo con la cantidad de glucosa suministrada el efecto Crabtree se puede realizar a corto plazo o largo plazo. El efecto Crabtree a corto plazo ocurre en la etapa *lag* del crecimiento, cuando las células se enfrentan a un importante aporte de glucosa, lo que da como resultado su inmediata transformación en etanol. Mientras que el efecto Crabtree a largo plazo ocurre cuando el aporte de glucosa es bajo, dando como resultado altas tasas de crecimiento. Esto lleva a una reclasificación de las levaduras, aquellas producen alcohol en condiciones aerobias reciben el nombre de Crabtree positivas y las que no Crabtree negativas (De Deken, 1966; Postma et al., 1989; van Urk et al., 1990).

En procesos biotecnológicos industriales en los que el producto deseado es la biomasa, las levaduras Crabtree positivas llevan a pérdidas económicas, ya que emplean el sustrato para la síntesis de subproductos, tales como el etanol. Es en estos procesos en los cuales levaduras Crabtree negativas tales como las de los géneros *Candida* y *Kluyveromyces* cobran importancia (van Urk et al., 1988, 1989, 1990; Kiers et al., 1998). Bellaver et al. (2004) evaluaron el efecto Crabtree negativo de *K. marxianus* empleando glucosa y lactosa como únicas fuentes de carbono (en aerobiosis). En ensayos a largo plazo (con poco suministro glucosídico) observaron similar producción de biomasa con ambos hidratos de carbono, destacando la ausencia de subproductos (etanol, acetato o glicerol) y en ensayos a corto plazo (con elevado suministro glucosídico) la producción de etanol. Finalmente evaluaron la el proceso en anaerobia, con suministro glucosídico, detectando la producción de etanol, glicerol y ácido acético por parte de la esta levadura.

Para explicar esta particularidad de *K. marxianus*, Bellaver et al. (2004) evaluaron actividades enzimáticas. Primeramente plantean la baja actividad piruvato descarboxilasa y la relativamente alta actividad de la acetil-CoA sintetasa deshidrogenasa, concluyendo que en esta levadura, el acetaldehído se puede oxidar a través de un bypass que evita su reducción a etanol. Adicionalmente los autores mencionan que en presencia de lactosa la actividad de la fosfoglucomutasa es mayor que con glucosa, lo cual refleja la actividad de la vía Leloir de *K. marxianus* para canalizar la galactosa, monómero de la lactosa, lo que podría explicar su metabolismo. Es decir, podría ser una

indicación de que la levadura emplea el exceso de carbono disponible para sintetizar carbohidratos de almacenamiento, lo que sería otra explicación de por qué *K. marxianus* canaliza el flujo de carbono hacia la biosíntesis de carbohidratos en detrimento de la formación de etanol.

Por tanto, para favorecer el procesamiento de lactosa en biomasa, la vía más conveniente es la del metabolismo respiratorio. En esta, como consecuencia del alto rendimiento energético (en forma de ATP) se favorece el crecimiento celular y la producción de CO<sub>2</sub>. Es decir, en aerobiosis, existe una estrecha relación entre la producción de biomasa y el consumo de lactosa (Mejía-Barajas et al., 2016). Considerando esto, según sea el objetivo del trabajo favorecer la producción de biomasa y el consumo de lactosa o la producción de etanol/ ácido láctico, se puede favorecer tanto el mecanismo aerobio como el anaerobio, respectivamente.

#### **1.9.1.2. Metabolismo del nitrógeno**

Las levaduras pueden utilizar una amplia variedad de fuentes nitrogenadas para su crecimiento, pero con diferente rendimiento. El primer paso para el uso de la mayoría de las fuentes de nitrógeno es su absorción a través de permeasas más o menos específicas (mecanismo de regulación). El segundo es la degradación de la fuente de nitrógeno a componentes útiles a través de las vías metabólicas del nitrógeno. A su vez, estas vías se pueden dividir en rutas que conducen a la degradación de la fuente nitrogenada en amoníaco y glutamato, o en otras que conducen a la síntesis de compuestos nitrogenados en los que el glutamato y la glutamina son los dadores de nitrógeno. La glutamina se sintetiza a partir de amoníaco y glutamato. La expresión de las rutas de degradación específicas también está regulada. La expresión de una u otra ruta depende de cada fuente de nitrógeno particular. El amoníaco juega un papel central como intermediario entre los procesos degradativos y de biosíntesis (ter Schure et al., 2000).

Algunas levaduras pueden usar sales de nitrato como fuente de nitrógeno mediante procesos enzimáticos en los que los iones amonio resultantes son asimilados en forma de glutamato y glutamina. Otras emplean proteínas, previa excreción de proteasas extracelulares o aminoácidos que pueden sufrir

descarboxilación, desaminación, transaminación y fermentación. La degradación de aminoácidos produce amonio y glutamato (Walker y White, 2005).

Es interesante mencionar la ausencia de consenso respecto a la mejor fuente nitrogenada para emplear con *K. marxianus*. Algunos autores sugieren mezclas de extracto de levadura y sales amoniacales (Grba et al., 2002; Aktaş et al., 2006), entre otras. En efecto, otros recomiendan el empleo de fuentes de nitrógeno orgánico (por ejemplo peptonas) pues favorecen la producción de biomasa y disminuye el gasto energético (Rojas et al., 2015; Serrat-Díaz et al., 2017). No obstante, todos acuerdan en la necesidad de suplementar el lactosuero para la producción de biomasa.

Por todo lo anteriormente expuesto, la hipótesis de esta tesis es que lactosuero con residuos de ATBs no debe descartarse sin tratamiento previo, pues al menos uno de éstos podría afectar una especie *no target*. Por ello, su aprovechamiento como materia prima para la obtención de biomasa de *K. marxianus*, constituye una alternativa interesante a nivel industrial, aunque requiere del tratamiento previo de los antimicrobianos.

## Capítulo 2

---

## **CAPÍTULO 2: Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Teniendo en consideración las actividades profesionales reservadas a los títulos de Veterinario y Médico Veterinario, que expresa en su sexta actividad “Proyectar y dirigir lo referido a higiene, seguridad y control del impacto ambiental en lo concerniente a su intervención profesional” (Resolución 1254/2018 del Ministerio de Educación de Argentina), surge la necesidad de evaluar el posible efecto de los antibióticos sobre especies *no target*, y analizar alternativas de tratamiento de los efluentes contaminados con los residuos provenientes de la explotación ganadera, tales como los antibióticos, por su elevado uso.

Por ello, el objetivo general de esta tesis consiste en estudiar las mejores condiciones de tratamiento térmico de lactosuero contaminado con antibióticos, para su empleo en la obtención de biomasa de *Kluyveromyces marxianus*, para minimizar el contenido residual de lactosa en el efluente.

### **2.2. Objetivos específicos**

Para cumplir el objetivo general de esta tesis Doctoral se planificaron los siguientes objetivos específicos:

**Objetivo específico 1:** Analizar el efecto de los antibióticos sobre algunos bioindicadores ambientales.

**Objetivo específico 2:** Evaluar el efecto inhibitorio de los antibióticos sobre el desarrollo de *K. marxianus* y su pérdida de actividad antimicrobiana mediante tratamiento térmico.

**Objetivo específico 3:** Optimizar los factores que afectan el crecimiento de *K. marxianus*, en lactosuero contaminado con antibióticos, previa inactivación de los mismos.

## Capítulo 3

---



### **CAPÍTULO 3: Efecto de los residuos de antibióticos en el medio ambiente**

Para estudiar el efecto de los residuos de ATBs sobre especies *no target* se dividió en tres trabajos. Primeramente se evaluó el efecto fitotóxico de cinco familias de ATBs (aminoglucósidos, betalactámicos, macrólidos, quinolonas y tetraciclinas) sobre la frecuencia germinativa y la elongación de las raíces de cinco cultivos: *Glycine max* (soja), *Helianthus annuus* (girasol), *Sorghum bicolor* (sorgo), *Triticum aestivum* (trigo) y *Zea mays* (maíz) y tres especies forrajeras: *Medicago sativa* (alfalfa), *Melilotus albus* (melilotus) y *Trifolium repens* (trébol blanco). También, se evaluó el efecto toxicológico agudo y crónico de fluoroquinolonas utilizando un cladóceros, *Daphnia magna*, como bioindicador.

## **3.1. Efecto de antibióticos sobre la germinación y elongación de raíces de semillas para cultivos de Argentina.**

### **3.1.1. Introducción**

La utilización de ATBs en medicina veterinaria representa una práctica ampliamente difundida (Ghava et al., 2015). La legislación de Argentina prohíbe que la leche contaminada con residuos de ATBs en concentraciones superiores a LMR se incorpore a la cadena alimentaria, y por lo tanto, ésta debe retirarse de su comercialización (Art. 556 Código Alimentario Argentino, 2011). No obstante, leche conteniendo ATBs en concentraciones inferiores a los LMRs establecidos por la legislación (EU, 2010; Codex Alimentarius - FAO/Organización Mundial de la Salud -OMS, 2011) ingresa a la industria láctea y sus efluentes pueden verterse al ambiente conteniendo parte de los mismos.

Algunas pequeñas industrias queseras, que no poseen plantas de tratamiento de efluentes, el lactosuero puede transformarse en un problema. Por esto, el *landfarming* representa una alternativa interesante para su descarte (Santorum et al., 2007; Mannetje et al., 2008). Sin embargo, su aplicación resulta limitada debido al tiempo que requiere la biodegradación de la materia orgánica. Factores tales como las características y concentración de los contaminantes, las propiedades fisicoquímicas del medio y la composición microbiana del suelo, afectan a los procesos de biodegradación (Thassitou et al., 2001; Lukić et al., 2015). En el caso concreto de la aplicación de *landfarming* para el tratamiento de ATBs, Wang y Wang (2015) reportan que son necesarios dos años de tratamiento para degradar tetraciclina (0,199 mg/L), clortetraciclina (0,007 mg/L) y sulfadimidina (0,011 mg/L).

Como consecuencia del tratamiento veterinario, moléculas de ATBs que no se metabolizan completamente, se excretan por la orina y/o estiércol llegando al suelo (Chee-Sanford et al., 2001; Kumar et al., 2005a, b; Pope et al., 2009; Finley et al., 2013; Topp et al., 2013). Desde allí pueden filtrarse a aguas subterráneas (Pedersen et al., 2003; Aga et al., 2003; Aga et al., 2005; Batt et al., 2006; Zhang y Li, 2011) o escurrir hacia ríos y lagunas adyacentes a áreas de producción ganadera (Kolpin et al., 2002; Boxall et al., 2003, 2004; Hamscher et al., 2004; Davis et al., 2006; Batt et al., 2006; Aust et al., 2008; Bowman et al.,

2011). Cuando esto ocurre, el crecimiento de vegetales puede verse afectado (Jjemba, 2002a, b; Liu et al., 2009).

Existen diferentes técnicas para evaluar el daño ambiental que producen los residuos de ATBs en el suelo, entre las cuales destacan los estudios de fitotoxicidad sobre el crecimiento de plantas y la germinación de semillas (Liu et al., 2009). Así, por ejemplo Hillis et al. (2011) estudiaron el efecto de betalactámicos, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim (en un rango de concentración de 1-10 mg/L) sobre la germinación de semillas y elongación de raíces de plantas de lechuga (*L. sativa*), alfalfa (*M. sativa*) y zanahoria (*D. carota*). Sus resultados mencionan que *D. carota* es la planta más sensible, seguida por *L. sativa* y *M. sativa*. Por su parte, Bowman et al. (2011) evaluaron la fitotoxicidad y la reducción en los niveles de calcio intracelular de tetraciclina en *Arabidopsis thaliana*. También, Migliore et al. (1995, 1998) investigaron la fitotoxicidad de sulfadimetoxina, enrofloxacin y oxitetraciclina sobre plantas de mijo (*Panicum miliaceum*), arvejas (*Pisum sativum*) y maíz (*Zea mays*). Sin embargo, no se han reportado estudios que evalúen los posibles efectos de ATBs sobre cultivos de Argentina.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el posible efecto fitotóxico que producen residuos de ATBs pertenecientes a cinco familias (aminoglucósidos, betalactámicos, macrólidos, quinolonas y tetraciclinas) sobre la frecuencia germinativa y la elongación de las raíces de cinco cultivos característicos de Argentina (*Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*). Se plantea la hipótesis de trabajo de que al menos un ATB presenta efecto fitotóxico sobre al menos una semilla, a niveles equivalentes al LMR.

### **3.1.2. Materiales y Métodos**

#### **Antibióticos**

Se seleccionaron ATBs representativas de cinco grupos de ATBs: enrofloxacin (quinolona), kanamicina (aminoglucósido), oxitetraciclina (tetraciclina), penicilina (betalactámico) y tilosina (macrólido). Con el propósito de evaluar el posible efecto de estos ATBs se eligieron concentraciones en escala logarítmicas a partir de los LMRs establecidos en leche por la legislación

para humanos (EU, 2010; Codex Alimentarius - FAO/OMS, 2011; Código Alimentario Argentino, 2011). Se utilizó lactosuero libre de ATBs y desproteinizado mediante tratamiento térmico a 120°C durante 20 min, seguido de la remoción de las proteínas precipitadas mediante filtración (Quintero et al., 2001; Uribarrí et al., 2004). Se prepararon disoluciones conteniendo  $C_0= 0$ ,  $C_1= \text{LMR}$ ,  $C_2= 10 \text{ LMR}$ ,  $C_3= 100 \text{ LMR}$  y  $C_4= 1000 \text{ LMR}$  de cada molécula ( $\text{LMR}_{\text{enrofloxacina}}: 0,1 \text{ mg/L}$ ,  $\text{LMR}_{\text{oxitetraciclina}}: 0,1 \text{ mg/L}$ ,  $\text{LMR}_{\text{kanamicina}}: 0,15 \text{ mg/L}$ ,  $\text{LMR}_{\text{penicilina}}: 0,004 \text{ mg/L}$ ,  $\text{LMR}_{\text{tilosina}}: 0,05 \text{ mg/L}$ ).

### **Cultivos seleccionados**

Se utilizaron 5 especies de cultivos sembrados frecuentemente en Argentina: girasol (*Helianthus annuus*), maíz (*Zea mays*), soja (*Glycine max*), sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum aestivum*).

### **Preparación del método**

Para la realización de las pruebas de toxicidad, se siguieron los lineamientos establecidos en el protocolo estándar de las plantas terrestres de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (del inglés *American Society for Testing and Materials* - ASTM, 2009; Liu et al., 2009; Hillis et al., 2011; Bowman et al., 2011; Adomas et al., 2013; Ghava et al., 2015). Antes de iniciar el tratamiento, las semillas se almacenaron a 4°C durante 1 mes. Transcurrido este tiempo, se realizó un estudio de germinación y se escogieron lotes que cumplieran con un porcentaje de germinación del 90%. De estos se seleccionaron 1500 unidades experimentales (semillas) de cada cultivo.

Para cada semilla y ATB se realizaron cinco réplicas de cada concentración, utilizando placas de Petri de poliestireno de 90 x 15 mm. En cada placa se distribuyeron 10 semillas sobre filtro de celulosa Whatman. Posteriormente, se agregaron alícuotas de 10 mL de las disoluciones de ATBs a cada una de las 5 réplicas de cada concentración ( $C_0$ ,  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ : 25 placas/antibiótico y semilla).

Las placas se cubrieron con Parafilm M (Sigma-Aldrich) para evitar la deshidratación y se colocaron en cámara de incubación a 25°C durante 7 días. Como control negativo de la tasa de germinación, se estableció un criterio de aceptabilidad mayor al 70% (ASTM, 2009).

## Mediciones y Análisis estadístico de los datos

### Frecuencia de germinación de las semillas

Las frecuencias relativas de germinación de las semillas fueron evaluadas a intervalos de 12 h, durante un período de 7 días (14 controles). Para ello se utilizó la opción stepwise del modelo de regresión logística múltiple mediante el programa estadístico StatGraphics Centurión XVI (StatGraphics® 2008):

$$Y = \text{Logística } L_{ijk} = \beta_0 + \beta_i \cdot t_i + \sum \beta_j \cdot C_j + \varepsilon_{ijk} \quad (3.1)$$

Dónde:  $Y = \text{Logística } L_{ijk}$ : Función logística =  $\ln [P_{ijkl}/(1 - P_{ijkl})]$ , con  $P_{ijkl}$ : probabilidad de semilla germinada y  $(1 - P_{ijkl})$ : probabilidad de semillas no germinadas.  $\beta_0$ : ordenada al origen;  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_j$ : coeficientes estimados por el modelo logístico;  $t_i$ : efecto del tiempo de germinación de las semillas ( $i=12$ );  $C_j$ : efecto de la concentración de ATBs en términos de variable *dummy* ( $C_0$ :  $C_1=0$ ,  $C_2=0$ ,  $C_3=0$  y  $C_4=0$ ;  $C_1$ :  $C_1=1$ ,  $C_2=0$ ,  $C_3=0$  y  $C_4=0$ ;  $C_2$ :  $C_1=0$ ,  $C_2=1$ ,  $C_3=0$  y  $C_4=0$ ;  $C_3$ :  $C_1=0$ ,  $C_2=0$ ,  $C_3=1$  and  $C_4=0$ ;  $C_4$ :  $C_1=0$ ,  $C_2=0$ ,  $C_3=0$  and  $C_4=1$ ) y  $\varepsilon_{ijk}$ : error residual del modelo.

### Elongación de las raíces de las semillas

Siete días después del inicio del experimento, se midió la longitud de la raíz de cada semilla germinada, por duplicado. Las mediciones se efectuaron desde la parte superior de la raíz primaria hasta el hipocotilo, utilizando un calibre Vernier (precisión 0,1 mm). Para el análisis del efecto de la concentración de ATBs sobre la elongación de las raíces se utilizó el test estadístico ANOVA (Centurion Stat Graphics®). Posteriormente, se aplicó la prueba de Tukey para evaluar diferencias significativas para cada concentración de ATB.

## 3.1.3. Resultados y Discusión

### Frecuencia de germinación de las semillas

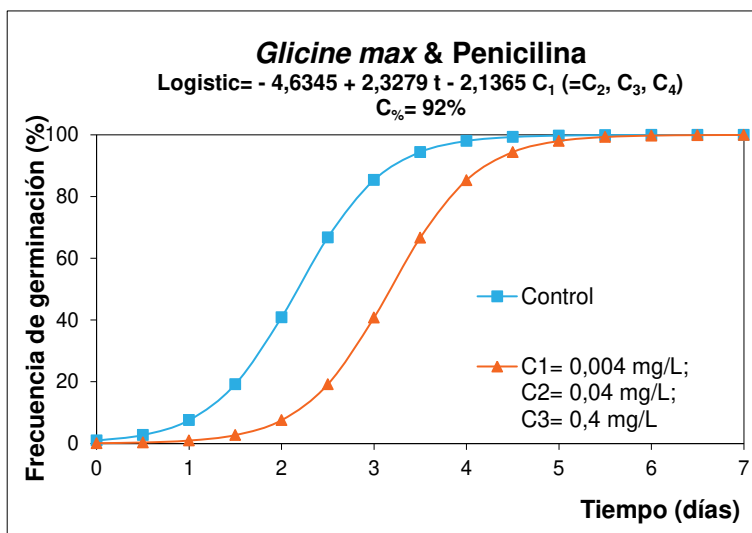
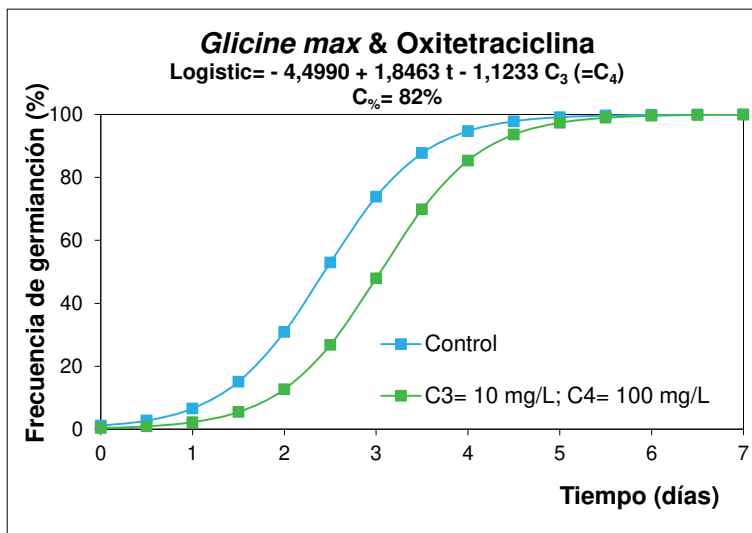
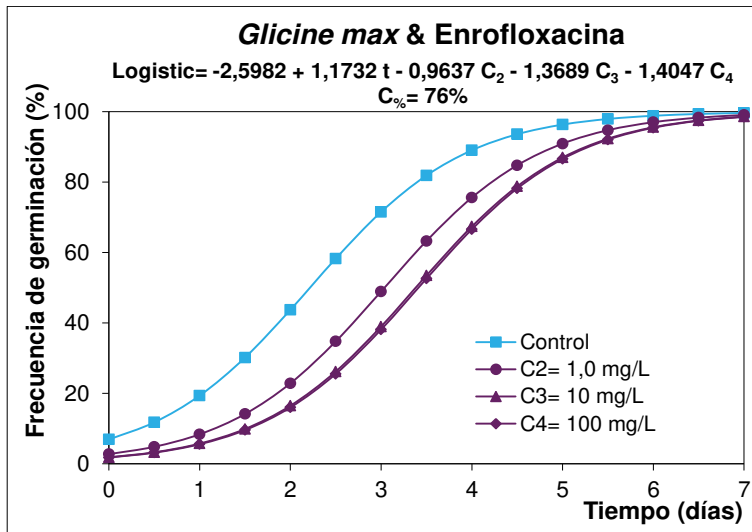
En Tabla 3.1 se exponen los  $\chi^2$  y valores p, del Modelo de Regresión Logístico, sobre la Frecuencia de Germinación (FG) de cada semilla, para aquellos ATBs que las afectaron en forma significativa ( $p < 0,05$ ). Asimismo las Fig. 3.1a (*G. max*), Fig. 3.1b (*S. bicolor*), Fig. 3.1c (*T. aestivum*), Fig. 3.1d (*Z. mays*) y Fig. 3.1e (*H. annuus*), muestran gráficamente dicho efecto. En todos los casos se aprecia que la presencia de ATBs produce un retraso en la FG de los cultivos,

poniendo de manifiesto su acción fitotóxica. Además, en dicha Figura se exponen las ecuaciones logísticas incluyendo los términos seleccionados mediante la opción stepwise. Se observa que el tiempo afecta de manera significativa ( $p < 0,05$ ) la FG (coeficientes “ $\beta_i$ ” positivos) mientras que las diferentes concentraciones de ATBs ( $p < 0,05$ ) lo hacen en forma negativa, lo cual se visualiza como efecto inhibitorio del crecimiento (coeficientes “ $\beta_{0j}$ ” negativos).

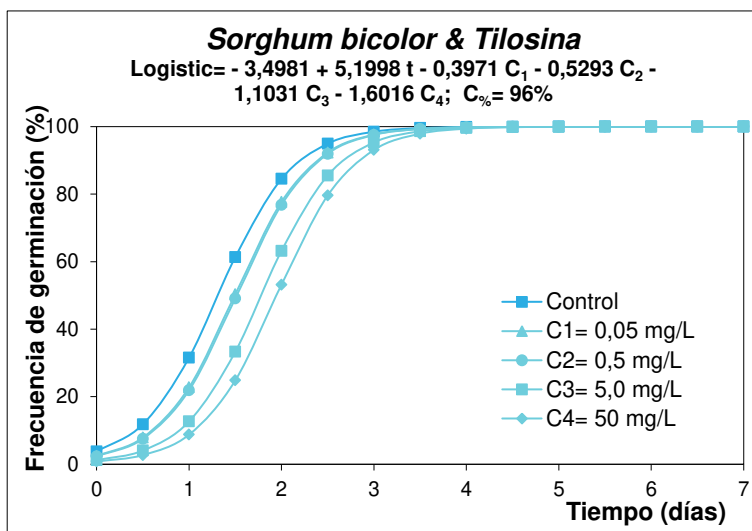
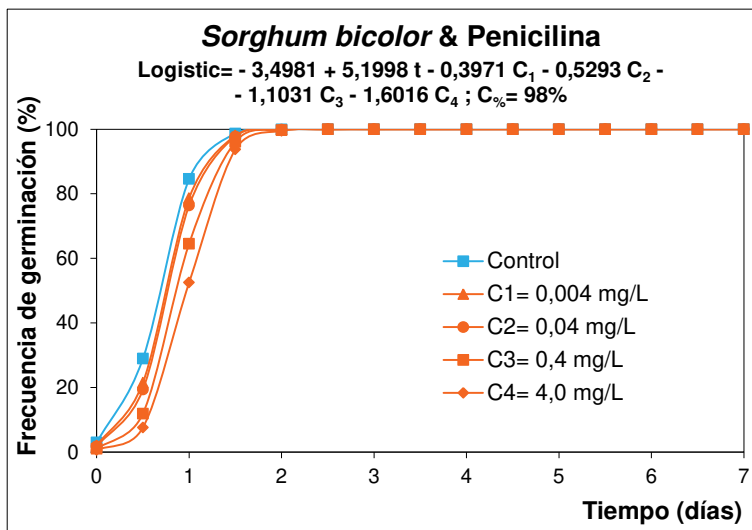
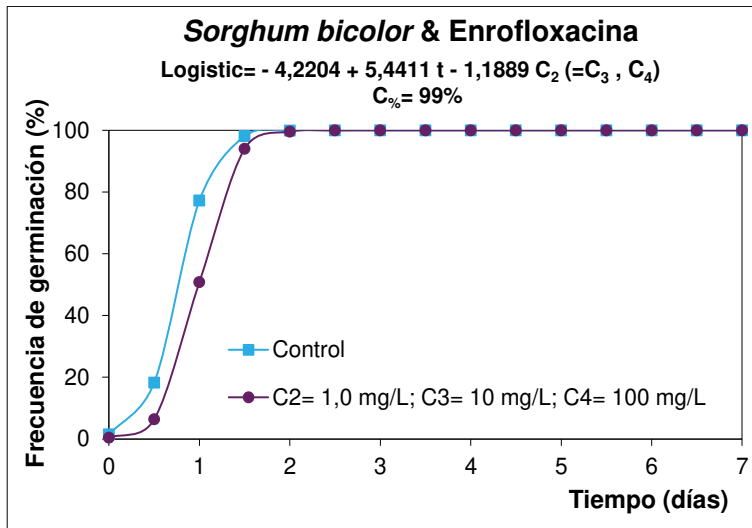
**Tabla 3.1:** Frecuencia relativa de germinación de semillas: resultados estadísticos de la aplicación de la opción stepwise del modelo de regresión logística para diferentes concentraciones de antibiótico.

Cultivo	Antibiótico	Tiempo		Concentración	
		$\chi^2$	Valor p	$\chi^2$	Valor p
<i>Glicine max</i>	Enrofloxacina	1316	0,0001	97,9	0,0001
	Oxitetraciclina	812	0,0001	32,9	0,0001
	Penicilina	935	0,0001	90,2	0,0001
<i>Helianthus annuus</i>	Enrofloxacina	971	0,0001	16,3	0,0027
	Enrofloxacina	876	0,0001	12,7	0,0004
<i>Sorghum bicolor</i>	Penicilina	2066	0,0001	29,4	0,0001
	Tilosina	2219	0,0001	95,0	0,0001
	Enrofloxacina	874	0,0001	6,79	0,0334
<i>Triticum aestivum</i>	Oxitetraciclina	1753	0,0001	6,82	0,0090
	Penicilina	808	0,0001	20,3	0,0001
	Oxitetraciclina	1184	0,0001	10,4	0,0013
<i>Zea mays</i>	Penicilina	1172	0,0001	11,9	0,0005

En la Fig. 3.1a se aprecia que a partir de 0,004 mg/L de penicilina, 1,0 mg/L de enrofloxacina y 10 mg/L de oxitetraciclina afectan marcadamente la frecuencia de germinación *G. max*, mientras que para *H. annuus* sólo se observa efecto significativo con 0,1 mg/L de enrofloxacina (en Fig. 3.1e). La frecuencia de germinación de *S. bicolor* disminuye con 0,004 mg/L de penicilina y 0,05 mg/L de tilosina, niveles equivalentes a sus respectivos LMRs. Pero es necesario 1,0 mg/L de enrofloxacina para afectar su FG (Fig. 3.1b). Las FGs de *T. aestivum* se ven afectadas por 0,4 mg/L de penicilina, 1,0 mg/L de oxitetraciclina y 10 mg/L de enrofloxacina (Fig. 3.1c). *Z. mays* es más resistente a los residuos de ATBs, debido a lo cual se necesita 100 mg/L de oxitetraciclina o 4 mg/L de penicilina para afectar su FG (Fig. 3.1d).



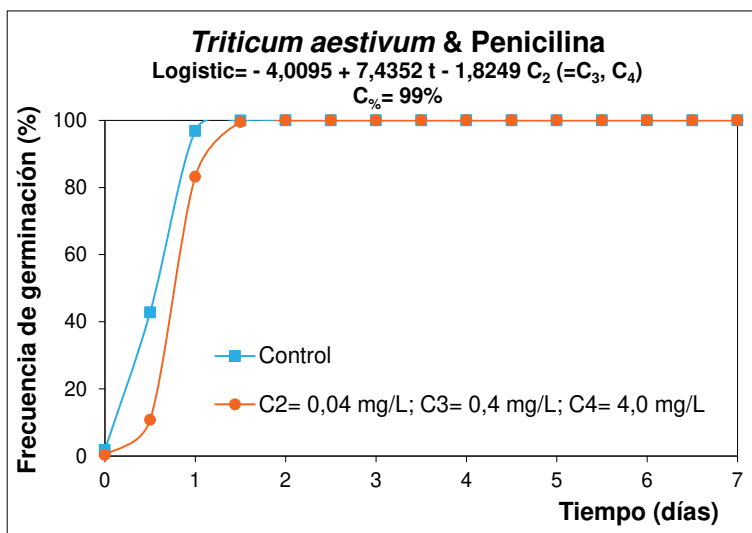
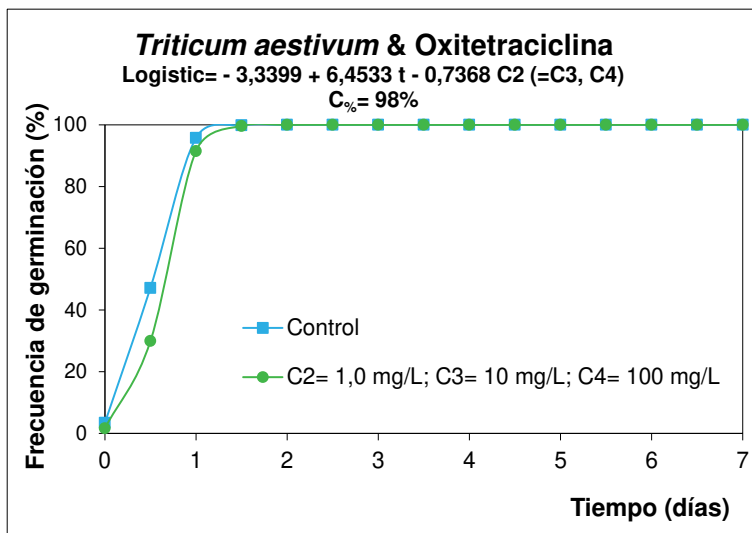
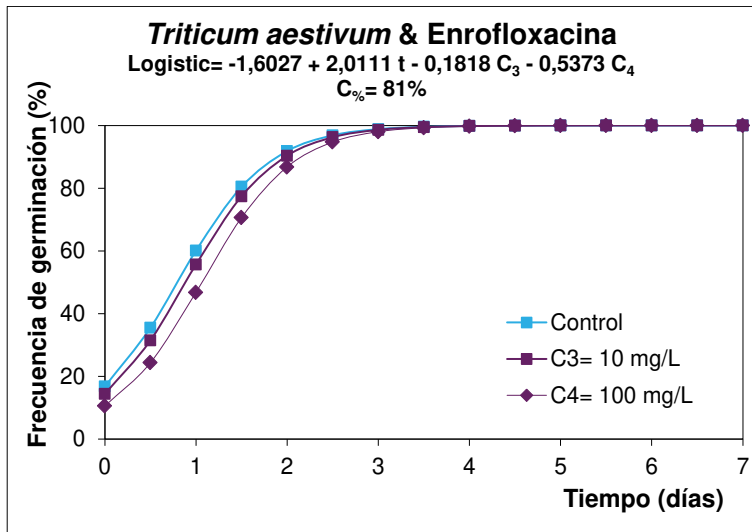
**Fig. 3.1a:** Efecto de la concentración de antibiótico sobre la frecuencia de germinación de *Glicine max*  
 $C\%$ : concordancia porcentual;  $t$ : tiempo,  $C$ : concentración de antibiótico.



**Fig. 3.1b:** Efecto de la concentración de antibiótico sobre la frecuencia de germinación de *S.bicolor*.

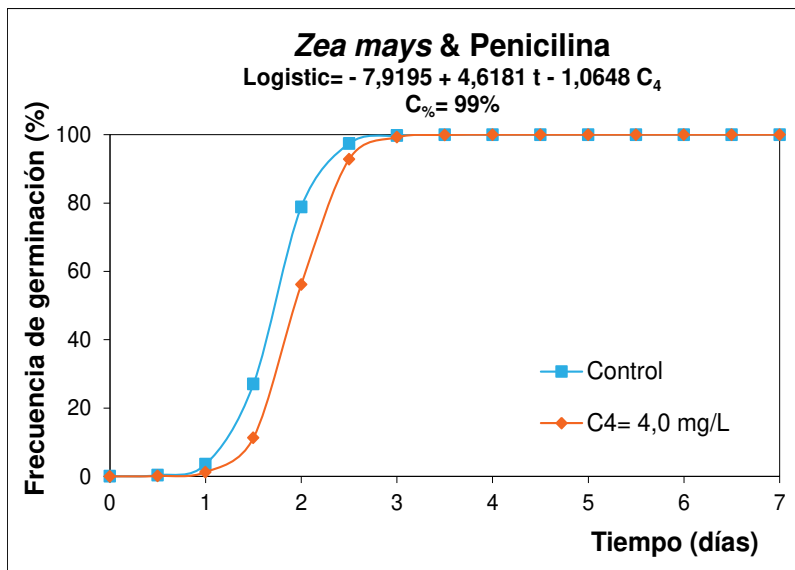
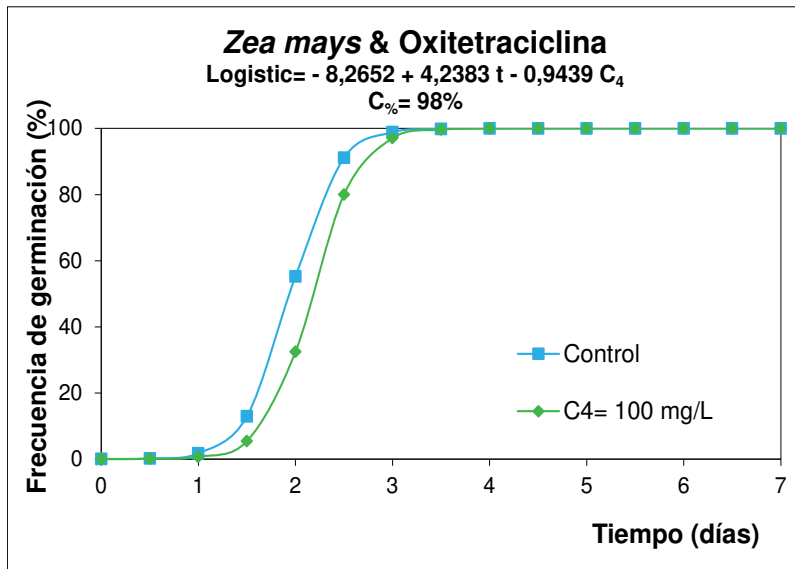
$C\%$ : concordancia porcentual;  $t$ : tiempo,  $C$ : concentración de antibiótico.



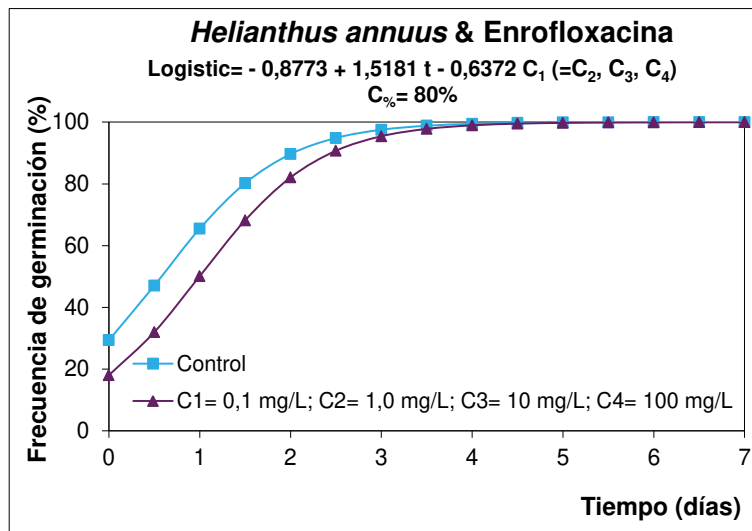


**Fig. 3.1c:** Efecto de las concentración de antibiótico sobre la frecuencia de germinación de *T.aestivum*.

$C\%$ : concordancia porcentual;  $t$ : tiempo,  $C$ : concentración de antibiótico.



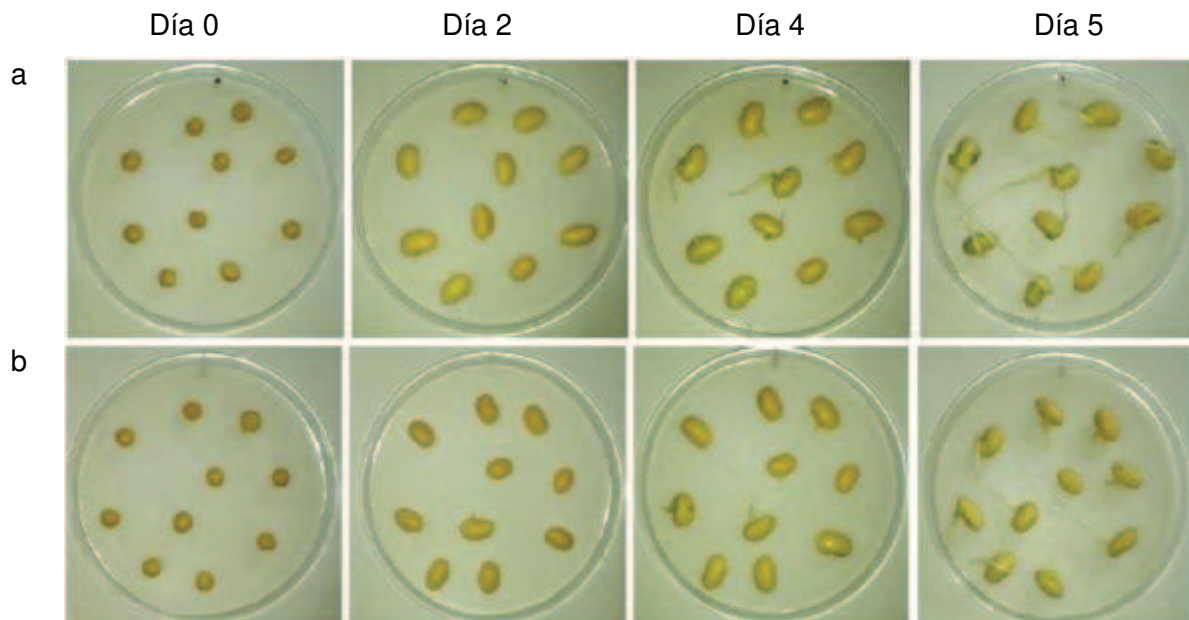
**Fig. 3.1d:** Efecto de la concentración de antibiótico sobre la frecuencia de germinación de *Z. mays*.  
 C%: concordancia porcentual; t: tiempo, C: concentración de antibiótico.



**Fig. 3.1e:** Efecto de la concentración de antibiótico sobre la frecuencia de germinación de *H.annus*.

C%: concordancia porcentual; t: tiempo, C: concentración de antibiótico.

Para visualizar el efecto inhibitorio de los ATBs sobre la germinación, se presenta la Fig. 3.2 (a: grupo control y b: grupo tratado). Esta imagen muestra que bajas concentraciones de penicilina (0,004 mg/L) afectan la FG de *G. max* en comparación con el control (libre de ATBs), en el segundo día (1 vs. 4 semillas germinadas) y cuarto día (4 vs. 8 semillas germinadas). Al quinto día de ensayo, germinaron todas las semillas.



**Fig. 3.2:** Efecto de 0,004 mg/L de penicilina en la frecuencia de germinación de la semilla de *Glycine max*.

(a) Grupo control, (b) grupo tratado

A modo de síntesis se puede establecer que concentraciones equivalentes a los LMRs en lactosuero, producen efecto fitotóxico sobre la FG de algunos cultivos. Así, 0,1 mg/L de enrofloxacin afecta a semillas de *H. annuus*, 0,004 mg/L de penicilina presenta efecto fitotóxico en *G. max* y *S. bicolor* mientras que 0,05 mg/L tilosina inhibe *S. bicolor*.

### **Elongación de las raíces de las semillas**

Los valores medios, desviaciones estándar y parámetros estadísticos (valores F y p) calculados con ANOVA para los ATBs que afectaron las semillas se muestran en la Tabla 3.2. También se presentan las diferencias significativas obtenidas al aplicar la prueba de Tukey.

Para *G. max*, todos los antibióticos evaluados causaron fitotoxicidad. La kanamicina, la penicilina y la tilosina mostraron toxicidad en sus LMRs ( $LMR_{kanamicina}$ : 0,15 mg/L,  $LMR_{penicilina}$ : 0,004 mg/L,  $LMR_{tilosina}$ : 0,05 mg/L), pero fueron necesarios 1 mg/L de oxitetraciclina y 10 mg/L de enrofloxacin para afectar elongación de la raíz.

Con respecto a *H. annuus* sólo se observa efecto inhibitorio para 10 mg/L de enrofloxacin y 100 mg/L de oxitetraciclina. Las semillas de *S. bicolor* resultan inhibidas por 0,1 mg/L de enrofloxacin, 0,004 mg/L de penicilina, 15 mg/L de kanamicina y 10 mg/L de oxitetraciclina. Se debe destacar que oxitetraciclina produce una disminución superior al 85% sobre la elongación de *S. bicolor*.

La fitotoxicidad debido a la presencia de ATBs sobre las semillas de *T. aestivum* se observa para 1,0 mg/L de oxitetraciclina, 10 mg/L de enrofloxacin, 15 mg/L de kanamicina y 0,4 mg/L de penicilina. Se debe destacar que la presencia 10 mg/L de enrofloxacin y 15 mg/L de kanamicina ocasionan disminuciones mayores al 50% en la elongación de las raíces. Los estudios de Ghava et al. (2015) respecto de la fitotoxicidad de amoxicilina, levofloxacin y tetraciclina sobre tres especies diferentes de trigo (*Triticum aestivum*) señalan ausencia de efecto significativo sobre la capacidad germinativa de las semillas debido a dichos ATBs, pero resaltan disminución en la elongación de las raíces en presencia de tetraciclina.

**Tabla 3.2:** Efecto de la concentración de antibióticos sobre la elongación de las raíces (cm) de cultivos agrícolas a los siete días.

Cultivo	ATB	Concentración (LMR)					F-valor	p-valor
		0	LMR	10LMR	100LMR	1000LMR		
<i>Glicine max</i>	Enrofloxacina	2,1 <sub>a</sub> ± 0,1	2,1 <sub>a</sub> ± 0,1	1,9 <sub>a,b</sub> ± 0,1	1,6 <sub>b,c</sub> ± 0,1	1,4 <sub>c</sub> ± 0,1	7,92	0,0001
	Kanamicina	1,8 <sub>a</sub> ± 0,1	1,4 <sub>b</sub> ± 0,1	1,5 <sub>b</sub> ± 0,1	1,4 <sub>b</sub> ± 0,1	1,4 <sub>b</sub> ± 0,1	3,74	0,0060
	Oxitetraciclina	3,6 <sub>a</sub> ± 0,2	3,2 <sub>a,b</sub> ± 0,2	2,9 <sub>b,c</sub> ± 0,2	2,3 <sub>c,d</sub> ± 0,2	1,6 <sub>d</sub> ± 0,2	19,12	0,0001
	Penicilina	2,7 <sub>a</sub> ± 0,2	1,7 <sub>b</sub> ± 0,2	1,6 <sub>b</sub> ± 0,2	1,9 <sub>b</sub> ± 0,2	1,8 <sub>b</sub> ± 0,2	5,62	0,0003
	Tilosina	3,0 <sub>a</sub> ± 0,1	2,5 <sub>b</sub> ± 0,1	2,4 <sub>b</sub> ± 0,2	2,5 <sub>b</sub> ± 0,2	1,8 <sub>c</sub> ± 0,2	9,42	0,0001
<i>Helianthus annuus</i>	Enrofloxacina	2,3 <sub>a</sub> ± 0,1	2,1 <sub>a,b</sub> ± 0,1	2,1 <sub>a,b</sub> ± 0,1	1,7 <sub>b</sub> ± 0,1	1,7 <sub>b</sub> ± 0,1	6,54	0,0001
	Oxitetraciclina	2,9 <sub>a</sub> ± 0,2	2,9 <sub>a</sub> ± 0,2	2,7 <sub>a</sub> ± 0,2	2,3 <sub>a</sub> ± 0,2	1,6 <sub>b</sub> ± 0,2	6,76	0,0001
<i>Sorghum bicolor</i>	Enrofloxacina	7,4 <sub>a</sub> ± 0,2	6,2 <sub>b</sub> ± 0,2	3,9 <sub>c</sub> ± 0,2	2,8 <sub>d</sub> ± 0,2	2,8 <sub>d</sub> ± 0,2	110,91	0,0001
	Kanamicina	4,7 <sub>a</sub> ± 0,3	5,1 <sub>a</sub> ± 0,3	5,1 <sub>a</sub> ± 0,3	2,8 <sub>b</sub> ± 0,3	1,4 <sub>b</sub> ± 0,2	61,41	0,0001
	Oxitetraciclina	6,8 <sub>a</sub> ± 0,2	6,0 <sub>a</sub> ± 0,2	5,3 <sub>a</sub> ± 0,2	1,9 <sub>b</sub> ± 0,2	2,0 <sub>b</sub> ± 0,2	41,97	0,0001
	Penicilina	8,3 <sub>a</sub> ± 0,3	6,2 <sub>b</sub> ± 0,3	6,6 <sub>b</sub> ± 0,3	6,6 <sub>b</sub> ± 0,3	6,4 <sub>b</sub> ± 0,3	6,53	0,0001
<i>Triticum aestivum</i>	Enrofloxacina	5,4 <sub>a</sub> ± 0,2	4,3 <sub>a</sub> ± 0,2	3,9 <sub>a</sub> ± 0,2	2,4 <sub>b</sub> ± 0,2	1,9 <sub>b</sub> ± 0,2	38,50	0,0001
	Kanamicina	5,1 <sub>a</sub> ± 0,2	5,4 <sub>a</sub> ± 0,2	5,3 <sub>a</sub> ± 0,2	2,3 <sub>b</sub> ± 0,2	1,1 <sub>b</sub> ± 0,2	78,38	0,0001
	Oxitetraciclina	5,1 <sub>a</sub> ± 0,1	5,2 <sub>a</sub> ± 0,1	3,5 <sub>b</sub> ± 0,1	1,4 <sub>c</sub> ± 0,1	0,8 <sub>c</sub> ± 0,1	175,59	0,0001
	Penicilina	6,4 <sub>a</sub> ± 0,3	6,0 <sub>a</sub> ± 0,3	5,7 <sub>a,b</sub> ± 0,3	5,1 <sub>b</sub> ± 0,3	5,1 <sub>b</sub> ± 0,3	3,78	0,0078
<i>Zea mays</i>	Enrofloxacina	1,8 <sub>a</sub> ± 0,1	1,8 <sub>a</sub> ± 0,1	1,7 <sub>a</sub> ± 0,1	1,7 <sub>a</sub> ± 0,1	1,5 <sub>b</sub> ± 0,1	3,33	0,0117
	Kanamicina	1,4 <sub>a</sub> ± 0,1	1,2 <sub>b</sub> ± 0,1	1,2 <sub>b</sub> ± 0,1	1,1 <sub>b,c</sub> ± 0,1	0,9 <sub>c</sub> ± 0,1	7,45	0,0001
	Oxitetraciclina	2,9 <sub>a</sub> ± 0,1	3,1 <sub>a</sub> ± 0,1	2,9 <sub>a</sub> ± 0,1	1,9 <sub>b</sub> ± 0,1	1,7 <sub>b</sub> ± 0,1	37,15	0,0001
	Penicilina	2,0 <sub>a</sub> ± 0,1	1,6 <sub>b</sub> ± 0,1	1,7 <sub>b</sub> ± 0,1	1,7 <sub>b</sub> ± 0,1	1,7 <sub>b</sub> ± 0,1	3,47	0,0091

Subíndices a, b, c: para valores de una misma fila que señalan diferencias significativas a un nivel de p<0,05,

LMR<sub>enrofloxacina</sub>: 0,1 mg/L, LMR<sub>oxitetraciclina</sub>: 0,1 mg/L, LMR<sub>kanamicina</sub>: 0,15 mg/L, LMR<sub>penicilina</sub>: 0,004 mg/L, LMR<sub>tilosina</sub>: 0,05 mg/L.

Para *Z. mays*, se observaron efectos inhibitorios a bajas concentraciones de kanamicina (0,15 mg/L) y penicilina (0,004 mg/L), pero a elevadas concentraciones de oxitetraciclina (10 mg/L) y enrofloxacina (100 mg/L).

En resumen, de la totalidad de ATBs ensayados, oxitetraciclina afectó la elongación de las raíces de todos los cultivos a diferentes concentraciones, similar al estudio realizado por Hillis et al. (2011) quienes reportan efecto inhibitorio de oxitetraciclina sobre la elongación de las raíces de *L. sativa*, *M. sativa* y *D. carota*.

Comparando las moléculas de ATBs que afectan a la elongación de las raíces de las diversas semillas (Tabla 3.2) con las moléculas que retardan su frecuencia de germinación (Tabla 3.1), se observa que el primer parámetro es más sensible que el segundo, tal como lo señalan Basset et al. (2002), Pan y Chu (2009) y Ghava et al. (2015).

Con el fin de visualizar el impacto de bajas concentraciones de ATBs sobre la elongación de las raíces se presenta Fig. 3.3, la cual muestra la acción de penicilina (0,004 mg/L) sobre *G. max*. Se observa que la penicilina produce una disminución significativa de la elongación de las raíces (Fig. 3.3b) en comparación con las semillas sin ATBs (Fig. 3.3a) medido el séptimo día de tratamiento.



**Fig. 3.3:** Efecto de la penicilina (0,004 mg/L) sobre la elongación de la raíz de *G. max* medido el séptimo día de tratamiento. (a) Grupo de control, (b) grupo tratado.

En síntesis, a bajas concentraciones los ATBs afectan la elongación de las raíces de los principales cultivos de Argentina. En este sentido 0,15 mg/L de kanamicina, 0,004 mg/L de penicilina y 0,05 mg/L de tilosina afectan las semillas

de *G. max*; 0,1 mg/L de enrofloxacin y 0,004 mg/L de penicilina afectan *S. bicolor* y 0,15 mg/L de kanamicina y 0,004 mg/L de penicilina afectan *Z. mays*. Por ello, se debería evaluar el uso de la técnica de *landfarming* con lactosuero contaminado ATBs, aun a concentraciones equivalentes los LMRs establecidos por la legislación.

### 3.1.4. Conclusiones

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de ATBs sobre la frecuencia de germinación y elongación de raíces de cultivos frecuentes de Argentina. Se concluye que concentraciones equivalentes a los LMR de enrofloxacin (0,10 mg/L) causa efecto fitotóxico sobre semillas *S. bicolor*; kanamicina (0,15 mg/L) sobre *Z. mays* y *G. max*, y penicilina (0,004 mg/L) en *Z. mays*, *G. max* y *S. bicolor*; mientras que tilosina (0,05 mg/L) afecta solamente a los cultivos de *G. max*.

Estos estudios ponen de manifiesto que concentraciones admisibles para la industria láctea, producen ralentización en la frecuencia de germinación y elongación de raíces de *S. bicolor*, *Z. mays* y *G. max* ampliamente cultivadas en Argentina, mientras que semillas de *H. annuus* y *T. aestivum* muestran una mayor resistencia. Por ello, el vertido al suelo de efluentes de la industria láctea contaminados con ATBs, podría constituir un problema ambiental.

Con el propósito de ampliar estos hallazgos, otras moléculas de aminoglucósidos, betalactámicos, macrólidos y quinolonas deberían investigarse. También, sería conveniente evaluar posibles efectos ecotóxicos de los ATBs sobre otros marcadores biológicos tales como bacterias (*Vibrio fischeri*), algas (*Cyclotella meneghiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Lemma gibba*), invertebrados (*Artemia salina*, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna*) y peces (*Danio rerio*, *Lepomis macrochirus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta*, *Salvelinus fontinalis*, *Salvelinus namaycush*). De este modo, se podrían seleccionar los biomarcadores más sensibles a utilizar en el futuro, para su monitoreo ambiental.

## **3.2. Efecto fitotóxico de residuos de antibióticos sobre semillas forrajeras.**

### **3.2.1. Introducción**

Los ATBs utilizados para el tratamiento veterinario pueden eliminarse junto con la leche, la orina y/o el estiércol del ganado (Chee-Sanford et al., 2001; Kumar et al., 2005a, b; Pope et al., 2009; Finley et al., 2013; Topp et al., 2013). Así, estas moléculas bioactivas llegan al suelo y afectan el desarrollo de las semillas (Jjemba 2002b; Liu et al., 2009).

Para evaluar el efecto de los ATBs, varios autores estudiaron su fitotoxicidad sobre la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, Liu et al. (2009) analizaron el efecto de seis ATBs (clortetraciclina, tetraciclina, tilosina, sulfametoxazol, sulfametazina y trimetoprima) sobre el crecimiento de arroz (*Oryza sativa* L), pepino (*Cucumis sativus* L) y plantas de avena dulce (*Cichorium endive*). Ellos indican que 0,10 mg/L de sulfametoxazol es perjudicial para el desarrollo de plantas de arroz. Además, Hillis et al. (2011) analizaron la acción de diez ATBs (amoxicilina, clortetraciclina, levofloxacina, lincomicina, oxitetraciclina, sulfametazina, sulfametoxazol, tetraciclina, trimetoprima y tilosina) sobre la germinación y desarrollo de lechuga (*L. sativa*), alfalfa (*M. sativa*) y zanahorias (*D. carota*), señalando la elevada fitotoxicidad de los ATBS (de 0,0039 mg/L para levofloxacina y 10 mg/L para trimetoprima) y destacando que levofloxacina, clortetraciclina y tetraciclina resultaron ser los más dañinos, mientras que amoxicilina y trimetoprima son menos riesgosos.

Debido al limitado número de estudios que evalúen los efectos de ATBs sobre semillas forrajeras, el propósito de este trabajo fue estudiar la fitotoxicidad de cinco ATBs sobre la frecuencia de germinación y elongación de raíces de tres especies forrajeras frecuentemente cultivadas en Argentina. Se postula como hipótesis de trabajo que al menos un ATB produce efecto fitotóxico sobre al menos una variedad de semilla forrajera a niveles de sus LMRs.



## 3.2.2. Materiales y Métodos

### Antibióticos

Se seleccionaron ATBs representativas de cinco grupos de ATBs: enrofloxacina (quinolonas), kanamicina (aminoglucósidos), oxitetraciclina (tetraciclinas), penicilina (betalactámicos) y tilosina (macrólidos). Con la intención de probar el posible efecto fitotóxico del lactosuero conteniendo residuos de estos ATBs, se trabajó con concentraciones equivalentes a sus LMRs (EU, 2010; Codex Alimentarius, 2011; Código Alimentario Argentino, 2011) como valores mínimos de estudio ( $LMR_{\text{enrofloxacina}}$ : 0,10 mg/L,  $LMR_{\text{oxitetraciclina}}$ : 0,10 mg/L,  $LMR_{\text{kanamicina}}$ : 0,15 mg/L,  $LMR_{\text{penicilina}}$ : 0,004 mg/L,  $LMR_{\text{tilosina}}$ : 0,05 mg/L). Sobre la base de estos valores umbral, se prepararon soluciones conteniendo las siguientes concentraciones en escala logarítmica:  $C_0= 0$  LMR,  $C_1= 1$  LMR,  $C_2= 10$  LMRs,  $C_3= 100$  LMRs y  $C_4= 1000$  LMRs, empleando lactosuero libre de ATBs y desproteínizado mediante tratamiento térmico a 120°C durante 20 min, seguido de la remoción de las proteínas precipitadas mediante filtración (Quintero et al., 2001; Urribarrí et al., 2004).

### Semillas forrajeras

Para este estudio se utilizaron semillas forrajeras: *Medicago sativa* (alfalfa), *Melilotus albus* (melilotus) y *Trifolium repens* (trébol blanco), provistas por el Departamento de Cultivos de la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina).

### Estudios de toxicidad

Para las pruebas de fitotoxicidad se siguió los lineamientos establecidos en el protocolo estándar para plantas terrestres de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM, 2009; Hillis et al., 2011; Ghava et al., 2015). Las semillas de las especies seleccionadas se almacenaron durante un mes a 4°C. Posteriormente, se realizó un estudio de germinación y se escogieron lotes que cumplieran con un porcentaje de germinación del 90%, de los cuales se seleccionaron 900 unidades experimentales de cada especie. Cada semilla y concentración de ATB se analizó por quintuplicado en placas de Petri (90 x 15 mm). En cada placa, se colocaron 10 semillas sobre un filtro de celulosa Whatman. A continuación, se añadió 10 mL de las soluciones antibióticas ( $C_0$ ,

C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>) a cada una de las cinco repeticiones de cada concentración (25 placas/antibiótico y semilla).

Para evitar sequedad las placas se cubrieron con Parafilm M (Sigma-Aldrich) y se colocaron durante 7 días en cámara de incubación a 25°C. De acuerdo con el protocolo, para el control negativo de la germinación se fijó un criterio de aceptabilidad mayor al 70%.

## Mediciones y análisis estadístico

### Frecuencia de germinación

Para cada semilla y concentración de ATB se calculó la frecuencia relativa de germinación a intervalos de 12 h luego del inicio del experimento y durante un período de 7 días (14 controles). Para ello, se implementó el procedimiento secuencial del Modelo de Regresión Logística del paquete estadístico StatGraphics Centurión XVI (StatGraphic® 2008):

$$Y = \text{Logística } L_{ijk} = \beta_0 + \beta_i \cdot t_i + \sum \beta_j \cdot C_j + \varepsilon_{ijk} \quad (3.2)$$

Dónde: Y= Logística  $L_{ijk}$ : Función logística=  $\ln [P_{ijkl}/(1- P_{ijkl})]$ , con  $P_{ijkl}$ : probabilidad de semilla germinada y  $(1-P_{ijkl})$ : probabilidad de semillas no germinadas.  $\beta_0$ : ordenada al origen;  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_j$ : coeficientes estimados por el modelo logístico;  $t_i$ : efecto del tiempo de germinación de las semillas ( $i=12$ );  $C_j$ : efecto de la concentración de ATBs en términos de variable *dummy* ( $C_0$ :  $C_1=0$ ,  $C_2=0$ ,  $C_3=0$  y  $C_4=0$ ;  $C_1$ :  $C_1=1$ ,  $C_2=0$ ,  $C_3=0$  y  $C_4=0$ ;  $C_2$ :  $C_1=0$ ,  $C_2=1$ ,  $C_3=0$  y  $C_4=0$ ;  $C_3$ :  $C_1=0$ ,  $C_2=0$ ,  $C_3=1$  and  $C_4=0$ ;  $C_4$ :  $C_1=0$ ,  $C_2=0$ ,  $C_3=0$  and  $C_4=1$ ) y  $\varepsilon_{ijk}$ : error residual del modelo.

### Elongación de raíces

Transcurridos 7 días del inicio del experimento, se midió la elongación de cada raíz, por duplicado. Las mediciones se efectuaron desde la parte superior de la raíz primaria hasta el hipocotilo, utilizando un calibre Vernier (precisión 0,1 mm).

Se empleó ANOVA (StatGraphics® 2008) para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de ATBs sobre la elongación de las raíces. Luego, se aplicó el test de Tukey para analizar diferencias significativas en cada concentración de ATB.

### 3.2.3. Resultados y Discusión

#### Frecuencia de germinación

En Tabla 3.3 se muestran los resultados estadísticos ( $\chi^2$  y valor p) de la aplicación del modelo de regresión logística para las diferentes concentraciones de ATBs que afectaron en forma significativa ( $p < 0,05$ ) la frecuencia de germinación las semillas. Se observó que enrofloxacina afecta la germinación de *M. sativa* y *T. repens*; mientras que la kanamicina inhibió a *M. sativa* y *M. albus*. Oxitetraciclina retrasó la germinación de las tres especies forrajeras, mientras que penicilina y tilosina son inocuas para ellas.

**Tabla 3.3:** Parámetros estadísticos del efecto de tiempo y la concentración de antibióticos sobre la frecuencia de germinación de semillas, calculados mediante la aplicación de la opción stepwise del modelo de regresión logística.

Antibióticos	Semillas	Tiempo		Concentración	
		$\chi^2$	Valor p	$\chi^2$	Valor p
Enrofloxacina	<i>Medicago sativa</i>	433	0,0001	112	0,0001
	<i>Trifolium repens</i>	250	0,0001	65,0	0,0001
Kanamicina	<i>Medicago sativa</i>	19,2	0,0001	12,9	0,0003
	<i>Melilotus albus</i>	778	0,0001	6,24	0,0124
Oxitetraciclina	<i>Medicago sativa</i>	252	0,0001	12,0	0,014
	<i>Melilotus albus</i>	777	0,0001	301	0,0001
	<i>Trifolium repens</i>	338	0,0001	5,53	0,0192

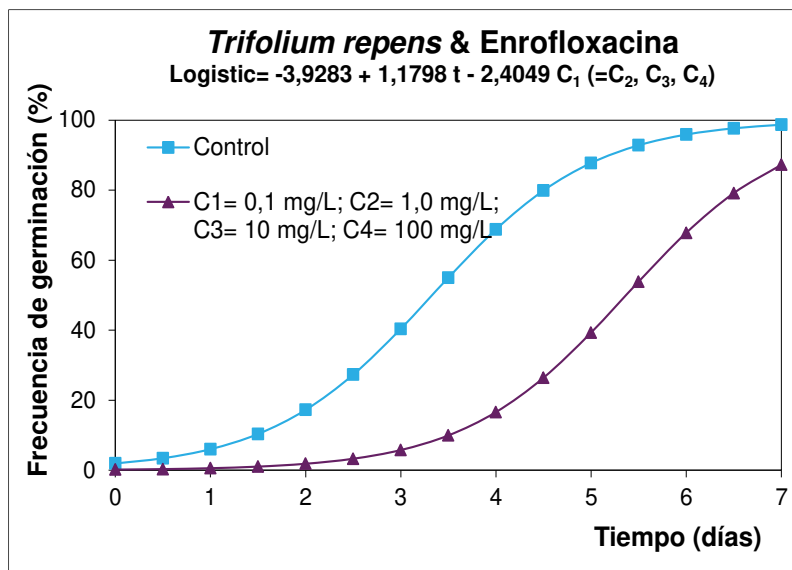
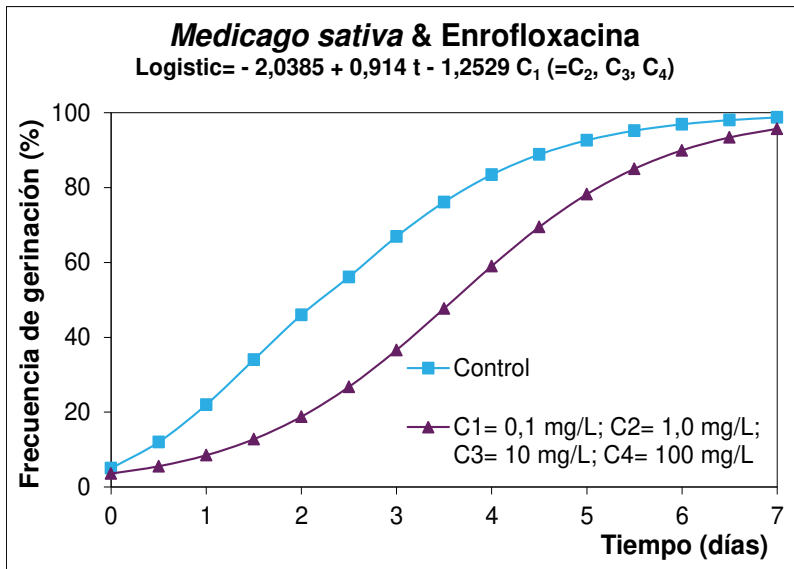
En Tabla 3.4 se presentan las ecuaciones logísticas calculadas para los ATBs que perjudicaron las frecuencias de germinación en forma significativa ( $p < 0,05$ ). Las variables tiempo y concentraciones de los ATBs fueron seleccionadas por opción stepwise del modelo logístico. Esta tabla muestra el efecto significativo ( $p < 0,05$ ) del tiempo sobre las frecuencias de germinación (coeficientes " $\beta_1$ " positivos) y la acción de las diferentes concentraciones de ATBs sobre las semillas (coeficientes " $\beta_2$ " negativos). La fitotoxicidad de los ATBs se pone de manifiesto a través del incremento en la magnitud de los coeficientes " $\beta_2$ ". Por ejemplo, enrofloxacina perjudica más a *T. repens* ( $\beta_2 = -2,4049$ ) que kanamicina a *M. albus* ( $\beta_2 = -0,5021$ ).

**Tabla 3.4:** Ecuaciones logísticas que relacionan las frecuencias de germinación de semillas forrajeras con el tiempo y las concentraciones de ATBs.

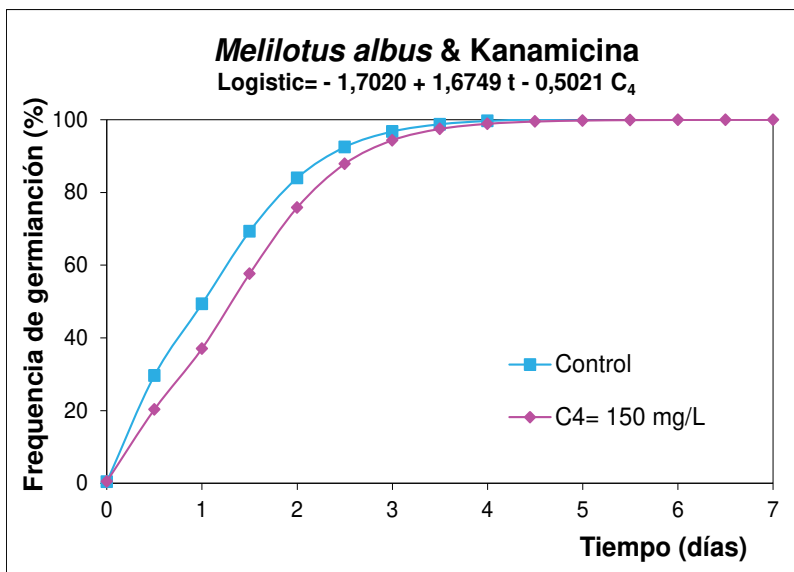
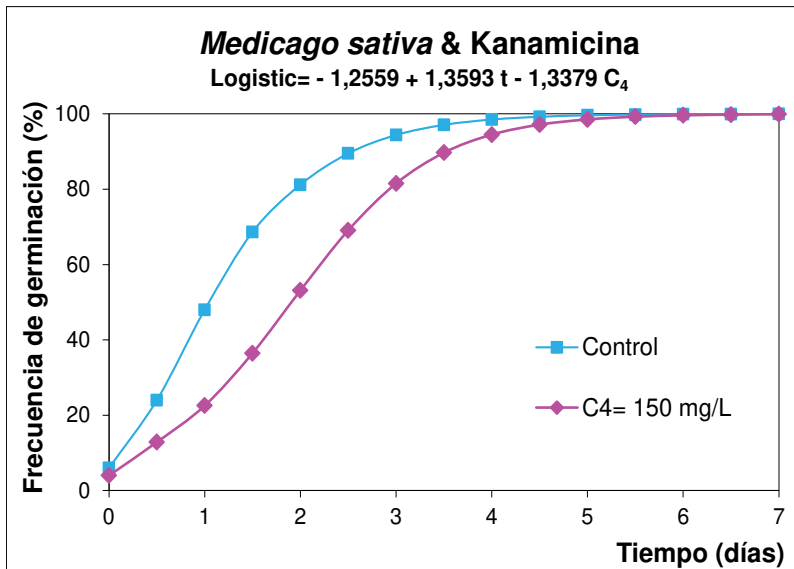
Antibióticos	Semillas	$L = \beta_0 + \beta_1 t + \sum \beta_2 C_i$				C%
		$\beta_0$	$\beta_1$	$\beta_2$	Concentracion	
Enrofloxacin	<i>Medicago sativa</i>	-2,0385	0,914	-1,2529	$C_1=C_2=C_3=C_4$	82
	<i>Trifolium repens</i>	-3,9283	1,1798	-2,4049	$C_1=C_2=C_3=C_4$	78
Kanamicina	<i>Medicago sativa</i>	-1,2559	1,3593	-1,3379	$C_4$	75
	<i>Melilotus albus</i>	-1,7020	1,6749	-0,5021	$C_1=C_2=C_3=C_4$	80
Oxitetraciclina	<i>Medicago sativa</i>	-0,6633	0,9637	-0,9481	$C_2=C_3=C_4$	70
	<i>Melilotus albus</i>	-1,7802	0,7856	-1,4885	$C_1=C_2=C_3=C_4$	79
	<i>Trifolium repens</i>	-3,6733	2,0077	-0,9481	$C_1=C_2=C_3=C_4$	90

$\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ = coeficientes estimados por el modelo; C%= concordancia porcentual; t= tiempo de ensayo.  $C_1= 1$  LMR,  $C_2= 10$  LMR,  $C_3= 100$  LMR,  $C_4=1000$  LMR. LMR<sub>enrofloxacin</sub>: 0,10 mg/L, LMR<sub>oxitetraciclina</sub>: 0,10 mg/L, LMR<sub>kanamicina</sub>: 0,15 mg/L, LMR<sub>penicilina</sub>: 0,004 mg/L, LMR<sub>tilosina</sub>: 0,05 mg/L.

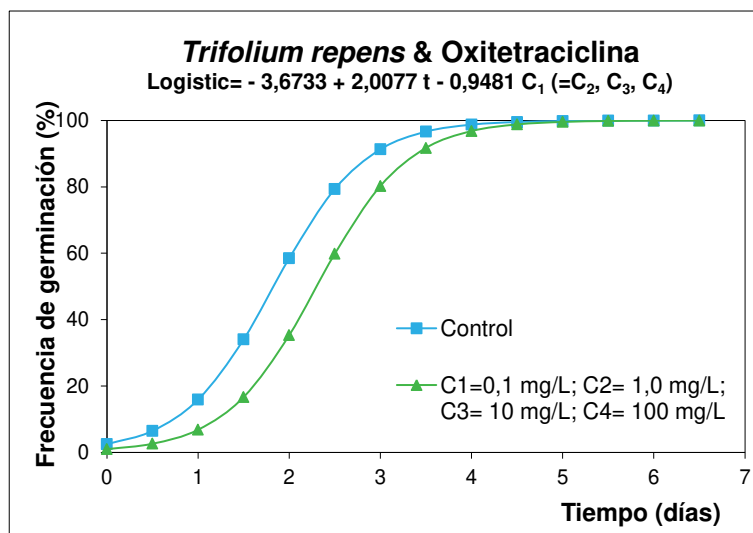
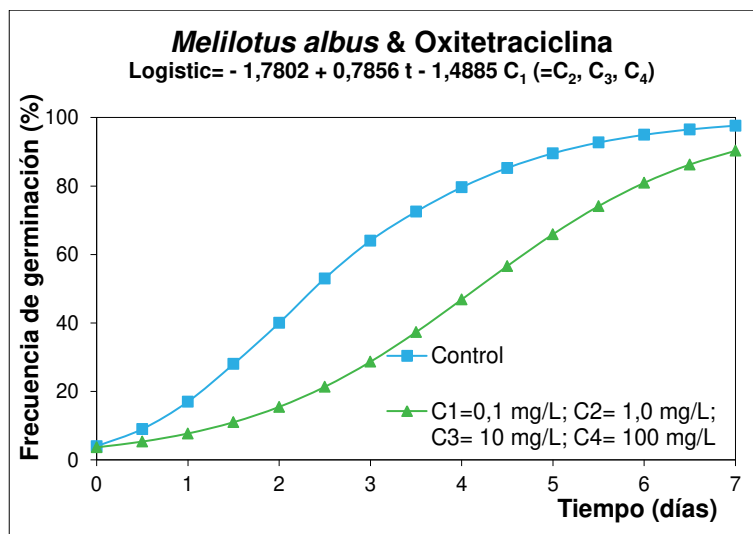
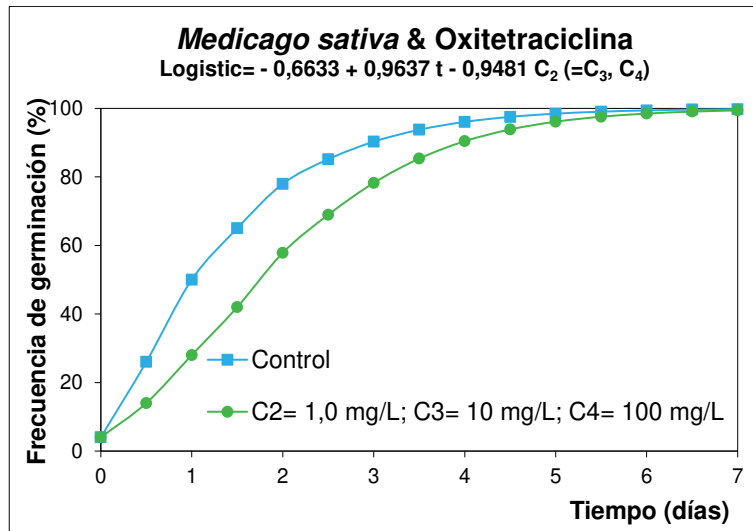
Las Fig. 3.4 (enrofloxacin), Fig. 3.5 (kanamicina) y Fig. 3.6 (oxitetraciclina) se construyeron para exponer esta inhibición debida a los ATBs. La Fig. 3.4 muestra que bajas concentraciones de enrofloxacin (0,10 mg/L) ralentizan la germinación de *M. sativa* y *T. repens*. Mientras que por el contrario, se necesita mayores concentraciones de kanamicina (150 mg/L) para inhibir *M. albus* y *M. sativa*. (Fig. 3.5). En Fig. 3.6 se observa que bajas concentraciones de oxitetraciclina (0,10 mg/L) afectan *M. albus* y *T. repens*, mientras que se requieren mayores concentraciones de este ATB (1,0 mg/L) para perjudicar la germinación de *M. sativa*.



**Fig. 3.4:** Efecto de diferentes concentraciones de enrofloxacin sobre la frecuencia de germinación de *Medicago sativa* (arriba) y *Trifolium repens* (abajo) C: concentraciones de enrofloxacin; t: tiempo de ensayo.

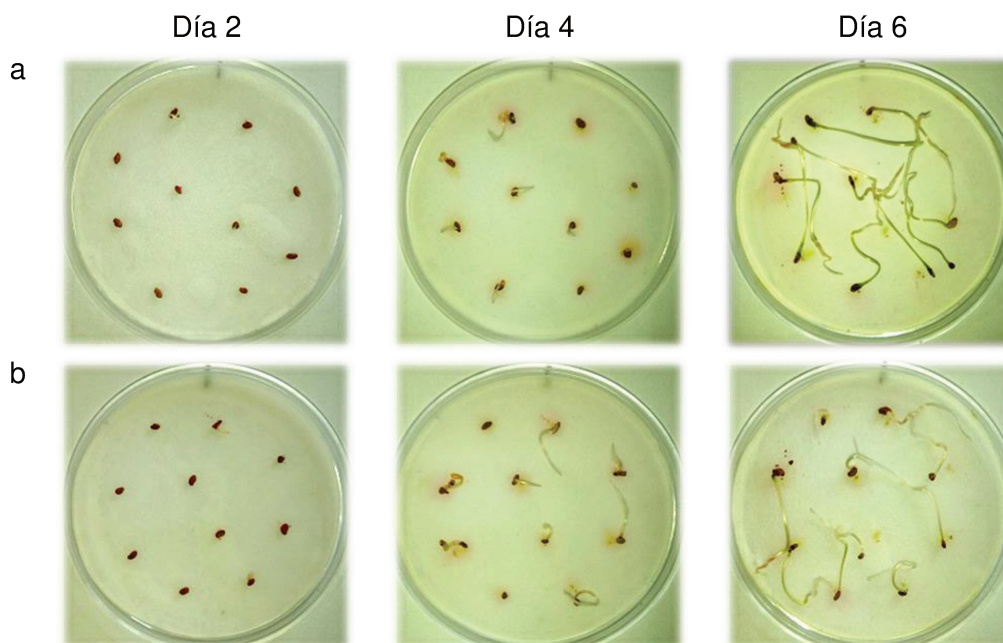


**Fig. 3.5:** Efecto de diferentes concentraciones de kanamicina sobre la frecuencia de germinación de *Medicago sativa* (arriba) y *Melilotus albus* (abajo) C: concentraciones de kanamicina; t: tiempo de ensayo.



**Fig. 3.6:** Efecto de diferentes concentraciones de oxitetraciclina sobre la frecuencia de germinación de *Medicago sativa* (arriba), *Melilotus albus* (centro) y *Trifolium repens* (abajo)  
 C: concentraciones de oxitetraciclina; t: tiempo de ensayo.

Con el propósito de visualizar el efecto inhibitorio de los ATBs sobre la frecuencia de germinación de semillas forrajeras se presenta Fig. 3.7. Se observa que aún con baja concentración de enrofloxacin (0,1 mg/L) resultan perjudicadas las semillas de *M. sativa* (a: grupo control y b: grupo tratado). En efecto, se muestra una disminución en la cantidad de semillas germinadas en comparación con el grupo control (sin ATB) al segundo día (a: 4 vs. b: 2), cuarto día (a: 8 vs. b: 6) y sexto día (a: 10 vs. b: 9) de iniciado el experimento.



**Fig. 3.7:** Efecto de 0,10 mg/L de enrofloxacin sobre la frecuencia de germinación de semillas de *Medicago sativa*.

(a) Grupo control, (b) grupo tratado.

La acción fitotóxica de bajas concentraciones de enrofloxacin (0,10 mg/L) sobre *M. sativa* y *T. repens* detectada en este trabajo, también fue señalada por Eluk et al. (2016) estudiaron el efecto de esta quinolona sobre la frecuencia de germinación de *H. annuus* (girasol). Por el contrario, aunque ninguna de las especies forrajeras resultó afectada por penicilina o tilosina, Eluk et al. (2016) destacaron que bajas concentraciones de penicilina (0,004 mg/L) tienen efecto fitotóxico sobre *G. max* y *S. bicolor*, y 0,05 mg/L de tilosina sobre *S. bicolor*. También, Liu et al. (2009) señalaron que una elevada concentración de tilosina (300 mg/L) afecta la germinación de *O. sativa* L (arroz) y *C. sativus* L (pepino), pero Hillis et al. (2011) mencionaron ausencia de fitotoxicidad de tilosina (10 mg/L) sobre la germinación de *M. sativa* (alfalfa), *D. carota* (zanahoria) y *L. sativa* (lechuga).



Resumiendo se puede establecer que concentraciones de enrofloxacina (0,10 mg/L) y oxitetraciclina (0,10 mg/L) equivalentes a sus LMRs, producen efectos fitotóxicos sobre la frecuencia de germinación de las semillas forrajeras estudiadas.

### **Elongación de raíces**

Tabla 3.5 presenta los valores medios, desviaciones estándar y parámetros estadísticos (Valor F y Valor p) calculados con ANOVA para los ATBs que presentan efecto fitotóxico ( $p < 0,05$ ) sobre las semillas forrajeras estudiadas. También, se presentan las diferencias significativas obtenidas con el Test de Tukey. Esta Tabla muestra que enrofloxacina y oxitetraciclina afectan significativamente ( $p < 0,05$ ) a las tres especies forrajeras, mientras que la kanamicina inhibe a *M. sativa* y *M. albus*, pero tilosina únicamente a *M. albus*. Por su parte, penicilina no afectó la elongación de las raíces de ninguna de las tres semillas forrajeras estudiadas.

Se observa que 0,10 mg/L de enrofloxacina tiene efecto negativo sobre la elongación de las raíces de todas las semillas, de forma similar a la frecuencia de germinación (Fig. 3.4). No obstante, se necesitan mayores concentraciones de kanamicina (150 mg/L) para afectar la elongación de raíces de *M. albus* y *M. sativa*, tal como se muestra en Fig. 3.5. De manera similar a lo expuesto en Fig. 3.6, oxitetraciclina (1,0 mg/L) afecta la elongación de las raíces de las tres semillas forrajeras. Por otra parte, 50 mg/L de tilosina disminuyen la elongación de las raíces de *M. albus*, pero no perjudican su frecuencia de germinación. Este hecho se puede atribuir a que la elongación de las raíces es una variable más sensible que la frecuencia de germinación, según lo señalaron Ghava et al. (2015).

En forma similar, Eluk et al. (2016) indicaron que bajas concentraciones de enrofloxacina (0,10 mg/L) afectan a *S. bicolor*, la kanamicina (0,15 mg/L) inhibe el desarrollo de *G. max* y *Z. mays*, mientras que la tilosina (0,05 mg/L) afecta a *G. max*. Además estos autores indicaron que una baja concentración de penicilina (0,004 mg/L) resulta perjudicial para las raíces de *G. max*, *S. bicolor* y *Z. mays*.

**Tabla 3.5:** Efecto de la concentración antibióticos sobre la elongación de las raíces (cm) de semillas forrajeras medidos a los 7 días.

Antibióticos	Semillas	Concentración (LMR)					Valor F	Valor p
		0	LMR	10LMR	100LMR	1000LMR		
Enrofloxacina	<i>Medicago sativa</i>	5,1 <sub>a</sub> ± 0,2	3,5 <sub>b</sub> ± 0,3	3,8 <sub>b</sub> ± 0,2	4,5 <sub>b</sub> ± 0,2	4,2 <sub>b</sub> ± 0,2	18,67	0,0001
	<i>Melilotus albus</i>	7,2 <sub>a</sub> ± 0,2	5,0 <sub>b</sub> ± 0,3	3,0 <sub>c</sub> ± 0,3	2,9 <sub>c</sub> ± 0,4	3,4 <sub>c</sub> ± 0,3	45,98	0,0001
	<i>Trifolium repens</i>	4,7 <sub>a</sub> ± 0,3	1,7 <sub>b</sub> ± 0,4	1,3 <sub>b</sub> ± 0,4	0,9 <sub>b</sub> ± 0,3	1,8 <sub>b</sub> ± 0,3	22,76	0,0001
Kanamicina	<i>Medicago sativa</i>	5,4 <sub>a</sub> ± 0,2	5,1 <sub>a</sub> ± 0,2	4,7 <sub>a</sub> ± 0,2	4,4 <sub>a</sub> ± 0,2	3,4 <sub>b</sub> ± 0,2	17,59	0,0001
	<i>Melilotus albus</i>	5,9 <sub>a</sub> ± 0,4	6,1 <sub>a</sub> ± 0,4	5,7 <sub>a</sub> ± 0,4	5,2 <sub>a</sub> ± 0,4	2,9 <sub>b</sub> ± 0,5	6,84	0,0001
Oxitetraciclina	<i>Medicago sativa</i>	2,8 <sub>a</sub> ± 0,1	2,6 <sub>a</sub> ± 0,1	2,2 <sub>b</sub> ± 0,1	1,0 <sub>c</sub> ± 0,1	1,1 <sub>c</sub> ± 0,1	52,33	0,0001
	<i>Melilotus albus</i>	4,4 <sub>a</sub> ± 0,2	4,3 <sub>a</sub> ± 0,2	3,1 <sub>b</sub> ± 0,2	2,2 <sub>c</sub> ± 0,2	1,7 <sub>c</sub> ± 0,3	30,27	0,0001
	<i>Trifolium repens</i>	4,0 <sub>a</sub> ± 0,3	3,6 <sub>a,b</sub> ± 0,2	2,9 <sub>b</sub> ± 0,2	1,2 <sub>c</sub> ± 0,2	1,1 <sub>c</sub> ± 0,2	28,80	0,0001
Tilosina	<i>Melilotus albus</i>	5,3 <sub>a</sub> ± 0,3	5,4 <sub>a</sub> ± 0,2	4,8 <sub>a</sub> ± 0,3	4,3 <sub>a,b</sub> ± 0,3	3,3 <sub>b</sub> ± 0,3	10,09	0,0001

a, b, c: diferentes subíndices para valores de una misma fila señalan diferencias significativas a un nivel de  $p < 0,05$ . LMR<sub>enrofloxacina</sub>: 0,10 mg/L, LMR<sub>oxitretetraciclina</sub>: 0,10 mg/L, LMR<sub>kanamicina</sub>: 0,15 mg/L, LMR<sub>penicilina</sub>: 0,004 mg/L, LMR<sub>tilosina</sub>: 0,05 mg/L.

Por su parte Hillis et al. (2011) señalaron efecto fitotóxico de oxitetraciclina sobre la elongación de raíces de *M. sativa* (10 mg/L), *L. sativa* (4,8 mg/L) y *D. carota* (1,6 mg/L). Estos autores también mencionaron la inhibición de tilosina (10 mg/L) sobre la elongación de raíces de *L. sativa* y *M. sativa*.

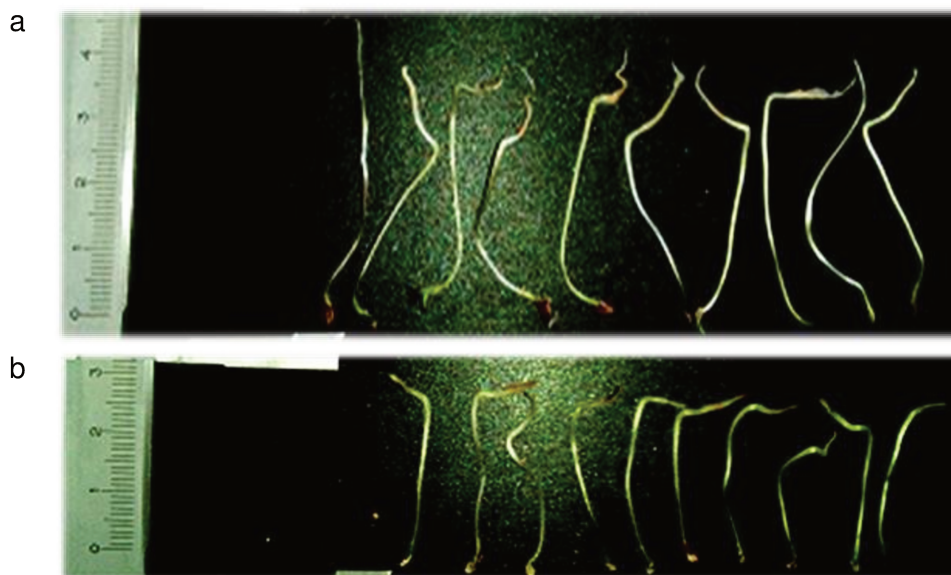
En resumen, 0,10 mg/L de enrofloxacin (LMR) ralentiza la elongación de las raíces de las tres especies de semillas forrajeras, con una disminución promedio del 60% en la elongación de raíces de *T. repens*. Pero se necesitan mayores concentraciones de kanamicina (150 mg/L), oxitetraciclina (1,0 mg/L) y tilosina (50 mg/L) para producir efecto sobre las raíces de semillas forrajeras (Tabla 4,3). En forma similar a lo observado en el estudio de las frecuencias de germinación, penicilina no tiene efecto sobre la elongación de las raíces de ninguna de las semillas forrajeras estudiadas.

El efecto de bajas concentraciones de ATBs sobre la elongación de las raíces se puede visualizar en Fig. 3.8, donde se presenta la acción de enrofloxacin (0,10 mg/L) sobre *M. sativa* luego de 7 días de ensayo. Esta figura muestra la disminución significativa de la elongación de las raíces debido a la fitotoxicidad de enrofloxacin (Fig. 3.8b), cuando se las compara con las raíces de las semillas sin tratar (Fig. 3.8a).

Resumidamente, 0,10 mg/L de enrofloxacin (LMR) ralentiza la elongación de las raíces de las tres especies de semillas forrajeras, con una disminución promedio del 60% en la elongación de raíces de *T. repens*. Pero se necesitan mayores concentraciones de kanamicina (150 mg/L), oxitetraciclina (1,0 mg/L) y tilosina (50 mg/L) para producir efecto sobre las raíces de semillas forrajeras (Tabla 4.3). En forma similar a lo observado en el estudio de las frecuencias de germinación, penicilina no tiene efecto sobre la elongación de las raíces de ninguna de las semillas forrajeras estudiadas.

Esto nos lleva a la conclusión de la necesidad de evaluar procesos de tratamiento que permitan disminuir la concentración ATBs en efluentes. En efecto, Sirtori et al. (2009) sugieren el uso de procesos fotocatalíticos solares para la degradación de residuos de quinolonas en agua. Asimismo, otros autores proponen la degradación de residuos de ATBs en leche mediante el empleo de tratamientos térmicos. De hecho, el proceso de esterilización (120°C-20min) de leche contaminada con ATBs genera una disminución significativa de

la actividad antimicrobiana de kanamicina (Zorraquino et al., 2009), penicilina (Zorraquino et al., 2008, Roca et al., 2011) y tilosina (Zorraquino et al., 2011), pero resulta insuficiente para la inactivación de enrofloxacin (Roca et al., 2010).



**Fig. 3.8:** Fitotoxicidad de enrofloxacin (0,10 mg/L) sobre la elongación de raíces de *Medicago sativa* luego de 7 días de ensayo. (a) Grupo control, (b) grupo tratado.

### 3.2.4. Conclusiones

Los resultados expuestos en este trabajo muestran que los ATBs tienen efecto fitotóxico sobre las semillas forrajeras. Se observa que concentraciones equivalentes a los LMRs establecidos para la industria láctea son perjudiciales para estos cultivos. En este sentido, 0,10 mg/L de enrofloxacin (LMR) inhiben a *M. sativa* (alfalfa), *M. albus* (melilotus) y *T. repens* (trébol blanco), mientras que 0,10 mg/L de oxitetraciclina (LMR) afectan *M. sativa* y *T. repens*. Con la intención de profundizar estos hallazgos otros ATBs y más bioindicadores, tales como las bacterias (por ejemplo, *Vibrio fischeri*), algas (por ejemplo, *Chlorella vulgaris*), invertebrados (por ejemplo, *Daphnia magna*) y peces (por ejemplo, *Salmo trutta*), deberían ensayarse.

### **3.3. Toxicidad de fluoroquinolonas sobre el cladócero *Daphnia magna***

#### **3.3.1. Introducción**

La presencia de fluoroquinolonas (FQs) en el agua puede deberse a su uso en aplicaciones humanas (áreas residenciales, hospitales) como veterinarias (granjas de animales) (Van Doorslaer et al., 2014). De hecho, las FQs están presentes en las aguas residuales urbanas (Blair et al., 2013; Dólar et al., 2012; Gracia-Lor et al., 2012; Jia et al., 2012; Li et al., 2013; Senta et al., 2013; Tewari et al., 2013; Verlicchi et al., 2012), aguas residuales hospitalarias (Verlicchi et al., 2012; Watkinson et al.; 2009; Yang et al., 2011; Zorita et al., 2009), aguas de acuicultura (Minh et al., 2009; Xu et al., 2009) y aguas residuales de la producción ganadera (Lin et al., 2008).

Se detectaron FQs en ríos de varios países tales como Argentina (Valdés et al., 2014; Teglia et al., 2019), Australia (Watkinson et al., 2009), China (Huang et al., 2009). al., 2020; Li et al., 2012; Lyu et al., 2020; Pan et al., 2020; Wei et al., 2012; Zheng et al., 2021; Zou et al., 2011), Finlandia (Vieno et al., 2006), Francia (Coetsier et al., 2009; Conley et al., 2008; Cui et al., 2011; Dinh et al., 2011); Hong Kong (Minh et al., 2009), Ghana (Azanu et al. (2018), Irán (Mirzaei et al. (2018), Italia (Sturini et al. (2009), Kenia (Madikizela et al. (2017), Sudáfrica (Agunbiade & Moodley, 2016), Rumania (Chitescu et al., 2015), España (López-Serna et al., 2011), Sri Lanka (Guruge et al. (2019), EE. UU. (He et al., 2015), entre otros. Además, se han reportado FQs en lagos de Brasil (Sodré et al., 2010), China (Tong et al., 2011), India (Rao et al., 2008), Italia (Sturini et al., 2009) y Vietnam (Duong et al., 2021).

A pesar de que las FQs se fotodegradan con la luz (Knapp et al., 2005; Sturini et al., 2010), pueden persistir en los suelos (Li et al., 2011), y esta persistencia conduce a su acumulación y lenta desorción en ambientes acuáticos (Picó & Andreu, 2007). En efecto, su presencia en diferentes fuentes de agua puede afectar a diversas especies (Andrieu et al., 2015; Dalla Bona et al., 2015; 2016; Dionísio et al., 2020).

Para evaluar el efecto de las FQs es posible emplear diferentes bioindicadores del zooplancton (Carraschi et al., 2015; Midya et al., 2019), que son sensibles al

estrés ambiental, abundantes en la naturaleza y tienen ciclos biológicos conocidos. Los cladóceros representan un grupo ideal para la evaluación de la toxicidad a nivel global, debido a su amplia distribución geográfica, facilidad de cultivo, alta sensibilidad a diferentes xenobióticos, reproducción partenogenética y ciclo de vida corto. Entre ellos, *Daphnia magna* se utiliza con frecuencia para estudiar sustancias químicas en pruebas ecotoxicológicas (Regaldo et al., 2014b; Reno et al. 2014; 2016; 2018; Silva et al., 2015).

Debido a que los mecanismos de toxicidad de las FQs pueden ser diferentes en las pruebas agudas y crónicas, las pruebas ecotoxicológicas deben incluir estudios de letalidad y subletalidad a corto y largo plazo (de Oliveira et al., 2016). Los estudios de letalidad mediante ensayos agudos aportan información valiosa para determinar la toxicidad de los compuestos de interés, mientras que los estudios de subletalidad mediante ensayos crónicos permiten obtener información de mayor relevancia ecológica. Estos últimos incluyen el análisis de los parámetros de supervivencia, crecimiento y fertilidad de los organismos bioindicadores. Por lo tanto, son útiles para predecir desequilibrios en poblaciones naturales y efectos a largo plazo, ya que brindan información sobre la estabilidad de una población y su potencial capacidad para mantenerse en el tiempo en los ecosistemas (Wagner et al., 2017). Además, las pruebas multigeneracionales complementan los estudios de toxicidad crónica, ya que se evalúan concentraciones bajas de ATBs durante numerosos ciclos de vida (Kim et al., 2012; Dalla Bona et al., 2015).

Con respecto a las FQ, estudios previos se han centrado principalmente en evaluar los efectos agudos provocados por ciprofloxacina (Dionísio et al., 2020; Halling-Sørensen et al., 2000; Martins et al., 2012; Robinson et al., 2005), enrofloxacin (Dalla Bona et al., 2015; Park & Choi, 2008) y levofloxacina (Robinson et al., 2005; Yamashita et al., 2006) en especies de agua dulce. Sin embargo, las pruebas crónicas con este tipo de moléculas son menos frecuentes (Dalla Bona et al., 2015, 2016; Dionísio et al., 2020; Park & Choi, 2008; Wolfe et al., 2015; Wollenberger et al., 2000; Yamashita et al., 2006).

Por lo expuesto y debido al amplio uso de las FQs en producción animal (Schulz et al., 2019), su baja biodegradabilidad en el ambiente (Parente et al., 2018; Riaz et al., 2018), su elevada termoestabilidad (Roca et al., 2010) y el

escaso conocimiento sobre los posibles efectos que pueden tener sobre organismos *no target*, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto toxicológico agudo y crónico de seis FQs (ciprofloxacina, enrofloxacina, levofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina y ofloxacina) utilizando a *Daphnia magna* como bioindicador. Por ello, la hipótesis de trabajo sugiere que al menos una FQ produce efecto crónico, a baja concentración, sobre *D. magna*.

### **3.3.2. Materiales y Métodos**

#### **Quinolonas**

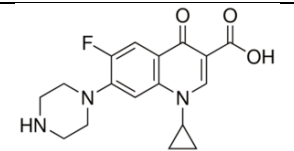
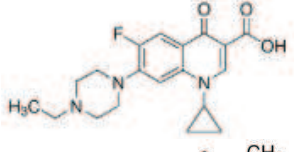
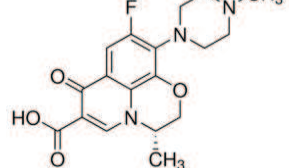
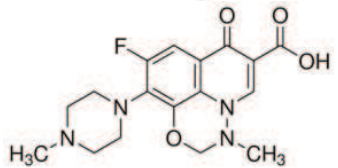
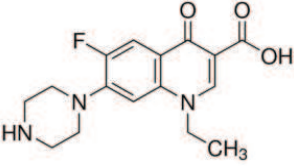
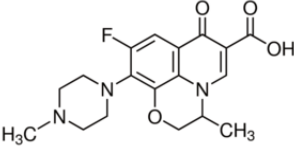
Se utilizaron seis FQs (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU, Tabla 3.6): ciprofloxacina, enrofloxacina, levofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina y ofloxacina. Se prepararon soluciones madre de FQ (10 g/L) en agua destilada. Las concentraciones finales se lograron haciendo diluciones seriadas de la solución madre, para un volumen de la solución de quinolona inferior el 1% del volumen final.

#### **Cultivo del organismo de ensayo**

##### *Daphnia magna*

Se siguieron las directrices del protocolo 202 propuesto por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE 202, 2004) para un cultivo madre de hembras adultas de *D. magna* Straus 1820 obtenido del Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina (Gutierrez et al., 2012; Regaldo et al., 2014a; Reno et al., 2015, 2016). Se preparó en un medio de cultivo sintético compuesto por 2,4 g de MgSO<sub>4</sub>, 3,84 g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,16 g de KCl y 2,4 g de CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O en 20 L de agua Milli-Q (American Public Health Association - APHA, 1998). El pH se ajustó a 7,5 añadiendo NaOH 1M. El medio se aireó durante al menos 24 horas y se lo utilizó para recambiar los cultivos madre semanalmente. Los cultivos se mantuvieron, en condiciones óptimas de temperatura (20 ± 2°C), fotoperiodo 16L: 8D y con una densidad de grupos de 25 individuos/dm<sup>3</sup>. El oxígeno disuelto se mantuvo en una concentración superior a 6 mg/L.

**Tabla 3.6:** Características generales de las fluoroquinolonas

Fluoroquinolona	Sigma Aldrich	CAS	Formula Empírica	MM (g/mol)	%Pureza	Fórmula
Ciprofloxacina	17850-F	85721-33-1	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	331,34	≥98	
Enrofloxacin	17849-F	93106-60-6	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	359,39	≥99	
Levofloxacin	28266-F	100986-85-4	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	361,37	≥98	
Marbofloxacin	34039-R	115550-35-1	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	362,36	≥99	
Norfloxacin	N9890	70458-96-7	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	319,33	≥98	
Ofloxacin	O8757	82419-36-1	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	361,37	≥99	

MM: masa molecular; CAS: Servicio de Resúmenes Químicos



Para efectos de homogeneización y estandarización, todos los experimentos se realizaron con neonatos (individuos <24 h de edad), nacidos entre la tercera y quinta cría (Olkova, 2021).

### *Chlorella vulgaris*

*C. vulgaris* (CLV2, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California, CISECE, México) se cultivó en frascos de 2 L, en condiciones estériles, utilizando Bold Basal Medium (BBM). El cultivo se mantuvo en condiciones constantes: aireación continua, agitación (100 rpm), intensidad de luz (8000 lux), temperatura  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH (6,5) y conductividad del medio (1,4 mS/cm). Posteriormente, la suspensión se centrifugó (500 rpm durante 7 min) para eliminar el medio salino, y se re-suspendió el medio de cultivo de *D. magna* para obtener una concentración stock de trabajo con una densidad de algas de  $1,02 \times 10^6$  células/mL medida directamente en una cámara de Neubauer e indirectamente, por espectrofotometría (absorbancia = 1,5,  $\lambda = 650$  nm) (Regaldo et al., 2014a; Reno et al., 2014, 2018).

## **Ensayos de ecotoxicidad**

### **Ensayos de toxicidad aguda (48 horas)**

Se realizaron acorde al protocolo de trabajo OECD 202 (OECD, 2004). Se emplearon neonatos <24 h (5 neonatos por réplica, 4 réplicas por concentración= 20 individuos por concentración de cada FQ). Se expusieron a ocho concentraciones de FQs (0; 0,1; 1,0; 5,0; 10; 25; 50; 100 mg/L= 160 individuos por FQ) en idénticas condiciones al cultivo madre. El rango de concentraciones utilizado surgió de ensayos preliminares no reportados en este trabajo. No se añadió alimento y las soluciones no se renovaron durante las pruebas. Durante las pruebas, la concentración de oxígeno disuelto y el pH se mantuvieron dentro de los límites establecidos por OCDE 202 (2004). A las 48 horas se registró el número de organismos inmobilizados, reconocidos por la falta de movilidad cuando los envases se agitaron de forma circular durante 10 segundos. Los resultados se consideraron aceptables para mortalidades  $\leq 10\%$  en los grupos de control. La sensibilidad de los cladóceros a las FQ se expresó como la concentración (g/L) en la que se observó falta de movilidad para el 50% de los organismos después de 48 h de exposición (48 h EC<sub>50</sub>). Estos valores se

calcularon con el método Probit, con un nivel de confianza del 95% (Finney, 1971).

### Ensayos de toxicidad crónica (21 días)

Se aplicó el protocolo de trabajo OECD 211 (OECD, 2012) para ensayos de toxicidad crónica con neonatos (<24h) de *D. magna* durante 21 días. La mayor concentración utilizada ( $C_1$ ) para cada FQ fue el 50% de la Concentración Efectiva a las 48 h de exposición (48 h  $EC_{50}$ ) obtenida en los ensayos agudos (Tabla 3.7). Las sucesivas concentraciones se obtuvieron realizando diluciones al 50% hasta obtener resultados aceptables de mortalidades  $\leq 10\%$ , similar a la de los grupos control (OCDE 211, 2012). Los neonatos fueron transferidos a recipientes de vidrio conteniendo 30 mL de medio sintético (cultivo de *D. magna*) al que se agregó diferentes concentraciones de FQ (Tabla 3.8). Para cada concentración de FQ, se utilizaron 10 neonatos. Por tanto, se utilizaron un total de 80-100 neonatos según la molécula ensayada. Tres veces a la semana, *D. magna* se alimentaba con *C. vulgaris*, justo después de que se renovaran las soluciones de exposición. Los valores de pH y oxígeno disuelto se mantuvieron dentro de los rangos propuestos por OCDE 211 (2012). Se registraron datos de mortalidad y crecimiento. La mortalidad se reconoció por la falta de movilidad cuando los contenedores se agitaron de manera circular durante 10 segundos, mientras que el crecimiento se determinó contando el número de mudas de cada cladócero.

**Tabla 3.7:** Concentración efectiva (mg/L) que produce el 10 y 50 de mortalidad en el estudio de toxicidad aguda a 48 h con fluoroquinolonas y *D. magna* (n=20).

Fluoroquinolona	48 h $EC_{10}$	48 h $EC_{50}$
Ciprofloxacina	0,7	7,2
Enrofloxacin	0,4	7,9
Levofloxacina	1,0	19,5
Marbofloxacina	0,3	5,4
Norfloxacina	0,5	8,7
Ofloxacina	4,8	36,0

**Tabla 3.8:** Concentraciones (mg/L) de fluoroquinolonas empleadas en los ensayos crónicos.

<b>Test Crónicos</b>	<b>C<sub>Control</sub></b>	<b>C<sub>1</sub></b>	<b>C<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>3</sub></b>	<b>C<sub>4</sub></b>	<b>C<sub>5</sub></b>	<b>C<sub>6</sub></b>	<b>C<sub>7</sub></b>	<b>C<sub>8</sub></b>	<b>C<sub>9</sub></b>
Ciprofloxacina	0,0	3,60	1,80	0,90	0,45	0,23	0,11	0,06		
Enrofloxacin	0,0	4,00	2,00	1,00	0,50	0,25	0,13	0,06		
Levofloxacin	0,0	10,0	5,00	2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	
Marbofloxacina	0,0	2,70	1,35	0,68	0,34	0,17	0,09			
Norfloxacin	0,0	4,40	2,20	1,10	0,55	0,28	0,14	0,07		
Ofloxacin	0,0	18,00	9,00	4,50	2,25	1,13	0,56	0,28	0,14	0,07

### 3.3.3. Análisis estadístico de los datos

#### Ensayo de toxicidad aguda (48 horas)

Para cada FQ, la EC<sub>50</sub> a las 48 h se calculó mediante el Modelo de Regresión Probit, con un nivel de confianza del 95% (Mala & Dutta, 2019).

#### Ensayo de toxicidad crónica (21 días)

En una primera etapa, para cada concentración de FQ, se calculó la mortalidad relativa y el crecimiento acumulado relativo de *D. magna* durante los 21 días de ensayo, para cada concentración de FQ.

Para evaluar el efecto crónico de las bajas concentraciones de FQ durante un período de tiempo, se utilizó el análisis Probit con interacción. El término de interacción permitió determinar ( $p < 0,05$ ) la magnitud de este efecto crónico. Este modelo permite analizar el efecto que produce bajas concentraciones de FQs durante periodos de exposición prolongados. El análisis estadístico se realizó mediante la opción stepwise del Modelo de Regresión Probit Multivariante contenido en el programa estadístico StatGraphics® Centurion, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Y_{ijk} = \Phi^{-1}(P_{ijk}) = \beta_0 + \beta_1 \cdot t_i + \beta_2 \cdot FQ_j + \beta_{12} \cdot FQ_j \cdot t_i + \epsilon_{ijk} \quad (3.3)$$

Dónde:  $Y_{ijk}$  = Modelo Probit,  $\Phi^{-1}(P_{ijk})$ : Inversa de la función de distribución normal acumulada;  $P_{ijk}$ : Probabilidad de mortalidad (M) o crecimiento acumulativo (G) según el caso.  $\beta_0$ : intercepción;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_{12}$ : coeficientes estimados por el modelo Probit;  $t_i$ : efecto del tiempo de prueba ( $i=0, 3, 6, 9$ ,

12, 15, 18, 21 día).  $FQ_j$ : Efecto de la concentración de fluoroquinolona (mg/L) ( $j= 7, 8, 9$  o  $10$ , según Tabla 3.8).  $FQ_j \cdot t_i$ : Interacción entre la concentración de FQ (mg/L) y el tiempo de ensayo.  $\varepsilon_{ijk}$ : Error residual del modelo.

Posteriormente, se calculó la Concentración con Efecto No Observable (del inglés *No Observable Effect Concentration* - NOEC) para cada FQ como la concentración más alta probada a la cual las curvas analizadas con el Modelo Multivariante Probit no muestran significancia ( $p < 0,05$ ) para cada parámetro registrado (mortalidad o crecimiento).

### **Cociente de riesgo**

El Cociente de Riesgo (del inglés *Risk Quotient* - RQ) para cada FQ se calculó dividiendo las Concentraciones Ambientales Medidas (del inglés *Measured Environmental Concentrations* - MEC) por las Concentraciones Previstas Sin Efecto (del inglés *Predicted No Effect Concentrations* - PNEC) para *Daphnia magna* utilizando la siguiente ecuación:

$$RQ = \frac{MEC}{PNEC} \quad (3.4)$$

Los riesgos se calcularon para diferentes valores de MEC informados en la literatura para varias fuentes de agua superficial, mientras que la PNEC se calculó para cada quinolona dividiendo la NOEC por un factor de evaluación  $AF= 1000$  para la prueba de toxicidad aguda (VICH, 2004) o  $AF= 100$  para Ensayos de toxicidad crónica (EMEA, 2003).

### **3.3.4. Resultados y Discusión**

#### **Ensayos de toxicidad aguda (48 horas):**

En la Tabla 3.7 se presentan los valores de concentraciones efectivas a las 48 horas de exposición que producen el 10% (48 h  $EC_{10}$ ) y 50% (48 h  $EC_{50}$ ) de mortalidad, estimados mediante el método Probit. Se observa el siguiente orden de toxicidad (48 h  $EC_{50}$ ): marbofloxacina (5,4 mg/L) > ciprofloxacina (7,2 mg/L) > enrofloxacina (7,9 mg/L) > norfloxacina (8,7 mg/L) > levofloxacina (19,5 mg/L) > ofloxacina (36,0 mg/L).

Los valores de 48 h  $EC_{50}$  calculados en este estudio (Tabla 3.7) para las pruebas de toxicidad aguda de ciprofloxacina (7,2 mg/L) y enrofloxacina (7,9

mg/L) fueron más bajos que los reportados por otros autores. Por ejemplo, para ciprofloxacina, Dionísio et al. (2020) informan valores de 48 h EC<sub>50</sub> de 36,49 mg/L, mientras que Dalla Bona et al. (2016) presentan un valor aún mayor, 87,14 mg/L para dicha FQ y 16,34 mg/L para enrofloxacin. De manera similar, Park y Choi (2008) informaron valores altos de 48 h EC<sub>50</sub> para enrofloxacin (56,7 mg/L). Por el contrario, para levofloxacin, Yamashita et al. (2006) informaron un valor más bajo (0,34 mg/L) al calculado en este trabajo (19,5 mg/L). Finalmente, Robinson et al. (2005) informaron 48 h NOEC para 10 mg/L de ciprofloxacina y 10 mg/L de levofloxacin, mientras que Halling-Sørensen et al. (2000) tampoco encontraron efecto tóxico al probar 60 mg/L de ciprofloxacina.

Estas diferencias en la EC<sub>50</sub> a las 48 h se pueden atribuir a factores experimentales como la alimentación, la temperatura, el fotoperiodo, la intensidad de la luz, la composición del medio y la dureza del agua, entre otros; ya que influyen en los resultados del bioensayo (de Oliveira et al., 2015).

La toxicidad de las FQ sobre *D. magna* se debe a la inhibición de la enzima topoisomerasa II eucariota que participa en la replicación celular de este cladocero (Hooper & Jacoby, 2016). Al respecto, Nunes et al. (2018) demostraron que concentraciones de 0,013 mg/L de ciprofloxacina inducen efectos genotóxicos en *D. magna*.

Además, las FQ pueden cambiar la conformación de los sitios de unión de los receptores de acetilcolina (Gregory et al., 2007) y permitir la acumulación de estos neurotransmisores en la hendidura sináptica, provocando un aumento de la actividad de la enzima colinesterasa.

Las FQs pueden cambiar o bloquear la conformación de los sitios de unión de los receptores de acetilcolina (Gregory et al., 2007), permitiendo que la acetilcolina se acumule en la hendidura sináptica y, en consecuencia, produzca un aumento de la actividad de la colinesterasa (Andrieu et al., 2015). Asimismo, Dionísio et al. (2020) informan de un aumento en la actividad de la colinesterasa debido a la exposición de *D. magna* a 36,493 mg/L de ciprofloxacina.

Más aun, altas concentraciones de ciprofloxacina (mg/L) pueden causar estrés oxidativo debido a un aumento en la actividad de la enzima catalasa y

posteriormente aumentar la susceptibilidad a las FQs debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (Nunes et al., 2018).

### Ensayos de toxicidad crónica (21 días):

En estos estudios se incluye la evaluación de 2 atributos de vida: mortalidad y crecimiento.

#### Mortalidad y crecimiento

En Tabla 3.9 se exponen las ecuaciones Probit que expresan los efectos de las FQs sobre los atributos de vida de *D. magna* (mortalidad relativa acumulada y crecimiento relativo acumulado) para aquellos efectos significativos ( $p < 0,05$ ). Los ajustes obtenidos mediante el Modelo Probit con interacción (Ec. 3.3) fueron buenos, ya que los coeficientes de regresión se incluyen entre  $R = 0,955$  (efecto de levofloxacina sobre el crecimiento) y  $R = 0,879$  (efecto de marbofloxacina sobre la mortalidad), indicando la adecuación de este modelo de regresión multivariante Probit.

**Tabla 3.9:** Mortalidad relativa acumulada y crecimiento relativo acumulado (número de mudas) de *D. magna* expuesta a seis FQs.

<b>Mortalidad</b>	<b>Probit= <math>\beta_{0,M} + \beta_{1,M} \cdot t + \beta_{12,M} \cdot t \cdot FQ</math></b>	<b>R</b>
Ciprofloxacina	Probit= $-1,7269 + 0,0375 \cdot t + 0,1054 \cdot t \cdot FQ$	0,908
Enrofloxacin	Probit= $-1,9287 + 0,0461 \cdot t + 0,1743 \cdot t \cdot FQ$	0,922
Levofloxacina	Probit= $-2,2581 + 0,0731 \cdot t + 0,0427 \cdot t \cdot FQ$	0,898
Marbofloxacina	Probit= $-1,9555 + 0,0626 \cdot t + 0,1283 \cdot t \cdot FQ$	0,879
Norfloxacina	Probit= $-2,9676 + 0,0897 \cdot t + 0,0435 \cdot t \cdot FQ$	0,927
Ofloxacina	Probit= $-3,4177 + 0,1234 \cdot t + 0,0341 \cdot t \cdot FQ$	0,937
<b>Crecimiento</b>	<b>Probit= <math>\beta_{0,G} + \beta_{1,G} \cdot t + \beta_{12,G} \cdot t \cdot FQ</math></b>	<b>R</b>
Ciprofloxacina	Probit= $-1,6741 + 0,1481 \cdot t - 0,0298 \cdot t \cdot FQ$	0,950
Enrofloxacin	Probit= $-1,7217 + 0,1315 \cdot t - 0,0333 \cdot t \cdot FQ$	0,942
Levofloxacina	Probit= $-1,6930 + 0,1784 \cdot t - 0,0093 \cdot t \cdot FQ$	0,955
Marbofloxacina	Probit= $-1,6017 + 0,1426 \cdot t - 0,0266 \cdot t \cdot FQ$	0,924
Norfloxacina	Probit= $-1,6707 + 0,1773 \cdot t - 0,0137 \cdot t \cdot FQ$	0,951
Ofloxacina	Probit= $-1,6115 + 0,1484 \cdot t - 0,0014 \cdot t \cdot FQ$	0,945

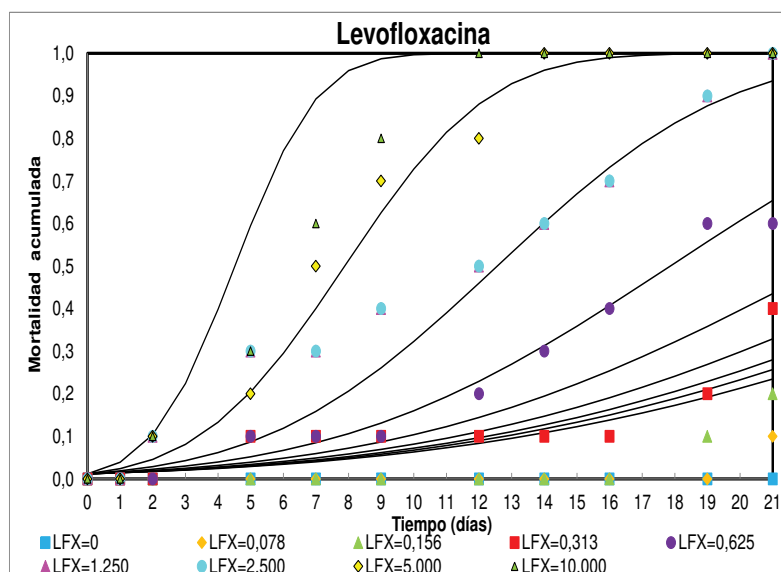
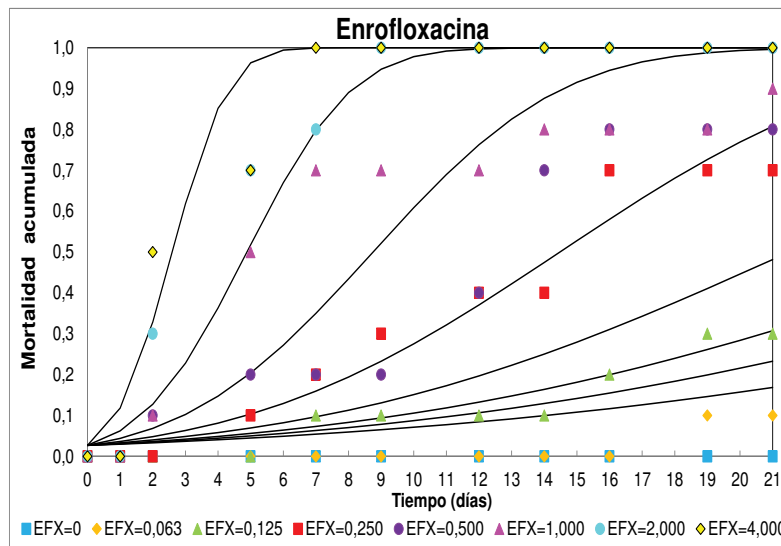
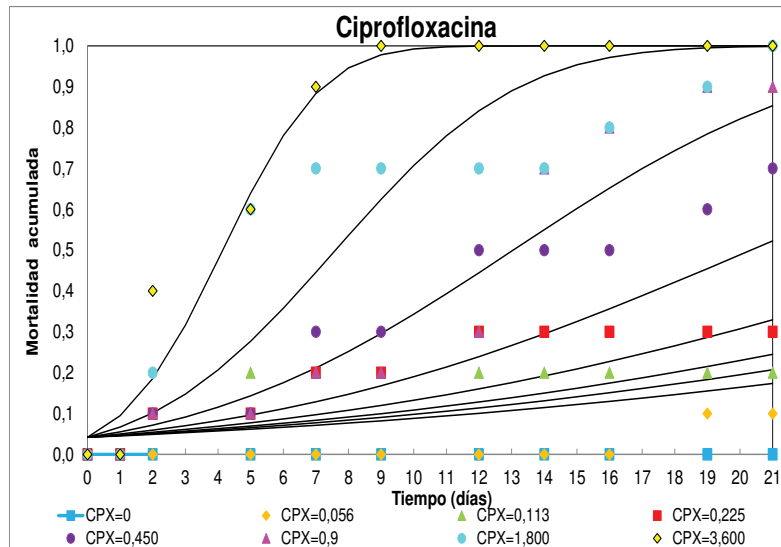
$\beta_0$ : intersección;  $\beta_1$ ,  $\beta_{12}$ : coeficientes estimados; t: tiempo de prueba (días); FQ: concentración de fluoroquinolona (mg/L); t · FQ: interacción entre el tiempo de prueba y la concentración de FQ; M: mortalidad relativa acumulada; G: crecimiento relativo acumulado; R: coeficiente de regresión.

Esta tabla indica un efecto positivo del tiempo de exposición ( $\beta_1 > 0$ ) sobre el desarrollo de los cladóceros, ya que el número de organismos aumenta según el tiempo de exposición. Además, el efecto de la concentración de estos FQ ( $\beta_2$ ) no fue significativo ( $p > 0,05$ ) para ambos atributos de vida. Esto se debe a que, las diluciones sucesivas utilizadas en el estudio, fueron inferiores a las concentraciones empleadas en las pruebas agudas (concentraciones inferiores a 48 h  $EC_{50}$ ). Sin embargo, el efecto crónico de las FQ ( $p < 0,05$ ) se evidenció por su interacción con el tiempo (FQ.t) tanto para la mortalidad como para el crecimiento.

De hecho, la acción inhibitoria de las FQs se visualiza aumentando la mortalidad en la medida en que *D. magna* es expuesta a bajas concentraciones de FQ durante tiempos prolongados ( $\beta_{12} > 0$ ). La suma de esta interacción positiva en el modelo Probit produce un aumento en la mortalidad acumulada relativa de *D. magna*. Por el contrario, el coeficiente de crecimiento  $\beta_{12,G}$  es negativo ( $\beta_{12,M} < 0$ ). Esta interacción negativa del modelo produce una disminución de la frecuencia relativa acumulada con respecto al grupo de control. Debido a que los coeficientes  $\beta_{12,M}$  son mayores que los valores de  $\beta_{12,G}$ , la mortalidad es un atributo mejor que el crecimiento, ya que muestra una mayor sensibilidad a las FQ durante períodos de tiempo prolongados (estudio de toxicidad crónica).

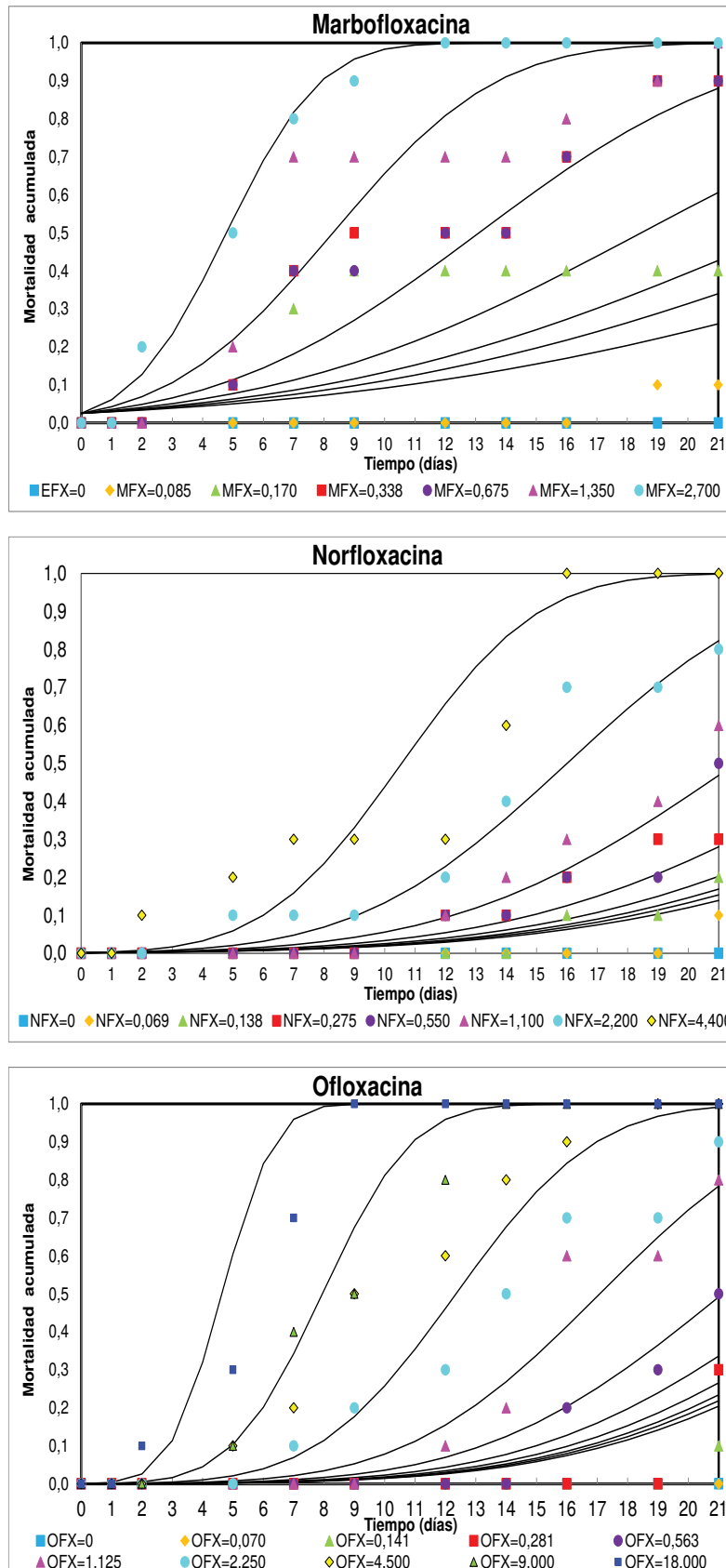
Cabe señalar que la magnitud del parámetro " $\beta_{12,M}$ " indica la ecotoxicidad de las FQ en tiempos prolongados. Este coeficiente es mayor para la enrofloxacin ( $\beta_{12,M} = 0,1743$ ), seguida de la marbofloxacin ( $\beta_{12,M} = 0,1283$ ), ciprofloxacin ( $\beta_{12,M} = 0,1054$ ), norfloxacin ( $\beta_{12,M} = 0,0435$ ), levofloxacin ( $\beta_{12,M} = 0,0427$ ) y ofloxacin ( $\beta_{12,M} = 0,0341$ ), como se observa en la Tabla 3.9.

Para visualizar estos efectos significativos, se realizaron la Fig. 3.9 (mortalidad relativa) y la Fig. 3.10 (crecimiento acumulado) que muestran los efectos significativos ( $p < 0,05$ , Tabla 3.10) de las FQs sobre atributos de historia de vida de *D. magna*, expuestas a diferentes concentraciones utilizando el Modelo de Regresión Multivariante Probit. Se observa en la Fig. 3.9 que la presencia de FQs provocó un aumento significativo en mortalidad respecto al control ( $p < 0,05$ ) de forma sinérgica entre la concentración de FQ y el tiempo de exposición a los mismos.

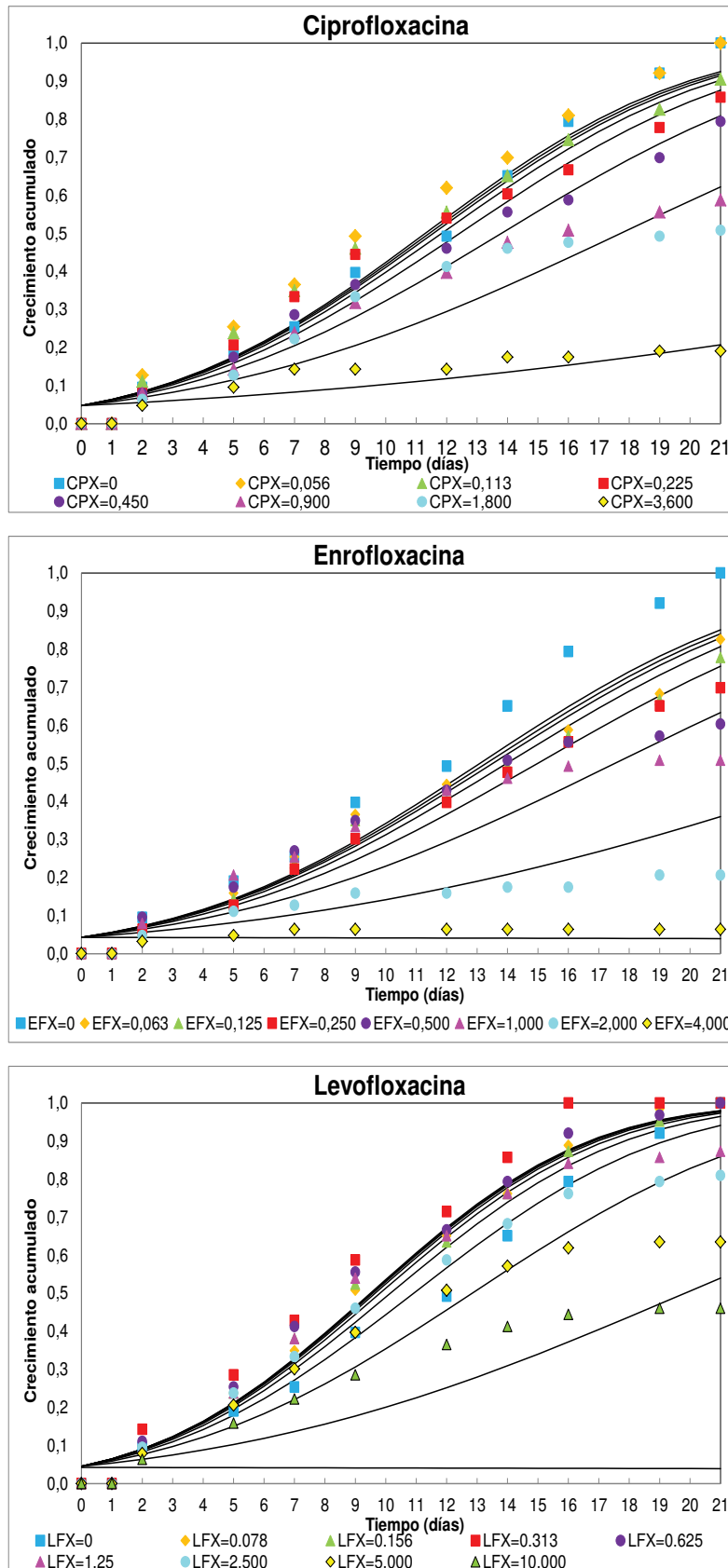


**Fig. 3.9:** Mortalidad relativa de *D. magna* debido a la presencia de seis fluoroquinolonas a diferentes concentraciones (mg/L)

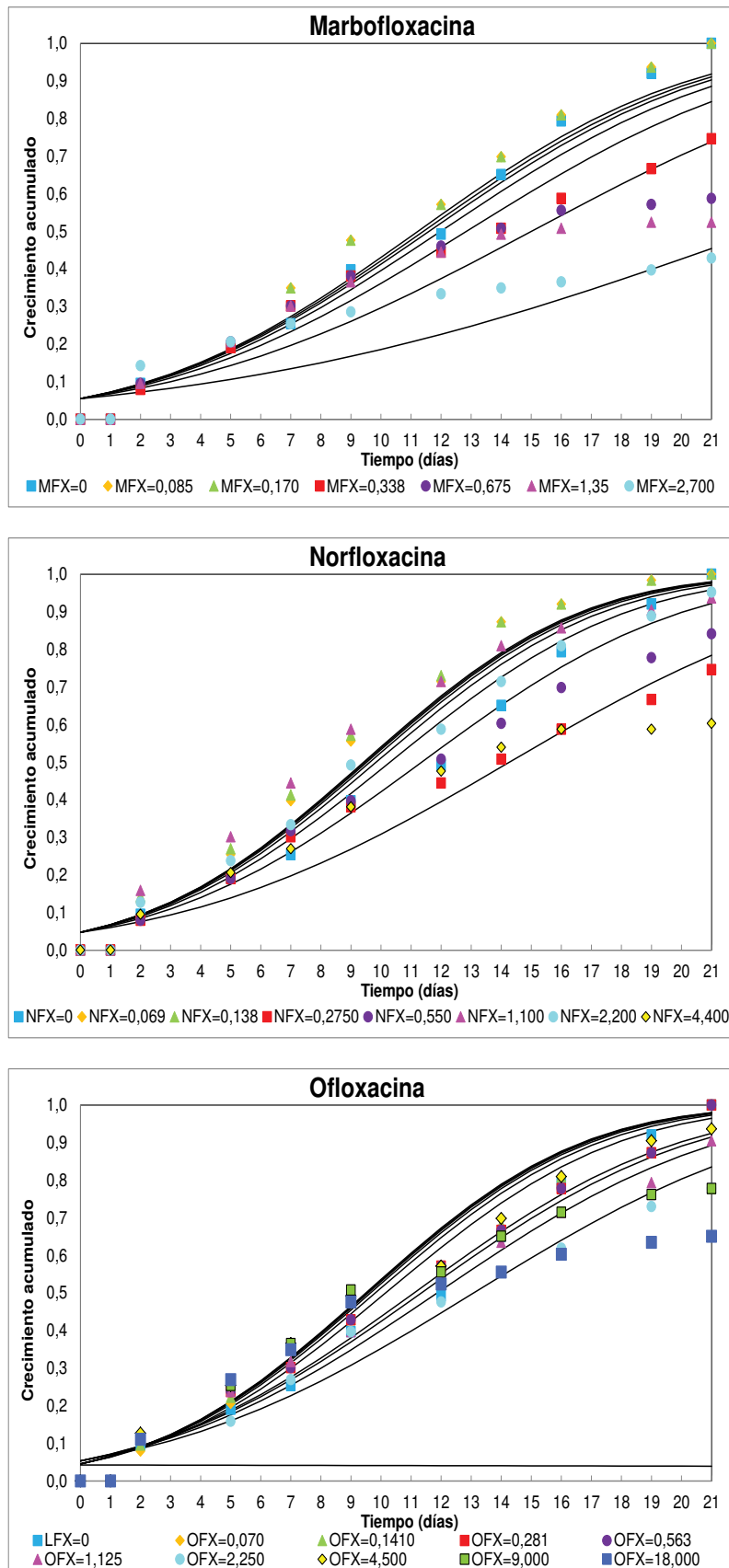




**Fig. 3.9** (continuación): Mortalidad relativa de *D. magna* debido a la presencia de seis fluoroquinolonas a diferentes concentraciones (mg/L)



**Fig. 3.10:** Crecimiento acumulado relativo (número de mudas acumuladas) de *D. magna* debido a la presencia de seis fluoroquinolonas a diferentes concentraciones (mg/L).



**Fig. 3.10** (continuación): Crecimiento acumulado relativo (número de mudas acumuladas) de *D. magna* debido a la presencia de seis fluoroquinolonas a diferentes concentraciones (mg/L).

Con respecto al crecimiento de cladóceros, la Fig. 3.10 muestra una disminución en la frecuencia de mudas acumuladas con aumentos del tiempo y de la concentración de FQ. Corresponde remarcar que bajas concentraciones de FQs producen poco efecto sobre las frecuencias de crecimiento acumuladas debido a  $\beta_{12,G} < 0$ . Por el contrario, las curvas de frecuencia de mortalidad acumulada muestran pequeños aumentos con las concentraciones de FQ debido a  $\beta_{12,M} > 0$ . Por ende, las curvas de mortalidad son más sensibles que las curvas de crecimiento. Por lo tanto, los valores de NOEC se calcularon utilizando las curvas de mortalidad determinadas en el estudio crónico.

Solo unos pocos estudios han evaluado la toxicidad crónica de algunas moléculas de FQ (ciprofloxacina, enrofloxacina y levofloxacina) en *D. magna*. Al respecto, cabe mencionar que el valor encontrado para ciprofloxacina (NOEC/21-d= 0,056 mg/L fue similar a 0,054 mg/L reportado por Wolfe et al. (2015). Con respecto a enrofloxacina, la concentración que causó la NOEC/21-d (0,063 mg/L) en este trabajo fue menor que la reportada por Park & Choi (2008) (11,5 mg/L) y la encontrada por Dalla Bona et al. (2015) (13 mg/L) para una mortalidad del 100%. El valor NOEC/21-d de levofloxacina (0,156 mg/L) está entre 0,059 mg/L (Wolfe et al., 2015) y 0,340 mg/L (Yamashita et al., 2006).

Además, Dionisio et al. (2020) destacaron que niveles bajos de ciprofloxacina (0,0125-0,0625 mg/L) produjeron daño en la membrana neuronal debido a un aumento de sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). Del mismo modo, Nunes et al. (2018) reportan un aumento en los niveles de TBARS en adultos expuestos a 0,078 mg/L de ciprofloxacina (concentración en el rango 0,056-3,600 mg/L, Tabla 3.8 de este trabajo) causando una disminución en la defensa antioxidante de *D. magna*.

Para las otras tres FQs analizadas, las NOEC (Tabla 3.10) calculadas para marbofloxacina (0,085 mg/L) y norfloxacina (0,069 mg/L) fueron similares a las obtenidas para enrofloxacina (0,063 mg/L), ciprofloxacina (0,056 mg/L) y levofloxacina (0,078 mg/L), a excepción de la ofloxacina que presentó una NOEC más alta (0,141 mg/L). Cabe señalar que los valores NOEC para estos tres FQ no se encontraron en la bibliografía consultada.

Los parámetros NOEC se calcularon aplicando las ecuaciones del Modelo Probit (Ec. 3.3, Tabla 3.9) como las concentraciones que no producen

diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para ciprofloxacina, enrofloxacin, marbofloxacina, norfloxacina ( $\chi^2 = 2,8946$ ;  $p = 0,0889$ ) y levofloxacina, ofloxacina ( $\chi^2 = 1,4361$ ;  $p = 0,2308$ ), como se muestra en la Tabla 3.10.

**Tabla 3.10:** Parámetros ( $\mu\text{g/L}$ ) del estudio de ecotoxicidad aguda y crónica de fluoroquinolonas con *D. magna*.

Fluoroquinolona	Test Agudo		Test Crónico	
	EC <sub>50</sub>	PNEC <sup>a</sup>	NOEC	PNEC <sup>b</sup>
Ciprofloxacina	7200	7,2	56	0,56
Enrofloxacin	7900	7,9	63	0,63
Levofloxacina	19500	19,5	78	0,78
Marbofloxacina	5400	5,4	85	0,85
Norfloxacina	8700	8,7	69	0,69
Ofloxacina	36000	36	141	1,41

<sup>a</sup>: PNEC: concentración prevista sin efecto para *D. magna* en un estudio agudo utilizando un factor de evaluación (AF = 1000) según VICH (2004)

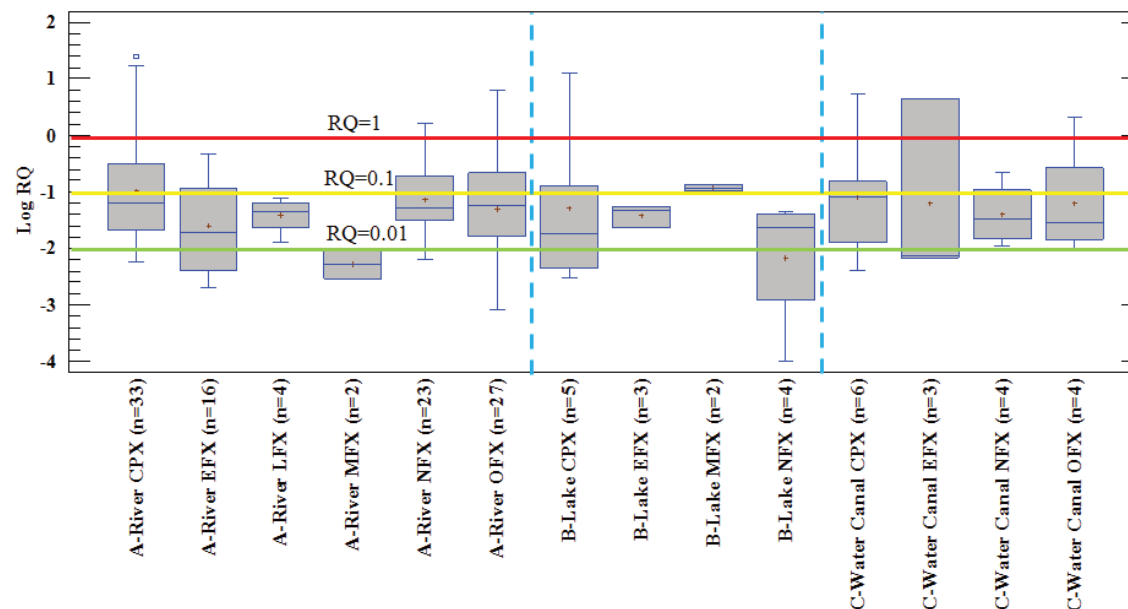
<sup>b</sup>: PNEC: concentración prevista sin efecto para *D. magna* en un estudio crónico utilizando un factor de evaluación (AF = 100) según EMEA (2003).

Los valores de PNEC se calcularon en las pruebas agudas (48 h EC<sub>50</sub>, AF= 1000) y crónica (NOEC, AF= 100) para ciprofloxacina (7,2  $\mu\text{g/L}$  frente a 0,56  $\mu\text{g/L}$ ), enrofloxacin (7,9  $\mu\text{g/L}$  frente a 0,63  $\mu\text{g/L}$ ), levofloxacina (19,5  $\mu\text{g/L}$  frente a 0,78  $\mu\text{g/L}$ ), marbofloxacina (5,4  $\mu\text{g/L}$  frente a 0,85  $\mu\text{g/L}$ ), norfloxacina (8,7  $\mu\text{g/L}$  frente a 0,69  $\mu\text{g/L}$ ) y ofloxacina (36  $\mu\text{g/L}$  frente a 1,41  $\mu\text{g/L}$ ), respectivamente.

Debido a que los PNEC de los ensayos crónicos fueron inferiores que los de los ensayos agudos, para el cálculo de los cocientes de riesgo en muestras de agua de diferentes fuentes se dichos valores.

### Cociente de riesgo

Para evaluar los riesgos que presentan las FQ en *D. magna*, se determinó el RQ utilizando la PNEC de las seis FQs analizadas (Tabla 3.10) y las MEC reportadas para 51 muestras de ríos, 6 canales de agua y 6 lagos. La Fig. 3.11 muestra los *BoxPlots* de las transformaciones logarítmicas de los RQ (Log RQ) para el agua de los ríos, lagos y canales. En esta figura, se observan tres zonas de riesgo: riesgos altos con  $\text{RQ} > 1$  ( $\text{Log RQ} > 0$ ), riesgos moderados con  $0,1 < \text{RQ} < 1$  ( $-1 < \text{Log RQ} < 0$ ) y riesgos bajos con  $\text{RQ} < 0,1$  ( $\text{Log RQ} < -1$ ).



**Fig. 3.11:** Diagramas de caja de transformación logarítmica del cociente de riesgo (Log RQ) de seis fluoroquinolonas en río (river), lago (lake) y canal de agua (canal).

CPX: ciprofloxacina, EFX: enrofloxacina, LFX: levofloxacina, MFX: marbofloxacina, NFX: norfloxacina, OFX: ofloxacina, n: número de muestras que contienen cada FQ, RQ: cociente de riesgo.

**Datos obtenidos de:** **Río:** Agunbiade y Moodley (2016), Azanu et al. (2018), Chitescu et al. (2015), Christian et al. (2003), Coetsier et al. (2009), Conley et al. (2008), Costanzo et al. (2005), Dinh et al. (2011), Feitosa-Felizzola y Chiron (2009), García-Galán et al. (2011), Ginebreda et al. (2010). Golet y col. (2009). Gros y col. (2010). Gulkowska y col. (2007), Guruge et al. (2019), Hanna et al. (2018), Huang et al (2019), Huang et al. (2020), Li et al. (2012), López-Roldán et al (2010), López-Serna et al. (2011), Luo et al. (2011), Lyu et al. (2020), Madikizela et al. (2017), Minh et al. (2009), Mirzaei et al. (2018), Olaitan et al. (2014), Pena et al. (2007), Rao et al. (2008), Sturini et al. (2009), Tamtam et al. (2008), Teglia et al. (2019), Tong et al. (2011), Valcárcel et al. (2011), Valdés et al. (2014), Vieno et al. (2006), Vulliet y Cren-Olivé (2011), Watkinson et al. (2009), Wei et al. (2012), Wolfe et al. (2015), Xiao et al. (2008), Xu et al. (2007b), Xu et al. (2020), Yan et al. (2010), Yang et al. (2011), Yao et al. (2017), Zang et al. (2012), Zheng et al. (2021), Zou et al. (2011) y Zuccato et al. (2005). **Lago:** Sodré et al. (2010), Duong et al. (2021), Fick et al. (2009), Rao et al. (2008), Sturini et al. (2009) y Tong et al. (2011). **Agua de canal:** Golet et al. (2002), Li et al. (2012), Tewari et al. (2013), Tran et al. (2019), Vazquez-Roig et al. (2012) y Yan et al. (2010).

Los RQ para *D. magna* calculados para concentraciones de FQs presentes en muestras de agua de río (Fig. 3.11) tienen rangos de 0,06-25,53 para ciprofloxacina (con 6 muestras de RQ>1), 0,02-0,48 para enrofloxacin, 0,003-0,010 para marbofloxacina, 0,01-0,05 para levofloxacina, 0,06-1,67 para norfloxacina (con 1 muestra de RQ>1) y 0,01-6,22 para ofloxacina (con 1 muestra de RQ>1). En general, estas muestras presentan riesgos moderados y bajos para *D. magna*, ya que el 50% de los riesgos se encuentran entre Log RQ= -2 (RQ= 0,01) y Log RQ= -1 (RQ= 0,1).

Cabe señalar que la ciprofloxacina presenta altos riesgos en 6 aguas fluviales (18,2%) de Australia (Watkinson et al., 2009), Francia (Feitosa-Felizzola & Chiron, 2009), Ghana (Azanu et al., 2018), Irán (Mirzaei et al., 2018), Nigeria (Olaitan et al., 2014) y Sudáfrica (Agunbiade & Moodley, 2016). Además, las moléculas de norfloxacina (4,3%; 1/23) y ofloxacina (7,4%; 2/27) representan un alto riesgo (RQ>1) para las muestras de agua de río de Australia (Watkinson et al., 2009) y España (Ginebreda et al., 2010; López-Roldán et al., 2010), respectivamente. Por el contrario, debido a las bajas concentraciones reportadas, se presentan riesgos bajos para levofloxacina (RQ: 0,013-0,076) y marbofloxacina (RQ: 0,003-0,010) en países como China (Xu et al., 2020; Zheng et al., 2021), Kenia (Madikizela et al., 2017) y EEUU (Conley et al., 2008; Wolfe et al., 2015).

Marbofloxacina está presente en bajas frecuencias en muestras de ríos (3,9%, 2/51) y lagos (16%, 1/6) analizados en la Figura 3.11 y que proviene principalmente del tratamiento de enfermedades de los cerdos (Zeng et al., 2017) y vacas lecheras (Lhermie et al., 2017).

En seis muestras de agua de lago en Patancheru en India (Fick et al., 2009), la ciprofloxacina presenta un alto riesgo (RQ = 4,46) para *D. magna* debido a su alta concentración (2,5 µg/L) reportada. Esta alta contaminación se puede atribuir a la presencia de una industria farmacéutica cerca del lago.

Con respecto a las aguas del canal, solo la muestra de los canales de Hanoi (Vietnam) presenta un alto riesgo para ciprofloxacina (RQ= 5,420, 3,04 µg/L), enrofloxacin (RQ= 4,554, 2,869 µg/L) y ofloxacina (RQ= 2,033, 2,867 µg/L). Cabe destacar que Hanoi (Vietnam) es la segunda ciudad más poblada con más de 7,6 millones de habitantes (Tran et al., 2019).

Debido a los altos riesgos de FQs en aguas de ríos, lagos y canales, se decidió analizar los RQ de las seis moléculas de Aguas Residuales Urbanas (del inglés *Urban Wastewater* - UWW), Aguas Residuales Hospitalarias (del inglés *Hospital Wastewater* - HWW) y Agua de Acuicultura (del inglés *Aquaculture water* - AW) porque estas muestras de agua pueden contener altas concentraciones de estos ATBs. Para esto, la Fig. 3.12 presenta un *Boxplots* de la transformación Logarítmica del Cociente de Riesgo (Log RQ) calculado para FQs presentes en 65 UWW, 20 HWW y 15 AW muestras de diferentes países y los valores de PNEC calculados en este estudio (Tabla 3.10).

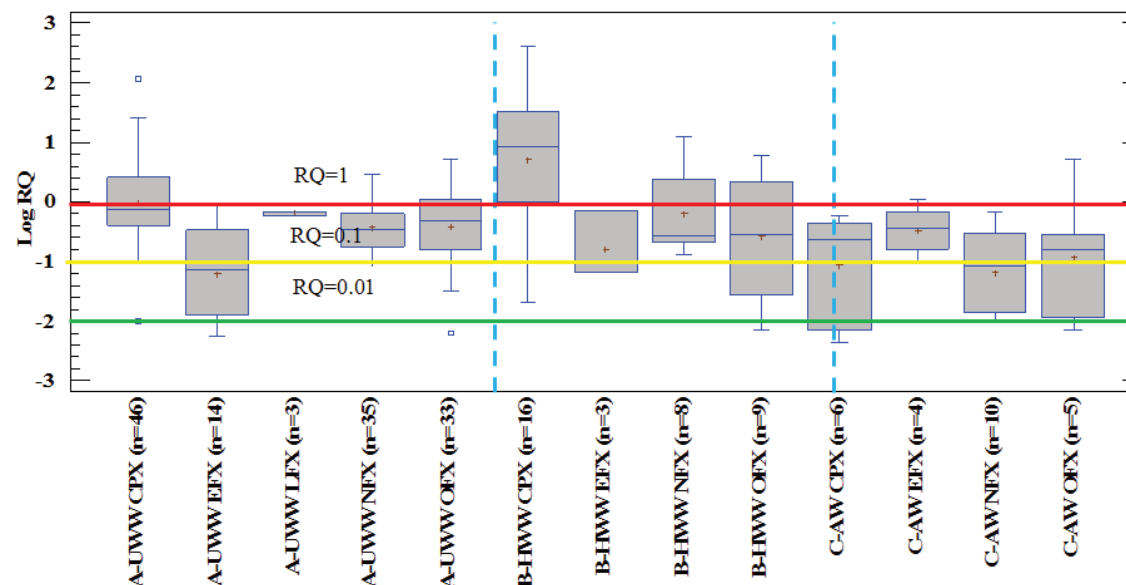
En la Fig. 3.12 se muestra que los ATBs con riesgo alto ( $RQ > 1$ ) son ciprofloxacina (43,5%; 20/46), seguida de norfloxacina (20,0%; 7/35) y ofloxacina (30,3%; 10/33), mientras que enrofloxacina, levofloxacina y marbofloxacina presentan riesgos moderados y bajos de 67 muestras de UWW. También, en muestras de aguas residuales hospitalarias (HWW), ciprofloxacina (75%; 12/16), norfloxacina (37,5%; 3/8) y ofloxacina (44,4%; 4/9) presentan valores de riesgo alto para *D. magna*. Finalmente, las muestras de agua de acuicultura presentan valores de riesgo bajo.

La Fig. 3.12 expone que ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina tienen RQ más altos en muestras de aguas residuales de hospitales que en aguas residuales urbanas. Además, Verlicchi et al. (2010) y Van Doorslaer et al. (2014) señalan que las concentraciones de estas quinolonas son 8-10 y 30 veces mayores en HWW que en UWW, respectivamente.

Los RQ calculados a partir de 15 muestras de agua de acuicultura (AW) son bajos (Fig. 3.12), excepto por dos muestras de Vietnam que contienen enrofloxacina ( $RQ = 1,08$ ; 0,680  $\mu\text{g/L}$ , Andrieu et al., 2015) y ofloxacina ( $RQ = 5,25$ ; 7,40  $\mu\text{g/L}$ , Takasu et al., 2009).

En relación a la contaminación con FQ de aguas residuales de ganado (LWW), Zhi et al. (2018) analizaron residuos de medicamentos veterinarios en el agua de una granja de cerdos y dos granjas de ganado lechero en el norte de Tianjin (China). Estos autores reportan concentraciones elevadas de ciprofloxacina (13,56  $\mu\text{g/L}$ ;  $RQ = 24,214$ ), enrofloxacina (1,69  $\mu\text{g/L}$ ;  $RQ = 2,68$ ) y ofloxacina (10,46  $\mu\text{g/L}$ ;  $RQ = 7,42$ ) en las aguas residuales de la granja porcina, mientras que las concentraciones de FQs en las granjas de ganado lechero son bajas.





**Fig. 3.12:** Diagramas de caja de transformación logarítmica del cociente de riesgo (Log RQ) de seis fluoroquinolonas en aguas residuales urbanas (del inglés urban wastewater - UWW), aguas residuales hospitalarias (del inglés hospital wastewater - HWW) y aguas de acuicultura (del inglés aquaculture waters - AW)

CPX: ciprofloxacina, EFX: enrofloxacina, LFX: levofloxacina, MFX: marbofloxacina, NFX: norfloxacina, OFX: ofloxacina, n: número de muestras que contienen cada FQ, RQ: Cociente de riesgo.

**Datos obtenidos de:** **UWW:** Agunbiade y Moodley (2016), Alexy et al. (2006), Azanu et al. (2018), Batt y col. (2007), Bernabeu et al. (2011), Blair et al. (2013), Brown et al. (2006), Costanzo et al. (2005), Cui et al. (2011), Dan y col. (2020), Danner et al. (2019), Deblonde et al. (2011), Dólar et al. (2012), Ferdig y col. (2005), Gao et al. (2012), Golet et al. (2001), Golet et al. (2002), Golet et al. (2003), Gracia-Lor et al. (2012), Gros et al. (2009), Gulkowska et al. (2008), Huang et al. (2019), Jia et al. (2012), Karthikeyan y Meyer (2006), Kurasam et al. (2018), Leung et al. (2012), Li et al. (2009), Li et al. (2013), Lin et Alabama. (2008), Lin et al. (2009), Lindberg et al. (2005), Martins y col. (2008), Miège et al. (2009), Oliver et al. (2020), Peng et al. (2006), Reverté et al. (2003), Rodríguez-Mozaz et al. (2015), Rosal et al. (2010), Segura y col. (2007), Seifrtová et al. (2008), Senta et al. (2008), Senta et al. (2013), Shi et al. (2009), Sim et al. (2010), Sim et al. (2011), Sponberg y Witter (2008), Takasu et al. (2011), Teijon et al. (2010), Terzić et al. (2008), Tewari et al. (2013), Thomas et al. (2007), Tong et al. (2011), Verlicchi et al. (2012a), Verlicchi et al. (2012b), Vieno et al. (2006), Vieno et al. (2007), Walraven y Laane (2009), Watkinson et al. (2007), Watkinson et al. (2009), Wei et al. (2012), Xiao et al. (2008), Xu et al. (2007a), Yang et al. (2011), Yasojima et al. (2006) y Zorita et al. (2009). **HWW:** Watkinson et al. (2009), Ahmed (2017), Ajibola et al. (2021), Azanu et al. (2018), Brown et al. (2006), Castiglioni et al. (2005), Duong et al. (2008), Hartmann y col. (1998), Jarnheimer et al. (2004), Jiang et al. (2011), Lin et al. (2008), Lindberg et al. (2004), Mitani y Kataoka (2006), Rodríguez-Mozaz et al. (2015), Rodríguez-Silva et al. (2019), Seifrtová et al. (2008), Thomas et al. (2007), Verlicchi et al. (2012b), Yang et al. (2011) y Zorita et al. (2009). **AW:** Andrieu y col. (2015), Costanzo et al. (2005), Giang et al. (2015), Gulkowska et al. (2007), He et al. (2012), He et al. (2012), Ikem et al. (2017), Le y Munekage (2004), Lin et al. (2008), Takasu et al. (2009), Takasu et al. (2009), Tuan et al. (2004), Xu et al. (2007), Zou et al. (2011).

La limitada cantidad de investigación que analizan los niveles de FQs en la cría de animales y las altas concentraciones reportadas en este trabajo, sugieren la necesidad de realizar más estudios sobre la contaminación debida al tratamiento veterinario del ganado.

Los RQ calculados a partir de 15 muestras de agua de acuicultura (AW) son bajos (Fig. 3.12), excepto por dos muestras de Vietnam que contienen enrofloxacina (RQ= 1,08; 0,680 µg/L, Andrieu et al., 2015) y ofloxacina (RQ = 5,25; 7,40 µg/L, Takasu et al., 2009).

Con respecto a la contaminación con FQ de aguas residuales de ganado (LWW), Zhi et al. (2018) analizaron residuos de medicamentos veterinarios en el agua de una granja de cerdos y dos granjas de ganado lechero en el norte de Tianjin (China). Estos autores reportan concentraciones elevadas de ciprofloxacina (13,56 µg/L; RQ= 24,214), enrofloxacina (1,69 µg/L; RQ= 2,68) y ofloxacina (10,46 µg/L; RQ= 7,42) en las aguas residuales de la granja porcina, mientras que las concentraciones de FQs en las granjas de ganado lechero son bajas. La limitada cantidad de investigación que analizan los niveles de FQs en la cría de animales y las altas concentraciones reportadas en este trabajo, sugieren la necesidad de realizar más estudios sobre la contaminación debida al tratamiento veterinario del ganado.

Finalmente, considerando que las FQ se metabolizan entre un 30% (norfloxacina) y un 70% (ofloxacina) según Kümmerer y Henninger (2003), la ecotoxicidad de los efluentes podría ser aún peor debido a los metabolitos de estas FQs en aguas dulces superficiales (Ahmed, 2017).

### **3.3.5. Conclusiones**

En resumen, el presente estudio establece que concentraciones de seis fluoroquinolonas entre 56 µg/L (ciprofloxacina) y 141 µg/L (ofloxacina) producen importantes efectos crónicos sobre la mortalidad de *D. magna*. En general, las concentraciones de estos antibióticos reportados en aguas de ríos y lagos presentan riesgos moderados. Sin embargo, los niveles de ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina en aguas residuales urbanas y aguas residuales hospitalarias constituyen una amenaza para *D. magna*, ya que pueden producir tanto Riesgos moderados y altos.

## Capítulo 4

---

## **CAPÍTULO 4: Inhibición de *Kluyveromyces marxianus* por antibióticos**

El lactosuero puede emplearse para la producción de biomasa de levaduras. No obstante, la presencia de ATBs inhibir su desarrollo. En efecto, con la intención de emplear lactosuero contaminado con ATBs para la producción de *K. marxianus*, se utilizó un bioensayo en placas de microtitulación para evaluar la posible acción inhibitoria de 27 ATBs (aminoglucósidos, betalactámicos, macrólidos, quinolonas, tetraciclinas y sulfonamidas) sobre el crecimiento de dicha levadura. A continuación analizando el crecimiento de *K. marxianus* y el consumo de lactosa en lactosuero enriquecido con ATBs, se investigó el efecto del tiempo de tratamiento térmico (120°C) sobre su degradación.

## **4.1. Actividad inhibitoria de antibióticos en lactosuero sobre el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus*.**

### **4.1.1. Introducción**

Los antibióticos se utilizan ampliamente para tratar diferentes enfermedades del ganado lechero. Como consecuencia, la leche que contiene residuos de antibióticos (ATBs) en concentraciones cercanas a los Límites Máximos de Residuos (LMR) puede ingresar a las empresas lácteas y estos residuos de ATBs pueden permanecer en subproductos lácteos como el lactosuero (Giraldo et al., 2017).

Entre los diversos usos industriales del lactosuero, es importante destacar la producción de biomasa (Lavari et al., 2014) mediante procesos fermentativos con levaduras, preferiblemente con *Kluyveromyces marxianus* (Díaz-Vergara et al., 2017). Sin embargo, los residuos de antibióticos en el lactosuero en concentraciones cercanas a los LMR podrían inhibir los procesos fermentativos de *K. marxianus*.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la posible inhibición de *K. marxianus* debido a los ATBs presentes en lactosuero, mediante un bioensayo rápido, sencillo y de bajo costo, considerando la hipótesis de que al menos un ATB (aminoglucósido, betalactámico, macrólido, quinolona, tetraciclina o sulfonamida) pueda provocar inhibición del desarrollo de *K. marxianus*.

### **4.1.2. Materiales y Métodos**

Se desarrolló un bioensayo de inhibición de levaduras en placas de microtitulación según los siguientes apartados:

#### **4.1.2.1. Levadura**

Se utilizó *K. marxianus* (ATCC 8554) suministrada por la colección de cepas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química (Universidad Nacional del Litoral). El medio de propagación se fortificó con 0,5% de extracto de levadura (Merck Millipore, EEUU), 3% de peptona de caseína (Biokar Diagnostics, Francia) y 20% de la suspensión de *K. marxianus*.

#### **4.1.2.2. Medio de cultivo con levadura**

Se empleó lactosuero libre de ATBs, desproteinizado por tratamiento térmico a 120°C-20 min, seguido de centrifugación y posterior filtración de proteínas precipitadas (Eluk et al., 2019). Este medio se fortificó con extracto de levadura al 0,5% m/V (5 g/L, Merck Millipore, EEUU), peptona de caseína al 3% m/V (30 g/L, Biokar Diagnostics, Francia), una suspensión de *K. marxianus* al 20% m/V en fase exponencial, 50 mg/L de azul de bromotimol. El pH se ajustó a 7 con NaOH 1 M. El azul de bromotimol es un indicador ácido-base que permite visualizar el cambio de pH (viraje del azul a amarillo) del medio de cultivo debido al efecto fermentativo de la levadura.

#### **4.1.2.3. Soluciones aditivadas con antibióticos en medio de cultivo**

Se prepararon disoluciones acuosas (1000 mg/L) de 27 ATBs (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Se utilizaron aminoglucósidos: streptomina (S9137), neomicina (N1876) y kanamicina (1355006); betalactámicos: penicilina (13752), amoxicilina (A8523), ampicilina (A9393), cloxacilina (C9393), oxacilina (28221), cefadroxil (C7020), cefalexina (C-4895), cefoperazone (C-4292), ceftiofur (34001) y cefuroxima (C4417); macrólidos: eritromicina (E1300000), tilmicosina (33864) y tilosina (1703805); quinolonas: enrofloxacina (Y0001259), ciprofloxacina (17850-F), marbofloxacina (Y0000819) y norfloxacina (N9890); tetraciclinas: clortetraciclina (C-4881), oxitetraciclina (O-5750) y tetraciclina (T-3258); sulfonamidas: sulfadiazina (S8626), sulfadimetoxina (S7007), sulfametoxazol (S7507) y sulfatiazol (292907).

#### **4.1.2.4. Bioensayo de inhibición de levaduras**

El medio de cultivo preparado previamente se fraccionó en 12 alícuotas, que se suplementaron con diferentes disoluciones de ATB (1 mg/L) de modo tal de obtener las concentraciones que se exponen en la Tabla 4.1.

Se utilizaron dos placas de microtitulación para cada ATB y se ensayaron 16 réplicas de las 12 soluciones en lactosuero. En cada pocillo de las placas de microtitulación, se añadieron 200 µL de solución de medio con antibiótico utilizando un dispensador electrónico (Eppendorf Research® Pro, Hamburgo, Alemania). Las placas se incubaron a 40°C durante 6 h, hasta que el color de los controles negativos cambió de azul a amarillo.

Posteriormente, se midieron las absorbancias a 450 nm con un lector Biotek ELx800TM (BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, EEUU) y se calcularon las absorbancias relativas en cada bioensayo.

**Tabla 4.1:** Concentraciones de antibióticos (mg/L) empleadas en los ensayos.

<b>Antibióticos</b>		<b>Concentraciones (mg/L)</b>												
Aminoglú- cidos	Estreptomicina	0,0	0,10	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	
	Kanamicina	0,0	0,10	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	
	Neomicina	0,0	0,10	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	
Betalactámicos	Penicilina G	0,0	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	
	Amoxicilina	0,0	0,40	0,80	1,20	1,60	2,00	2,40	2,80	3,20	3,60	4,00	4,40	
	Ampicilina	0,0	0,40	0,80	1,20	1,60	2,00	2,40	2,80	3,20	3,60	4,00	4,40	
	Cloxacilina	0,0	0,20	0,40	0,80	1,20	1,60	2,00	2,40	2,80	3,20	3,60	4,00	
	Oxacilina	0,0	0,20	0,40	0,80	1,20	1,60	2,00	2,40	2,80	3,20	3,60	4,00	
	Cefadroxil	0,0	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	
	Cefalexina	0,0	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	
	Cefoperazona	0,0	0,02	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40	
	Cefuroxima	0,0	0,02	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40	
	Ceftiofur <sup>®</sup>	0,0	0,02	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40	
Macrólidos	Eritromicina	0,0	5,00	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0	70,0	80,0	90,0	100,0	
	Tilmicosina	0,0	1,00	2,00	4,00	6,00	8,00	10,0	12,0	14,0	16,0	18,0	20,0	
	Tilosina	0,0	0,10	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	
Tetraciclinas	Clortetraciclina	0,0	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	
	Oxitetraciclina	0,0	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	
	Tetraciclina	0,0	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	
Quinolonas	Ciprofloxacina	0,0	0,02	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40	
	Enrofloxacin	0,0	0,02	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40	
	Marbofloxacina	0,0	0,02	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40	
	Norfloxacin	0,0	0,02	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40	
Sulfamidas	Sulfadiazina	0,0	5,00	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0	70,0	80,0	90,0	100,0	
	Sulfadimetoxina	0,0	5,00	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0	70,0	80,0	90,0	100,0	
	Sulfametoxazol	0,0	5,00	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0	70,0	80,0	90,0	100,0	
	Sulfatiazol	0,0	5,00	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0	70,0	80,0	90,0	100,0	

#### 4.1.2.5. Análisis estadístico de los datos

Las absorbancias relativas ( $A_r$ ) se analizaron mediante el siguiente Modelo de Regresión Logística:

$$\text{Logit}_{ij} \left[ \frac{A_r}{(1-A_r)} \right] = \beta_0 + \beta_1[\text{ATB}]_i + \varepsilon_{ij} \quad (4.1)$$

Dónde:  $\beta_0$  y  $\beta_1$ = parámetros calculados con el modelo logístico;  $[\text{ATB}]_i$ = concentración de antibiótico; y  $\varepsilon_{ij}$ = error del modelo. La  $\text{IC}_{50}$  (del inglés *Inhibitory Concentration*) se calculó como la concentración de antibiótico que provoca una inhibición del 50% del crecimiento de levaduras.

#### 4.1.3. Resultados y Discusión

La Tabla 4.2 muestra los resultados de la aplicación del modelo logístico para los diferentes ATBs que afectaron en forma estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) al crecimiento de la levadura. Para estos ATBs se reportan también los  $\text{IC}_{50}$  estimados por el modelo, junto con los LMRs establecidos por la legislación para la leche (Codex Alimentarius, 2011; Unión Europea, 2010; Código Alimentario Argentino, 2011).

La aplicación del modelo de regresión logística (Ec. 4.1) fue adecuada debido a que los altos coeficientes de concordancia estuvieron entre 82,3% para ampicilina y 97,3% para ciprofloxacina, como se observa en la Tabla 4.2. Los valores del coeficiente  $\beta_1$  representan la disminución del crecimiento de *K. marxianus* debido al aumento de la concentración de antibiótico. Por tanto, valores más altos de este parámetro indican una mayor inhibición por parte del antibiótico. Los valores de  $\beta_1$  obtenidos para cefalosporinas (de  $\beta_{1,\text{cefadroxil}} = -0,0294$  a  $\beta_{1,\text{cefuroxima}} = -0,0108$ ), quinolonas (de  $\beta_{1,\text{ciprofloxacina}} = -0,0391$  a  $\beta_{1,\text{marbofloxacina}} = -0,0120$ ) y tetraciclinas (de  $\beta_{1,\text{oxitetraciclina}} = -0,0508$ , a  $\beta_{1,\text{tetraciclina}} = -0,0360$ ) son superiores a los obtenidos otros ATBs (Tabla 4.2).

Los valores de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g/L}$ ) en lactosuero fueron cercanos a los LMR ( $\mu\text{g/L}$ ) de la leche para cefalexina (100 vs. 100), cefoperazona (180 vs. 50), ceftiofur (205 vs. 100), clortetraciclina (57 vs. 100), oxitetraciclina (62 vs. 100), tetraciclina (90 vs. 100), ciprofloxacina (178 vs. 100), enrofloxacin (130 vs. 100), marbofloxacina (130 vs. 75) y norfloxacina (130 vs. 100).



Por el contrario, los valores de IC<sub>50</sub> de penicilinas, aminoglucósidos, macrólidos y sulfonamidas, excepto neomicina (Tabla 4.2), fueron muy altos en comparación con sus LMR (> 30 LMR).

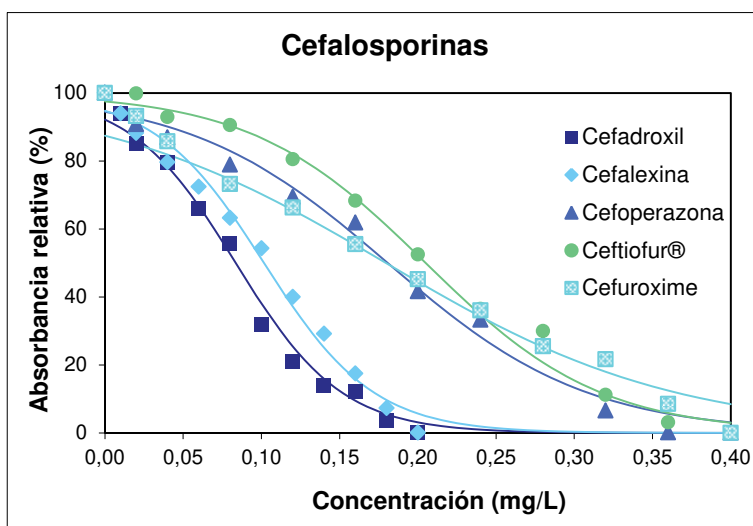
**Tabla 4.2:** Ecuaciones logística para el efecto de las concentraciones de antibióticos sobre la inhibición del crecimiento de *K. marxianus*.

Antibióticos	Logística [P]= $\beta_0 + \beta_1$ [ATB]			IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/L}$ )	LMR ( $\mu\text{g/L}$ )		
	$\beta_0$	$\beta_1$	C%				
Aminoglú- cidos	Estreptomicina	3,5496	-0,10	92,9	1140	-	
	Kanamicina	4,3517	-0,36	95,4	12000	150	
	Neomicina	3,0491	-2,50	89,4	1200	1500	
	Penicilina G	2,0971	-6,40	86,2	330	4	
	Amoxicilina	2,4839	-0,90	94,1	2680	4	
Betalactámicos	Ampicilina	1,6418	-0,60	82,3	2700	4	
	Cloxacilina	1,6090	-1,40	86,7	1200	30	
	Oxacilina	2,3871	-29,4	90,6	1700	30	
	Cefadroxil	2,4659	-29,4	91,6	84	100	
	Cefalexina	2,8972	-28,4	89,8	100	-	
	Cefoperazona	2,8371	-15,8	93,0	180	50	
	Cefuroxima	1,9394	-10,8	83,5	175	-	
	Ceftiofur <sup>®</sup>	3,6675	-17,9	90,9	205	100	
	Macróli- dos	Eritromicina	2,1208	-0,05	86,3	41000	-
		Tilmicosina	1,9330	-0,23	86,6	8200	50
Tilosina		3,3525	-2,90	95,3	1160	50	
Tetraci- nas	Clortetraciclina	2,3751	-41,0	89,6	57	100	
	Oxitetraciclina	3,1727	-50,8	97,1	62	100	
	Tetraciclina	3,2406	-36,0	95,3	90	100	
Quinolonas	Ciprofloxacina	6,9824	-39,1	97,2	178	100	
	Enrofloxacina	2,1906	-16,7	93,2	130	100	
	Marbofloxacina	1,7982	-12,0	85,5	130	75	
	Norfloxacina	3,6517	-17,7	96,1	200	100	

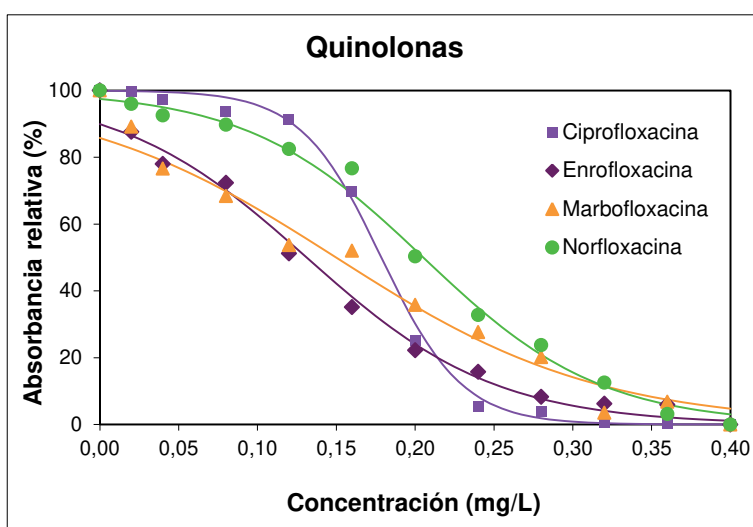
C%: concordancia porcentual; IC: concentraciones que producen y 50% (IC<sub>50</sub>) de inhibición del crecimiento de la levadura;  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ : parámetros calculados con el modelo logístico; [ATB]: concentración de antibiótico; LMR: límite máximo residual establecido por la legislación en leche (Codex Alimentarius, 2010; EU, 2009 y 2010).

Para visualizar la inhibición del crecimiento de *K. marxianus* debido a las concentraciones de cefalosporinas, quinolonas y tetraciclinas, se construyeron curvas de dosis-respuesta Fig. 4.1, Fig. 4.2 y Fig. 4.3, respectivamente.

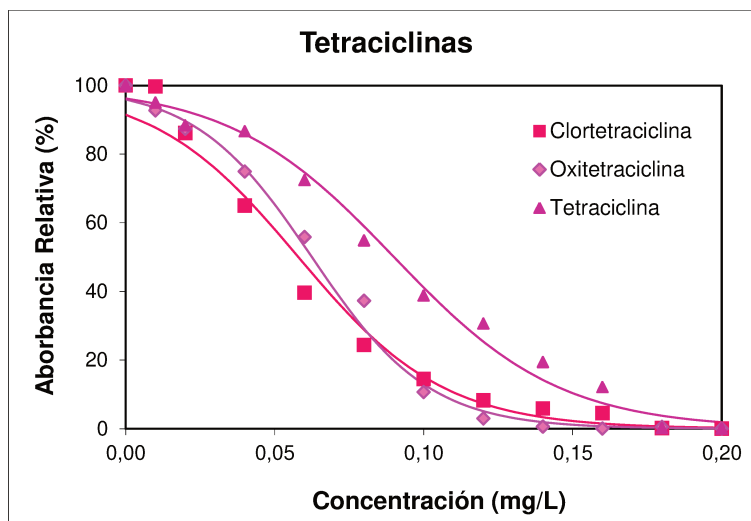
La Fig. 4.1 muestra que cefadroxil ( $\beta_1= 29,4$ ) y cefalexina ( $\beta_1= 28,4$ ) causaron mayor inhibición de la fermentación que otras cefalosporinas, reflejándose esto en los valores mayores de coeficientes  $\beta_1$  (Tabla 4.2). De manera similar, la ciprofloxacina ( $\beta_1= 39,1$ ) provocó menor inhibición que las otras quinolonas (Fig. 4.2), mientras que las inhibiciones debidas a las tetraciclinas fueron similares con coeficientes  $\beta_1$  entre 36,0 y 50,8 para tetraciclina y oxitetraciclina, respectivamente (Fig. 4.3).



**Fig. 4.1:** Efecto de la concentración de cefalosporinas sobre el crecimiento de *K. marxianus*.

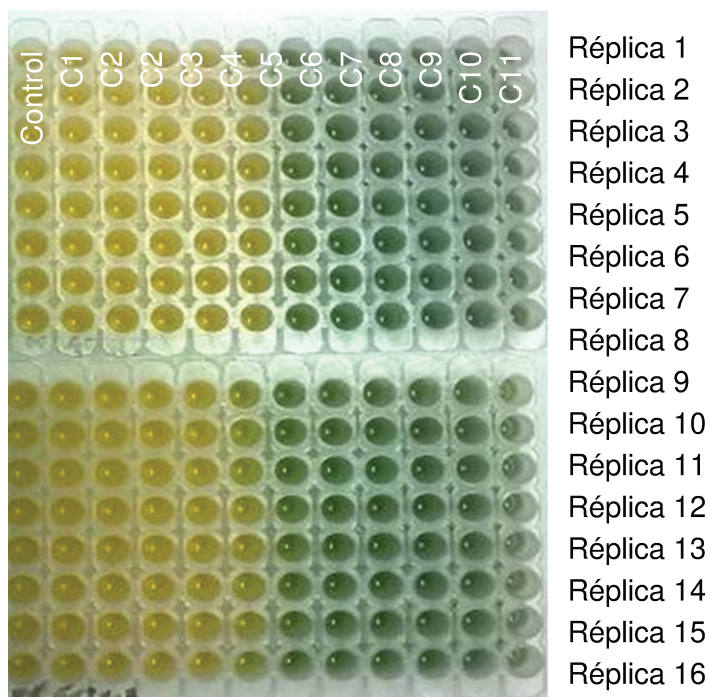


**Fig. 4.2:** Efecto de la concentración de quinolonas sobre el crecimiento de *K. marxianus*.



**Fig. 4.3:** Efecto de la concentración de tetraciclinas sobre el crecimiento de *K. marxianus*.

Con el propósito de visualizar el efecto inhibitorio de oxitetraciclina sobre la fermentación de *K. marxianus* se presenta Fig. 4.4, en la cual se expone de izquierda a derecha las 12 concentraciones ensayadas (en orden creciente) y de arriba hacia abajo las diferentes réplicas (2 placas por ATB, 192 pocillos). En efecto se puede observar como a medida que aumenta la concentración de oxitetraciclina la fermentación se ve inhibida, lo cual se manifiesta mediante la ausencia de viraje del indicador.



**Fig. 4.4:** Efecto inhibitorio de oxitetraciclina sobre la fermentación de *K. marxianus*.

Con respecto a las cefalosporinas, Hamilton-Miller (1999) observó inhibición del crecimiento de algunas levaduras patógenas y hongos filamentosos al analizar cefalosporinas semisintéticas que poseen un grupo lateral N-bencilditiocarbamato. Del mismo modo, Sanyal et al. (1992) informaron que los productos de degradación de las cefalosporinas inhiben el crecimiento de *Trichophyton mentagrophytes* (dermatofitos) y *Macrophomina phaseolina* (planta patógena), pero no son eficaces contra *Candida albicans* (levadura patógena) o *Aspergillus niger* (saprofito). En el presente estudio, la diferencia observada en la sensibilidad de cefalosporinas y penicilinas (Tabla 4.2) puede deberse a la producción de penicilinas por *K. marxianus*, que disminuye la acción de las penicilinas, permitiendo así la fermentación normal de la levadura. Al respecto, debe tenerse en cuenta que los betalactámicos inhiben las fases finales de la síntesis del peptidoglucano, bloqueando las proteínas de unión a penicilina (Marín y Gudiol, 2003). Estas proteínas, con actividad transpeptidasa, transglucosilasa y carboxipeptidasa, entrelazan los componentes de peptidoglucano (Sauvage et al., 2008). No obstante, dependiendo de su capacidad difusiva, su resistencia a betalactamasas, su capacidad de escapar de los sistemas de expulsión, etc., existen diferencias de actividad entre betalactámicos, destacando las cefalosporinas por su mayor actividad (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Estudios realizados con células eucariotas indican también la presencia de betalactamasas en levaduras como *Candida albicans*, *Candida boidinii* y *Pichia pinus* (Mehta y Nash, 1978), lo que hace factible la posibilidad de que betalactámicos puedan actuar sobre este tipo de organismos. Por esto, el efecto de penicilinas y cefalosporinas para inhibir la biosíntesis de la pared celular bacteriana otorga credibilidad al concepto de su posible acción sobre levaduras (Hector, 1993; Debono y Gordee, 1994).

En cuanto a las quinolonas, la inhibición del crecimiento de *K. marxianus* por estos ATBs (Figura 4.2) se puede atribuir a su efecto sobre la enzima topoisomerasa que participa en la relajación de la doble hélice del ADN. Zhang y col. (2015) indicaron efectos genotóxicos contra especies *no target* debido a la unión de quinolonas a topoisomerasa. Del mismo modo, Stergiopoulou et al. (2009) informaron la inhibición del crecimiento de *Candida spp.* por FQs. En una revisión realizada por Dalhoff (2015), el autor destaca que las quinolonas tienen efecto antibacteriano, antiviral, antifúngico y antiparasitario. Al respecto, Elsea et

al. (1992) señalaron que la actividad antifúngica de las FQs se debe principalmente a la inhibición de la topoisomerasa, pero otros autores sugieren que la sensibilidad de las levaduras a las FQs es consecuencia de mutaciones en esta enzima (Strumberg et al., 1999; Dong et al., 2000). De acuerdo con Sobieski et al. (1976), en algunos organismos eucariotas, el ácido nadixílico (quinolona) provoca perturbaciones en orgánulos celulares que poseen ADN circular de tipo procariota. Por ejemplo, actuando sobre la pared celular de *C. albicans* puede inhibir su crecimiento, efecto que aumenta con la concentración del fármaco. Otros estudios también menciona la acción de esta quinolona sobre levaduras, por ejemplo sobre *S. cerevisiae* inhibiendo su tasa de respiración mitocondrial en la etapa de crecimiento estacionario (Kaplan y Criddle, 1970) o a través su acción sobre el ADN mitocondrial (Gross y Smith, 1972). Debido a la presencia de quinolonas también se menciona inhibición a nivel de la síntesis de ADN mitocondrial de *K. lactis* (Luha et al., 1971) y efectos intracelulares que perjudican la división celular (Sobieski et al., 1976). La inhibición de *Candida spp.* por quinolonas también fue descrita por Ozdek et al. (2006) al realizar tratamientos oftalmológicos con moxifloxacina y gatifloxacina en forma tópica. Otros autores señalaron que ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina y trovafloxacina presentan efectos individuales y/o sinérgicos con agentes antifúngicos (por ejemplo, anfotericina B) contra *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans*, *Candida parapsilosis* y *Paecilomyces lilacinum* (Stergiopoulou et al., 2011). Por todas estas razones, la inhibición del crecimiento de *K. marxianus* debido a las quinolonas (Fig. 4.2) podría atribuirse a su efecto sobre la topoisomerasa (Elsea et al., 1992; Ozdek et al., 2006; Stergiopoulou et al., 2009, 2011), sobre la síntesis de ADN mitocondrial (Luha et al., 1971) o debido a efectos intracelulares que afecten la división celular (Sobieski et al., 1976), como se indica en otras especies de levaduras.

Con respecto a las tetraciclinas, su efecto sobre el crecimiento de *K. marxianus* (Figura 4.3) se puede atribuir a la inhibición de la síntesis de proteínas por parte de la levadura, ya que estas sustancias interfieren con la unión del aa-tRNA a la subunidad ribosómica 30S (Tenover, 2006). Al respecto, Oriel y Waterworth (1975) destacaron que la minociclina puede inhibir el crecimiento de la levadura *C. albicans*, mientras que Schwartz et al. (1972) sugirió que el efecto combinado de polimixina B y tetraciclina puede inhibir el

crecimiento de *C. albicans* y *S. cerevisiae*. Por su parte, Blackburn y Avery (2003) mostraron sensibilidad de mutantes de *S. cerevisiae* frente a tetraciclinas, mencionando que las cepas sensibles a tetraciclina y oxitetraciclina presentaron mutaciones en la biosíntesis de ergosterol y la enzima alcohol deshidrogenasa, mientras que aquellos que solo tuvieron sensibilidad a tetraciclina tenían mutadas las defensas antioxidantes y alguno factores de transcripción. Considerando estos antecedentes y que dichos dianas se encuentran en el interior celular, se podría pensar que la acción de tetraciclinas sobre *K. marxianus* se puede deber a un defecto en la función de su membrana, que permita el ingreso de este ATB a las células inhibiendo su desarrollo.

#### **4.1.4. Conclusiones**

En resumen, se desarrolló un bioensayo simple, rápido (seis horas) y de bajo costo para analizar el efecto inhibitor de los antibióticos sobre el crecimiento de *K. marxianus*. Por lo tanto, podrían implementarse bioensayos similares para determinar la susceptibilidad otras las levaduras en alimentos.

Los resultados mostraron que el lactosuero contaminado con residuos de cefalosporina, quinolona o tetraciclina en niveles cercanos a los LMR en la leche inhibe el crecimiento de *K. marxianus*. Por lo tanto, el lactosuero contaminado con antibióticos a niveles aceptados por la legislación debe ser tratado antes de la fermentación con *K. marxianus*.

## **4.2. Efecto de tratamiento térmico de lactosuero contaminado con antibióticos sobre el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus*.**

### **4.2.1. Introducción**

Una de las posibles aplicaciones industriales del lactosuero es la producción de biomasa de levadura. Entre las diversas levaduras destaca *K. marxianus* debido a su capacidad para asimilar la lactosa. Sin embargo, Althaus et al. (2014) resaltaron que su capacidad fermentativa disminuye cuando residuos de cefalosporinas, quinolonas y tetraciclinas están presentes en concentraciones cercanos a los LMRs establecidos para leche (Comunidad Europea, 2009).

No obstante, la información disponible sobre la inactivación de ATBs en lactosuero es limitada. Por esta razón y para el uso futuro de esta matriz, es necesario profundizar el estudio de la degradación térmica de los ATBs en lactosuero. Por esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tiempo de tratamiento térmico (120°C) de lactosuero con cefalosporinas, quinolonas y tetraciclinas a través del crecimiento de *K. marxianus* y su consumo de lactosa. Se postula como hipótesis de trabajo que el incremento del tiempo de calentamiento a 120°C produciría mayor pérdida de actividad antimicrobiana de los ATBs en lactosuero.

## **4.2.2. Materiales y Métodos**

### **4.2.2.1. Antibióticos**

Los ATBs (Sigma-Aldrich, EEUU) empleados fueron tres cefalosporinas (cefalexina C-4895, cefoperazona C-4292 y ceftiofur 34001), tres quinolonas (ciprofloxacina 17850-F, enrofloxacin Y0001259 y marbofloxacina Y0000819) y tres tetraciclinas (clortetraciclina C-4881, oxitetraciclina O-5750 y tetraciclina T-3258). En todos los casos se trabajó con una concentración de ATBs igual a los LMRs establecidos por Comunidad Europea (2009) y el Código Alimentario Argentino (2011), siendo este límite de 0,100 mg/L para los ATBs ensayados, a excepción de marbofloxacina y cefoperazona para los cuales es de 0,075 mg/L y 0,050 mg/L, respectivamente.

### **4.2.2.2. Levadura**

Se utilizó *K. marxianus* (ATCC 8554) suministrada por la colección de cepas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química (Universidad Nacional del Litoral).

### **4.2.2.3. Medio de cultivo**

Se utilizó lactosuero libre de ATBs y desproteinizado mediante tratamiento térmico a 120°C durante 20 min, seguido de la remoción de las proteínas precipitadas mediante filtración (Quintero et al., 2001; Uribarrí et al., 2004). El medio de cultivo se fortificó con 5 g/L de extracto de levadura (0,5% m/V, Merck Millipore, EEUU) y 25 g/L de peptona de caseína (2,5% m/V, Biokar Diagnostics,

Francia). Se ajustó el pH a 7,5 (con NaOH 0,1M) para que se desarrolle la fermentación durante un tiempo de 12 h.

#### 4.2.2.4. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental factorial 4x10 que permite evaluar el efecto del tiempo de tratamiento térmico (120°C) a cuatro niveles (TT= 0, 20, 40 y 60 min) en diez muestras de lactosuero aditivado con tres cefalosporinas (cefalexina, cefoperazona y ceftiofur), tres quinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacin y marbofloxacina) o tres tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina), y una muestra control negativo sin ATB.

Cada fermentador se inoculó con 20% de suspensión de *K. marxianus* de modo tal normalizar la Densidad Óptica inicial ( $DO_0 = 0,210 \pm 0,015$ ). Posteriormente se incubaron a 42°C durante un tiempo de 12 h, con agitación y ajuste de pH a 7,5 (con NaOH 0,1M) cada 1 hora. Se tomaron muestras por triplicado de cada fermentador cada 2 horas (21 muestras por cada ATB) para determinar producción de biomasa y concentración de lactosa residual.

#### 4.2.2.5. Determinación de biomasa

La producción de biomasa se determinó mediante lecturas de las Densidades Ópticas (DO) a 620 nm utilizando un espectrofotómetro Boeco Modelo S-22 UV/Vis (Hamburg, Alemania). Con los datos de biomasa obtenidos para cada muestra, se calculó el crecimiento relativo (CR):

$$CR = \frac{C_x}{C_f} \quad (4.3)$$

Dónde: CR: crecimiento relativo,  $C_x$ : crecimiento a tiempo "x",  $C_f$ : crecimiento a tiempo final.

#### 4.2.2.6. Consumo de lactosa

Se empleó una técnica enzimática colorimétrica que evalúa la hidrólisis de lactosa a galactosa y glucosa, en presencia de  $\beta$ -galactosidasa (Aktaş et al., 2006). Luego se expresó en términos del consumo relativo de lactosa (LRC):

$$LRC = \frac{CL_x}{CL_0} \quad (4.4)$$

Dónde: LRC: consumo relativo de lactosa,  $CL_x$ : consumo de lactosa para la muestra a tiempo "x",  $CL_0$ : consumo de lactosa a tiempo inicial.



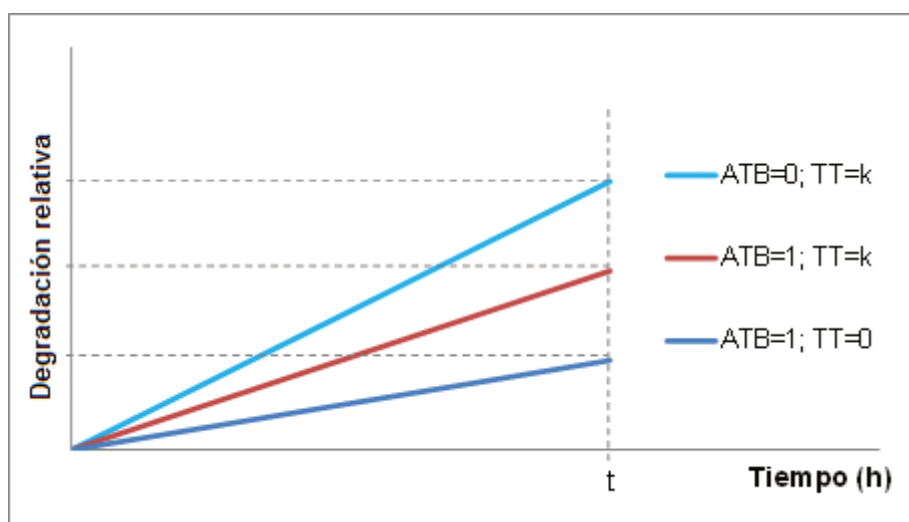
#### 4.2.2.7. Análisis estadístico de los datos

Los resultados se analizaron utilizando la opción stepwise del Modelo de Regresión Lineal General utilizando el procedimiento GLM (del inglés *General Linear Model*) del paquete estadístico StatGraphics Centurión XVI (StatGraphics®, 2008). La Ec. (4.5) describe los efectos de tiempo, del tipo de ATB y del tratamiento térmico sobre la fermentación de *K. marxianus*:

$$Y_{ijkl} = (\beta_1 - \beta_2 \cdot ATB_j + \beta_3 \cdot ATB_j \cdot TT_k) \cdot t_i + \epsilon_{ijkl} \quad (4.5)$$

Dónde:  $Y_{ijkl}$ = Variable respuesta ( $CR_{ijkl}$ : producción de biomasa relativa,  $LRC_{ijkl}$ : consumo de lactosa relativo);  $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ : coeficientes estimados por el modelo;  $t_i$ : efecto del tiempo de fermentación ( $i=7$ : 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h);  $ATB_j$ : efecto del antibiótico en términos de variable dummy ( $j= 2$ ,  $ATB= 0$ : sin antibiótico,  $ATB= 1$ : con antibiótico);  $TT_k$ : efecto del tiempo del tratamiento térmico a 120°C ( $k=4$ ,  $TT= 0, 20, 40$  y 60 minutos);  $ATB_j \cdot TT_k$ : interacción entre el efecto del antibiótico y el tiempo del tratamiento térmico a 120°C;  $\epsilon_{ijkl}$ : error residual del modelo.

Posteriormente, el porcentaje de degradación relativa (%DR) para cada ATB ( $ATB= 1$ ) y tratamiento térmico ( $TT_k= 20, 40$  y 60 min) se calculó utilizando la Ec. (4.5) para el crecimiento relativo (CR), como se muestra en la Fig. 4.5.



**Fig. 4.5:** Estimación del porcentaje de degradación de antibióticos  
ATB: Antibiótico, TT: Tratamiento Térmico.

El porcentaje de degradación debido al tratamiento térmico se calculó según la siguiente Ecuación:

$$\%DR = \frac{CR_{(ATB=1,TT=k)} - CR_{(ATB=1,TT=0)}}{CR_{(ATB=0,TT=0)} - CR_{(ATB=1,TT=0)}} \cdot 100 \quad (4.6)$$

Reemplazando los valores de crecimiento relativo por sus variables predictivas (Ec. 4.3) se obtiene:

$$\%DR = \frac{(\beta_1 - \beta_2 \cdot ATB_1 + \beta_3 \cdot ATB_1 \cdot TT_k) \cdot t_i - (\beta_1 - \beta_2 \cdot ATB_1 + \beta_3 \cdot ATB_1 \cdot TT_0) \cdot t_i}{(\beta_1 - \beta_2 \cdot ATB_0 + \beta_3 \cdot ATB_0 \cdot TT_k) \cdot t_i - (\beta_1 - \beta_2 \cdot ATB_1 + \beta_3 \cdot ATB_1 \cdot TT_0) \cdot t_i} \cdot 100 \quad (4.7)$$

Luego de reemplazar las variables dummy por sus respectivos valores ( $ATB_0=0$ ,  $TT_0=0$  y  $ATB_1=1$ ) y simplificar “ $t_i$ ” (nótese que el porcentaje de degradación es independiente del tiempo de fermentación) se obtiene:

$$\%DR = \frac{(\beta_1 - \beta_2 \cdot 1 + \beta_3 \cdot 1 \cdot 1) - (\beta_1 - \beta_2 \cdot 1 + \beta_3 \cdot 1 \cdot 0)}{(\beta_1 - \beta_2 \cdot 0 + \beta_3 \cdot 0 \cdot 1) - (\beta_1 - \beta_2 \cdot 1 + \beta_3 \cdot 1 \cdot 0)} \cdot 100 \quad (4.8)$$

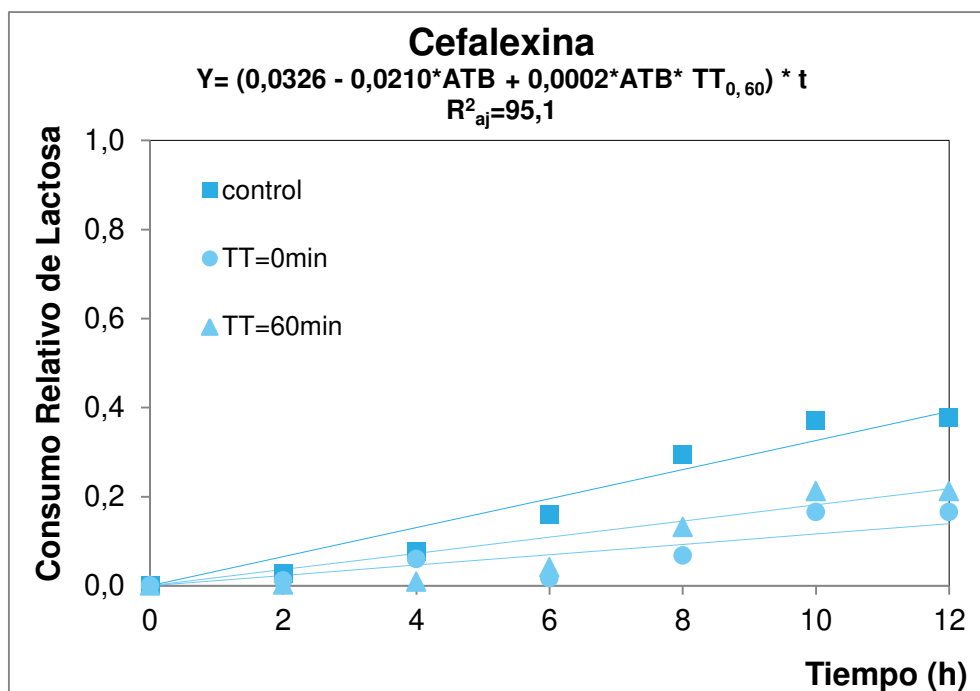
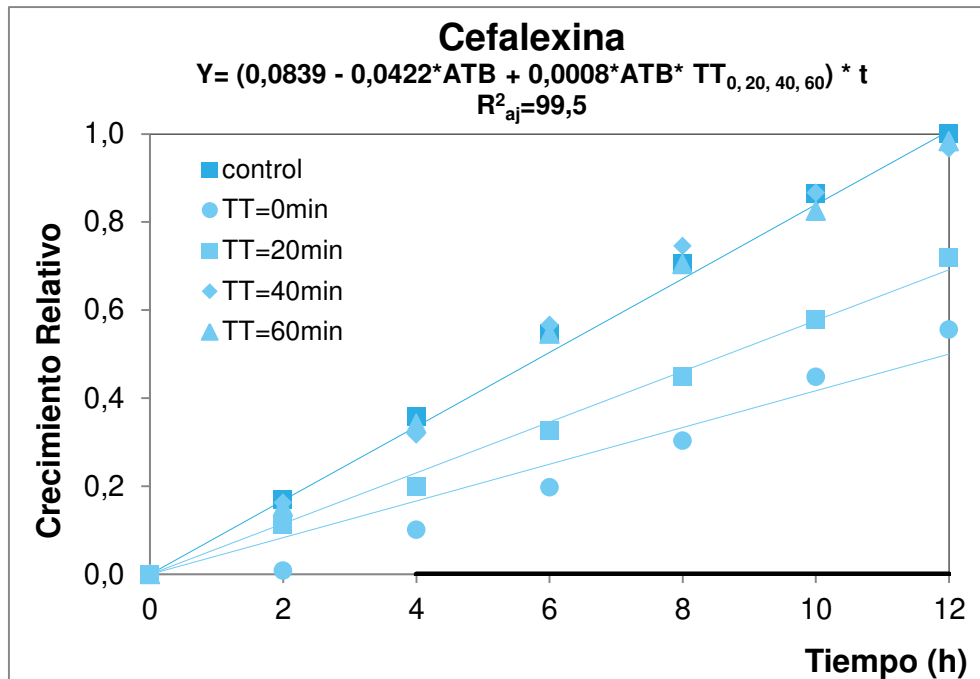
Simplificando términos se llega a la expresión reducida para el cálculo de los porcentajes de degradación, que permite estimar tiempos de tratamientos para lograr la inactivación total de cada ATB:

$$\%DR = \frac{\beta_3 \cdot TT_k}{\beta_2} \cdot 100 \quad (4.9)$$

### 4.2.3. Resultados y Discusión

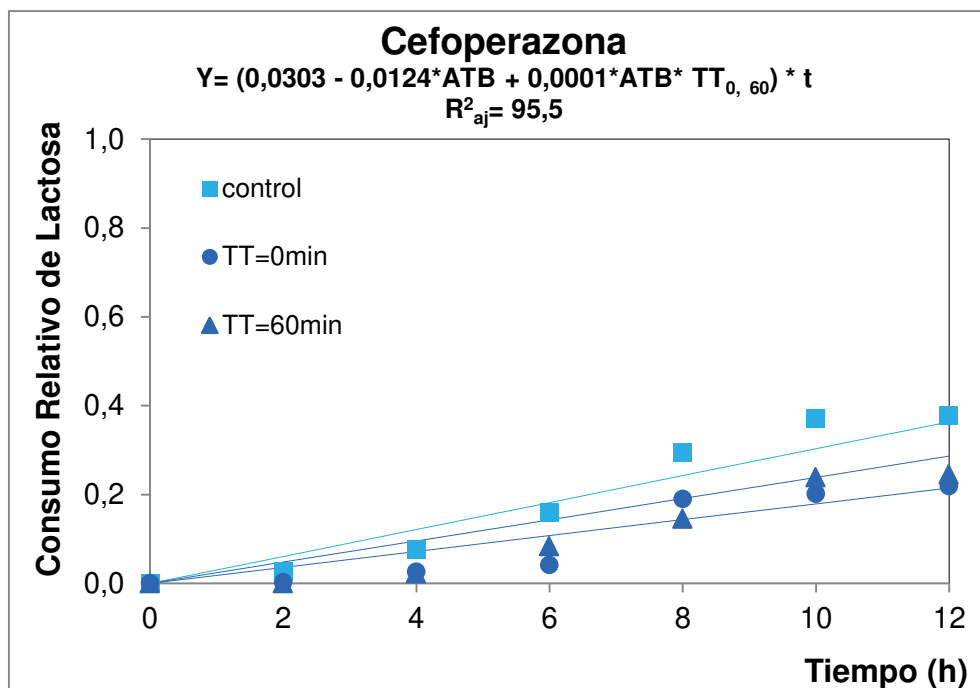
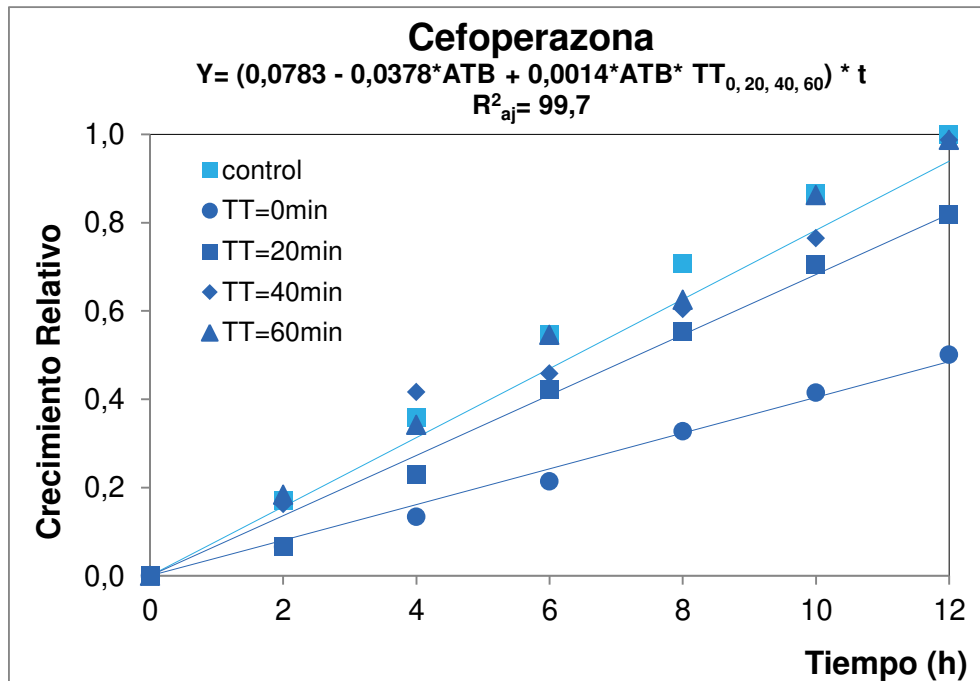
Para visualizar los efectos significativos de los ATBs y los tiempos de tratamiento térmico sobre el crecimiento de *K. marxianus* y el consumo relativo de lactosa, se construyen Fig. 4.6 (a: cefalexina, b: cefoperazona, c: ceftiofur), Fig. 4.7 (a: ciprofloxacina, b: enrofloxacin, c: marbofloxacina) y Fig. 4.8 (a: clortetraciclina, b: oxitetraciclina, c: tetraciclina). Además, se expone en cada figura la ecuación logística obtenida aplicando la opción stepwise de la Ec. (4.5). Por su parte, no se observaron diferencias significativas para el efecto del tiempo de tratamiento térmico (0, 20, 40 y 60 min) sobre la muestra control libre de ATBs ( $F= 0,0125$ ;  $p<0,001$ ).

Los coeficientes de tiempo de tratamiento ( $\beta_1$ ) indican un aumento en el crecimiento celular y el consumo de lactosa a medida que se extiende el tiempo de fermentación. La acción inhibitoria de los antibióticos sobre *K. marxianus* se manifestó por los coeficientes negativos del parámetro “ $\beta_2$ ”, indicando una disminución en la producción de biomasa y el consumo de lactosa con el avance de la fermentación. Además, la termolabilidad de los antimicrobianos se manifiesta por los términos positivos de “ $\beta_3$ ”, lo que indica mayor consumo de biomasa y lactosa con más tiempo de tratamiento térmico.

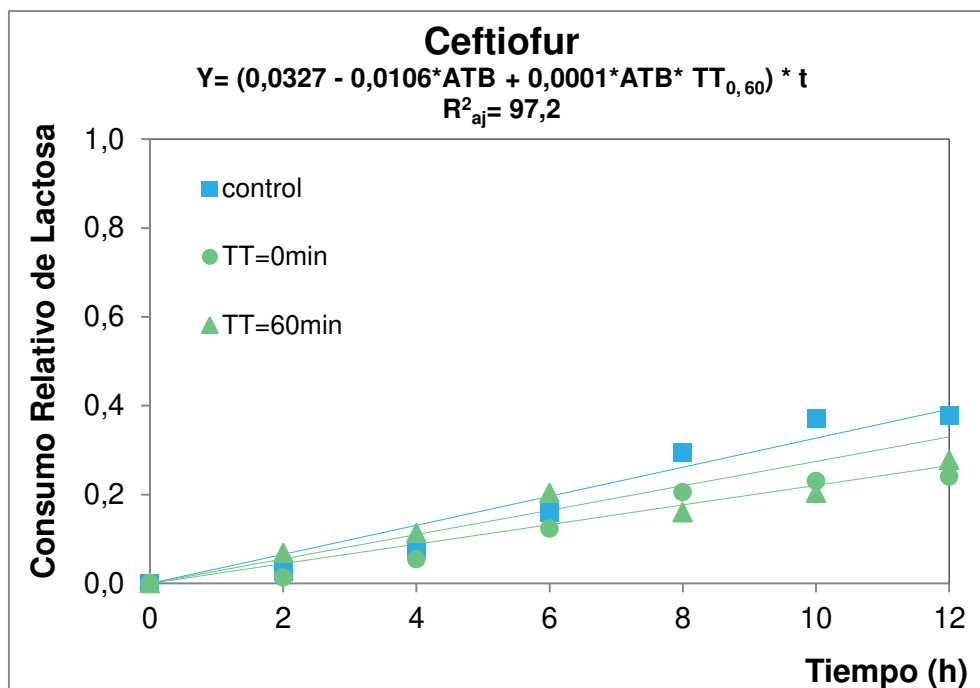
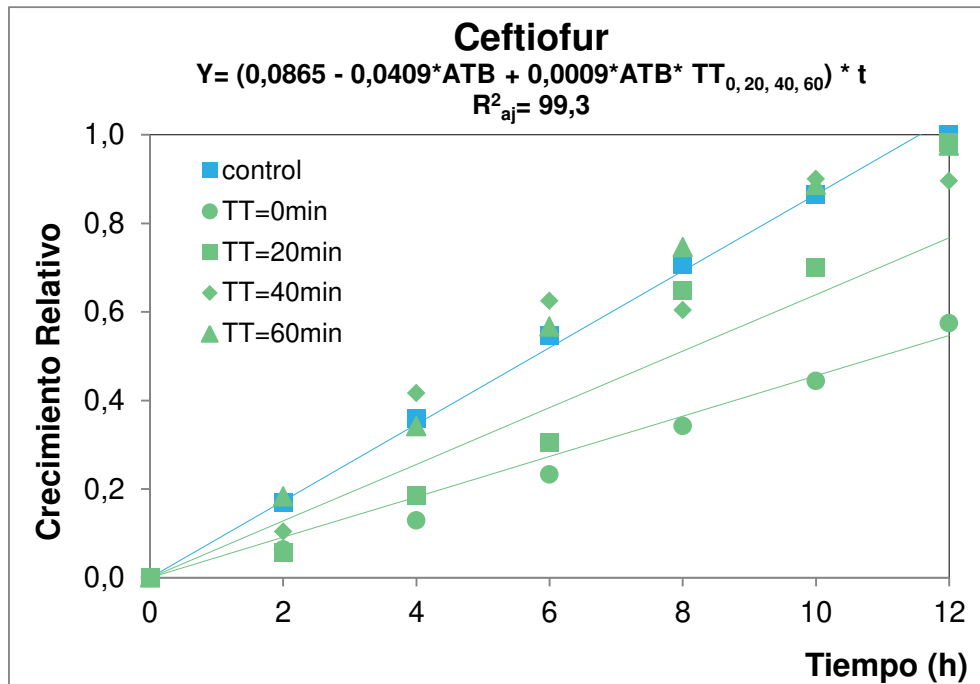


**Fig. 4.6a:** Efecto del tratamiento térmico y cefalexina, sobre el crecimiento de *K. marxianus* y el consumo de lactosa.

TT: efecto del tiempo de tratamiento térmico; ATB: efecto del antibiótico; t: tiempo de fermentación;  $R^2_{aj}$ : coeficiente de regresión cuadrático ajustado.



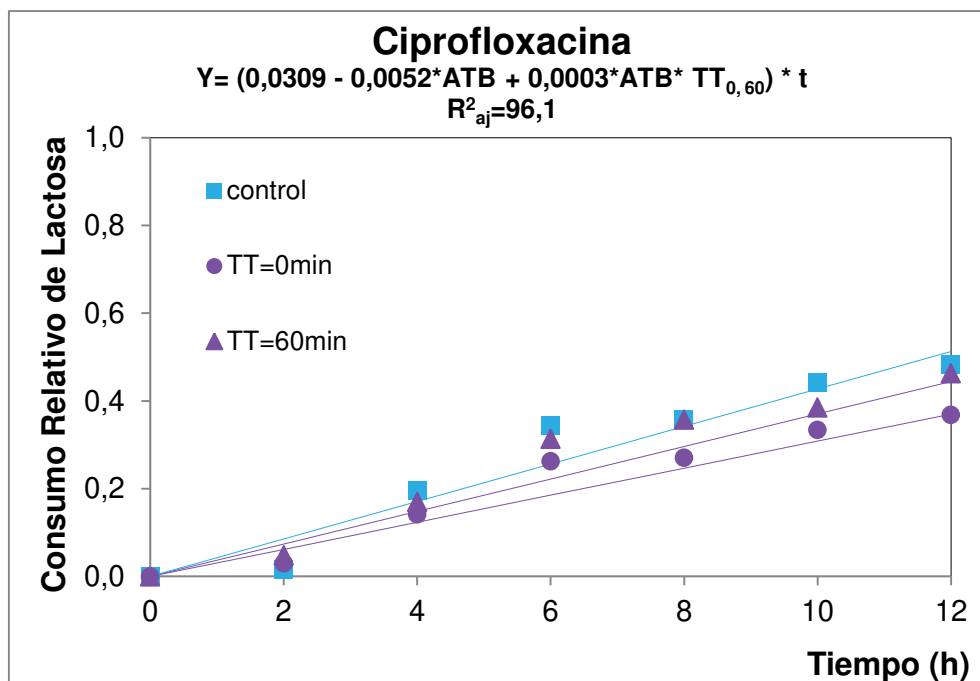
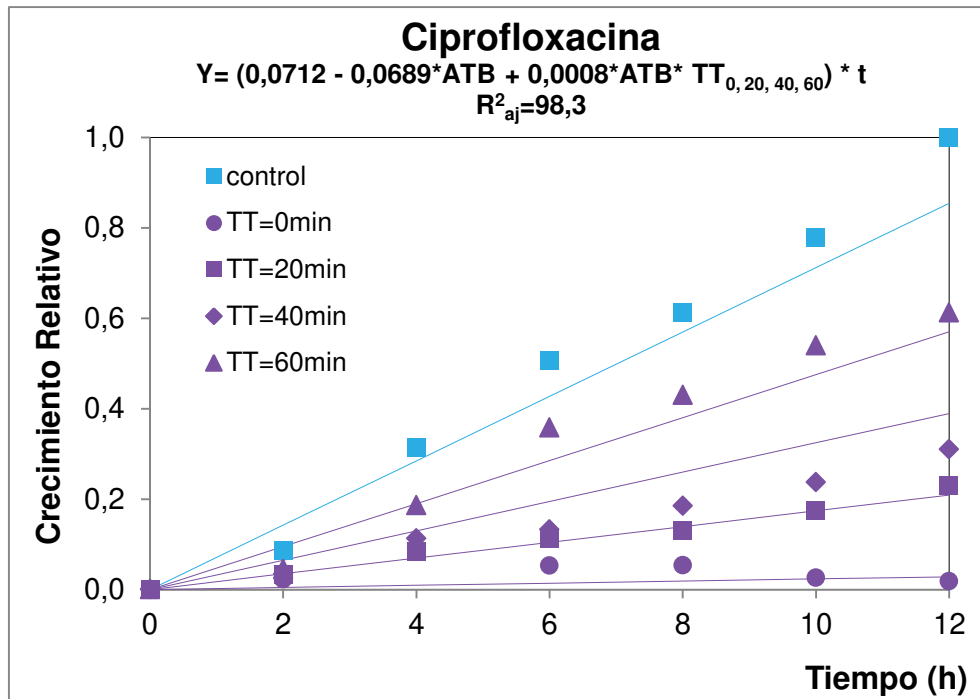
**Fig. 4.6b:** Efecto del tratamiento térmico y cefoperazona, sobre el crecimiento de *K. marxianus* y el consumo de lactosa. TT: efecto del tiempo de tratamiento térmico; ATB: efecto del antibiótico; t: tiempo de fermentación;  $R^2_{aj}$ : coeficiente de regresión cuadrático ajustado.



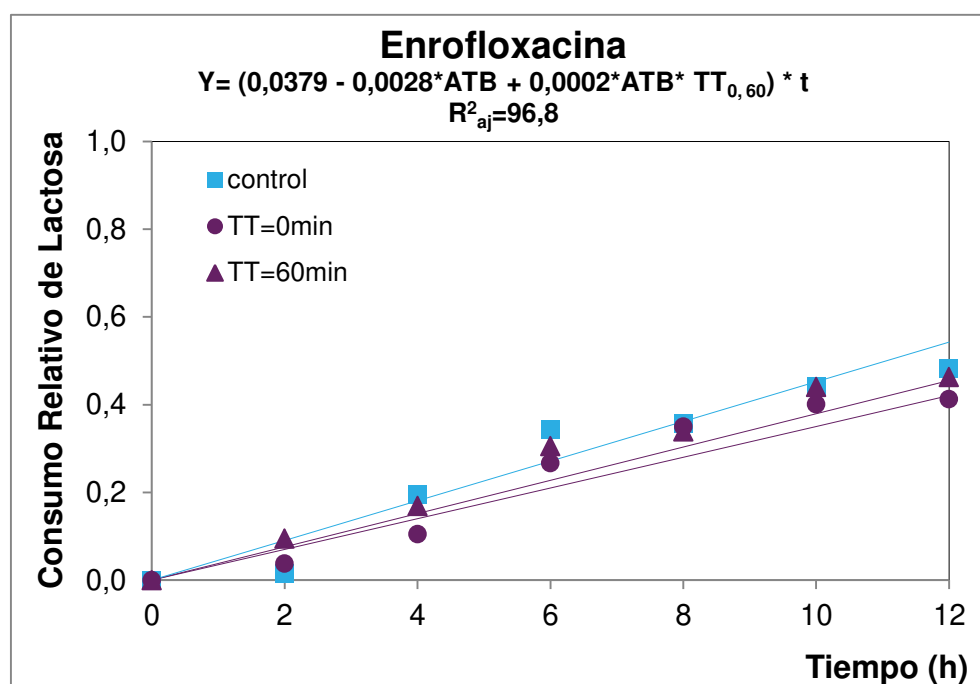
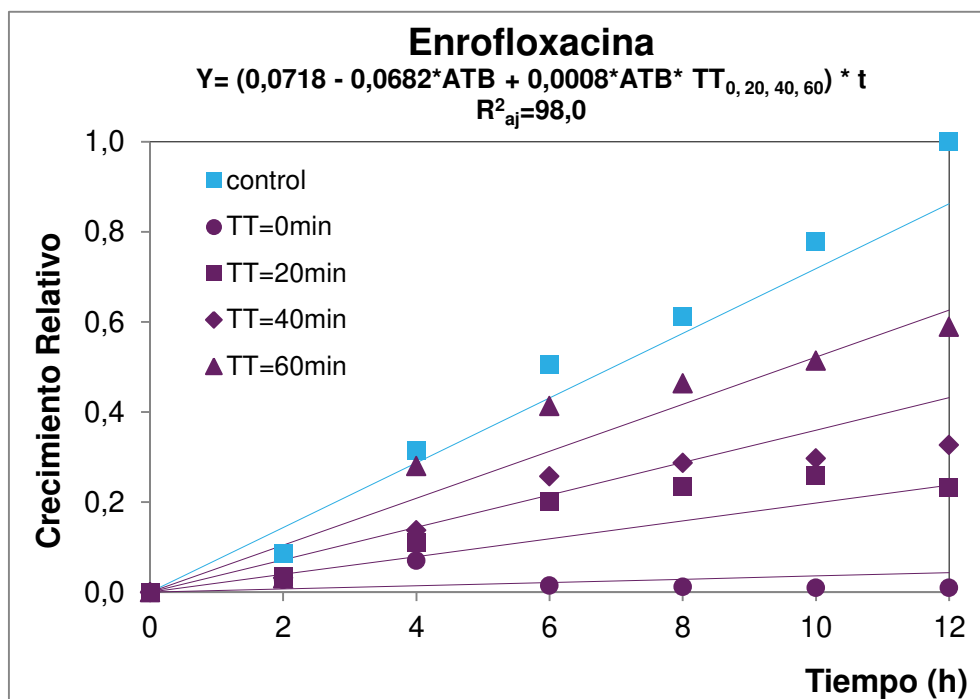
**Fig. 4.6c:** Efecto del tratamiento térmico y ceftiofur, sobre el crecimiento de *K. marxianus* y el consumo de lactosa.

TT: efecto del tiempo de tratamiento térmico; ATB: efecto del antibiótico;

t: tiempo de fermentación;  $R^2_{aj}$ : coeficiente de regresión cuadrático ajustado.

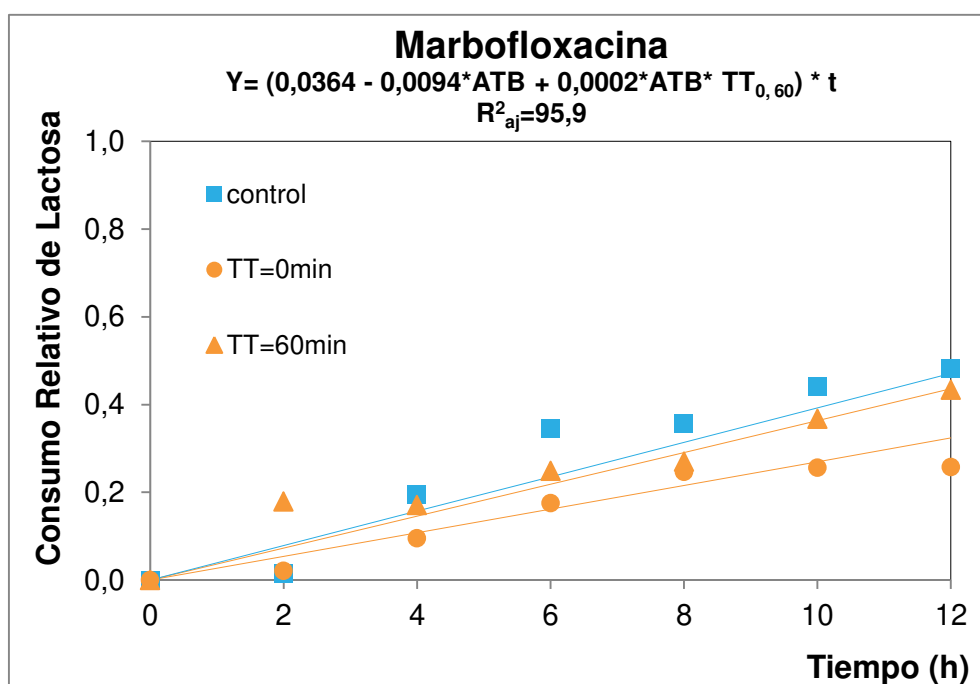
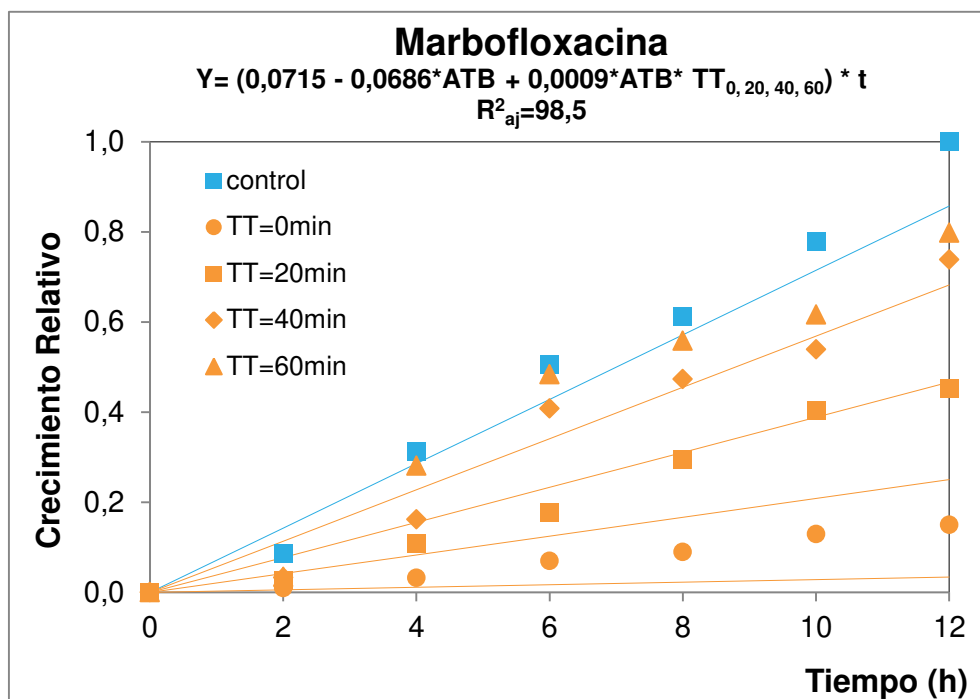


**Fig. 4.7a:** Efecto del tratamiento térmico y ciprofloxacina sobre el crecimiento de *K. marxianus* y el consumo de lactosa.  
 TT: efecto del tiempo de tratamiento térmico; ATB: efecto del antibiótico; t: tiempo de fermentación;  $R^2_{aj}$ : coeficiente de regresión cuadrático ajustado.



**Fig. 4.7b:** Efecto del tratamiento térmico y enrofloxacin sobre el crecimiento de *K. marxianus* y el consumo de lactosa.

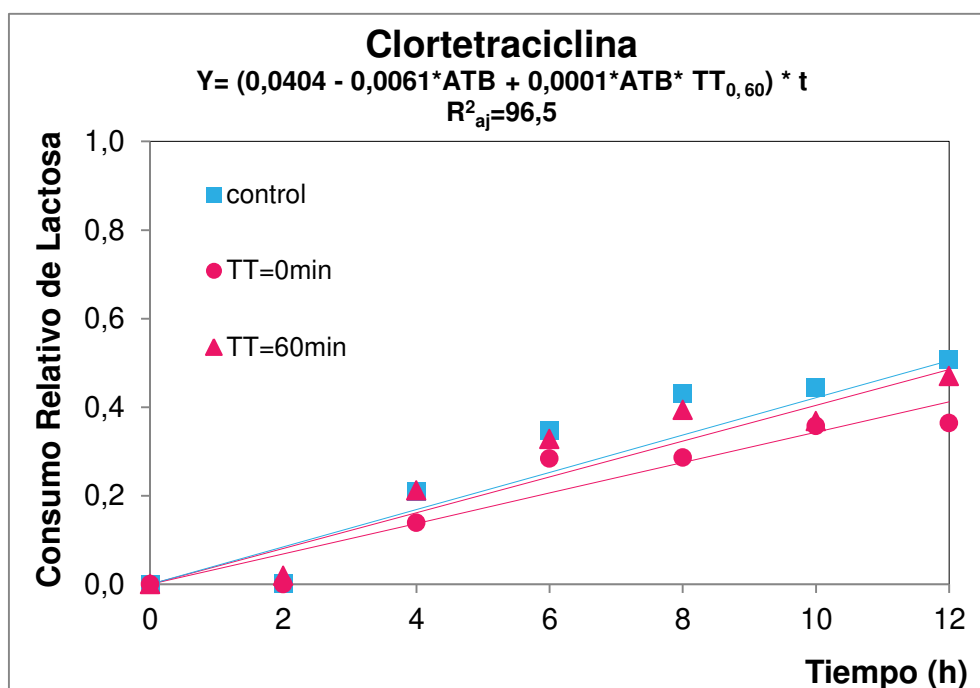
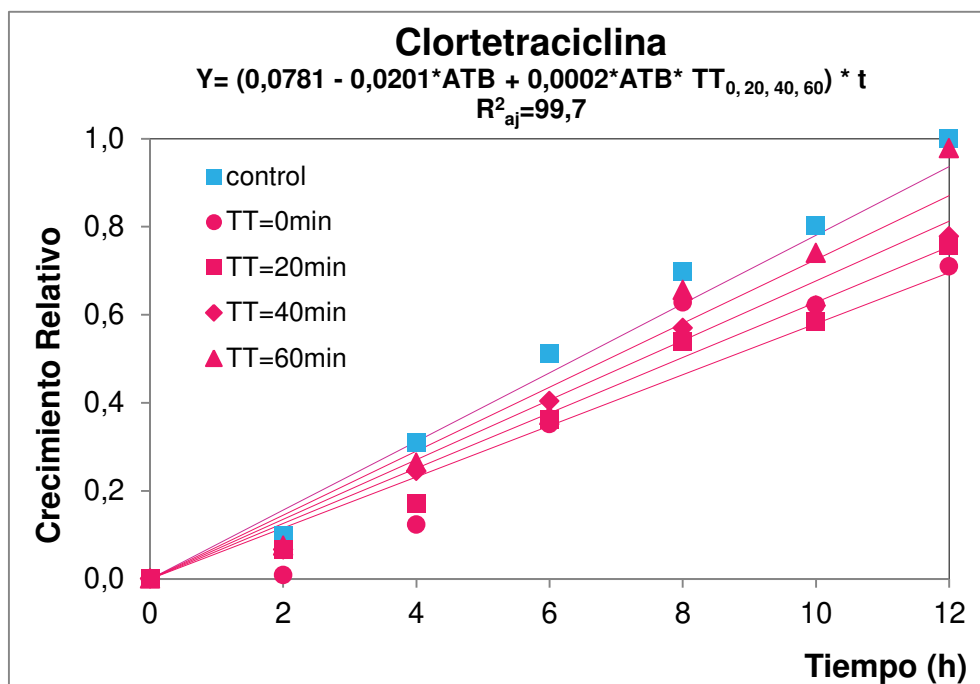
TT: efecto del tiempo de tratamiento térmico; ATB: efecto del antibiótico; t: tiempo de fermentación;  $R^2_{aj}$ : coeficiente de regresión cuadrático ajustado.



**Fig. 4.7c:** Efecto del tratamiento térmico y marbofloxacina sobre el crecimiento de *K. marxianus* y el consumo de lactosa.

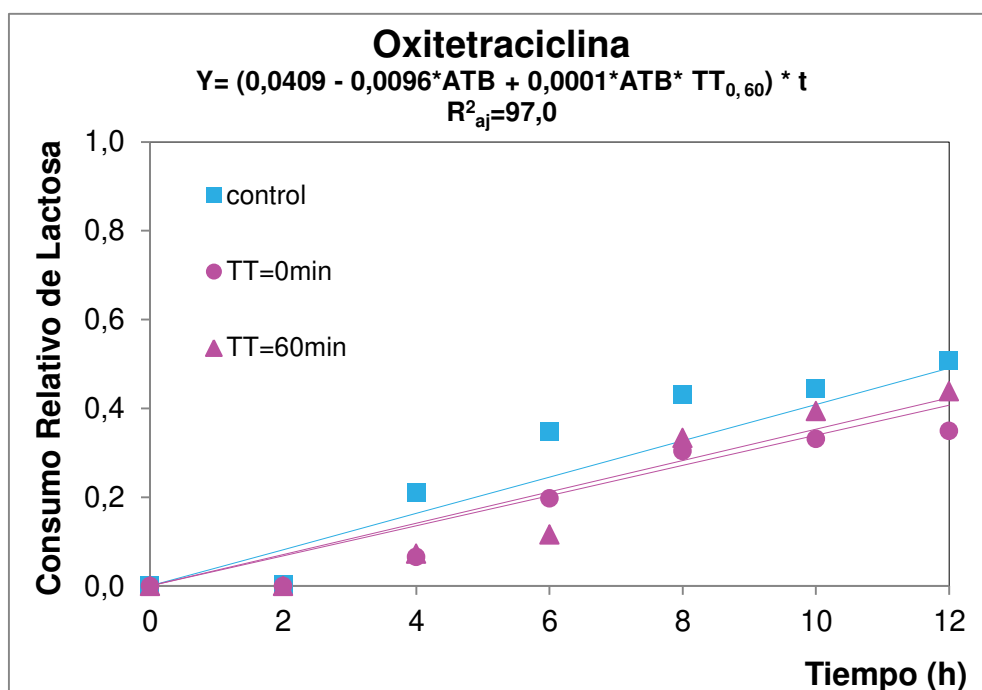
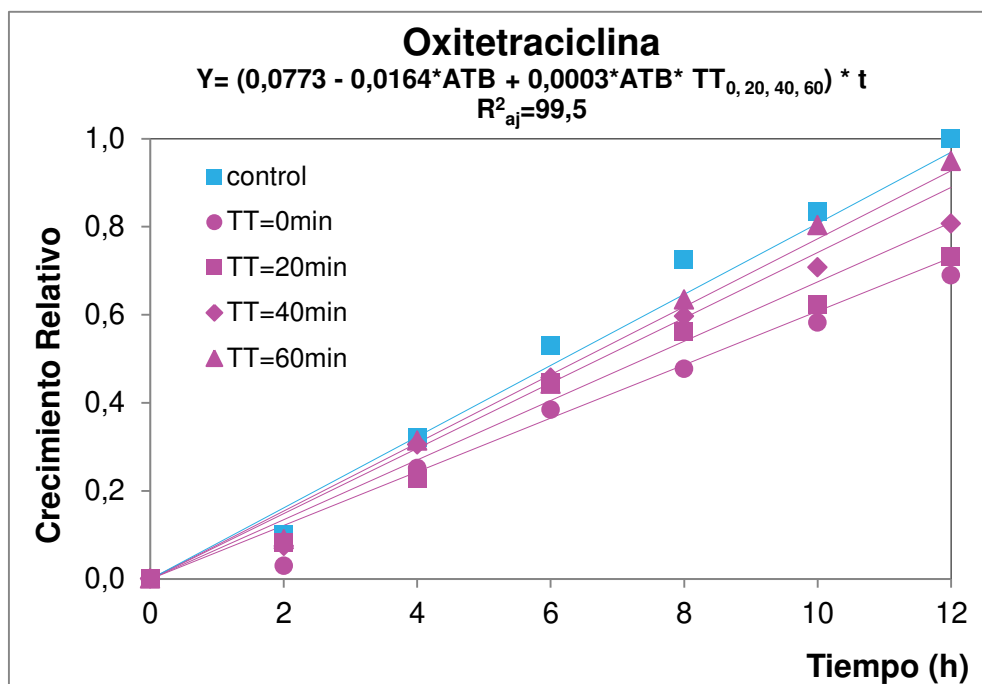
TT: efecto del tiempo de tratamiento térmico; ATB: efecto del antibiótico; t: tiempo de fermentación;  $R^2_{aj}$ : coeficiente de regresión cuadrático ajustado.





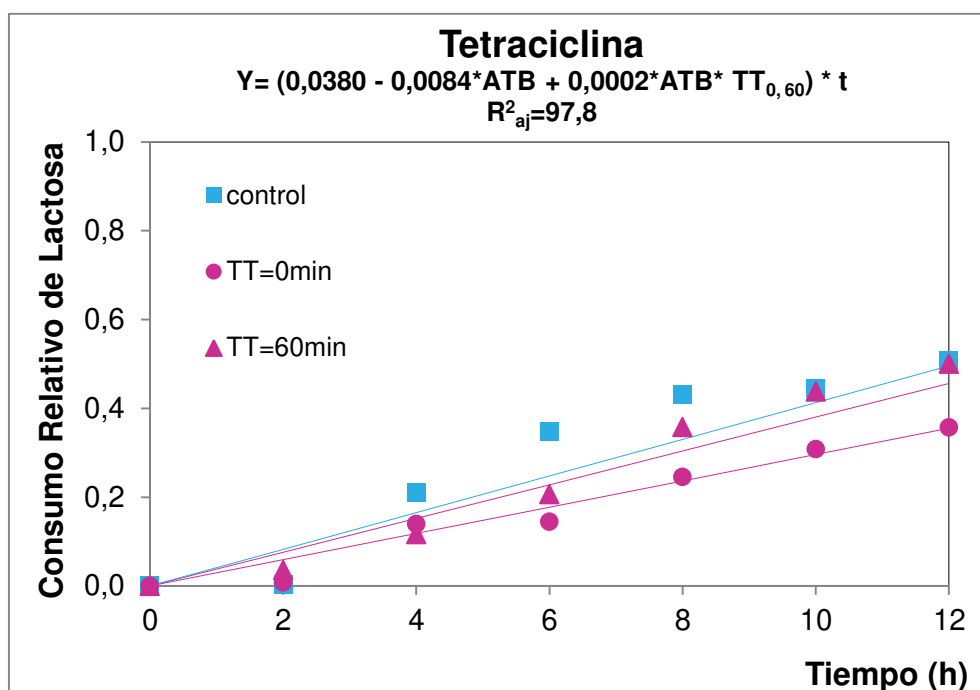
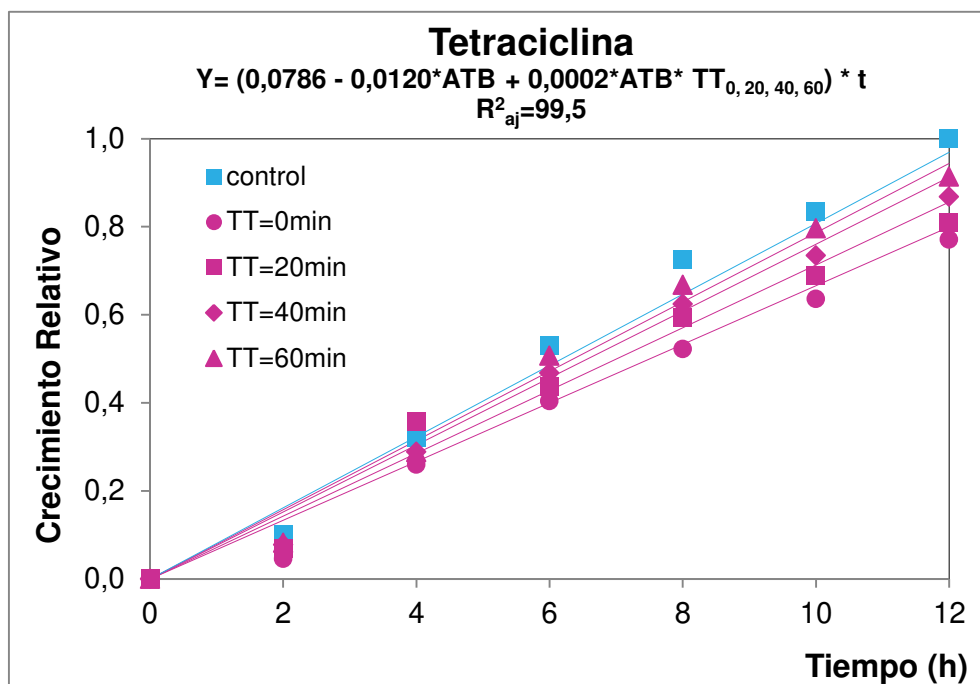
**Fig. 4.8a:** Efecto del tratamiento térmico y clortetraciclina sobre el crecimiento de *K. marxianus* y el consumo de lactosa.

TT: efecto del tiempo de tratamiento térmico; ATB: efecto del antibiótico; t: tiempo de fermentación;  $R^2_{aj}$ : coeficiente de regresión cuadrático ajustado.



**Fig. 4.8b:** Efecto del tratamiento térmico y oxitetraciclina sobre el crecimiento de *K. marxianus* y el consumo de lactosa.

TT: efecto del tiempo de tratamiento térmico; ATB: efecto del antibiótico; t: tiempo de fermentación;  $R^2_{aj}$ : coeficiente de regresión cuadrático ajustado.



**Fig. 4.8c:** Efecto del tratamiento térmico y tetraciclina sobre el crecimiento de *K. marxianus* y el consumo de lactosa.

TT: efecto del tiempo de tratamiento térmico; ATB: efecto del antibiótico; t: tiempo de fermentación;  $R^2_{aj}$ : coeficiente de regresión cuadrático ajustado.

Las figuras muestran que los crecimientos celulares relativos fueron mayores a cuando el tiempo de fermentación aumentaba. Además, la presencia de antibióticos a niveles equivalentes a sus respectivos LMR provocó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el crecimiento celular, mientras que los tratamientos térmicos inactivaron los ATBs, mejorando así la producción de biomasa de estas muestras.

Con respecto al consumo de lactosa por parte de *K. marxianus*, se aprecia una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) debido a la presencia de los ATBs, pero que revierte para las muestras calentadas a 120°C durante 60 min ( $p < 0,05$ ) (Fig. 4.6, Fig. 4.7 y Fig. 4.8). No obstante, tiempos de calentamiento más cortos (20 y 40 min) no causaron mejoras significativas ( $p > 0,05$ ) en el consumo de lactosa. Esta diferencia en la respuesta de la levadura frente a un mismo efecto (tratamiento térmico), señala que el análisis del consumo de lactosa es un parámetro menos sensible que la producción de biomasa.

### **Cefalosporinas**

Estos ATBs mostraron gran termolabilidad, observándose que las muestras sometidas a tratamiento térmico de 120°C durante 20 min generaron una respuesta estadísticamente diferente respecto del grupo de control ( $p < 0,05$ ), mientras que los tiempos de calentamiento más largos (TT= 40 min) permitieron la pérdida de actividad antimicrobiana total de estos ATBs (%DR= 100).

En la Fig. 4.6 se puede apreciar que las líneas de crecimiento relativo para los tratamientos térmicos durante 40 y 60 min se superponen con las del grupo de control ( $p > 0,05$ ), mientras que el calentamiento a 120°C durante 20 min, permitió la inactivación del 69% de cefalexina, 82% de cefoperazona y 77% de ceftiofur.

Zorraquino et al. (2008b) informaron valores de inactivación térmica para cefalosporinas ligeramente superiores (>92% para cefoperazona y > 90% para cefalexina) a los obtenidos en este trabajo, al esterilizar muestras de leche a 120°C durante 20 min. Del mismo modo, Roca et al. (2011) lograron altas degradaciones térmicas (99% para cefalexina y 100% para cefoperazona) con un proceso de esterilización de leche de 120°C durante 20 min, pero con la cuantificación de estas moléculas mediante HPLC.

## Quinolonas

La marcada inhibición de las quinolonas sobre la producción de biomasa se evidencia en los altos valores del coeficiente " $\beta_2$ " ( $\beta_{2,\text{ciprofloxacina}} = 0,0689$ ;  $\beta_{2,\text{enrofloxacin}} = 0,0682$  y  $\beta_{2,\text{marbofloxacina}} = 0,0686$ ), lo que muestra que estas moléculas disminuyen el crecimiento de *K. marxianus*. Este efecto también se manifiesta en la reducción del consumo de lactosa ( $\beta_{2,\text{ciprofloxacina}} = 0,0052$ ;  $\beta_{2,\text{enrofloxacin}} = 0,0028$  y  $\beta_{2,\text{marbofloxacina}} = 0,0094$ ).

Se aprecia que el aumento en el tiempo de tratamiento térmico provoca una pérdida parcial de actividad antimicrobiana de las quinolonas, favorecida con incrementos en el tiempo de calentamiento (Fig. 4.7). En este sentido, el tratamiento térmico durante 20 min causa inactivaciones leves, lo que resulta en bajos incrementos del crecimiento ( $\%DR_{\text{ciprofloxacina}} = 21$ ,  $\%DR_{\text{enrofloxacin}} = 24$  y  $\%DR_{\text{marbofloxacina}} = 25$ ). Del mismo modo, Zorraquino et al. (2008a) informaron bajos porcentajes de inactivación (18% para enrofloxacin y 34% para marbofloxacina) al esterilizar muestras de leche a 120°C durante 20 min, utilizando *E. coli* como bacteria test. Además, Roca et al. (2010) informaron bajas inactivaciones térmicas (120°C-20 min) para ciprofloxacina (13%) y enrofloxacin (5%) empleando HPLC con detección UV para su cuantificación.

Los resultados muestran que los tiempos de tratamiento utilizados en este estudio no son suficientes para provocan la pérdida total de la actividad antimicrobiana quinolonas. Sin embargo, el uso de la Ec. (4.9) permite estimar el tiempo necesario para alcanzar la degradación total de ciprofloxacina (91 min), enrofloxacin (84 min) y marbofloxacina (76 min). Al respecto, Fisher et al. (2010) cuando aplican la ecuación de Eyring en la degradación de cinco fluoroquinolonas estudiadas por Roca et al. (2010), sugieren que se estabilidad se debe a una combinación de la entropía ( $\Delta S$ ) – entalpía ( $\Delta H$ ) de cada molécula y que el proceso de degradación térmica es cinéticamente desfavorable en términos de entalpía y entropía, puesto que ambos términos varían ampliamente mientras que la Energía Libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) presenta variaciones relativamente pequeñas, debido a la compensación entálpico-entrópica de estas moléculas.

## **Tetraciclinas**

La Fig. 4.8 muestra que el calentamiento a 120°C durante 60 min provoca la pérdida de actividad antimicrobiana para oxitetraciclina y tetraciclina, pero es insuficiente para clortetraciclina (72%). Para esta molécula, el tiempo de degradación total (82 min) se puede estimar mediante la Ec. (4.7).

Las inactivaciones térmicas de las tetraciclinas obtenidas en este estudio son similares a las reportadas por Zorraquino et al. (2010) para valores de leche.

### **4.2.4. Conclusiones**

En resumen, en forma teórica, tratamientos térmicos a 120°C durante 40, 82 y 91 min serían necesarios para la pérdida de actividad antimicrobiana de cefalosporinas, tetraciclinas y quinolona en lactosuero, respectivamente. Por lo tanto, consideramos que estos tratamientos térmicos podrían aplicarse en lactosuero contaminado con ATBs, previo a la producción de biomasa de *K. marxianus*. Además, la estabilidad térmica de las quinolonas está determinada por la combinación de entalpía-entropía y las contribuciones de cada parámetro termodinámico dependen de la estructura de cada fluoroquinolona. Así, el tiempo de inactivación de ciprofloxacina (91 min) es parecido al de enrofloxacin (84 min) por la similitud de sus estructuras químicas, mientras que marbofloxacina (76 min) presenta diferencias estructurales respecto de las anteriores.

# Capítulo 5

---

## **CAPÍTULO 5: Optimización de condiciones para la inhibición de antibióticos y producción de biomasa**

### **5.1. Introducción**

El lactosuero se puede emplear para producción de biomasa (Huang et al., 2016) debido al bajo costo y facilidad de implementación (Fonseca et al., 2008; Gutiérrez y Bastidas, 2016). Entre las diversas levaduras que se pueden usar con este fin destacan las del género *Kluyveromyces*, en particular *Kluyveromyces marxianus*, por su elevada tasa de crecimiento y capacidad para consumir lactosa (Morrissey et al., 2015; Saini et al., 2017; Löser et al., 2018).

El crecimiento de *K. marxianus* se ve afectado por una amplia variedad de factores tales como la fuente nitrogenada, la temperatura, el pH y la aireación, entre otros.

Es interesante mencionar la ausencia de consenso en la literatura respecto a la mejor fuente nitrogenada a emplear con *K. marxianus*. No obstante, todos acuerdan en la necesidad de suplementar el lactosuero para la producción de biomasa. En efecto, Grba et al. (2002) sugieren fortificar lactosuero desproteinizado con una mezcla de extracto de levadura (3 g/L), fosfato de amonio di-básico (1 g/L) y sulfato de amonio (2 g/L). Por su parte, Aktaş et al. (2006) ensayaron el efecto del empleo de extracto de levadura (3 g/L) y diferentes concentraciones de una mezcla de sales amoniacaes (65% sulfato de amonio y 35% fosfato de amonio di-básico), concluyendo que el uso de 4 g/L de la mezcla de sales de amonio es la mejor opción. En otro estudio, Serrat-Díaz et al. (2017) evaluaron diferentes concentraciones de sulfato de amonio (0,5, 2 y 5 g/L) y la sustitución de esta sal por peptona (5 g/L), recomendando el empleo de peptona -fuente de nitrógeno orgánico- porque favorece la producción de biomasa y disminuye el gasto energético. De manera similar, empleando *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*, Rojas et al., (2015), observan que la suplementación de lactosuero con sulfato de amonio (12,5; 15 y 18 g/L) tuvo resultados poco favorables, mientras que la suplementaron con fosfato de amonio y extracto de levadura resultó mucho mejor.



En la literatura se mencionan diferencias en las condiciones de temperatura y pH óptimos para el crecimiento de esta levadura. Por ejemplo, Castrillo y Ugalde (1993) y Serrat-Díaz et al. (2017) sugieren 30°C y pH 3,5 para el cultivo de *K. marxianus* en lactosuero, mientras que Gabardo et al. (2016) pH óptimo de 7 a esta temperatura. En otro trabajo para optimizar la producción de biomasa, Harden (1996) recomienda 35°C y pH 4,5, de manera similar a Grba et al. (2002) quienes sugieren 34°C y pH 4,5-5,0 cuando comparan la producción de biomasa a distintas temperaturas (30, 34 y 37°C).

También, según sea el objetivo del trabajo favorecer la producción de biomasa y el consumo de lactosa o la producción de etanol, hay investigaciones en condiciones aerobias o anaerobias (Guimarães et al., 2010, Grba et al., 2002, Serrat-Díaz et al., 2017, Zoppellari y Bardi 2013). Así por ejemplo, para optimizar los consumos de lactosa y biomasa, Aktaş et al. (2006) indican 35°C, 40°C, pH 6,0 y la adición de aire estéril enriquecido en oxígeno de manera continua (0,8 VVM- volumen de aire/volumen de medio por minuto). Por otro lado al comparar la producción de biomasa en condiciones aerobias y microaerofílicas, Serrat-Díaz et al. (2017) mencionan que la oxigenación genera una producción de biomasa 76% mayor que la microaerobiosis. Por su parte, Silveira et al. (2005) combinan condiciones anaeróbicas y aeróbicas, observando que bajos niveles de oxígeno favorecen el metabolismo fermentativo (mayor producción de etanol), mientras que condiciones aeróbicas favorecen la producción de biomasa. De manera similar, con el objetivo de favorecer la fermentación alcohólica, Grba et al. (2002) plantean una primera etapa aeróbica, en la que prevalece la producción de biomasa y una segunda etapa fermentativa, que genera mayor producción de etanol. Zoppellari y Bardi (2013) también sugieren trabajar en condiciones mixtas, pero dando inicio al proceso en condiciones semi-aerobias (lactosuero con aire estéril, 1 VVM), para luego cortar el suministro de aire, por lo que una vez consumido el oxígeno remanente por parte de las levaduras en crecimiento, continúa en anaerobiosis.

Por todo lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue implementar un diseño experimental secuencial de cuatro etapas que permitiera optimizar las condiciones operativas para maximizar tanto la producción de biomasa, como el consumo de lactosa y proteínas del lactosuero mediante fermentación con *K.*

*marxianus*. La hipótesis de trabajo establece que se puede determinar las mejores condiciones operativa de *K. marxianus*, de modo tal de disminuir el contenido de lactosa y proteínas del lactosuero e incrementar la producción de biomasa.

## **5.2. Materiales y Métodos**

Se utilizó un diseño experimental secuencial en el cual se evaluaron de manera consecutiva: 1) diferentes fuentes nitrogenadas; 2) efecto del pH y la temperatura; 3) aplicación del Diseño de Doehlert para analizar la concentración de proteína y la aireación, utilizando *K. marxianus*, mediante la técnica de análisis de superficies de respuesta seguido de la implementación de la función deseabilidad para la optimización de las condiciones operativas; 4) validación de las mejores condiciones operativas que permitan incrementar la producción de biomasa y disminuir la concentración residual de lactosa en lactosuero contaminado con ATBs, previamente inactivados térmicamente.

### **5.2.1. Medio de cultivo**

En todos los experimentos se utilizó lactosuero conteniendo 4% m/V (40 g/L) de lactosa, desproteinizado mediante tratamiento térmico a 120°C durante 20 min, seguido de una remoción de las proteínas precipitadas mediante filtración (Eluk et al., 2019) y posteriormente fortificado con 0,5% m/V (5 g/L) de extracto de levadura (Laboratorios Britania, Argentina).

### **5.2.2. Levadura**

Se empleó *K. marxianus* (ATCC 8554) suministrada por la colección de cepas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química (Universidad Nacional del Litoral).

### **5.2.3. Antibióticos**

Considerando los resultados obtenidos en el Capítulo 4 de esta tesis, se trabajó con tres ATBs (Sigma-Aldrich, EEUU) representativos de las moléculas que afectan el crecimiento de *K. marxianus*: cefalexina (C-4895, cefalosporina), enrofloxacin (Y0001259, quinolona) y oxitetraciclina (O-5750, tetraciclina). La concentración de ensayo en todos los casos fue de 0,100 mg/L de ATBs, equivalente al LMR (Comunidad Europea, 2009; CAA, 2011).

#### 5.2.4. Determinación de biomasa

La cuantificación de la producción de biomasa se llevó a cabo a través de un método turbidimétrico a 620 nm utilizando un espectrofotómetro Boeco Modelo S-22 UV/Vis (Hamburg, Alemania). Para esto, se tomaron muestras de 2 mL (por duplicado) y se centrifugaron a 2500 rpm (700g) durante 10 min. Luego, las células se re-suspendieron en igual volumen con disolución fisiológica estéril y se determinaron las absorbancias a 620 nm. Estas lecturas de Densidad Óptica (DO) se convirtieron a peso seco (g/L) utilizando un modelo de regresión lineal ( $B=0,0005+0,243.DO$ ) calibrado previamente.

#### 5.2.5. Determinación de la concentración de lactosa

La concentración de lactosa se analizó mediante una técnica enzimática colorimétrica basada en la hidrólisis de lactosa en glucosa y galactosa, en presencia de  $\beta$ -galactosidasa (G5160 Sigma-Aldrich, EEUU). La cuantificación de glucosa se realizó con el método enzimático-colorimétrico de dos reacciones acopladas catalizadas con las enzimas glucosa oxidasa (G6125, Sigma-Aldrich, EEUU) y peroxidasa (P6782, Sigma-Aldrich, EEUU). El compuesto coloreado se leyó a 505 nm con un espectrofotómetro Boeco Modelo S-22 UV/Vis (Hamburg, Alemania). Los resultados se expresaron en términos de Lactosa Residual relativa ( $L_R$ ) y fueron calculados haciendo uso de siguiente ecuación:

$$L_R = \frac{L_x}{L_0} \quad (5.1)$$

Dónde:  $L_R$ : concentración de lactosa residual relativa,  $L_x$ : concentración de lactosa para la muestra a tiempo "x",  $L_0$ : concentración de lactosa a tiempo inicial.

#### 5.2.6. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteínas residual se analizó mediante la reacción colorimétrica de  $\alpha$ -aminoácidos con ninhidrina para formar un compuesto violáceo (púrpura de Ruhemann), que se cuantificó a 570 nm utilizando un espectrofotómetro (Hamburg, Alemania). Para interpretar los resultados en términos de consumo de proteína, las lecturas de absorbancia de cada muestra fueron expresadas como Proteína Residual relativa:

$$P_R = \frac{P_x}{P_0} \quad (5.1)$$

Dónde:  $P_R$ : concentración de proteína residual relativa,  $P_x$ : concentración de proteína para la muestra a tiempo "x",  $P_0$ : concentración de proteína a tiempo inicial.

### **5.2.7. Determinación de la concentración de alcohol**

Para la determinación cuantitativa de la concentración del alcohol etílico en lactosuero se empleó un test enzimático colorimétrico. Este analiza el contenido de alcohol etílico en la muestra a través de su reacción con  $NAD^+$  para producir acetaldehído y NADH en presencia de alcohol deshidrogenasa (ADH). El NADH formado durante la reacción se cuantificó a 340 nm utilizando un espectrofotómetro (Hamburg, Alemania) y es directamente proporcional a la concentración del alcohol etílico (Pruden, 1995). Los resultados se interpretaron en términos de g/L mediante una curva de calibrado construida a tal efecto ( $y = 297,36x - 60,246$ ;  $R^2 = 0,9938$ ).

### **5.2.8. Determinación de la concentración de amoníaco**

La concentración de amoníaco se evaluó con un test enzimático colorimétrico que se basa en la medición del amoníaco originado en una reacción enzimática en presencia de fenol e hipoclorito en medio alcalino, produciendo azul de indofenol que se determina colorimétricamente. La absorbancia a 540 nm se cuantifica utilizando un espectrofotómetro (Hamburg, Alemania) y es directamente proporcional a la concentración de amoníaco en la muestra (de la Fuente Oliver et al., 2017). Los resultados se interpretan en términos de g/L mediante una curva de calibrado construida a tal efecto ( $y = 0,5884x - 0,0017$ ;  $R^2 = 0,9894$ ).

### **5.2.9. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)**

Para determinar la demanda química de oxígeno se sometió la muestra a un reflujo, en presencia de sulfato de mercurio (II), con cantidad conocida de dicromato de potasio y ion plata como catalizador, en ácido sulfúrico concentrado, por un período determinado, durante el cual parte del dicromato reacciona con las sustancias reductoras presentes. Se testeó entonces el dicromato remanente con solución de sulfato de amonio y hierro (II) (sal de Mohr). A partir de la cantidad de dicromato reducido se calculó la DQO (1 mol de dicromato equivale a 1,5 moles de oxígeno) (ISO, 1989).

## 5.3. Primera parte: Selección de la fuente nitrogenada

### 5.3.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial 3x7 que permite evaluar tres variedades de proteínas a siete tiempos diferentes, empleando el medio de cultivo descrito en la Sección 5.2.1. Se emplearon 3 fermentadores de 100 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo, que se incubaron a 37°C y 2,5% m/V (25 g/L) de diferentes fuentes nitrogenadas (peptona de caseína, peptona de carne o triptona de carne; Biokar Diagnostics, Francia). Cada fermentador se inoculó con 20% de suspensión de *K. marxianus* de modo tal de obtener uniformidad en la Densidad Óptica inicial ( $DO_0 = 0,210 \pm 0,015$ ). Se realizaron ajustes de pH a 6,5 (empleando NaOH 0,1M) y muestreos cada 2 horas (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 horas), para las cuales se midieron la producción de biomasa (Sección 5.2.4) y la concentración de lactosa (Sección 5.2.5), expresada en términos de lactosa residual relativa.

### Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de la fuente nitrogenada sobre la producción de biomasa y lactosa residual relativa, se utilizó la opción stepwise del modelo lineal general de segundo grado con interacción, que permite incluir en el modelo aquellas variables significativas ( $p < 0,05$ ). Para ello, se empleó el paquete estadístico StatGraphics Centurión XVI (StatGraphics® 2008). El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 \cdot t_i + \beta_2 \cdot FN_j + \beta_{11} \cdot t_i^2 + \beta_{22} \cdot FN_j^2 + \beta_{12} \cdot t_i \cdot FN_j + \varepsilon_{ijk} \quad (5.3)$$

Dónde:  $Y_{ijk}$ : Variable dependiente (producción de biomasa (g/L), o lactosa residual relativa);  $\beta_0$ : intercepto;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$ ,  $\beta_{12}$ : Coeficientes estimados por el modelo;  $t_i$ : efecto del tiempo ( $i = 6$ ),  $FN_j$ : efecto de la fuente nitrogenada en términos de variable dummy ( $j = 3$ :  $FN_1$ : Triptona de soja=1,  $FN_2$ : Peptona de carne=0 y  $FN_3$ : Peptona de caseína=0;  $FN_1=0$ ,  $FN_2=1$  y  $FN_3=0$ ;  $FN_1=0$ ,  $FN_2=0$  y  $FN_3=1$ );  $t_i^2$ : efecto cuadrático del tiempo;  $FN_j^2$ : efecto cuadrático de la fuente nitrogenada;  $t_i \cdot FN_j$ : interacción del tiempo con la fuente nitrogenada;  $\varepsilon_{ijk}$ : error residual aleatorio del modelo.

### 5.3.2. Resultados y Discusión

En Tabla 5.1 se exponen las ecuaciones matemáticas obtenidas para los diferentes tipos de fuente nitrogenada sobre la producción de biomasa y la lactosa residual relativa (Ec. 5.3). Los coeficientes de regresión cuadráticos ajustados ( $R^2_{aj}$ ) para biomasa (88%) y lactosa (93%) indican una buena correlación entre los datos experimentales y el modelo propuesto.

**Tabla 5.1:** Modelos que representan el efecto de fuente nitrogenada sobre la producción de biomasa de *K. marxianus* y la lactosa residual.

Variable	$Y = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_{11} t^2 + \beta_2 FN + \beta_{12} t FN$	$R^2_{aj}$
Biomasa	$Y = 0,0482 + 0,0302 t + 0,0044 t^2$	88%
Lactosa	$Y = 1,005 - 0,0351 t - 0,005 t FN_1 - 0,00007 t FN_2 - 0,01 t FN_3$	93%

$R^2_{aj}$ : coeficiente de regresión cuadrático ajustado, x: tiempo, variable independiente, Y: producción de biomasa o concentración de lactosa residual (variable dependiente), FN<sub>1</sub>: Triptona de soja, FN<sub>2</sub>: Peptona de carne, FN<sub>3</sub>: Peptona de caseína.

Se construyó Fig. 5.1, en la cual se muestra el ajuste entre los datos experimentales (puntos) y las curvas representativas de los modelos ajustados (líneas). En efecto se puede observar así de manera comparativa el efecto de las tres fuentes nitrogenadas (triptona de soja, peptona de carne y peptona de caseína) sobre la producción de biomasa de *K. marxianus* y la lactosa residual a lo largo de las 12 h de fermentación. Evaluando las gráficas se puede observar que la producción de levaduras va acompañada de la disminución en la lactosa residual.

Las diferentes fuentes nitrogenadas no muestran efecto significativo ( $p > 0,05$ ) sobre la producción de biomasa, no obstante sí se observa diferencias en la lactosa residual. De acuerdo con los resultados de este estudio luego de 12 h se logra el mayor consumo de lactosa (54% de consumo y 46% de lactosa residual) con la peptona de caseína, seguido de triptona de soja (48% de consumo y 52% de lactosa residual) y peptona de carne (42% de consumo y 58% de lactosa residual). Algunos estudios previos sugieren como mejor alternativa la suplementación con sales de amonio (Grba et al., 2002; Aktaş et al., 2006), pero otros plantean mejores resultados con fuentes orgánicas (peptonas) (Serrat-Diaz et al., 2017). Al respecto, Xiao y VanBriesen (2006) mencionan que el crecimiento celular requiere menor gasto energético cuando se usan fuentes orgánicas en vez de fuentes inorgánicas. Con base a los

resultados de este ensayo los próximos experimentos se llevaron a cabo utilizando peptona de caseína como fuente nitrogenada.

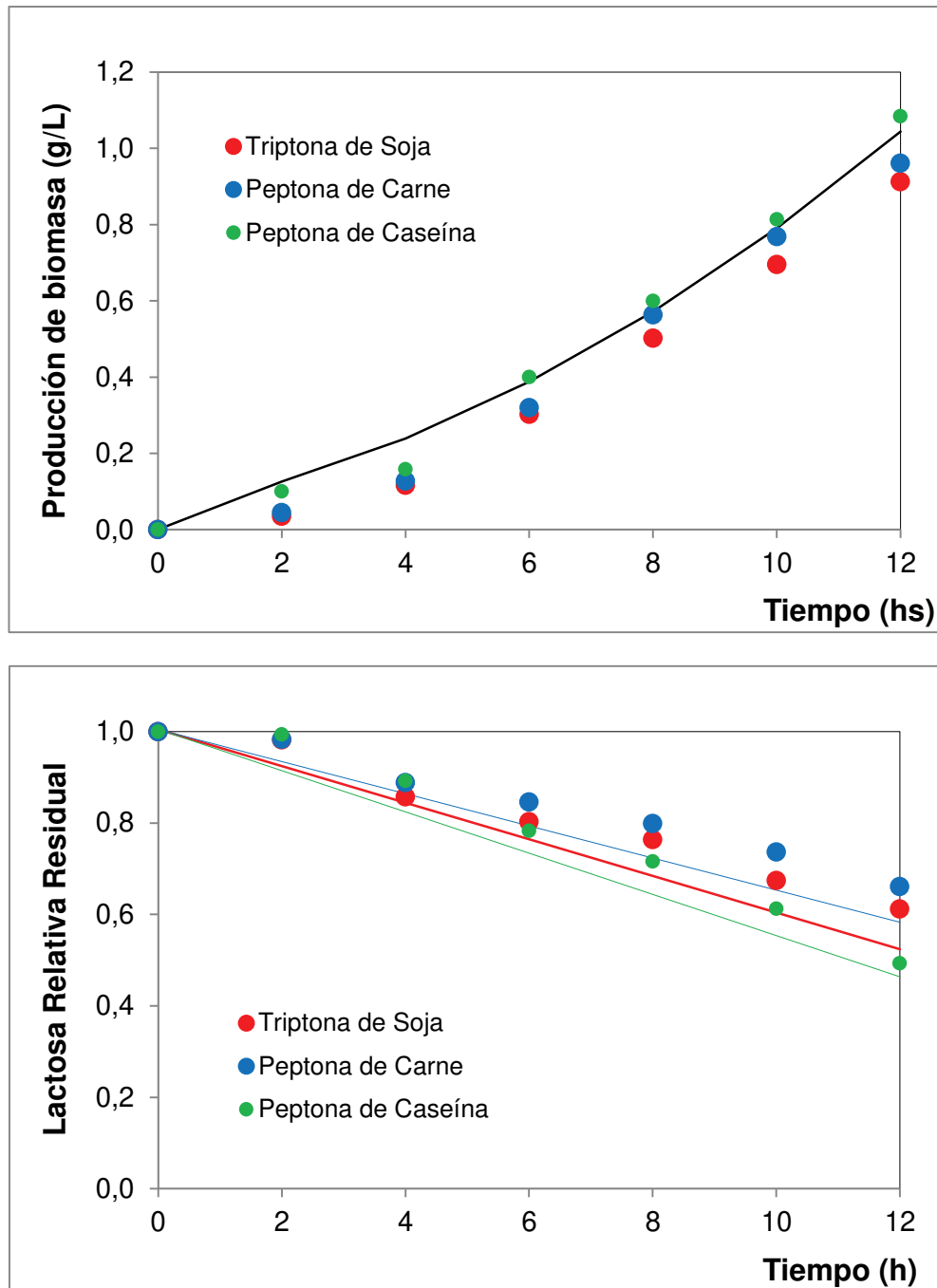


Fig. 5.1: Efecto del tipo de fuente nitrogenada sobre la producción de biomasa (arriba) de *K. marxianus* y la lactosa residual (abajo) a pH= 6,5 y T= 37°C.

## 5.4. Segunda parte: Selección del pH y la Temperatura

### 5.4.1. Diseño experimental

Empleando el medio de cultivo descrito en la Sección 5.2.1 y fortificado con 2,5% m/V (25 g/L) de peptona de caseína, se empleó un diseño factorial 3x3 que permite evaluar las fermentaciones a tres niveles de pH (5,5, 6,5 y 7,5) y tres temperaturas diferentes (32, 37 y 42°C). Para esto se utilizaron 9 fermentadores de 100 mL conteniendo 50 mL del medio de cultivo e inoculados con 20% de suspensión de *K. marxianus* a fin de lograr una Densidad Óptica inicial ( $DO_0 = 0,210 \pm 0,015$ ). Se hicieron ajustes de pH (NaOH 0,1M), agitaciones y muestreos cada 2 horas (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 horas). Se midió la producción de biomasa (Sección 5.2.4) y la concentración de lactosa (Sección 5.2.5), expresada en términos de lactosa residual relativa.

### Análisis estadístico

Para evaluar los efectos del pH y de la temperatura sobre la producción de biomasa y la lactosa residual relativa, se empleó la opción stepwise del modelo lineal general de segundo grado con interacción del paquete estadístico StatGraphics Centurión XVI (StatGraphics® 2008). Se incluyeron de esta manera todas las variables significativas ( $p < 0,05$ ) para el modelo matemático propuesto:

$$Y_{ijkl} = \beta_0 + \beta_1 \cdot t_i + \beta_2 \cdot P_j + \beta_3 \cdot Z_k + \beta_{11} \cdot t_i^2 + \beta_{22} \cdot P_j^2 + \beta_{33} \cdot Z_k^2 + \beta_{12} \cdot t_i \cdot P_j + \beta_{13} \cdot t_i \cdot Z_k + \beta_{23} \cdot P_j \cdot Z_k + \beta_{123} \cdot t_i \cdot P_j \cdot Z_k + \varepsilon_{ijkl} \quad (5.4)$$

Dónde:  $Y_{ijkl}$ : Variable dependiente (biomasa en g/L, o lactosa residual relativa);  $\beta_0$ : intercepto;  $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}, \beta_{123}$ : coeficientes estimados por el modelo;  $t_i$ : efecto del tiempo ( $i=6$ );  $P_j$ : efecto del pH ( $j=3$ );  $Z_k$ : efecto de la temperatura ( $k=3$ );  $t_i^2$ : efecto cuadrático del tiempo;  $P_j^2$ : efecto cuadrático del pH;  $Z_k^2$ : efecto cuadrático de la temperatura;  $t_i \cdot P_j$ : interacción del tiempo con el pH;  $t_i \cdot Z_k$ : interacción del tiempo con la temperatura;  $t_i \cdot P_j \cdot Z_k$ : interacción del tiempo con el pH y la temperatura;  $\varepsilon_{ijkl}$ : error residual aleatorio del modelo.



### 5.4.2. Resultados y Discusión

Las ecuaciones matemáticas calculadas mediante el modelo propuesto (Ec. 5.4) para los diferentes pH y temperaturas ensayadas se presentan en Tabla 5.2. Se exponen en esta la producción de biomasa y la concentración de lactosa residual relativa. Los  $R_{aj}^2$  obtenidos fueron mayores a 85%, lo que demuestra la adecuación del modelo propuesto a los datos experimentales.

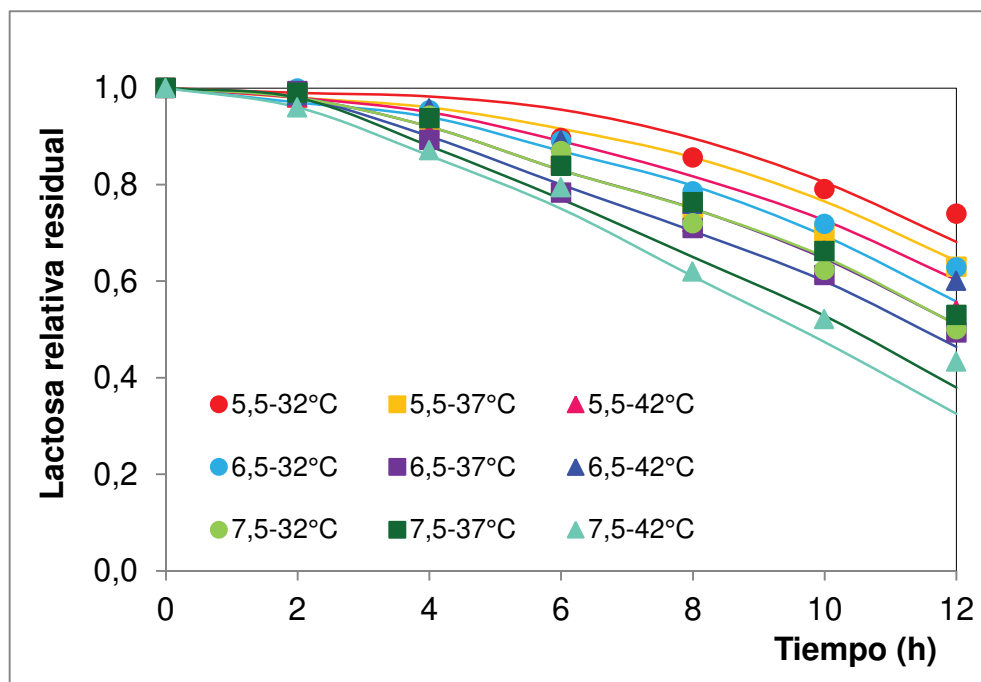
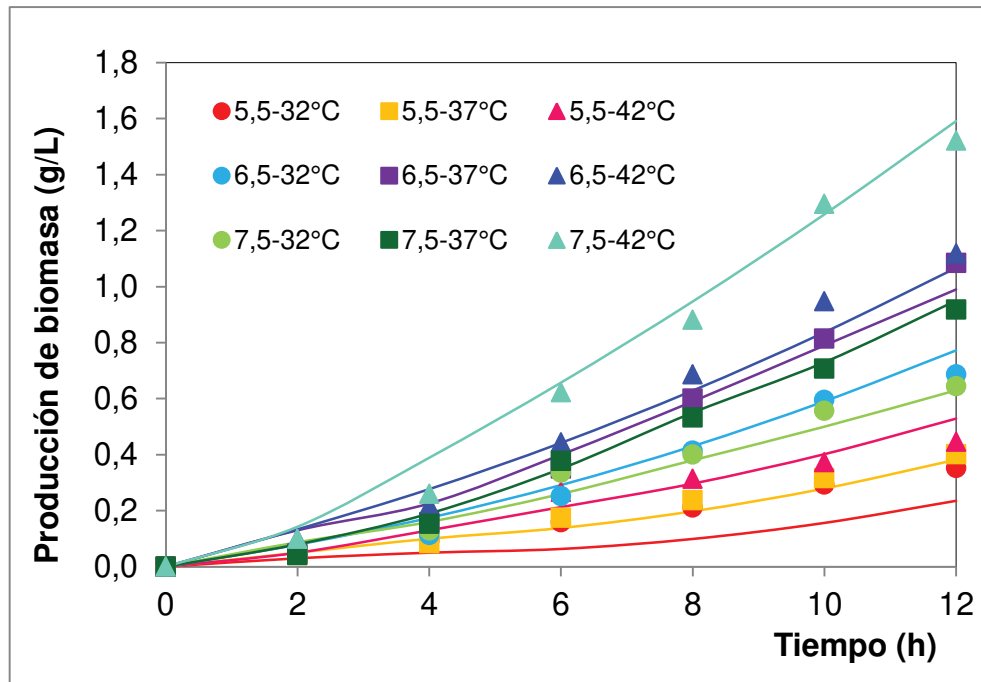
**Tabla 5.2:** Modelos que representan el efecto del pH y la temperatura sobre la producción de biomasa de *K. marxianus* y la concentración de lactosa residual

Variable	$Y = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_{11} t^2 + \beta_{22} pH^2 + \beta_{12} t pH + \beta_{13} t pH + \beta_{23} pH T + \beta_{123} t pH T$	$R_{aj}^2$
Biomasa	$Y = 0,2800 - 0,3812 t + 0,00269 t^2 - 0,0071 pH^2 + 0,0515 t pH + 0,0024 t T + 0,0004 pH T + 0,0005 t pH T$	93%
Lactosa	$Y = 1,2000 - 0,061 t + 0,0040 t^2 - 0,0063 t pH - 0,0015 pH T + 0,00001 t pH T$	86%

$R_{aj}^2$ : Coeficiente de regresión cuadrático ajustado, X: tiempo, variable independiente, Y: producción de biomasa o lactosa residual (variable dependiente), P: pH (5,5, 6,5 y 7,5); Z: temperatura (32, 37 y 42°C).

Se construyó luego Fig. 5.2, que expone de manera combinada el efecto del pH (5,5, 6,5 y 7,5) y la temperatura (32, 37 y 42°C), sobre la producción de biomasa de *K. marxianus* y el contenido de lactosa residual en función de las ecuaciones expuestas en Tabla 5.2. En dichas figuras se aprecia que aumentos del pH y la temperatura favorecen la producción de biomasa y disminuyen el contenido residual de lactosa, mientras que valores más bajos actuaron de manera contraria. Los resultados de este experimento muestran que la producción de biomasa aumenta un 77% y la lactosa residual disminuye 41% cuando se cambia de un pH de 5,5 y una temperatura de 32°C a un pH de 7,5 y una temperatura de 42°C. Este efecto queda además demostrado a través de las ecuaciones del modelo propuesto (Ec. 5.4), el cual señala una interacción entre el pH y la temperatura ( $p < 0,05$ ), que favorece de manera simultánea la producción de biomasa ( $\beta_{23} > 0$ ) y la disminución de lactosa residual ( $\beta_{23} < 0$ ) (Tabla 5.2).

No obstante, es difícil realizar una evaluación comparativa de nuestros resultados con los reportados por otros autores.



**Fig. 5.2:** Efecto del pH y de la temperatura sobre la producción de biomasa (arriba) de *K. marxianus* y la lactosa residual (abajo).

En efecto, para una temperatura de 30°C, Castrillo y Ugalde (1993) y Serrat-Díaz et al. (2017) mencionan óptimos resultados a pH 3,5 mientras que Gabardo et al. (2016) proponen pH 7,0. Por otra parte, para 35°C, Harden (1996) y Grba et al. (2002) opinan que el pH óptimo es de 4,5-5,0 para la producción de biomasa, pero Aktaş et al. (2006) indican efecto significativo sobre el consumo de lactosa a pH 6,0. Por su parte Serrat et al. (2017) señalan poco incremento

de la producción de biomasa (11%) cuando suben la temperatura de 30 a 40°C, pero bastante mayor (36%) cuando elevan el pH inicial de 3,5 a 5,4, destacando además que el trabajo en aerobiosis favorece la producción de biomasa.

Otro aspecto interesante a destacar es que, en todas las condiciones ensayadas se observó producción de biomasa de *K. marxianus* debido a su capacidad para utilizar lactosa como fuente de carbono. Sin embargo, en esta etapa (con 12 horas de duración) la producción de *K. marxianus* se halla en fase de crecimiento exponencial ( $\beta_{11}>0$ ), es decir, no llega a su crecimiento máximo (fase estacionaria). Esto coincide con lo observado por otros autores quienes proponen ensayos más prolongados para alcanzar la fase estacionaria. Por ejemplo, Zafar y Owais (2006) plantean fermentaciones de 14 h (en condiciones de anaerobiosis), mientras que Belem y Lee (1999) sugieren 20 h en aerobiosis y Padín González et al. (2006) alrededor de las 26 h de ensayo. Por su parte, para el mayor consumo de lactosa en condiciones aerobias, Aktaş et al. (2006) señalaron como mejor opción ensayos de 36 h, mientras que en anaerobiosis Das et al. (2006) requirieron 72 h.

Al respecto es preciso recordar que en este capítulo se plantea con un diseño experimental secuencial, en el cual se optimizan de manera consecutiva diferentes aspectos del proceso fermentativo, con la intención de lograr las mejores condiciones operativas. Por esto, considerando los resultados de este experimento, los próximos ajustes de diseño se llevarán a cabo utilizando peptona de caseína como fuente nitrogenada a un pH de 7,5 y una temperatura de 42°C, pero incrementando los tiempos de fermentación e incluyendo el efecto de la aireación para aumentar la producción de biomasa y disminuir la lactosa residual.

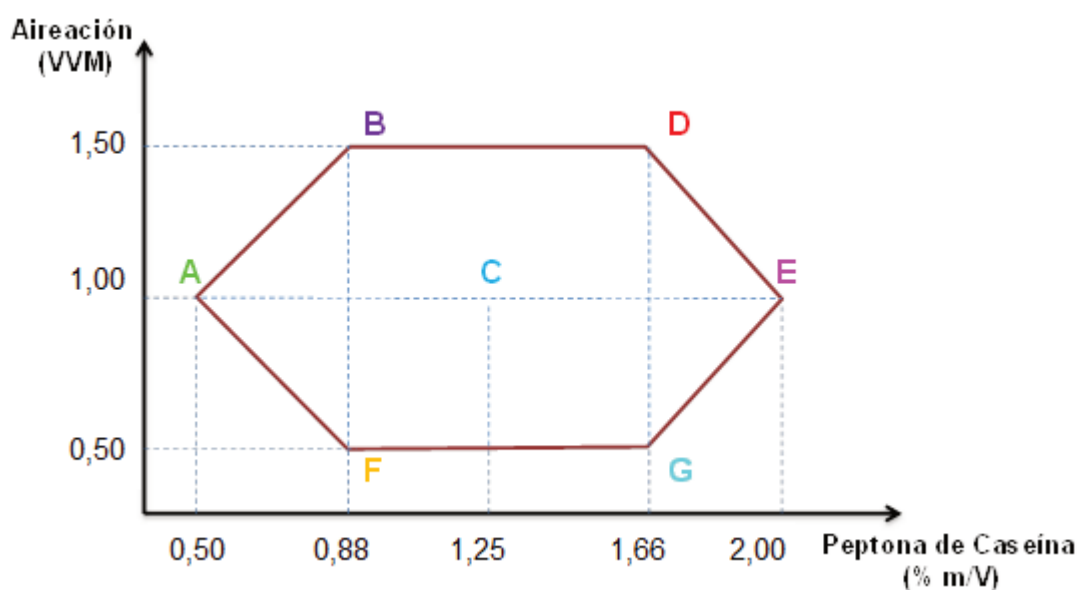
## **5.5. Tercera parte: Optimización de producción de biomasa**

### **5.5.1. Diseño experimental**

Se utilizó un Diseño Experimental de Matriz de Doehlert (ver Fig. 5.3) que permitió evaluar simultáneamente 3 niveles de aireación (NA: 0,5, 1,0 y 1,5 VVM) (volumen de aire por volumen de medio por minuto, del inglés *Volume of air per Volume of medium per Minute* - VVM), 5 concentraciones de peptona de caseína (PC: 0,50, 0,88, 1,25, 1,66 y 2,00% m/V) y tiempo de fermentación (36

horas) mediante un mínimo número de experimentos ( $n=7$ ) a fin de analizar efectos lineales, cuadráticos e interacción (con un mínimo número de grados de libertad) sobre la producción de biomasa y las concentraciones residuales de lactosa y proteínas del medio.

Se preparó un volumen apropiado de medio de cultivo (descrito en la Sección 5.2.1), de forma tal de disponer de siete reactores (frascos borosilicato 250 mL) con 100 mL de medio y 20% de suspensión de *K. marxianus* ( $DO_0 = 0,210 \pm 0,015$ ) en fase exponencial. Éstos se incubaron a  $42^\circ\text{C}$  durante 36 horas, con agitación y ajustes de  $\text{pH}=7,5$  (NaOH 0,1M), cada 2 horas.



**Fig. 5.3:** Diseño en matriz Doehlert empleado para la selección de condiciones de trabajo.

Se realizaron determinaciones de biomasa (Sección 5.2.4), concentración de lactosa (en términos de lactosa residual, ver Sección 5.2.5), concentración de proteínas (en términos de proteína residual, ver Sección 5.2.6), producción de alcohol (Sección 5.2.7), amoníaco (Sección 5.2.8) y Demanda Química de Oxígeno, DQO (Sección 5.2.8).

### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron utilizando la opción stepwise del Modelo de Regresión Lineal Múltiple de segundo orden con interacción del paquete estadístico StatGraphics Centurión XVI (StatGraphics® 2008), de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \beta_0 + \beta_1 \cdot t_i + \beta_2 \cdot NA_j + \beta_3 \cdot CPC_k + \beta_{11} \cdot t_i^2 + \beta_{22} \cdot NA_j^2 + \beta_{33} \cdot NA_k^2 + \beta_{12} \cdot t_i \cdot NA_j + \beta_{13} \cdot t_i \cdot CPC_k + \beta_{23} \cdot NA_j \cdot CPC_k + \varepsilon_{ijkl} \quad (5.5)$$

Dónde:  $Y_{ijkl}$ = Modelo de Regresión Lineal General;  $\beta_0$ : ordenada al origen;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$ ,  $\beta_{33}$ ,  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{23}$ : coeficientes estimados por el modelo;  $t_i$ : efecto del tiempo ( $i=19$ );  $NA_j$ : efecto del nivel de aireación ( $j=3$ );  $CPC_k$ : efecto de la concentración de peptona de caseína ( $k=5$ );  $t_i^2$ : efecto cuadrático del tiempo;  $NA_j^2$ : efecto cuadrático del nivel de aireación;  $CPC_k^2$ : efecto cuadrático de la concentración de peptona de caseína;  $t_i \cdot NA_j$ : interacción del tiempo con el nivel de aireación;  $t_i \cdot CPC_k$ : interacción del tiempo con la concentración de peptona de caseína;  $NA_j \cdot CPC_k$ : interacción del nivel de aireación con la concentración de peptona de caseína;  $\varepsilon_{ijkl}$ : error residual del modelo. Además, se calculó el coeficiente de regresión cuadrático ( $R_{aj}^2$ ) como parámetro de la adecuación del modelo propuesto.

**Análisis de superficie de respuesta:** La metodología de superficie de respuesta involucra un conjunto de técnicas estadísticas que se utilizan para modelar y analizar situaciones problemas que buscan la optimización de una (o varias) respuesta(s) a través de un número mínimo de variables. En este caso concreto, se pretendió analizar y modelar el efecto de las variables control (concentración de proteínas, aireación y tiempo de fermentación) sobre las variables respuestas (niveles de lactosa y proteínas de medio de cultivo residual y la producción de biomasa).

Para ello, se efectuó un modelado empírico, mediante el empleo de ecuaciones de segundo grado con interacciones, a fin de describir las superficies de respuestas que se representan como una superficie en un espacio tridimensional que permite visualizar mejor los efectos de las diferentes variables predictivas sobre cada una de las variables respuesta que se desea optimizar.

En el presente estudio se modelaron las concentraciones de lactosa y proteínas residuales, y la producción de biomasa como una función de los niveles de proteínas, aireación y tiempo de fermentación. Al igual que otros procedimientos estadísticos, se trató de lograr el principio de parsimonia, es

decir, se buscó que la superficie de respuesta quede expresada con un número reducido de variables y polinomios de bajo orden.

**Optimización mediante la función Deseabilidad de Derringer y Suich:** En caso de optimizar un sistema que presenta múltiples respuestas, resulta prácticamente imposible optimizar cada una de ellas por separado, más aún, cuando se trata de maximizar algunas (como la producción de biomasa) y minimizar otras (como la lactosa y proteínas residuales), el análisis estadístico debe realizarse en forma multivariante.

Cuando el número de respuestas es reducido, una simple superposición de las gráficas de contorno de la optimización para cada respuesta individual, permite estimar las soluciones. Por el contrario, cuando el número de respuestas es elevado (tres o más), la metodología de gráficas no resulta conveniente. Por ello, la función Deseabilidad propuesta por Derringer y Suich (1980), brinda las condiciones experimentales satisfactorias para obtener la mejor optimización de las respuestas como la optimización de procesos industriales con múltiples respuestas (Myers y Montgomery, 1995).

Para el cálculo de dicha función se postula que se puede calcular una función deseable  $d_i(Y_i)$  para cada respuesta  $Y_i(x)$ . Esta función  $d_i(Y_i)$  toma valores comprendidos entre 0 y 1, de modo tal que  $d_i(Y_i)= 0$  representa un valor no deseable y  $d_i(Y_i)= 1$  representa un valor altamente deseable. Las deseabilidades individuales se combinan después, generando la función *Deseabilidad (D)* global:

$$D = (d_1 \cdot d_2 \cdot d_i \cdot \dots \cdot d_n)^{\frac{1}{n}} = \left( \prod_{i=1}^n d_i \right)^{\frac{1}{n}} \quad (5.6)$$

Dónde:  $n$  es el número de respuestas,  $d_i$  es la deseabilidad específica de la respuesta “ $i$ ”, y “ $D$ ” es la deseabilidad global para múltiples respuestas a optimizar. Se debe destacar que en el caso que una de las respuestas “ $Y_i$ ” resulte indeseable ( $d_i = 0$ ), entonces la deseabilidad de esa respuesta  $d_i(Y_i)$  será igual a cero, y por lo tanto, la función deseabilidad global será nula. En la práctica se usan los valores de las respuestas estimadas mediante la ecuación de ajuste de la superficie de respuesta en lugar de los valores de las respuestas experimentales.

Además, la función deseabilidad permite asignarle a cada respuesta una importancia relativa con respecto a las demás respuestas. La importancia relativa ( $r_i$ ) puede tomar valores como “1” para las respuestas menos importante, hasta un valor de “5” para aquellas más importante. En caso de asignar un grado de importancia a cada respuesta, la función deseabilidad se puede expresar de la siguiente forma:

$$D = (d_1^{r_1} \cdot d_2^{r_2} \cdot \dots \cdot d_n^{r_n})^{\frac{1}{\sum r_i}} = \left( \prod_{i=1}^n d_i^{r_i} \right)^{\frac{1}{\sum r_i}} \quad (5.7)$$

La función deseabilidad permite realizar en forma simultáneas tres tipos de optimizaciones: minimizar parámetros (como por ejemplo los efluentes contaminantes, tipo lactosa y proteínas residuales al ambiente), maximizar otros parámetros (por ejemplo, la producción de biomasa) y ajustar a un valor fijo otros parámetros, es decir, permite trabajar en forma multivariante con diferentes objetivos para cada respuesta.

Una vez especificados los criterios de optimización, se generarán las coordenadas de las variables independientes donde la función  $D$  toma su mayor valor. Se debe aclarar que, en todos los puntos donde la deseabilidad global ( $D$ ) es distinta de 0, se cumplen todos los criterios especificados -en mayor o en menor medida-, por lo tanto, se puede trabajar experimentalmente en una *zona de condiciones óptimas*, aunque las mejores condiciones podrían ser aquellas donde  $D$  toma su mayor valor.

En el caso específico de este trabajo, se utilizó la función deseabilidad para optimizar las condiciones operativas de trabajo (aireación y proteína) que permitan maximizar la producción de biomasa de *K. marxianus* y minimizar las concentraciones de lactosa y proteína residuales del medio (StatGraphics® 2008). En Tabla 5.3 se resumen los criterios utilizados para la optimización de las variables respuestas, así como también la importancia relativa de cada una de ellas sobre el efecto ambiental. Las concentraciones residuales de lactosa y proteína fueron ponderadas con el máximo nivel ( $r= 5$ ), mientras que la producción de biomasa fue ponderada con un nivel intermedio ( $r= 3$ ).

**Tabla 5.3:** Criterios de optimización configurados en la función deseabilidad

Antibiótico	Criterio	Importancia
Lactosa residual	Minimizar	5
Proteína residual	Minimizar	5
Biomasa	Maximizar	3

### 5.5.2. Resultados y Discusión

La Tabla 5.4 exhibe las ecuaciones que relacionan la producción de biomasa y las concentraciones residuales de lactosa (Ec. 5.1) y proteína (Ec. 5.2), en términos de sus factores significativos ( $p < 0,05$ ). Como puede apreciarse, los  $R^2_{aj}$  para la producción de biomasa fue 91%, para la lactosa residual 96% y para proteína residual 77%, indicando un adecuado ajuste del modelo utilizado. En dicha tabla se aprecia que altos niveles de aireación favorecen el proceso respiratorio, acompañados de una mayor producción de biomasa y una disminución del contenido residual de lactosa y proteína en el medio. Por el contrario, la disminución en el nivel de aireación favorece el proceso fermentativo de la levadura, aparejado con una disminución en la producción de biomasa y un incremento en la producción de alcohol. Este efecto queda además demostrado a través de las ecuaciones del modelo propuesto (Ec. 5.5), el cual a través de su coeficientes ( $\beta_3 > 0$ ,  $\beta_{23} > 0$ ) señala que altas concentraciones de peptona de caseína ( $p < 0,05$ ) favorecen la producción de biomasa a medida que transcurre el tiempo de ensayo ( $\beta_{13} > 0$ ).

**Tabla 5.4:** Modelos que relacionan la producción de biomasa y los contenidos de lactosa y proteína residuales con el nivel de aireación y la concentración de peptona de caseína.

Variable	$Y = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 NA + \beta_3 CPC + \beta_{11} t^2 + \beta_{22} NA^2 + \beta_{33} CPC^2 + \beta_{12} t NA + \beta_{13} t CPC + \beta_{23} NA CPC$	$R^2_{aj}$
Biomasa	$Y = 4,9437 + 0,0437 t + 6,5557 NA + 3,3950 CPC - 0,0023 t^2 + 0,0933 t CPC - 3,2779 NA^2 - 1,2788 CPC^2$	91%
Lactosa	$Y = 5,4085 - 0,1222 t - 1,0675 NA - 0,5671 CPC + 0,00078 t^2 - 0,0163 t NA + 0,5694 NA^2$	96%
Proteína	$Y = 7,4429 - 0,0632 t - 7,5339 NA - 2,4997 CPC + 0,0255 t NA + 1,4456 NA^2 + 2,4997 CPC NA$	77%

$R^2_{aj}$ : Coeficiente de regresión cuadrático ajustado, t: tiempo, Y: Variable respuesta (producción de biomasa, lactosa residual o proteína residual), NA: nivel de aireación; CPC: concentración de peptona de caseína.



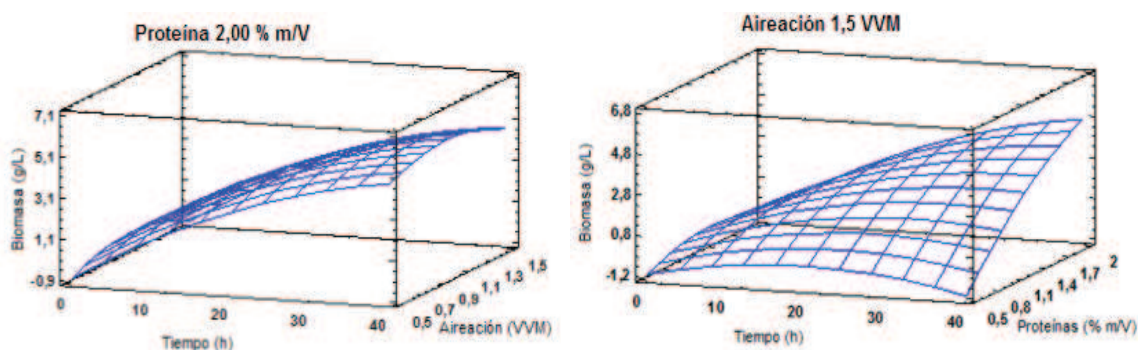
Asimismo, a través del coeficiente  $\beta_{22}<0$  muestra como la aireación favorece el mecanismo fermentativo, con disminución en la producción de biomasa. En lo que respecta a lactosa residual, a través de sus coeficientes  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_{12}$ , menores a cero, se observa que tanto la concentración de peptona de caseína como la aireación favorecen el consumo de lactosa. Observándose una comportamiento similar para la proteína residual ( $\beta_2<0$ ,  $\beta_3<0$ ).

El crecimiento de *K. marxianus* en los diferentes reactores alcanzó la fase estacionaria aproximadamente luego de 24 h de ensayo con una concentración celular de aproximadamente de 3,99-4,37 g/L (para un inóculo inicial de 0,23 g/L). Además, se observa que la máxima producción de biomasa (4,51-4,49 g/L) se produjo en los reactores suplementados con 2,00% m/V de PC, reactores D (1,5 VVM) y E (1,0 VVM), y la mínima (1,02-0,91 g/L) en los reactores suplementados con 0,88% m/V, reactores B (1,5 VVM) y F (0,5 VVM). Observando estos resultados se deduce que la concentración de peptona de caseína tiene mayor efecto en la producción de *K. marxianus* que la aireación, pudiendo así contrarrestar la disminución en la producción de biomasa que se observa en los fenómenos fermentativos (Grba et al., 2002; Aktaş et al., 2006; Serrat-Díaz et al., 2017). No obstante, debido a que el objetivo de esta tesis es producir biomasa con la intención de disminuir el efecto ambiental, incrementar la suplementación inicial de peptona de caseína, es una alternativa inviable.

Consecuentemente, se visualizó que los reactores con mayor producción de biomasa (reactores D y E) resultaron tener además los menores contenidos residuales de lactosa y de proteína 0,28-0,32% m/V y 0,20-0,46% m/V, respectivamente. Mientras que el reactor F (0,88% m/V-0,5 VVM), con menor producción de biomasa, al finalizar el ensayo presentó los mayores valores residuales de lactosa (1,28% m/V) y proteína (1,13% m/V). Por el contrario, este fenómeno no ocurrió en el reactor B (0,88% m/V-1,5 VVM), puesto que tanto las cantidades residuales de lactosa (0,47% m/V) como la de proteínas (0,07% m/V) fueron bajas. Algunos autores explican que dicha diferencia de comportamiento entre los reactores B y F podría atribuirse a la menor velocidad en que ocurren los procesos fermentativos en comparación con los respiratorios. Es decir, el proceso fermentativo sería más lento pues iniciaría con la degradación biológica de materia nitrogenada en la fase de latencia, para luego, en la fase exponencial

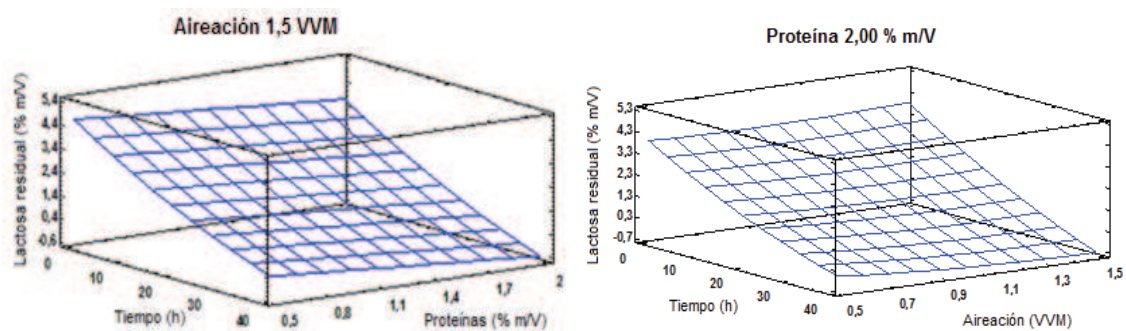
continuar con la fermentación de los azúcares (Thompson y Hobson, 1971; Chen et al. 2008; Huertas, 2010; Leyva 2010). De acuerdo con Bellaver et al. (2004) este fenómeno también podría explicarse debido a que en aerobiosis la baja actividad piruvato descarboxilasa y la relativamente alta actividad de la acetil-CoA sintetasa deshidrogenasa en *K. marxianus* hacen que el acetaldehído se oxide evitando así su reducción a etanol.

Se presenta a continuación el resultado de las superficies de respuesta realizadas. En la Fig. 5.4 se presentan las superficies de respuesta para la producción de biomasa en función de la aireación-tiempo y proteínas-tiempo. Se observa que la producción de biomasa crece en la medida que se incrementa la aireación, concentración de proteínas y tiempo. Asimismo, se visualiza un efecto cuadrático para las tres variables (Tabla 5.4), hecho que manifiesta la saturación en la medida que se incrementan los tres parámetros.



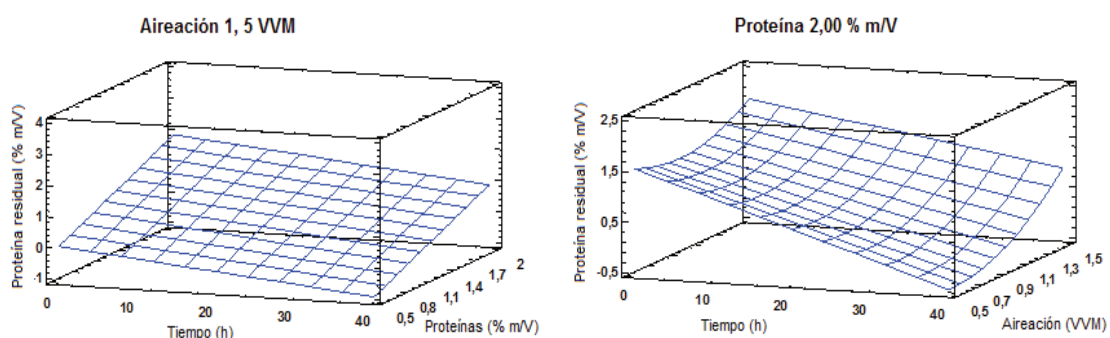
**Fig. 5.4:** Superficies de Respuesta Estimada para el efecto del nivel de aireación (VVM)-tiempo (h); y la concentración de proteínas (% m/V)-tiempo (h) sobre la producción de biomasa (g/L).

En forma similar, la Fig. 5.5 representa las superficies de respuesta de la concentración de lactosa residual (% m/V) en función de aireación-tiempo y proteínas-tiempo. Se observa una disminución de los niveles de lactosa conforme la fermentación avanza, y que los mayores consumos de lactosa se obtienen a concentraciones más elevadas de peptona de caseína y mayor aireación. Se aprecia una disminución lineal en los niveles de lactosa con respecto a las proteínas, mientras que el tiempo y la aireación muestran un leve efecto cuadrático.



**Fig. 5.5:** Superficies de Respuesta Estimada para el efecto del nivel de aireación (VVM)-tiempo (h) y la concentración de proteínas (% m/V)-tiempo (h) sobre la concentración de lactosa residual (% m/V).

La Fig. 5.6 representa los niveles de proteínas residuales (% m/V) en términos de aireación-tiempo y proteínas-tiempo. Al igual que en el caso de lactosa, las proteínas residuales disminuyen en la medida que el tiempo de reacción avanza. Se visualiza una disminución lineal de los niveles de proteínas con el tiempo de reacción y la concentración de proteínas inicial, mientras que la aireación presenta un efecto cuadrático, como lo indica la ecuación de la Tabla 5.4.



**Fig. 5.6:** Superficies de Respuesta Estimada para el efecto del nivel de aireación (VVM)-tiempo (h) y las proteínas (% m/V)-tiempo (h) sobre la concentración de proteínas residual (% m/V).

Es interesante destacar que estos resultados concuerdan con los expuestos en la literatura, donde se propone que en condiciones aerobias las levaduras degradan rápidamente las moléculas de lactosa por vía respiratoria con generación de energía, lo que favorece la producción de biomasa y el consecuente consumo de lactosa, mientras que lo contrario ocurre en el proceso fermentativo (Guimarães et al., 2010; Grba et al., 2002; Silveira et al., 2005; Serrat-Díaz et al., 2017; Zoppellari y Bardi, 2013). Asimismo Grba et al. (2002) plantearon que el incremento en la producción de biomasa en condiciones

aeróbicas es una consecuencia del mecanismo de respiración, el cual promueve la degradación de azúcares y la liberación de energía, estimulando la multiplicación celular, mientras que la eliminación del suministro de aire lleva a la vía fermentativa, en la cual prevalece la producción de etanol.

Por su parte, Padín González et al. (2006) reportaron la aparición de la fase estacionaria de crecimiento alrededor de las 26 h de ensayo, y una producción de biomasa un poco mayor (5 g/L), pero para un inóculo inicial de 0,8 g/L, 4 veces mayor al nuestro. Además trabajando de manera anaerobia mencionaron un consumo de lactosa del 99% (con concentración inicial de lactosa de 7% m/V) y una muy elevada producción de etanol de 35,2 g/L. Por su parte Das et al. (2006) indicaron que fermentando (sin aireación) 72 h lactosuero fortificado con 150 g/L en lactosa (aproximadamente 4 veces mayor a la empleada en nuestro estudio) obtuvieron 6,02 g/L de *K. marxianus*, el consumo casi completo del azúcar y 43,7 g/L de alcohol. Esto demuestra otra vez que el ensayo fermentativo favorece la producción de alcohol en detrimento de la producción de biomasa. Por otra parte, en reactores con flujo de oxígeno, Serrat-Díaz et al. (2017) destacaron un incremento en la producción de biomasa del 76%, al igual que Silveira et al. (2005) quienes expusieron que condiciones aeróbicas favorecen la producción celular, y bajos niveles de oxígeno la producción de etanol (metabolismo fermentativo). Adicionalmente Aktaş et al. (2006) señalaron que al trabajar con *K. marxianus* y una oxigenación de 0,8 VVM durante 36 h, obtuvieron un consumo casi total de la lactosa. Por esto, Zoppellari y Bardi (2013) sugirieron trabajar en condiciones mixtas, comenzando en condiciones aerobias (1 VVM), para luego cortar el suministro de aire. Asimismo, Silveira et al. (2005) investigaron el efecto del nivel de oxígeno en la fermentación de permeado de suero (con concentraciones de lactosa en el rango 0,1-24% m/V), observando también que bajos niveles de oxígeno favorecen el metabolismo fermentativo, o sea mayor productividad volumétrica de etanol en hipoxia (poco suministro de oxígeno), seguida de una disminución en anoxia (mínimo suministro de oxígeno) y luego en condiciones aeróbicas. Destacaron además mayor rendimiento etanol/lactosa en condiciones anóxicas e hipóxicas que en condiciones aeróbicas. Además, Bellaver et al. (2004) sugirieron que en aerobiosis, como consecuencia de la baja actividad de la enzima piruvato

descarboxilasa, *K. marxianus* favorecería la vía de la acetil-CoA sintetasa deshidrogenasa generando acetaldehído en vez de etanol.

Se muestra así que la disponibilidad de oxígeno es un factor clave, el cual afecta el rendimiento de la levadura durante su crecimiento. En este sentido, modificando el suministro de oxígeno se puede favorecer la producción de biomasa o de alcohol. Al respecto, Guimarães et al. (2010) mencionaron que la biosíntesis de lípidos de membrana (esteroles y ácidos grasos insaturados) requiere un ajuste adecuado de la oxigenación, ya que altas concentraciones podrían causar crecimiento celular excesivo, con la consecuente reducción en el rendimiento de etanol.

Se observa así la falta de consenso respecto de la mejor fuente nitrogenada a emplear. No obstante se cree que las fuentes orgánicas tienen menor requisito energético que las fuentes inorgánicas (Xiao y VanBriesen, 2006; Rojas et al., 2015). Por esto, Serrat-Diaz et al. (2017), mencionan mejores resultados utilizando 5 g/L de peptona, mientras que otros autores sostienen la suplementación con fuentes inorgánicas como mejor alternativa (Grba et al., 2002; Aktaş et al., 2006).

En lo referente a las condiciones de operaciones aerobias o anaerobias, se observó mejor correlación entre la propuesta de oxigenación expresada en esta tesis (para favorecer la producción de biomasa y minimizar el contenido residual de lactosa) y el énfasis en el empleo de condiciones aerobias propuesto en la literatura. Así, por ejemplo utilizando 0,8 VVM de aire estéril enriquecido en oxígeno, Aktaş et al. (2006) consiguieron la eliminación del 95% de lactosa después de una fermentación de 18 h. Mientras que otros proponen que mejor alternativa es insuflar 1 VVM de aire (Silveira et al., 2005; Zoppellari y Bardi, 2013).

Se destaca además que en la literatura también se propone el empleo de modelos matemáticos como herramientas esenciales para la optimización e implementación industrial de sistemas de fermentación (Castrillo y Ugalde, 1993; Zafar y Owais, 2006).

La Tabla 5.5 presenta de manera resumida (0, 12, 24 y 36 h) los valores obtenidos en las mediciones de amoníaco, alcohol y DQO para cada reactor, expresados todos en % m/V para una mejor comparación de los mismos.

**Tabla 5.5:** Valores medios de concentración alcohol, amoníaco y DQO según el Diseño Dohelert.

Reactor	CPC (% m/V)	NA (VVM)	Tiempo (h)	Alcohol (% m/V)	NH <sub>3</sub> (% m/V)	DQO (% m/V)
Reactor A	0,50	1,00	0	0,00	0,01	5,30
			12	0,00	0,04	4,86
			24	0,01	0,05	4,02
			36	0,02	0,05	3,61
Reactor B	0,88	1,5	0	0,00	0,02	5,58
			12	0,00	0,06	4,86
			24	0,00	0,06	4,01
			36	0,01	0,07	3,62
Reactor C	1,0	1,25	0	0,00	0,03	5,90
			12	0,00	0,05	5,56
			24	0,01	0,06	4,05
			36	0,01	0,06	3,64
Reactor D	1,66	1,5	0	0,00	0,03	5,75
			12	0,00	0,05	5,90
			24	0,00	0,06	4,07
			36	0,01	0,06	3,67
Reactor E	2,00	1,0	0	0,00	0,04	6,46
			12	0,00	0,05	4,64
			24	0,00	0,06	3,89
			36	0,01	0,08	3,49
Reactor F	0,88	0,5	0	0,00	0,04	6,18
			12	0,01	0,07	5,28
			24	0,03	0,07	4,62
			36	0,09	0,07	3,50
Reactor G	1,66	0,5	0	0,00	0,02	6,07
			12	0,00	0,05	5,16
			24	0,03	0,07	4,32
			36	0,06	0,07	3,89

CPC: concentración de peptona de caseína, NA: nivel de aireación; DQO: demanda química de oxígeno.

Consistentemente con el hecho de que los procesos fermentativos favorecen la producción de alcohol y metabolitos secundarios (Guimarães et al., 2010; Huertas, 2010; Chavan et al., 2015), nuestros resultados mostraron máxima elaboración de alcohol para los reactores menos aireados (0,5 VVM): 0,85 g/L (reactor F-0,88% m/V de PC) y 0,58 g/L (reactor G-1,66% m/V de PC). Además se observó que en los reactores con el máximo nivel de aireación (1,5 VVM) la producción alcohólica fue menor: 0,07 g/L (reactor B-0,88% m/V de PC) y 0,06 g/L (reactor D-1,66% m/V de PC). Se deduce así que el empleo de lactosa para la generación de biomasa mediante la vía respiratoria es la más conveniente debido a que, como consecuencia del alto rendimiento energético (en forma de

ATP), favorece el crecimiento celular. Es decir, en aerobiosis, existe una estrecha relación entre el consumo de lactosa y la producción de biomasa (Mejía-Barajas et al., 2016).

Aunque la producción de alcohol en todos los casos fue baja, en los reactores con menor suministro de aire (F y G) se alcanzaron los valores más altos, y la producción de biomasa se vio afectada pero no minimizada, debido quizás a las buenas características nutricionales del lactosuero. Se sabe que la disponibilidad de oxígeno es necesaria para la biosíntesis de varias moléculas, como ácidos grasos insaturados, esteroides y aminoácidos (Mannazzu et al., 2008; Zara et al., 2009) luego, cuando las células de levadura pueden encontrar estas moléculas en el medio de crecimiento, pueden crecer y sintetizar las proteínas transportadoras de la membrana y las enzimas necesarias para catabolizar la lactosa. Se evidencia así que en nuestros experimentos, el lactosuero puede satisfacer estas necesidades. Además, el mayor porcentaje de lactosa residual en los reactores con baja aireación (F y G) indicaría menor transporte a la célula para ser catabolizado, probablemente debido a funciones alteradas de las membranas plasmáticas cuando las células no pudieron encontrar en el medio de crecimiento los nutrientes necesarios para adaptar la composición de la membrana al estrés y a su dificultad de sintetizarlos debido al menor suministro de aire (Belviso et al., 2004; Mannazzu et al., 2008; Zara et al., 2009)

Otro de metabolito secundario producido en el proceso fermentativo es el amoníaco (Chen et al. 2008; Huertas, 2010). Según Leyva (2010), la desaminación de péptidos y aminoácidos genera amoníaco, el cual se produce por acción de las levaduras durante sus procesos metabólicos de síntesis celular, oxidándolo a compuestos volátiles, como los ácidos grasos, CO<sub>2</sub> y agua. En efecto, durante la fermentación con levaduras la producción de amoníaco aumenta con el tiempo de ensayo (Brea-Maure et al., 2015). Al respecto, Thompson y Hobson (1971) indicaron que la disponibilidad de amoníaco es limitante para las levaduras, y que cuando este no es suficiente entran a fase de latencia, para luego en la fase exponencial fermentar los azúcares. En Tabla 5.5 se muestra la relación que existe entre la CPC inicial y el amoníaco producido. En efecto, se observa que la producción de amoníaco fue máxima (0,76 g/L)

para el reactor conteniendo la mayor CPC (reactor E) y mínima (0,50 g/L) para el reactor con menor concentración de esta fuente nitrogenada (reactor A), destacándose el hecho de que ambos reactores funcionaron con el mismo nivel de aireación (1,0 VVM). Concentraciones en el rango de las presentadas en esta tesis también fueron expuestas por Huerta et al. (2010) cuando realizó tratamientos de digestión aerobia de lactosuero.

Además se evaluó la DQO, con valores iniciales de 53,04 g/L para el reactor A (0,50% m/V de PC) y 64,63 g/L para reactor E (2,00% m/V PC) y que tras 36 horas de ensayo la DQO disminuyeron entre 32-46%. Corresponde mencionar que las DQO iniciales obtenidas en este ensayo están en línea con las reportadas (30-68 g/L) por Muñi et al. (2005) para lactosuero y con el 56% de disminución expuesto por Huertas (2010) luego del tratamiento aerobio de aguas residuales conteniendo lactosuero. Asimismo es interesante mencionar que los iones amoníaco no son cuantificados en la DQO (Aquino et al., 2006).

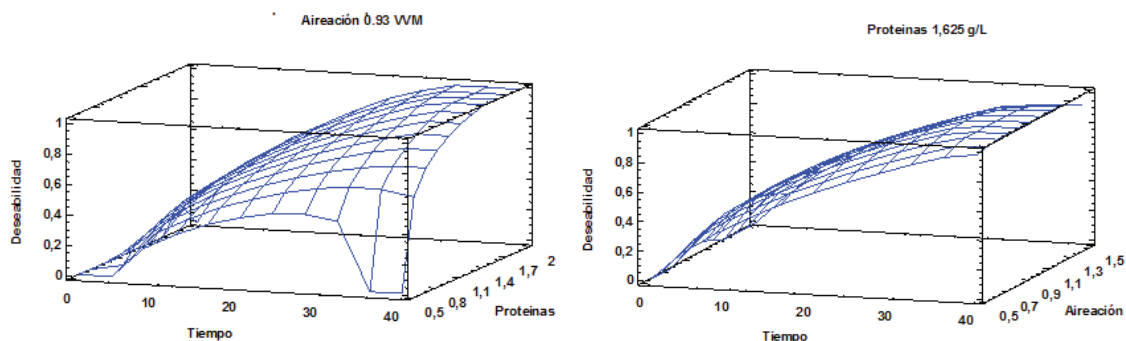
En este punto de la discusión es interesante indicar que el elevado consumo en lactosa (93%) y proteína (92%) reportado en esta tesis no condice con la disminución de DQO (46% en el mejor de los casos). Esto también fue planteado por otros autores, por ejemplo Huertas (2010) quien tratando de manera aerobia efluentes lácteos, logró una eficiencia de degradación de DQO del 56%, un consumo de lactosa del 99% y de proteínas del 64%. Además, Vidal et al. (2000) sugirieron que en condiciones anaerobias la hidrólisis de proteínas es más lenta que la hidrólisis de carbohidratos, por cuanto la eficiencia de degradación en proteína es menor a la de carbohidratos.

Finalmente, para optimizar los factores de diseño (concentración de proteínas, aireación y tiempo), en esta tesis se aplicó la función deseabilidad (Ecuación 5.7) *minimizando* los contenidos residuales de lactosa y proteína ( $r= 5$ ) y *maximizando* la producción de biomasa ( $r= 3$ ).

En la Fig. 5.7 se presenta la función deseabilidad para diferentes valores de aireación, concentración de peptona de caseína y tiempo de producción. El valor más elevado de deseabilidad (valor óptimo de 1,00) se obtuvo para un tiempo de 35,64 horas, una concentración inicial de proteínas de 1,63 % m/V (PC) y un nivel de aireación de 1,5 VVM. Para estos valores óptimos de las variables de



control se obtuvieron adecuados valores de biomasa (4,48 g/L), y bajos niveles de lactosa (0,09% m/V) y proteínas (0,02% m/V) residuales.



**Fig. 5.7:** Superficies de la función deseabilidad para diferentes valores de diseño.

Concentración de peptona de caseína (CPC: % m/V), niveles de aireación (NA: VVM) y tiempo (h).

Como se mencionó anteriormente, en relación al tiempo de ensayo, algunos autores plantearon que en aerobiosis la aparición de la fase estacionaria de crecimiento se obtuvo aproximadamente luego de 26 h de ensayo con aproximadamente de biomasa 5,0 g/L (Padín González et al., 2006), mientras que otros en anaerobiosis sugirieron la necesidad de trabajar por 72 h, para obtener 6,02 g/L de *K. marxianus*, por tanto nuestra propuesta de 36 h estaría en línea con la de dichos autores. Además, el resultado de la deseabilidad aquí expuesto planteó 1,5 VVM de aire estéril que también es similar al valor propuesto por otros estudios (Silveira et al., 2005; Zoppellari y Bardi, 2013). En cuanto a la suplementación con 1,63% m/V de peptona de caseína, corresponde señalar que tanto Xiao y VanBriesen (2006) como Rojas et al. (2015) sugirieron mejores resultados con esta fuente nitrogenada orgánica, debido a su bajo requisito energético.

## 5.6. Cuarta parte: Verificación de las mejores condiciones de trabajo.

### 5.6.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental 4x18 que permite evaluar el efecto de la presencia/ausencia de ATBs a cuatro niveles (sin ATB, con 100 µg/L de

cefalexina, 100 µg/L de enrofloxacinina o 100 µg/L de oxitetraciclina) en 18 tiempos distintos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 y 36 h) de modo tal del monitorear los niveles de lactosa, proteína y producción de biomasa.

Para ello se inoculó cada reactor con 20% de suspensión de *K. marxianus* ( $DO_0 = 0,210 \pm 0,015$ ) en fase exponencial y se incubaron a 42°C, con una aireación de 1,5 VVM. Durante la incubación, los reactores se mantuvieron a pH=7,5 (NaOH 0,1M). Se tomaron muestras de medio de cultivo cada dos horas, y se les midió la producción de biomasa (Sección 5.2.4), la concentración de lactosa (Sección 5.2.5, expresada en términos de lactosa residual) y la concentración de proteína (Sección 5.2.6, expresada en términos de proteína residual).

Los cuatro reactores previamente fueron tratados térmicamente a 120°C durante 91 min, estimado en el Capítulo 4, porque supone la degradación las quinolonas que son los ATBs que presentaron mayor termoresistencia.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron utilizando Modelo de Regresión Lineal General del paquete estadístico StatGraphics Centurión XVI (StatGraphics® 2008), de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 \cdot t_i + \beta_2 \cdot ATB_j + \beta_{11} \cdot t_i^2 + \beta_{22} \cdot ATB_j^2 + \beta_{12} \cdot t_i \cdot ATB_j + \beta_{112} \cdot t_i^2 \cdot ATB_j + \beta_{122} \cdot t_i \cdot ATB_j^2 + \varepsilon_{ijk} \quad (5.8)$$

Dónde:  $Y_{ijk}$ = Modelo de Regresión Lineal General;  $\beta_0$ : ordenada al origen;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$ ,  $\beta_{12}$ : coeficientes estimados por el modelo;  $t_i$ : efecto del tiempo ( $i=19$ );  $ATB_j$ : efecto del antibiótico en términos de variable dummy ( $j=4$ :  $ATB_0$ = control, CEFA: cefalosporina, ENRO: enrofloxacinina, OXI: oxitetraciclina;  $ATB_0=1$ , CEFA=0, ENRO=0, OXI=0;  $ATB_0=0$ , CEFA=1, ENRO=0, OXI=0;  $ATB_0=0$ , CEFA=0, ENRO=1, OXI=0;  $ATB_0=0$ , CEFA=0, ENRO=0, OXI=1);  $t_i^2$ : efecto cuadrático del tiempo;  $ATB_j^2$ : efecto cuadrático del antibiótico;  $t_i \cdot ATB_j$ : interacción del tiempo con el antibiótico;  $t_i^2 \cdot ATB_j$ : interacción del tiempo cuadrático con el antibiótico;  $t_i \cdot ATB_j^2$ : interacción del tiempo con el antibiótico cuadrático;  $\varepsilon_{ijk}$ : error

residual del modelo. Como parámetro de la adecuación del modelo propuesto se calculó el coeficiente de regresión ( $R_{aj}^2$ ).

### 5.6.2. Resultados y Discusión

La Tabla 5.6 presenta las ecuaciones que relacionan la producción de biomasa con las concentraciones residuales de lactosa y proteína (Ec. 5.8), en términos de sus factores significativos ( $p < 0,05$ ). Es posible observar el adecuado ajuste del modelo utilizado a través de los coeficientes porcentuales de regresión ajustados ( $R_{aj}^2 > 96\%$ ).

**Tabla 5.6:** Modelos que relacionan la producción de biomasa y los contenidos de lactosa y proteína residuales con la acción de antibióticos inactivados térmicamente.

Variable	$Y = \beta_0 + \beta_1.t + \beta_{12}.t.ATB + \beta_{11}.t^2 + \beta_{112}.t^2.ATB$	$R_{aj}^2$
Biomasa	$Y = -0,1388 + 0,1212 t - 0,0179 t^2 + ATB$	96%
Lactosa	$Y = 3,7620 - 0,1504 t + 0,0342 t^2 + 0,0015 t^2 .ATB - 0,0008 t^2 .ATB$	98%
Proteína	$Y = 0,51597 - 0,0837 t + 0,0080 t^2 + 0,0014 t^2 .ATB - 0,0002 t^2 .ATB$	98%

$R_{aj}^2$ : Coeficiente de regresión cuadrático ajustado, t: tiempo, Y: Variable respuesta (producción de biomasa, lactosa residual o proteína residual), ATB: variable dummy (control:  $ATB_0 = 1$ , ENRO=0 o presencia de enrofloxacin:  $ATB_0 = 0$ , ENRO=1).

Se debe destacar que el análisis estadístico no muestra diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el control y los ensayos con cefalexina en lo que respecta al crecimiento de biomasa ( $F = 0,80$ ;  $p = 0,3772$ ), ni los contenidos residuales de lactosa ( $F = 1,66$ ;  $p = 0,2058$ ) y proteína ( $F = 1,68$ ;  $p = 0,2043$ ). Del mismo modo, no existen diferencias entre el control y los ensayos con oxitetraciclina: crecimiento de biomasa ( $F = 3,58$ ;  $p = 0,0669$ ), contenidos residuales de lactosa ( $F = 0,26$ ;  $p = 0,6164$ ) y proteína ( $F = 1,93$ ;  $p = 0,1733$ ). Estos resultados indican que el proceso térmico de los ATBs fue adecuado ( $120^\circ\text{C}$ -40 min para la cefalosporina,  $120^\circ\text{C}$ -83 min para la tetraciclina). Por el contrario, el reactor con enrofloxacin presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con grupo de control para el crecimiento de biomasa: ( $F = 32,67$ ;  $p = 0,0001$ ) y los contenidos residuales de lactosa ( $F = 9,06$ ;  $p = 0,0049$ ) y proteína ( $F = 53,77$ ;  $p = 0,0001$ ), puesto que el tratamiento de  $120^\circ\text{C}$ -91 min no fue suficiente para permitir la inactivación total de quinolonas en el medio.

Con respecto a las ecuaciones logísticas calculadas para enrofloxacin (Tabla 5.6), se puede visualizar el efecto significativo ( $p < 0,05$ ) del tiempo en la

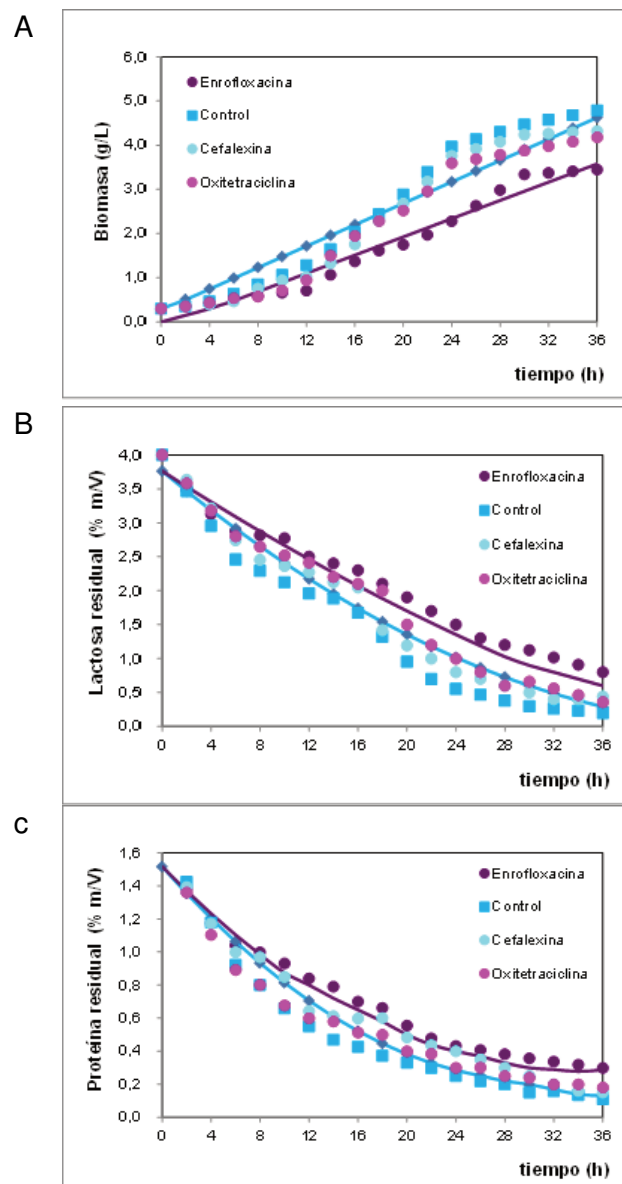
producción de biomasa ( $\beta_1 > 0$ ) y la inhibición generada por enrofloxacin ( $\beta_{12} < 0$ ). El consumo de lactosa y proteína a lo largo del ensayo, se pone de manifiesto a través del coeficiente " $\beta_1$ " positivo, y el efecto retardador de los ATBs mediante el coeficiente " $\beta_2$ " negativo. Además, el aplanamiento producido en el consumo de lactosa y peptona de caseína cerca del final del ensayo se manifiesta el coeficiente cuadrático del tiempo ( $\beta_{112}$  negativo).

Empleando las ecuaciones de Tabla 5.6 se construyó la Fig. 5.8 que presenta la cinética de crecimiento de *K. marxianus* con lactosuero (previa inactivación térmica de los ATBs) y los consumos residuales de lactosa y proteína, durante las 36 horas de ensayo a 42°C, pH 7,5 y con un nivel de aireación de 1,5 VVM.

Se puede observar que la producción de levaduras va acompañada del consumo de la lactosa y proteína. Luego de 36 h de ensayo la producción de biomasa para el ensayo control fue de 4,78 g/L, pero 3,44 g/L con enrofloxacin. Consecuentemente el ensayo control mostró menor contenido residual de lactosa (0,20% m/V) y proteína (0,11% m/V) que el ensayo con enrofloxacin (0,75% m/V y 0,30% m/V, respectivamente).

Para este ensayo control, es interesante mencionar que la producción de biomasa presenta comportamiento lineal (fase exponencial) durante las 36 h de trabajo, a diferencia de lo que ocurrió en el ensayo presentado en la Sección 5.5, donde la fase estacionaria se alcanzó aproximadamente a las 24 h. Este perfeccionamiento en la producción de *K. marxianus* es una consecuencia de la implementación de las mejores condiciones de operación obtenidas en el estudio de deseabilidad. Asimismo, corresponde señalar los elevados consumos de lactosa (95%) y de proteínas (93%), lo que lleva a concluir que dichos nutrientes se metabolizan principalmente en la fase exponencial. Del mismo modo, se observa que cuando se alcanzan las 36 h de ensayo (aun en crecimiento exponencial), las curvas de consumo de sustratos adquieren valores asintóticos en valores muy cercanos a cero (expresados en el modelo propuesto a través del efecto de la interacción del tiempo cuadrático con el ATB). Este consumo casi completo de los nutrientes, también fue reportado en la literatura por otros investigadores, quienes explican que la limitante de nutrientes obligaría a las levaduras a pasar inmediatamente a la fase crecimiento estacionario (Grba et al., 2002; Aktaş et al., 2006; Serrat-Díaz et al., 2017). En

efecto, Zafar y Owais (2006) reportaron un aumento en la actividad metabólica de *K. marxianus*, como consecuencia de la escases de nutrientes, antes de su paso a la fase estacionaria. Considerado esto, se podría creer que la adición de mayor cantidad de lactosa y peptona de caseína permitiría aumentar la producción de biomasa. Sin embargo, debido a que el objetivo principal de esta tesis es disminuir el efecto ambiental que produce el lactosuero contaminado con ATBs en el ambiente, y que la producción biomasa es un objetivo secundario, en esta tesis no es una opción recomendable.



**Fig. 5.8:** Cinética de crecimiento *K. marxianus* (A) con lactosuero (previa inactivación térmica de los antibióticos) y los consumos relativos residuales, de lactosa (B) y proteína (C), durante las 36 h de fermentación a 42°C, pH 7,5 y con un nivel de aireación de 1,5 VVM. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas llenas el resultado del ajuste obtenido con el modelo.

Se destaca entonces la posibilidad de obtener biomasa de *K. marxianus* a partir de lactosuero contaminado con cefalosporinas y tetraciclinas previamente inactivados térmicamente (120°C durante 91 min). Asimismo, corresponde señalar que según el modelo propuesto en esta tesis los valores residuales finales de lactosa y proteína se encuentran cercanos al 5% de tolerancia aceptable para que produzcan un mínimo efecto ambiental. Este hecho puede respaldarse por la evidencia empírica mencionada en el trabajo de Pilatti et al. (2017), quienes plantean la utilización de efluentes lácteos líquidos, con contenidos de lactosa y proteínas en el entorno aquí propuesto, como mejoradores de suelo aprovechando su contenido mineral para enmienda o para el control de la degradación edáfica.

En este punto del análisis es importante mencionar que aunque para la inactivación de enrofloxacin se empleó las condiciones propuestas en la Sección 4.2 (120°C-91 min), en este ensayo no resultó suficiente. Esto se evidencia en la menor producción de biomasa (3,44 g/L) y los mayores contenidos residuales de lactosa (0,75% m/V) y proteína (0,30% m/V). Esta inactivación parcial de la enrofloxacin, podría atribuirse al equilibrio termodinámico que se genera en las quinolonas, como consecuencia de la resonancia de su estructura química. Si tal fuera el caso, la prolongación del tiempo de tratamiento térmico sería irrelevante, puesto que el equilibrio termodinámico no permitiría que la cinética de inactivación continúe. Este hecho fue señalado oportunamente por Fisher et al. (2010), quienes atribuyen la elevada estabilidad térmica de las quinolonas a la combinación de entalpía y entropía, las cuales están relacionadas mediante el principio de conservación entálpico-entrópico. En efecto, aunque puede haber una amplia variación en los valores de entalpía y entropía de activación en la degradación térmica de quinolonas, como resultado de la compensación de entalpía-entropía, la energía libre de activación es relativamente constante. Así, la constancia de la energía libre de Gibbs permite considerar un estado de equilibrio termodinámico.

## **5.7. Conclusiones del Capítulo**

El diseño planteado permitió establecer condiciones óptimas de trabajo (1,63% peptona de caseína, pH de 7,5, temperatura de 42°C, aireación de 1,5 VVM y 35,6 h de fermentación) para obtener 4,48 g/L de biomasa y bajos niveles de

lactosa (0,09% m/V) y proteínas (0,02% m/V) residuales. Asimismo se verificó que cefalosporinas, tetraciclinas y quinolona inhiben el crecimiento de *K. marxianus* en lactosuero. Sin embargo, el tratamiento a 120°C-91 del lactosuero contaminado con cefalosporinas y tetraciclinas resulta adecuado para inactivar estos ATBs, pero es insuficiente para la inactivación de quinolonas. Se sugiere la necesidad de evaluar otras técnicas de tales como procesos de oxidación avanzada.

## Capítulo 6

---



## CAPÍTULO 6: Discusión general

Según la Organización Mundial de la Salud más de la mitad de los ATBs producidos se emplean en medicina veterinaria, y un gran número de estos en ganadería (David et al., 2020). Sin embargo, entre el 75-90% de los mismos no se metabolizan por completo y se excretan a través de heces, orina y leche, llegando así a diferentes estratos ambientales (Martínez-Carballo et al., 2007; Aminov, 2010; Sabourin et al., 2017). Los ATBs contenidos en el estiércol pueden contaminar la tierra (Li et al., 2016; Shi et al., 2016; Vilca et al., 2018) o escurrir por infiltración y escorrentía hacia ríos/lagunas cercanos (Inyinbor et al., 2018; Le et al., 2018; Pan y Chu, 2016).

El descarte de lactosuero, sin tratamiento previo, también constituye una fuente importante de contaminación ambiental (Bosco et al., 2018). Aunque existen técnicas de biorremediación para su tratamiento (Bártíková et al., 2016; Deng et al., 2016), la presencia de residuos de ATBs puede dificultarlas y/o ralentizarlas (Finley et al., 2013; Wellington et al., 2013).

Los métodos oficiales para control de los tratamientos de biorremediación incluyen técnicas de respuesta inespecíficas, que no evalúan los efectos nocivos que pueden generar los ATBs (Claxton et al., 1998; Coombe et al., 1999; Farré y Barceló, 2003). Por el contrario, los ensayos de ecotoxicidad ofrecen la posibilidad de un análisis específico, que permite establecer el nivel de toxicidad de cada ATB sobre diferentes organismos de prueba. Estos ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba, en condiciones experimentalmente controladas. Los bioensayos *in vitro* utilizan una amplia variedad de organismos que incluyen desde células o cultivos de células (Ebert et al., 2011; González-Pleiter et al. 2013; Nagel et al., 2009, 2011, 2013; Tumini et al., 2015, 2017), hasta organismos más complejos como semillas y plantas de interés agrícola (Bowman et al., 2011; Hillis et al.; 2011; Motwani y Mehta, 2018; Pan y Chu, 2016), microcrustáceos importantes por sus implicancias en diferentes niveles del ecosistema (Lampi et al., 2006; Lattuada et al., 2009; Regaldo et al., 2009, 2014; Reno et al., 2014, 2018) y peces (Liu et al., 2014; Rico et al., 2014; Zhou et al., 2020).

Los ensayos de fitotoxicidad con semillas y plantas terrestres tienen ventajas pues permiten incluir distintas variables de respuesta, como por ejemplo, la frecuencia de germinación, la elongación de las raíces, la foliación, el peso de la biomasa, etc. (Farré y Barceló, 2003; Liu et al., 2009). Por tal motivo, se evaluó el impacto de diferentes concentraciones de ATBs (aminoglucósidos, betalactámicos, macrólidos, quinolonas, sulfamidas y tetraciclinas) sobre la frecuencia de germinación y elongación de raíces de diferentes variedades de semillas: alfalfa (*Medicago sativa*), girasol (*Helianthus annuus*), maíz (*Zea mays*), melilotus (*Melilotus albus*), soja (*Glycine max*), sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum aestivum*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). Se concluyó que 0,150 mg/L de kanamicina perjudicaron maíz y soja, 0,100 mg/L de enrofloxacin tuvieron efecto fitotóxico sobre la germinación y/o elongación de raíces de alfalfa, melilotus, sorgo y trébol blanco, 0,100 mg/L de oxitetraciclina afectaron alfalfa y trébol blanco, 0,050 mg/L de tilosina actuaron sobre soja y 0,004 mg/L de penicilina sobre maíz, soja y sorgo.

Realizando estudios *in vitro*, Hillis et al. (2011) evaluaron la fitotoxicidad de clortetraciclina, levofloxacin y sulfametoxazol sobre la germinación y el crecimiento de *Lactuca sativa* (lechuga), *M. sativa* (alfalfa) y *Daucus carota* (zanahoria). Sus resultados mostraron que clortetraciclina redujo la longitud de las raíces de *D. carota* y *L. sativa* (de 1 y 10 mg/L, respectivamente), pero no las de *M. sativa* (10 mg/L); con sulfametoxazol observaron menor longitud de raíces de *D. carota*. También Liu et al. (2009) evaluaron *in vitro* el efecto de clortetraciclina, tetraciclina, tilosina, sulfametoxazol, sulfametazina y trimetoprima sobre crecimiento *Avena sativa* L., *Oryza sativa* (arroz) y *Cucumis sativus* (pepino), exponiendo una reducción en la elongación de raíces de avena en un rango entre 0,200 mg/L (clortetraciclina) y 19 mg/L (tilosina), para arroz entre 0,100 mg/L (sulfametoxazol) y 500 mg/L (tilosina), y para pepino entre 0,700 mg/L (clortetraciclina) y 300 mg/L (tilosina). Mientras que Migliore et al. (2003) destacaron la fitotoxicidad de 5 mg/L de enrofloxacin sobre *C. sativus*, *L. sativa*, *Phaseolus vulgaris* (frijoles) y *Raphanus sativus* (rabanito).

Para explicar el efecto fitotóxico de ATBs (eritromicina, cloranfenicol, norfloxacin, sulfametazina y tetraciclina), Pan y Chu (2016) destacaron su hidrofobicidad como base de un posible mecanismo de narcosis polar, el cual

generaría estimulación de la respiración celular, seguida de una depresión generalizada de la actividad germinativa. Por su parte, Abou Elezz et al. (2019) plantearon que altas concentraciones de ATBs en ensayos agudos no afectaron de manera significativa la elongación de raíces, pero concentraciones menores podrían hacerlo en ensayos crónicos. No obstante, reconocieron desconocer el mecanismo de transferencia de estos compuestos a través de las redes tróficas, los ensamblajes entre comunidades y los procesos naturales del ecosistema.

Analizando comparativamente los resultados de esta tesis con los expuestos por otros autores se puede concluir que levofloxacin (0,0039 mg/L) frente a lechuga y penicilina (0,004 mg/L) frente a maíz, soja y sorgo fueron los ATBs más fitotóxicos. Seguidos por tilosina (0,050 mg/L) que perjudicó a soja; enrofloxacin (0,100 mg/L) sobre alfalfa, melilotus, sorgo y trébol blanco; oxitetraciclina (0,100 mg/L) en alfalfa y trébol blanco; y kanamicina (0,150 mg/L) que ralentizó maíz y soja. Demostrando así que los ATBs presentan efecto fitotóxico en semillas, tales como la ralentización de la frecuencia germinativa y la disminución de la elongación de raíces. Por otra parte, entre los ATBs estudiados en esta tesis, enrofloxacin mostró la mayor fitotoxicidad una amplia variedad de semillas (alfalfa, melilotus, sorgo y trébol blanco).

Debido al extenso uso de las FQs en medicina veterinaria (Schulz et al., 2019), su elevada termoestabilidad (Roca et al., 2010) y su baja biodegradabilidad en el ambiente (Parente et al., 2018; Riaz et al., 2018), suelen encontrarse frecuentemente en muestras de aguas naturales (Kümmerer, 2009a,b; He et al., 2012; Zhang et al., 2012). Por ello, para evaluar su ecotoxicidad, además de semillas, es posible emplear otros organismos indicadores tales como algas, invertebrados y vertebrados (Ginebreda et al., 2010; Halling-Sørensen et al., 2000; Martins et al., 2012).

Entre estas especies, debido a su abundancia en la naturaleza y el conocimiento de su ciclo biológico, se destaca *Daphnia magna*. Los resultados de los ensayos agudos realizados en esta tesis expusieron mortalidad (48 h EC<sub>50</sub>) frente a marbofloxacin (5,4 mg/L), ciprofloxacin (7,2 mg/L), enrofloxacin (7,9 mg/L), norfloxacin (8,7 mg/L), levofloxacin (19,5 mg/L) y ofloxacin (36 mg/L). Mientras que las respuestas obtenidas en ensayos crónicos mostraron mortalidad (EC<sub>50</sub>/21-d) para 0,162 mg/L de enrofloxacin,

0,284 mg/L de levofloxacin, 0,340 mg/L de marbofloxacin, 0,404 mg/L de ciprofloxacin, 0,804 mg/L de norfloxacin y 0,968 mg/L de ofloxacin. En este trabajo también se presentó el rango de concentraciones por debajo de las cuales no se observaron efectos tóxicos (NOEC/21-d), con valores entre 0,056 mg/L para ciprofloxacin y 0,141 mg/L para ofloxacin. En base a esto se destaca nuevamente la elevada toxicidad de enrofloxacin y su metabolito, ciprofloxacin, las cuales en concentraciones por debajo de los LMRs permitidos en leche (0,100 mg/L) producen mortalidad de este cladócer.

Los estudios bibliográficos que mencionan mortalidad (48 h EC<sub>50</sub>) de *D. magna* frente a FQs exponen discrepancias. Por ejemplo, en esta tesis se reportó 7,2 mg/L para ciprofloxacin, mientras que existen reportes para 10 mg/L (Robinson et al., 2005), 36,5 mg/L (Dionísio et al., 2020), 60 mg/L (Halling-Sørensen et al., 2000), 65,3 mg/L (Martins et al., 2012) y 87,1 mg/L (Dalla Bona et al., 2014); similar a lo que ocurre para enrofloxacin (7,9 mg/L) con datos de mortalidad para 16,3 mg/L (Dalla Bona et al., 2014), 56,7 mg/L (Park y Choi, 2008) y 131,7 mg/L (Park y Choi, 2008). Mientras que para levofloxacin las discrepancias son aún mayores (19,5 mg/L, esta tesis), con reportes de concentraciones tóxicas bajas como por ejemplo 0,34 mg/L (Yamashita et al., 2006), 10 mg/L (Robinson et al., 2005) y muy elevadas, 285 mg/L (Park y Choi, 2008). En lo que respecta a 48 h NOEC para ciprofloxacin en este trabajo se expuso 7,2 mg/L, similar a los 10 mg/L planteados por Robinson et al. (2005), pero mucho menor que los 60 mg/L obtenidos por Halling-Sørensen et al. (2000). Aunque los datos bibliográficos de ensayos crónicos son menos, también exponen diferencias. Justamente, para levofloxacin, Yamashita et al. (2006) presentaron mortalidad con 0,34 mg/L, en el rango de lo reportado en esta investigación (0,284 mg/L); mientras que para enrofloxacin, Park y Choi (2008) obtuvieron 11,5 mg/L, un resultado mucho mayor al observado en esta tesis (0,162 mg/L). En efecto, los resultados de los bioensayos dependen de factores experimentales tales como la comida, la temperatura, el fotoperíodo, la intensidad de la luz, la composición del medio y dureza del agua, entre otros (de Oliveira et al., 2015), los cuales podrían explicar las diferencias encontradas.

Para enriquecer el análisis del estudio de la toxicidad crónica con *D. magna* realizado en esta tesis, se agregó un modelo de regresión logística con

interacción que permitió evaluar el efecto de la concentración de ATB y su interacción con el tiempo de exposición. Además, considerando las mortalidades obtenidas en los ensayos crónicos y las concentraciones medioambientales, reportadas en la literatura por otros autores (Huang et al., 2019; Huang et al., 2020; Lyu et al., 2020; Madikizela et al., 2017; Teglia et al., 2019), se calcularon coeficientes de riesgo para *D. magna* frente a FQs. Se observó que la presencia de ciprofloxacina representa un alto riesgo en aguas fluviales; mientras que ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina constituyen un alto riesgo para la supervivencia de este cladóceros tanto en ríos como en aguas residuales (urbana y hospitalaria).

Comparando los organismos estudiados en esta tesis (semillas y el cladóceros) se destaca la elevada sensibilidad de *D. magna* frente a FQs (0,056-0,085 mg/L). Asimismo se insiste en la fitotoxicidad de los ATBs (aminoglucósidos, betalactámicos, macrólidos, quinolonas, sulfamidas y tetraciclinas) frente a las semillas estudiadas (alfalfa, girasol, maíz, melilotus, soja, sorgo, trigo y trébol blanco). Por esto se sugiere que investigaciones futuras deberían incluir ensayos crónicos con otros bioindicadores (bacterias, algas, plantas, peces, etc.), con concentraciones de ATBs más bajas que las ensayadas en esta tesis, pudiendo evaluar así otras variables de respuesta como por ejemplo la fertilidad, producción de clorofila, foliación, etc. Asimismo, fundamentado en el hecho de que concentraciones de ATBs en el rango admisible por la legislación en leche (0,004-0,150 mg/L) afectan el desarrollo de organismos *no target*, se considera necesario implementar mecanismos a fin de evitar que sus residuos (a estas concentraciones) lleguen al ambiente.

Otras especies *no target* expuestas en la literatura son las algas (Ebert et al., 2011; Eguchi et al., 2013; González-Pleiter et al., 2013; Martins et al., 2012; Nie et al., 2008; Robinson et al., 2005), plantas acuáticas (Ebert et al., 2011) y peces (Liu et al., 2015).

Con respecto a las algas, Robinson et al. (2005) observaron mortalidad de *Pseudokirchneriella subcapitata* (alga verde) con enrofloxacin (24 h EC<sub>50</sub>= 3,1 mg/L), levofloxacin (24 h EC<sub>50</sub>= 7,4 mg/L), ofloxacina (24 h EC<sub>50</sub>= 12,1 mg/L) y ciprofloxacina (24 h EC<sub>50</sub>= 18,7 mg/L). De manera similar, pero en ensayos crónicos otros autores detectaron mortalidad frente a ciprofloxacina (EC<sub>50</sub>= 3,9

mg/L; Martins et al., 2012), levofloxacin (EC<sub>50</sub>= 120 mg/L; González-Pleiter et al., 2013) y norfloxacin (EC<sub>50</sub>= 16,6 mg/L; Eguchi et al., 2013). Para *Chlorella vulgaris* (alga verde unicelular) existen reportes de disminución en el crecimiento con norfloxacin (EC<sub>50</sub>= 10,4 mg/L; Eguchi et al., 2004) y ciprofloxacina (EC<sub>50</sub>= 12,5 mg/L; Nie et al., 2008), y cambios en la producción de clorofila con ciprofloxacina (20,6 mg/L; Nie et al., 2008). Por su parte, Ebert et al. (2011), señalaron disminución en el desarrollo de *Desmodemus subspicatus* (alga verde) debido a enrofloxacin (EC<sub>50</sub>= 0,0056 mg/L) y ciprofloxacina (EC<sub>50</sub>= 0,008 mg/L).

Por su parte, Ebert et al. (2011) indicaron disminución en el crecimiento de *Lemna minor* (lenteja de agua menor) y *Myriophyllum spicatum* (milennrama espiga de agua) con enrofloxacin (0,107 mg/L y 0,008 mg/L, respectivamente) y ciprofloxacina (0,063 mg/L y 0,008 mg/L, respectivamente).

Además, los estudios realizados con peces ponen de manifiesto la toxicidad de FQs. En este sentido Richards et al. (2004), en estudios con *Lepomis gibbosus* (pez sol) señalaron mortalidad frente a ciprofloxacina (10 mg/L). También *Danio rerio* (pez cebra) se vio afectado por ofloxacin (4,69 mg/L), norfloxacin (9,38 mg/L) y ciprofloxacina (>37,5 mg/L) (Wang et al., 2014; Yin et al., 2014) y *Xiphophorus helleri* (pez cola de espada) por norfloxacin (6 mg/L; Liang et al., 2015).

A modo de síntesis, se puede mencionar que la literatura sugiere implementar baterías de bioensayos incluyendo organismos representativos de diferentes niveles tróficos. En efecto, González-Pleiter et al. (2013) compararon la acción de levofloxacin y norfloxacin frente a *Anabaena flos-aquae* (cianobacteria) y *P. subcapitata* (alga) encontrando mayor susceptibilidad para el alga. De manera similar, Backhaus y Grimme (1999), estudiaron el efecto de norfloxacin con distintos organismos, señalando también mayor susceptibilidad en algas (*C. vulgaris* y *P. subcapitata*) con respecto a una bacteria (*Vibrio fischeri*). Asimismo, Robinson et al. (2005) evaluaron la toxicidad de FQs frente *P. subcapitata* (alga verde) y *L. minor* (planta acuática), marcando mayor sensibilidad en el alga. Analizando estos resultados otra vez se observa la toxicidad de FQs sobre especies *no target*, y en este apartado en particular sobre algas. Por ello, futuros estudios de toxicidad de xenobióticos deberían

incluir baterías de ensayo con diferentes organismos a fin de disponer de una herramienta que analice globalmente el efecto de ATBs sobre distintos organismos representativos de la cadena trófica.

Además, en virtud de la acción de ATBs sobre especies *no target*, se propuso evaluar el efecto de éstos compuestos sobre la levadura *Kluyveromyces marxianus*. Nuestros resultados demostraron que cefalosporinas (cefadroxil, cefalexina, cefoperazona, cefuroxima, ceftiofur), tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina) y quinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina) afectaron el desarrollo de *K. marxianus* a niveles cercanos a los LMRs establecidos por la legislación. A tal fin, se desarrolló un test de inhibición en placas de microtitulación, simple (no requiere de personal entrenado), rápido (6 horas) y económico, que se podría emplear también para otros tipos de levaduras. Este test es más fácil de realizar que otras técnicas de identificación y cuantificación, tales como la cromatografía HPLC o la electroforesis capilar.

Asimismo en la literatura existen estudios que exponen la acción de cefalosporinas, pero no penicilinas, sobre hongos hialinos (Sanyal et al., 1992) y filamentosos (Hamilton-Miller, 1999). De manera similar a la expuesta en esta tesis, algunos autores mencionan que FQs inhiben el desarrollo de levaduras (Strumberg et al., 1999; Dong et al., 2000; Ozdek et al., 2006; Stergiopoulou et al., 2011), hongos (Elsea et al., 1992; Ozdek et al., 2006; Stergiopoulou et al., 2009, 2011), virus y parásitos (Dalhoff, 2015). Mientras que otros reportan inhibición de células eucariotas por tetraciclinas (Oriol y Waterworth, 1975). Al respecto, cabe recordar que los betalactámicos inhiben la síntesis de la pared celular (Marín y Gudíol, 2003), efecto que disminuye debido a betalactamasas (Botsoglou y Fletouris, 2001). La existencia de penicilasas fue señalada en *Candida albicans*, *Candida boidinii* y *Pichia pinus* (Mehta y Nash, 1978). Esto podría explicar porque *K. marxianus* es sensible a cefalosporinas pero no a penicilinas. En efecto, la sensibilidad de levaduras frente a cefalosporinas también fue señalada por otros autores (Hamilton-Miller, 1999; Sanyal et al., 1992). El mecanismo de acción de quinolonas frente a bacterias comprende dos inhibiciones: primero de la ADN girasa y luego de la topoisomerasa (Martinez et al., 2006). No obstante, la elevada afinidad de estos ATBs con la topoisomerasa

eucariota (Elsea et al., 1992; Ozdek et al., 2006; Stergiopoulou et al., 2009, 2011) hace que éstos actúen sobre diferentes especies *no target* (Martinez et al., 2006; Zhang et al., 2015). Así, la inhibición del crecimiento de *K. marxianus* aquí mencionada se podría atribuir su efecto sobre la topoisomerasa. En efecto, Dalhoff (2015), señalaron la acción antivírica, antifúngica y antiparasitaria de quinolonas. Del mismo modo cabe señalar la acción de moxifloxacina y gatifloxacina sobre *Candida spp.* (Ozdek et al., 2006); y de ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina y trovafloxacina sobre *C. albicans*, *Candida parapsilosis* y *Paecilomyces lilacinum* (Stergiopoulou et al., 2011). Por su parte, las tetraciclinas inhiben la elongación de la cadena peptídica de proteínas (Connell et al., 2003; Tenover 2006), lo que podría explicar la inhibición observada en esta investigación en *K. marxianus* y la reportada por Oriel y Waterworth (1975) para minociclina con *C. albicans*.

Con la intención de emplear lactosuero conteniendo residuos de ATBs, se investigó la posibilidad de inactivar térmicamente los mismos. Nuestros resultados mostraron que es posible degradar térmicamente (120°C) la totalidad de cefalosporinas (40 min) y tetraciclinas (82 min), pero parcialmente quinolonas (91 min). Esto podría ser resultado de la termoestabilidad de quinolonas, la cual según Fisher et al. (2010), podría deberse al equilibrio termodinámico de su estructura química el cual no permitiría que la cinética de inactivación continúe. En consecuencia, prolongar el tiempo de tratamiento térmico sería irrelevante y por ende, para la degradación de quinolonas, futuros estudios deberían incluir otras técnicas de inactivación.

En este sentido, Babić et al. (2013) evaluaron la fotólisis de FQs (norfloxacina, enrofloxacina y ciprofloxacina) bajo irradiación solar simulada, en diferentes matrices sintéticas de composición similar a aguas residuales de la industria farmacéutica (0,1 mg/L), y observaron que aunque las FQs se degradaron rápidamente, su tasa de fotodegradación disminuyó entre un 15-30% en agua de río. De manera similar, en la revisión bibliográfica realizada por Rodrigues-Silva et al. (2014), los procesos de oxidación avanzados (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foto-Fenton, UVA/TiO<sub>2</sub> y UV/TiO<sub>2</sub>) y la ozonización (debido a la formación de radicales hidroxilo) fueron más efectivos para degradar FQs. Justamente, Sturini et al. (2012a,b), comparando la fotodegradación de FQs (0,02-0,05 mg/L) mediante



fotólisis y fotocátalisis (con  $\text{TiO}_2$  en suspensión) en agua de río, concluyeron que la segunda fue más eficiente (aproximadamente un 90%, similar a la inactivación alcanzada en este trabajo). Por su parte, Tien et al. (2021), utilizando un fotocatalizador (UVA/ $\text{TiO}_2$ ) y condiciones operativas optimizadas (pH 5,9-120 min), eliminaron aproximadamente 100% de la enrofloxacin presente (21,4 mg/L) en una solución acuosa. También Paul et al. (2007, 2010), para la degradación de ciprofloxacina en agua, emplearon fotocátalisis (UVA/ $\text{TiO}_2$ ) y la compararon con fotólisis-ultravioleta (VIS/UVA). Sus hallazgos plantean mejor inactivación con UVA/ $\text{TiO}_2$ , pero liberación de productos orgánicos con la estructura central de las quinolonas. Al evaluar éstos con un bioensayo con *Escherichia coli*, notaron retención de parte de su actividad antibacteriana. También Sirtori et al. (2009) compararon dos procesos, fotocátalisis (UV/ $\text{TiO}_2$ ) y foto-Fenton (con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de luz solar), para la degradación de flumequina y ácido nalidíxico en agua destilada. Sus resultados mostraron que ambos procesos fotocatalíticos redujeron la toxicidad (según lo evaluado mediante un bioensayo con *V. fischeri*), pero que el proceso foto-Fenton fue más veloz (<25 min). En otro estudio, Serna-Galvis et al. (2017) trataron FQs por  $\text{UV}_{254}$  y  $\text{UV}_{254}$ /persulfato (UV/PS) observando diferencias significativas en la cinética de degradación con  $\text{UV}_{254}$  (ciprofloxacina > norfloxacina >> levofloxacina) y que el proceso UV/PS favoreció las eliminaciones. Estos autores evaluaron también la aplicabilidad de  $\text{UV}_{254}$  y UV/PS en aguas residuales hospitalarias sintéticas señalando que ninguno consiguió la eliminación total de las FQs. El Najjar et al. (2013), empleando ozono y radicales libres hidroxilo (UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ), observaron la degradación total de FQs, aunque luego de realizar pruebas de toxicidad con *V. fischeri*, notaron que algunos subproductos generados en la ozonización conservaban elevada toxicidad. Con vista a lo expuesto, para la degradación de FQs, se propone el empleo de procesos de oxidación avanzados, pero se sugiere incorporar bioensayos a fin de evaluar los productos de transformación generados y descartar su toxicidad.

Finalmente, se optimizaron las condiciones operativas para disminuir la concentración residual de lactosa y proteínas en el lactosuero, mediante la producción de biomasa de *K. marxianus*. Se implementó un diseño experimental secuencial que incluye un diseño factorial, la implementación de una matriz de

Doehlert y el análisis mediante la función Deseabilidad de Derringer y Suich (1980). Este método permitió determinar la fuente nitrogenada (1,63% m/V peptona de caseína), la temperatura óptima de fermentación (42°C), el pH de trabajo (7,5) y el nivel de aireación (1,5 VVM) en un tiempo de 35,6 horas. Se consiguió así 95% de consumo de lactosa y 93% de proteínas, con una producción de biomasa de 4,48 g/L. Además es interesante señalar que se logró una disminución de aproximadamente el 40% de la DQO y un efluente con bajo contenido de alcohol (<0,10 g/L) y amoníaco (<0,80 g/L). Estos resultados sugieren que es posible emplear lactosuero para producción de biomasa, generando en el proceso un efluente líquido menos nocivo para el medio ambiente que el lactosuero original.

También es interesante mencionar que la biomasa obtenida se puede emplear como suplemento dietario (Díaz-Vergara et al., 2017). Justamente, debido a su equilibrado perfil de aminoacídico (5,5% m/m de metionina y 1,73% m/m de cisteína), *K. marxianus* es buena fuente de proteína unicelular (Páez et al., 2008). Además es posible usar la levadura como aditivo para la alimentación de rumiantes (Broadway et al., 2015), cerdos (Brooks et al., 2001) y aves de corral (Neifar et al., 2013; Fadel y El-Ghonemy, 2015), o hidrolizada, como fuente de proteína funcional (Amata et al., 2013). Por ejemplo, Boggero et al. (2014) señalan que la suplementación alimentaria con *S. cerevisiae* (10 g/día) benefició el tratamiento de mastitis subclínica en ovejas. Asimismo, existen antecedentes de que la suplementación con *Kluyveromyces* (1,0 g/día/Kg peso vivo) favoreció la inmunidad (Keimer et al., 2018) y aumentó la eficiencia alimenticia (2,5 g día/Kg peso vivo; Wang et al., 2017).

# Capítulo 7

---

## CAPÍTULO 7: Conclusión general

En esta tesis se señaló que concentraciones admisibles para la industria láctea (inferiores a los LMRs) ralentizan la frecuencia de germinación y/o elongación de raíces de semillas. Demostrándose así fitotoxicidad de penicilina (4 µg/L) sobre *G. max*, *S. bicolor* y *Z. mays*; tilosina (50 µg/L) sobre *S. bicolor*; enrofloxacin (100 µg/L) sobre *M. sativa*, *M. albus* y *T. repens*; oxitetraciclina (100 µg) sobre *M. sativa* y *T. repens*; mientras que kanamicina (150 µg/L) afectó a *G. max* y *Z. mays*. También se destacó la sensibilidad de *D. magna* en los ensayos de toxicidad crónica (rango 56-141 µg/L para ciprofloxacina y ofloxacina, respectivamente) frente a FQs (ciprofloxacina, enrofloxacin, levofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina y ofloxacina).

A continuación, con el desarrollo de un bioensayo simple, rápido y de bajo costo, se expuso que cefalosporina, quinolona o tetraciclina (en niveles cercanos a sus LMRs) inhibieron el crecimiento de *K. marxianus*. Se planteó entonces que previo al empleo de lactosuero con residuos de ATBs para la producción de biomasa, sería necesario su tratamiento a 120°C durante 91 min. Sin embargo, luego se demostró que dicho calentamiento degradó 100% de cefalosporinas y tetraciclinas, pero 82% de las quinolonas. Sugiriéndose para éstas la evaluación de otras técnicas, de tales como procesos de oxidación avanzada.

Finalmente, se implementó de un diseño experimental secuencial, una matriz de Doehlert y la función Deseabilidad de Derringer y Suich. Se establecieron así como mejores condiciones de trabajo la fortificación del lactosuero con 1,63% de peptona de caseína, pH 7,5, 42°C, un nivel de aireación de 1,5 VVM y 35,6 h de trabajo. Empleando estas condiciones, con lactosuero libre de ATBs, se consiguieron 4,48 g/L de biomasa y altos consumos de lactosa (95%) y proteínas (93%). No obstante, con lactosuero conteniendo residuos de ATBs, luego del tratamiento térmico (120°C-91) y a pesar de la inactivación parcial de las quinolonas, se obtuvieron 3,4 g/L de *K. marxianus*, un consumo del 80% de lactosa (residual de 0,75 g/L) y del 70% de las proteínas (residual de 0,30 g/L). Esto señala que, aunque insuficiente para la degradación total de quinolonas, el proceso propuesto genera un efluente con menor carga orgánica que el lactosuero original.

## **Bibliografía**

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abdel-Rahman M A, Tashiro Y, Sonomoto K. 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol. Adv.* 31(6): 877-902.

Abou Elezz A, Easa A, Atia F, Ahmed T. 2019. The potential impact data of Tylosin and Enrofloxacin veterinary antibiotics on germination and accumulation in barley seed as a forage crop and good dietary sources using LC/MS-MS. *Data in Brief.* 25: 1-7.

Adetunji V O. 2011. Effects of processing on antibiotic residues (streptomycin, penicillin-G and tetracycline) in soft cheese and yoghurt processing lines. *Pak. J. Nutr.* 10(8): 792-795.

Adomas B, Antczak-Marecka J, Nałęcz-Jawecki G, Piotrowicz-Cieślak A I. 2013. Phytotoxicity of enrofloxacin soil pollutant to narrow-leaved lupin plant. *Pol. J. Environ. Stud.* 22(1): 71-76.

Aga D S, Goldfish R, Kulshrestha P. 2003. Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes. *Analyst.* 128(6): 658-662.

Agunbiade F O, Moodley B. 2016. Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu Natal, South Africa. *Environ. Toxicol. Chem.* 35(1): 36-46.

Ahmed M J. 2017. Adsorption of quinolone, tetracycline, and penicillin antibiotics from aqueous solution using activated carbons. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 50: 1-10.

Ahmetović E, Martín M, Grossmann I E. 2010. Optimization of energy and water consumption in corn-based ethanol plants. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49: 7972–7982.

Ajibola A S, Amoniyani O A, Ekoja F O, Ajibola F O. 2021. QuEChERS Approach for the Analysis of Three Fluoroquinolone Antibiotics in Wastewater: Concentration Profiles and Ecological Risk in Two Nigerian Hospital Wastewater Treatment Plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 80(2): 389-401.

Aktaş N, Boyacı I H, Mutlu M, Tanyolaç A. 2006. Optimization of lactose

utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). *Bioresour. Technol.* 97(18): 2252-2259.

Al-Ahmad A, Daschner F D, Kümmerer K. 1999. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37(2): 158-163.

Alaton I A, Dogruel S, Baykal E, Gerone G. 2004. Combined chemical and biological oxidation of penicillin formulation effluent. *J. Environ. Manag.* 73(2): 155-163.

Alexy R, Sommer A, Lange F T, Kümmerer K. 2006. Local use of antibiotics and their input and fate in a small sewage treatment plant—significance of balancing and analysis on a local scale vs. nationwide scale. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 34(6): 587-592.

Alkimin G D, Daniel D, Frankenbach S, Serôdio J, Soares A M V M, Barata C, Nunes B. 2019. Evaluation of pharmaceutical toxic effects of non-standard endpoints on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Sci. Total Environ.* 657: 926-937.

Althaus R, Nagel O, Molina P. 2014. Effect of antibiotics in whey on the fermentation of *K. marxianus*. Argentina. Concordia Argentina. Libro. Resumen. Congreso. Food Innova – International Conference in Food Innovation –978-950698340-6.

Amado I R, Vázquez J A, Pastrana L, Teixeira J A. 2016. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chem.* 198: 54-61.

Amata I. 2013. Yeast a single cell protein: Characteristics and metabolism. *Int. J. Appl.* 4: 158-170.

American Society for Testing and Materials (ASTM). 2009. Standard guide for conducting terrestrial plant toxicity tests.

Aminov R I. 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* 1(134): 1-7.

Andersson D I, Hughes D. 2012. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resist. Update* 15(3): 162-172.

- Andreozi R, Caprio V, Marotta R, Radovnikovic A. 2003. Ozonation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV treatment of clofibric acid in water: a kinetic investigation. *J. Hazard Mater.* 103(3): 233-246.
- Andreozi R, Marotta R, Pinto G, Pollio A. 2002. Carbamazepine in water: persistence in the environment ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Res.* 36(11): 2869-2877.
- Andrieu M, Rico A, Phu T M, Phuong N T, Van den Brink P J. 2015. Ecological risk assessment of the antibiotic enrofloxacin applied to *Pangasius catfish* farms in the Mekong Delta Vietnam. *Chemosphere.* 119: 407-414.
- Aquino S F D, Silva S D Q, Chernicharo C A. 2006. Aspectos prácticos del ensayo de demanda química de oxígeno (DQO) aplicado al análisis de efluentes anaeróbicos. *Ing. Sanit. Ambiente.*, 11(4): 295-304.
- Archer E, Petrie B, Kasprzyk-Hordern B, Wolfaardt G M. 2017. The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): endocrine disrupting contaminants (EDCs): metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters. *Chemosphere.* 174: 437-446.
- Augugliaro V, García-López E, Loddo V, Malato-Rodríguez S, Maldonado I, Marcì G, Molinari R, Palmisano L. 2005. Degradation of lincomycin in aqueous medium: Coupling of solar photocatalysis and membrane separation. *Sol. Energy* 79(4): 402-408.
- Aust M O, Godlinski F, Travis G R, Hao X, McAllister T A, Leinweber P, Thiele-Bruhn S. 2008. Distribution of sulfamethazine chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environ. Pollut.* 156(3): 1243-1251.
- Aycan E, Ince S. 2018. Presence of beta-lactam antibiotic residues in raw milk obtained from Afyonkarahisar province. *Kocatepe Vet. J.* 11(2): 113-118.
- Azanu D, Styriahave B, Darko G, Weisser J J, Abaidoo R C. 2018. Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *Sci. Total Environ.* 622: 293-305.
- Babić S, Periša M, Škorić I. 2013. Photolytic degradation of norfloxacin enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media. *Chemosphere.* 91(11):



1635-1642.

Backhaus T, Grimme L H. 1999. The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*. 38(14): 3291-3301.

Barberis S, Segovia R. 2002. Maximum volumetric production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces fragilis* in fed-batch culture with automatic control. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77(6): 706-710.

Bártíková H, Podlipná R, Skálová L. 2016. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*. 144: 2290-2301.

Bartlett A J, Hedges A M, Intini K D, Brown L R, Maisonneuve F J, Robinson S A, Gillis P L, de Solla S R. 2019. Acute and chronic toxicity of neonicotinoid and butenolide insecticides to the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotox. Environ. Safe.* 175: 215-223.

Basset G, Quinlivan E P, Ziemak M J, de la Garza R D, Fischer M, Schiffmann S, Bacher A, Gregory J F, Hanson A D. 2002. Folate synthesis in plants: the first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *PNAS* 99(19): 12489-12494.

Batayneh A T. 2012. Toxic (aluminum beryllium boron chromium and zinc) in groundwater: health risk assessment. *Int. J. Environ. Sci. Tec.* 9(1): 153-162.

Batchelder A R. 1982. Chlortetracycline and oxytetracycline effects on plant growth and development in soil systems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 11(4): 675-678.

Batt A L, Snow D D, Aga D S. 2006. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County Idaho USA. *Chemosphere*. 64(11): 1963-1971.

Batt A, Kim S, Aga D S. 2007. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. *Chemosphere*. 68(3): 428-435.

Baynes R E, Lyman R, Anderson K L, Brownie C F. 1999. A preliminary survey of antibiotic residues and viable bacteria in milk from three Caribbean basin countries. *J. Food Prot.* 62(2): 177-180.

Belem M A F, Lee B H. 1999. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Process*

Biochem. 34(5): 501-509.

Bellaver L H, de Carvalho N M B, Abrahão-Neto J, Gombert A K. 2004. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. FEMS Yeast Res. 4(7): 691-698.

Belviso S, Bardi L, Bartolini A B, Marzona M. 2004. Lipid nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* in winemaking. Canadian J. Microbiol. 50(9): 669-674.

Bencini R. 2001. Factors affecting the quality of ewe's milk. In: Proceedings of the 7th Great Lakes Dairy Sheep Symposium Wisconsin USA. 52-83.

Bennani H, Mateus A, Mays N, Eastmure E, Stärk K. D, Häsler B. 2020.

Berg G, Smalla K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. FEMS Microbiol. Ecol. 68(1): 1-13.

Bernabeu A, Vercher R F, Santos-Juanes L, Simón P J, Lardín C, Martínez M A, Amat A M. 2011. Solar photocatalysis as a tertiary treatment to remove emerging pollutants from wastewater treatment plant effluents. Catal. Today. 161(1): 235-240.

Berruga M I, Beltrán M C, Novés B, Molina A, Molina M P. 2011. Effect of penicillins on the acidification of yogurt made from ewe's milk during the storage. In Science and Technology against Microbial Pathogens: Research Development and Evaluation (pp. 145-149).

Berruga M I, Molina A, Carrión D, Molina M P, Román M. 2005. Chemicophysical properties of yoghurt from Manchega ewe milk. In Congresos y Jornadas. Serie Ganadería Ovino-Caprino-Junta de Andalucía (España). JA, CAP.

Berruga M I, Molina M P, Noves B, Roman M, Molina A. 2007. *In vitro* study about the effect of several penicillins during the fermentation of yogurt made from ewe's milk. Milchwissenschaft. 62: 303-305.

Berruga M I, Noves B, Molina M P, Roman M, Molina A. 2008. Influence of cephalosporins on the coagulation time of yogurt made from ewes' milk. Int. J.

Dairy Technol. 61(4): 372-378.

Beyene T. 2016. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. J. Vet. Sci. Tech. 7(1): 1-7.

Bhutani N, Muraleedharan C, Talreja D, Rana S W, Walia S, Kumar A, Walia S K. 2015. Occurrence of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase-producing bacteria on iceberg lettuce retailed for human consumption. BioMed Res. Int. 2015: 1-10. <https://doi.org/10.1155/2015/547547>

Bisacchi G S. 2015. Origins of the quinolone class of antibacterials: an expanded “discovery story” miniperspective. J. Med. Chem. 58(12): 4874-4882.

Blackburn A S, Avery S V. 2003. Genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes required for antibiotic insusceptibility of eukaryotes. Antimicrob. Agents Chemother. 47(2): 676-681.

Blair B D, Crago J P, Hedman C J, Treguer R J, Magruder C, Royer L S, Klaper R D. 2013. Evaluation of a model for the removal of pharmaceuticals, personal care products, and hormones from wastewater. Sci. Total Environ. 444: 515-521.

Blanco G, Junza A, Segarra D, Barbosa J, Barrón D. 2016. Wildlife contamination with fluoroquinolones from livestock: widespread occurrence of enrofloxacin and marbofloxacin in vultures. Chemosphere 144: 1536-1543.

Blöchl A, Peterbauer T, Richter A. 2007. Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. J. Plant Physiol. 164(8): 1093-1096.

Boggero C, Althaus R, Sosa J, Fernandez G, Nagel O, Rodriguez M. 2014. Effect of the yeast addition in the diet on SCC of Pampinta sheep milk. In XXXIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC): XV Congreso Internacional Ourense España 17-19 de septiembre de 2014 (pp. 182-186). Sociedad Española Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC).

Bosco F, Carletto R A, Marmo L. 2018. An integrated cheese whey valorization process. Chem. Eng. Trans. 64: 379-384.

Botsoglou N, Fletouris J. 2001. Drugs residues in foods: Pharmacology food safety and analysis. In: Serie Food Science and technology. Ed. Marcel Dekker Inc. New York USA.

- Bowman S M, Drzewiecki K E, Mojica E R E, Zielinski A M, Siegel A, Aga D S, Berry J O. 2011. Toxicity and reductions in intracellular calcium levels following uptake of a tetracycline antibiotic in *Arabidopsis*. *Env. Sci. Technol.* 45(20): 8958-8964.
- Boxall A B, Fogg L A, Blackwell P A, Blackwell P, Kay P, Pemberton E J, Croxford A. 2004. *Vet. Med. Environ.* In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 1-91). Springer New York NY.
- Boxall A B, Kolpin D W, Halling-Sørensen B, Tolls J. 2003. Peer reviewed: are veterinary medicines causing environmental risks? 286A–294A.
- Brain R A, Johnson D J, Richards S M, Sanderson H, Sibley P K, Solomon K R. 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(2): 371-382.
- Brea-Maure O, Elías-Iglesias A, Ortiz-Milán A, Motta-Ferreira W, Hechavarría-Riviaux S. 2015. Efecto de la urea y del tiempo en la fermentación en estado sólido de la harina de frutos del árbol del pan (*Artocarpus altilis*). *Cs. Agric.*, 12(2): 91-101.
- Broadway P R, Carroll J A, Sanchez N C B. 2015. Live yeast and yeast cell wall supplements enhance immune function and performance in food-producing livestock: a review. *Microorganisms.* 3(3): 417-427.
- Brooks P H, Moran C A, Beal J D, Demeckova V, Campbell A, Varley M A, Wiseman J. 2001. *The weaner pig: Nutrition and management*. CAB International.
- Brown K D, Kulis J, Thomson B, Chapman T H, Mawhinney D B. 2006. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci. Total Environ.* 366(2-3): 772-783.
- Buitrago G, Soto L, Paez G, Araujo K, Mármol Z, Rincón M. 2008. Continue production of single cell protein of *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* from diluted cheese whey. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia.* 31: 107-113.
- Cabello F C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ.*

Microbiol. 8(7): 1137-1144.

Cabizza R, Rubattu N, Salis S, Pes M, Comunian R, Paba Addis M, Teswta M C, Urgeghe P P. 2017. Transfer of oxytetracycline from ovine spiked milk to whey and cheese. *Int. Dairy J.* 70: 12-17.

Calderón A, Rodríguez V, Vélez S. 2007. Evaluación de la calidad de leches en cuatro procesadoras de quesos en el municipio de montería Colombia. *Revista MVZ Córdoba.* 12(1): 912-920.

Calvo J, Martínez-Martínez L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm. Infecc. Microbiol.* 27(1): 44-52.

Campagnolo E R, Johnson K R, Karpati A, Rubin C S, Kolpin D W, Esteban J, Currier R, Smith K, Thu K, McGeehin M. 2002. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Sci. Total Environ.* 299(1-3): 89-95.

Capurso L, Koch M. 2021. Side effects of antibiotic: diarrhea and *Clostridium difficile* infection. *Rec. Prog. Med.*, 112(1): 4-26.

Carlet J, Collignon P, Goldmann D, Goossens H, Gyssens I C, Harbarth S, Jarlier V, Levy S B, N'Doye B, Pittet D, Richtmann R, Seto W H, van der Meer J W M, Voss A, Richtmann R. 2011. Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. *The Lancet* 378(9788): 369-371.

Carpenter S R, Kitchell J F (Eds.). 1996. The trophic cascade in lakes. Cambridge University Press.

Carraschi S P, Florêncio T, Garlich N, Ferreira da Silva A, Marcari Marques A, da Cruz C, Tavares Ranzani Paiva M J. 2015. Ecotoxicology of drugs used in fish disease treatment. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 7: 31-36.

Cartagena C J. 2011. Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos. *Rev. Lasallista Investig.* 8(2): 143-153.

Castiglioni S, Bagnati R, Calamari D, Fanelli R, Zuccato E. 2005. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J. Chromatogr. A.* 1092(2): 206-215.

- Castrillo J I, Ugalde U O. 1993. Patterns of energy metabolism and growth kinetics of *Kluyveromyces marxianus* in whey chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biot.* 40(2-3): 386-393.
- Castro W F, Cruz A G, Bisinotto M S, Guerreiro L M R, Faria J A F, Bolini H M A, Cunha R L, Deliza R. 2013. Development of probiotic dairy beverages: Rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. *Int. J. Dairy Sci.* 96(1): 16-25.
- Chander Y, Kumar K, Goyal S M, Gupta S C. 2005. Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. *J. Environ. Qual.* 34(6): 1952-1957.
- Chandrapala J, Chen G Q, Kezia K, Bowman E G, Vasiljevic T, Kentish S E. 2016. Removal of lactate from acid whey using nanofiltration. *J. Food. Eng.* 177: 59-64.
- Chang C W, Takemoto J Y. 2014. Antifungal amphiphilic aminoglycosides. *Med. Chem. Comm.* 5(8): 1048-1057.
- Chavan R. S, Shraddha R. C, Kumar A Nalawade T. 2015. Whey based beverage: its functionality formulations health benefits and applications. *J. Food Proc. Tech.* 6(10): 1-8.
- Chee-Sanford J C, Aminov R I, Krapac I J, Garrigues-Jeanjean N, Mackie R I. 2001. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied Environ. Microbiol.* 67(4): 1494-1502.
- Chen H, Wang L. 2016. Technologies for biochemical conversion of biomass. Academic Press. ISBN 9780128025949.
- Chen Q L, An X L, Li H, Zhu Y G, Su J Q, Cui L. 2017. Do manure-borne or indigenous soil microorganisms influence the spread of antibiotic resistance genes in manured soil? *Soil Biol. Biochem.* 114: 229-237.
- Chen Q Y, Wu Z H, Liu J L. 2011. Ecotoxicity of chloramphenicol and Hg acting on the root elongation of crops in North China. *Int. J. Environ. Sci.* 5(4): 909-916.
- Chitescu C L, Kaklamanos G, Nicolau A I, Stolker A A M L. 2015. High sensitive multiresidue analysis of pharmaceuticals and antifungals in surface water using U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. Application to the Danube river basin on

the Romanian territory. *Sci. Total Environ.* 532: 501-511.

Choi K, Kim Y, Jung J, Kim M H, Kim C S, Kim N H, Park J. 2008. Occurrences and ecological risks of roxithromycin, trimethoprim, and chloramphenicol in the Han River, Korea. *Environ. Toxicol. Chem.* 27(3): 711-719.

Christian T, Schneider R J, Färber H A, Skutlarek D, Meyer M T, Goldbach H E. 2003. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31(1): 36-44.

Claxton L D, Houk V S, Hughes T J. 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.* 410: 237-243.

Codex Alimentarius. 2011. Límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios admisibles en los alimentos. FAO/OMS.

Código Alimentario Argentino. 2011. Capítulo VIII. Art. 556. Alimentos lácteos. Actualización al 10-06.

Coetsier C M, Spinelli S, Lin L, Roig B, Touraud E. 2009. Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs?. *Environment International*, 35(5): 787-792.

Conley J M, Symes S J, Schorr M S, Richards S M. 2008. Spatial and temporal analysis of pharmaceutical concentrations in the upper Tennessee River basin. *Chemosphere.* 73(8): 1178-1187.

Connell S R, Tracz D M, Nierhaus K H, Taylor D E. 2003. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Ch.* 47(12): 3675-3681.

Connon R, Hooper H L, Sibly R M, Lim F L, Heckmann L H, Moore D J, Watanabe H, Soetaert A, Cook K, Maund S J, Hutchinson T H. 2008. Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna*, exposed to cadmium. *Env. Sci. Technol.* 42(6): 2181-2188.

Conzuelo F, Montiel V R V, Campuzano S, Gamella M, Torrente-Rodríguez R M, Reviejo A J, Pingarrón J M. 2014. Rapid screening of multiple antibiotic residues in milk using disposable amperometric magnetosensors. *Anal. Chim. Acta.* 820: 32-38.

- Coombe V T, Moore K W, Hutchings M J. 1999. TIE and TRE: an abbreviated guide to dealing with toxicity. *Water Sci. Technol.* 39: 91-97.
- Cortesana G A L. 2002. Determinación de residuos de antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca. *Alimentaria.* 2(2): 35-43.
- Costanzo S D, Murby J, Bates J. 2005. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Mar. Pollut. Bull.* 51(1-4): 218-223.
- Cuervo González L M, Guerrero F. 2018. Prospectiva en América Latina: aprendizajes a partir de la práctica. Disponible en: [https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/43722/S1701160\\_es.pdf?sequence=1](https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/43722/S1701160_es.pdf?sequence=1)
- Cui C, Han Q, Jiang L, Ma L, Jin L, Zhang D, Lin K, Zhang T. 2018. Occurrence distribution and seasonal variation of antibiotics in an artificial water source reservoir in the Yangtze River delta East China. *Environ. Sci. Pollut. R.* 25(20): 19393-19402.
- Cui J, Zhang K, Huang Q, Yu Y, Peng X. 2011. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of norfloxacin in waters using a specific polyclonal antibody. *Anal. Chim. Acta.* 688(1): 84-89.
- Daghrir R, Drogui P. 2013. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ. Chem. Lett.* 11(3): 209-227.
- Dalhoff A. 2015. Antiviral antifungal and antiparasitic activities of fluoroquinolones optimized for treatment of bacterial infections: a puzzling paradox or a logical consequence of their mode of action? *Eur. J. Clin. Microbiol.* 34(4): 661-668.
- Dalla Bona M, Lizzi F, Borgato A, De Liguoro M. 2016. Increasing toxicity of enrofloxacin over four generations of *Daphnia magna*. *Ecotox. Environ. Safe.* 132: 397-402.
- Dalla Bona M, Zounková R, Merlanti R, Blaha L, De Liguoro M. 2015. Effects of enrofloxacin ciprofloxacin and trimethoprim on two generations of *Daphnia magna*. *Ecotox. Environ. Safe.* 113: 152-158.
- Dan A, Zhang X, Dai Y, Chen C, Yang Y. 2020. Occurrence and removal of quinolone, tetracycline, and macrolide antibiotics from urban wastewater in



- constructed wetlands. *J. Clean. Prod.* 252: 119677.
- Dang H, Zhang X, Song L, Chang Y, Yang G. 2007. Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. *J. Appl. Microbiol.* 103(6): 2580-2592.
- Danilova N, Galitskaya P. Y, Selivanovskaya S. Y. 2018. Change in phytotoxicity during composting of manures containing oxytetracycline. *IIOAB Journal* 9(5): 13-17.
- Danner M C, Robertson A, Behrends V, Reiss J. 2019. Antibiotic pollution in surface fresh waters: occurrence and effects. *Sci. Total Environ.* 664: 793-804.
- Dantas M D D A, Silva M D M, Silva O N, Franco O L, Fensterseifer I C M, Tenorio H D A, Pereira H J V, Figueiredo I M, Santos J C C. 2020. Interactions of tetracyclines with milk allergenic protein (casein): a molecular and biological approach. *J. Biomol.Struct.Dyn.* 38(18): 5389-5400.
- Das B, Sarkar S, Maiti S, Bhattacharjee S. 2016. Studies on production of ethanol from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Mater. Today* 3(10): 3253-3257.
- Dasa B, Dasa M, Bhattacharjeeb S, Bhattacharjeea C. 2017. Ethanol production from deproteinized cheese whey powder in a batch fermentation process: optimization of process and kinetic modelling. *Desal. Water Treat.* 64: 198-206.
- David J C, Buchet A, Sialelli J N, Delouvé S. 2020. The use of antibiotics in veterinary medicine: Representations of antibiotics and biosecurity by pig farmers. *Pratiqu. Psych.* <https://doi.org/10.1016/j.prps.2020.06.003>.
- Davis J G, Truman C C, Kim S C, Ascough J C, Carlson K. 2006. Antibiotic transport via runoff and soil loss. *J. Environ. Qual.* 35(6): 2250-2260.
- De Deken R H. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology.* 44(2): 149-156.
- De Jesus C S A, Ruth V G E, Daniel S F R, Sharma A. 2015. Biotechnological alternatives for the utilization of dairy industry waste products. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 6(03): 223-235.
- De Kraker M E, Davey P G, Grundmann H. 2011. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. PLoS Medicine 8(10):e1001104.

De la Fuente Oliver G, Jones E, Jones S, Newbold C J. 2017. Functional resilience and response to a dietary additive (Kefir) in models of foregut and hindgut microbial fermentation *in vitro*. Front. Microbiol. 8: a1194. doi: 10.3389/fmicb.2017.01194

De Oliveira L L D, Antunes S C, Gonçalves F, Rocha O, Nunes B. 2016. Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna*. Drug Chem. Toxicol. 39(1): 13-21.

De Oliveira L L, Antunes S C, Gonçalves F, Rocha O, Nunes B. 2015. Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. Ecotoxicol. Environ. Saf. 119: 123-131.

Deblonde T, Cossu-Leguille C, Hartemann P. 2011. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 214(6): 442-448.

Debono M. Gordee R S. 1994. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. Annu. Rev. Microbiol. 48(1): 471-497.

Deeb O, Hemmateenejad B, Jaber A, Garduno-Juarez R, Miri R. 2007. Effect of the electronic and physicochemical parameters on the carcinogenesis activity of some sulfa drugs using QSAR analysis based on genetic-MLR and genetic-PLS. Chemosphere. 67(11): 2122-2130.

Deguchi Y, Toyozumi T, Masuda S, Yasuhara A, Mohri S, Yamada M, Inoue Y, Kinae N. 2007. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. Mut. Res. 5: 178–185.

Demoly P, Romano A. 2005. Update on beta-lactam allergy diagnosis. Curr. Allergy Asthma Rep. 5(1): 9-14.

Deng W, Li N, Zheng H, Lin H. 2016. Occurrence and risk assessment of antibiotics in river water in Hong Kong. Ecotox. Environ. Safe. 125:121-127.

Derringer G, Suich R. 1980. Simultaneous optimization of several response variables. J. Qual. Technol. 12(4): 214-219.

Dethlefsen L, Relman D. A. 2011. Incomplete recovery and individualized

responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108(1): 4554-4561.

Díaz-Vergara L, Pereyra C M, Montenegro M, Pena G A, Aminahuel C A, Cavaglieri L R. 2017. Encapsulated whey–native yeast *Kluyveromyces marxianus* as a feed additive for animal production. *Food Addit. Contam. A Part A.* 34(5): 750-759.

Dimitrakopoulou D, Rethemiotaki I, Frontistis Z, Xekoukoulotakis N P, Venieri D, Mantzavinos D. 2012. Degradation mineralization and antibiotic inactivation of amoxicillin by UV-A/TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *J. Environ. Manage.* 98: 168-174.

Dimitrellou D, Kandylis P, Kourkoutas Y, Koutinas A A, Kanellaki M. 2009. Evaluation of thermally-dried *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. *Food Chem.* 115(2): 691-696.

Dinh Q T, Alliot F, Moreau-Guigon E, Eurin J, Chevreuil M, Labadie P. 2011. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. *Talanta*, 85(3): 1238-1245.

Dionísio R, Daniel D, de Alkimin G D, Nunes B. 2020. Multi-parametric analysis of ciprofloxacin toxicity at ecologically relevant levels: Short-and long-term effects on *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 74 : 103295. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103295>.

Diserens J, Beck Henzelin A, Le Breton M, Savoy Perroud M. 2005. Antibiotics in milk: Actual situation & compilation of commercial available screening methods for the detection of inhibitors/antibiotics residues in milk. Informe técnico: Quality & Safety Department Nestlé Research Center. Lausanne Switzerland. 186-220.

Długosz M, Żmudzki P, Kwiecień A, Szczubiałka K, Krzek J, Nowakowska M. 2015. Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous solution using a floating TiO<sub>2</sub>-expanded perlite photocatalyst. *J. Hazard. Mater.* 298: 146-153.

Dolar D, Gros M, Rodriguez-Mozaz S, Moreno J, Comas J, Rodriguez-Roda I, Barceló D. 2012. Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an integrated membrane system, MBR–RO. *J. Hazard. Mater.* 239: 64-69.

Dong J, Walker J, Nitiss J L. 2000. A mutation in yeast topoisomerase II that

confers hypersensitivity to multiple classes of topoisomerase II poisons. *Int. J. Biol. Chem.* 275(11): 7980-7987.

Downie B, Bewley J D. 2000. Soluble sugar content of white spruce (*Picea glauca*) seeds during and after germination. *Physiol. Plant.* 110(1): 1-12

Drlica K, Zhao X, Malik M, Hiasa H, Mustaev A, Kerns R. 2019. Fluoroquinolone resistance. *Bacterial Resistance to Antibiotics—From Molecules to Man*. Ed: Drlica K, Zhao X, Malik M, Hiasa H, Mustaev A, Kerns R, p.p. 125-161. Ed. John Wiley & Sons, Ltd. England

Duchene O, Vian J F, Celette F. 2017. Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agr. Ecosyst. Environ.* 240: 148-161.

Duong H A, Pham N H, Nguyen H T, Hoang T T, Pham H V, Pham V C, Alder A. C. 2008. Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere.* 72(6): 968-973.

Duong H A, Phung T V, Nguyen T N, Phan Thi L A, Pham H V. 2021. Occurrence, distribution, and ecological risk assessment of antibiotics in selected urban lakes of Hanoi, Vietnam. *J. Anal. Methods Chem.* 1-13.

Ebele A J, Abdallah M A E, Harrad S. 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg. Contam.* 3(1): 1-16.

Ebert I, Bachmann J, Kühnen U, Küster A, Kussatz C, Maletzki D, Schlüter C. 2011. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 30(12): 2786-2792.

Eguchi K, Nagase H, Ozawa M, Endoh Y S, Goto K, Hirata K, Miyamoto K, Yoshimura H. 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere.* 57(11): 1733-1738.

El Najjar N H, Touffet A, Deborde M, Journel R, Leitner N K V. 2013. Levofloxacin oxidation by ozone and hydroxyl radicals: kinetic study, transformation products and toxicity. *Chemosphere.* 93(4): 604-611.

Elsea S. H, Osheroff N, Nitiss J. L. 1992. Cytotoxicity of quinolones toward eukaryotic cells. Identification of topoisomerase II as the primary cellular target for the quinolone CP-115953 in yeast. *Int. J. Biol. Chem.* 267(19): 13150-13153.

Eluk D, Ceruti R, Nagel O, Althaus R. 2019. Effect of thermal treatment of whey contaminated with antibiotics on the growth of *Kluyveromyces marxianus*. *J. Dairy Res.* 86(1): 102-107.

Eluk D, Franck R, Nagel O G, Molina M P, Althaus R L. 2017. Phytotoxic effect of antibiotic residues on forage seeds. *Int. J. Agric. Innov. Res.* 5: 828- 848

Eluk D, Nagel O G, Zimmermann J, Molina M P, Althaus R L. 2016. Effect of antibiotics on the germination and root elongation of Argentine intensive crops. *Int. J. Environ. Res.* 10(4): 471-480.

Eluk D, Nagel O, Gagneten A, Reno U, Althaus R. 2021. Toxicity of fluoroquinolones on the cladoceran *Daphnia magna*. *Water Environ. Res.* 1–17

EMA. (2003). Note for guidance on environmental risk assessment of medicinal products for human use. CPMP/SWP/44447/00 drage corr. Available from <<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf>>.

Erginkaya Z, Turhan E U, Tatlı D. 2018. Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from traditional Turkish fermented dairy products. *Iran. J. Vet. Res.* 19(1): 53-56.

Erskine R J, Wagner S, DeGraves F J. 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *The Veterinary clinics of North America. Food Anim. Pract.* 19(1): 109-38.

EU. 2009. Reglamento N°1069/2009 del parlamento europeo y del consejo. Por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y productos derivados no destinados al consumo humano.

European Union (EU). 2009. Regulation EC N°470/2009 of 6 lay 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of 147 animal origin repealing Council Regulation (EEC) N°2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) N°726/2004 of the European Parliament and of the Council. *Off. J. L1* 52 11-22.

European Union (EU). 2010. Regulation EU N°37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of European Communities L, 15 1-72.

Fadel M, El-Ghonemy D H. 2015. Biological fungal treatment of olive cake for better utilization in ruminants nutrition in Egypt. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* 4(4): 1-271.

Farkas M H, Berry J O, Aga D S. 2007. Chlortetracycline detoxification in maize via induction of glutathione S-transferases after antibiotic exposure. *Environ. Sci. Technol.*, 41(4): 1450-1456.

Farré M, Barceló D. 2003. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors bioassays and chemical analysis. *Trends Analyt. Chem.* 22(5): 299-310.

Feitosa-Felizzola J, Chiron S. 2009. Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). *J. Hydrol.*364. (1-2): 50-57

Feng X, Littler H M, Knowlton K F, Garner E, Pruden A. 2019. The impacts of feeding milk with antibiotics on the fecal microbiome and antibiotic resistance genes in dairy calves. *Can. J. Anim. Sci.* (0): 1-8.

Ferdig M, Kaleta A, Buchberger W. 2005. Improved liquid chromatographic determination of nine currently used (fluoro) quinolones with fluorescence and mass spectrometric detection for environmental samples. *J. Sep. Sci.* 28(13): 1448-1456.

Fick J, Söderström H, Lindberg R H, Phan C, Tysklind M, Larsson D J. 2009. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ. Toxicol. Chem.* 28(12): 2522-2527.

Fiechter A, Gmünder F K. 1989. Metabolic control of glucose degradation in yeast and tumor cells. *Verteb. Cell Culture II Enz. Tech.* 1-28.

Finley R L, Collignon P, Larsson D J, McEwen S A, Li X Z, Gaze W H, Reid-Smith R, Timinouni M, Graham D W, Topp E. 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Arch. Clin. Infect. Dis.* 57(5):

704-710.

Fisher N R, Purnell C B, Kang J. 2010. Comment on effect of heating on the stability of quinolones in milk. *J. Agric. Food Chem.*, 58(24): 13020-13021.

Flaherty C M, Dodson S I. 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival growth and reproduction. *Chemosphere* 61(2): 200-207.

Flieger J, Flieger M. 2020. Ionic liquids toxicity—benefits and threats. *Int. J. Mol. Sci.* 21(17): 6267-6308.

Fonseca G G, Heinzle E, Wittmann C, Gombert A K. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biot.* 79(3): 339-354.

Food and Drug Administration (FDA). 2015. Milk drug residue sampling survey. Silver Spring 10.

Food and Drug Administration (FDA). 2019. Judicious Use of Antimicrobials. <https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/JudiciousUseofAntimicrobials/>.

Forsberg K J, Reyes A, Wang B, Selleck E M, Sommer M O, Dantas G. 2012. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337(6098): 1107-1111.

Fox P F, McSweeney P L H. 2017. Cheese: an overview. In *Cheese: chemistry physics and microbiology* (1-36). Springer Boston MA.

Fram M S, Belitz K. 2011. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. *Sci.Total Environ.* 409(18): 3409-3417.

Fu L, Huang T, Wang S, Wang X, Su L, Li C, Zhao Y. 2017. Toxicity of 13 different antibiotics towards freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and their modes of action. *Chemosphere* 168: 217-222.

Fukuhara H. 2006. *Kluyveromyces lactis*—a retrospective. *FEMS Yeast Res.* 6(3): 323-324.

Gabardo S, Pereira G F, Klein M P, Rech R, Hertz P F, Ayub M A Z. 2016. Dynamics of yeast immobilized-cell fluidized-bed bioreactors systems in ethanol fermentation from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate. *Bioproc.*

Biosyst. Eng. 39(1): 141-150.

Gao L, Shi Y, Li W, Niu H, Liu J, Cai Y. 2012. Occurrence of antibiotics in eight sewage treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere*. 86(6): 665-671.

Garcia J F, Diez M J, Sahagun A M, Diez R, Sierra M, Garcia J J, Fernandez M N. 2020. The online sale of antibiotics for veterinary use. *Animals* 10(3): 503-517.

García-Galán M J, Díaz-Cruz M S, Barceló D. 2011. Occurrence of sulfonamide residues along the Ebro River basin: removal in wastewater treatment plants and environmental impact assessment. *Environ. Int.* 37, 462-473.

Gastaldi L, Litwin G, Maekawa M, Centeno A, Engler P, Cuatrin A, Chimicz J, Ferrer J L, Suero M. 2015. El tambo argentino: una mirada integral a los sistemas de producción de leche de la región pampeana. Informe técnico INTA EEA Rafaela.

Ghaly A E. 1996. A comparative study of anaerobic digestion of acid cheese whey and dairy manure in a two stage reactor. *J. Bioresour. Technol* 58(1): 61-72.

Ghaly A, Kamal M, Correia L. 2005. Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Bioresour. Technol.* 96(10): 1143-1152.

Ghava K, Rathod M C, Dhale D A. 2015. Effect of antibiotics on seed germination and root elongation of wheat. *Int. J. Curr. Microbiol. Applied Sci.* 4(1): 516-527.

Ghosh P, Thakur I S, Kaushik A. 2017. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 141: 259-270.

Giang C N D, Sebesvari Z, Renaud F, Rosendahl I, Minh Q H, Amelung W. 2015. Occurrence and dissipation of the antibiotics sulfamethoxazole, sulfadiazine, trimethoprim, and enrofloxacin in the Mekong delta, Vietnam. *PLoS One.* 10(7): e0131855.



- Giang L T, Thien T L T. 2019. Determination of residual quantity of tetracycline antibiotics in shrimp pool water by UPLC-HRMS method. Vietnam J. Chemistry 57(6): 758-764.
- Gilbert D N, Leggett J E. 2000. Principles and practice of infectious disease. Aminoglycosides. 271-321.
- Ginebreda A, Muñoz I, de Alda M L, Brix R, López-Doval J, Barceló D. 2010. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). Environ. Int., 36(2): 153-162.
- Giraldo Gómez J. 2020. Transfer of antibiotics from goat's milk to cheese and whey (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València)
- Giraldo J, Althaus R L, Beltran M C, Molina M P. 2017. Antimicrobial activity in cheese whey as an indicator of antibiotic drug transfer from goat milk. Int. Dairy J. 69: 40-44.
- Godden S M, Fetrow J P, Feirtag J M, Green L R, Wells S J. 2005. Economic analysis of feeding pasteurized nonsaleable milk versus conventional milk replacer to dairy calves. J. Am. Vet. Med. A. 226(9): 1547-1554.
- Golet E M, Alder A C, Giger W. 2002. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. Environ. Sci. Technol. 36(17): 3645-3651.
- Golet E M, Alder A C, Hartmann A, Ternes T A, Giger W. 2001. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. Anal. Chem. 73(15): 3632-3638.
- Golet E M, Xifra I, Siegrist H, Alder A C, Giger W. 2003. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. Environ. Sci. Technol. 37(15): 3243-3249.
- Gomes M P, Gonçalves C A, de Brito J C M, Souza A M, da Silva Cruz F V, Bicalho E M, Figuero C C, Garcia Q S. 2017. Ciprofloxacin induces oxidative stress in duckweed (*Lemna minor L.*): implications for energy metabolism and

antibiotic-uptake ability. J. Hazard. Mat. 328: 140-149.

González-Pleiter M, Gonzalo S, Rodea-Palomares I, Leganés F, Rosal R, Boltes K, Marco E, Fernández-Piñas F. 2013. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment. Water Res. 47(6): 2050-2064.

Gracia-Lor E, Sancho J V, Serrano R, Hernández F. 2012. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. Chemosphere. 87(5): 453-462.

Graham F, Paradis L, Bégin P, Paradis J, Babin Y, Des Roches A. 2014. Risk of allergic reaction and sensitization to antibiotics in foods. Ann. Allergy Asthma Immunol. 113(3): 329-330.

Grba S, Stehlik-Tomas V, Stanzer D, Vahcic N, Skrlin A. 2002. Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. Chem. Biochem. Eng. Q. 16(1): 13-16.

Gregory K J, Sexton P M, Christopoulos A. (2007). Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. Curr. Neuropharmacol. 5(3): 157-167.

Gros M, Petrovic M, Barceló D. 2009. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. Anal. Chem. 81(3): 898-912.

Gros M, Petrović M, Ginebreda A, Barceló D. 2010. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. Environ. Int. 36(1): 15-26.

Gross V J, Smith D G. 1972. The effect of nalidixic acid on growth and petite formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbios. 6(22): 139-146.

Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Adv. Drug Deliv. Rev. 50(3): 245-259.

Guilhermino L, Diamantino T, Silva M C, Soares A M V M. 2000. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? Ecotox. Environ. Safe. 46(3): 357-362.

- Guimarães P M, Teixeira J A, Domingues L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol. Adv.* 28(3): 375-384.
- Gulkowska A, He Y, So M K, Yeung L W, Leung H W, Giesy J P, Richardson B. J. 2007. The occurrence of selected antibiotics in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 54(8): 1287-1293.
- Gulkowska A, Leung H W, So M K, Taniyasu S, Yamashita N, Yeung L W, Lam P K. 2008. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. *Water Res.* 42(1-2): 395-403.
- Gupta A, Verma J P. 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41: 550-567.
- Guruge K S, Goswami P, Tanoue R, Nomiya K, Wijesekara R G S, Dharmaratne T S. 2019. First nationwide investigation and environmental risk assessment of 72 pharmaceuticals and personal care products from Sri Lankan surface waterways. *Sci. Total Environ.* 690: 683-695.
- Gutiérrez E, Bastidas M. 2016. Reducción óptima de la carga orgánica del lactosuero dulce mediante el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* (KM). *Afinidad* 73(575): 185-190.
- Gutierrez M F, Paggi J C, Gagneten A M. 2012. Microcrustaceans escape behavior as an early bioindicator of copper, chromium and endosulfan toxicity. *Ecotoxicology.* 21: 428–438.
- Gyawali R, Ibrahim S A. 2016. Effects of hydrocolloids and processing conditions on acid whey production with reference to Greek yogurt. *Trends Food Sci. Tech.* 56: 61-76.
- Halling-Sørensen B, Lützhøft H C H, Andersen H R, Ingerslev F. 2000. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam trimethoprim and ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 46(1): 53-58.
- Hamilton-Miller J M T. 1999.  $\beta$ -Lactams: variations on a chemical theme with some surprising biological results. *J. Antimicrob. Chemother.* 44(6): 729-734.
- Hamscher G, Pawelzick H T, Höper H, Nau H. 2004. Antibiotics in soil: routes of entry environmental concentrations fate and possible effects. In:

Pharmaceuticals in the Environment (139-147). Springer Berlin Heidelberg.

Hamscher G, Sczesny S, Höper H, Nau H. 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74(7): 1509-1518.

Handa A K, Mattoo A K. 2010. Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48(7): 540-546.

Hanna N, Sun P, Sun Q, Li X, Yang X, Ji X, Zou H, Ottoson J, Nilsson L E, Berglund B, Dyar O J, Tamhankar A J, Lundborg C S. 2018. Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: it's potential for resistance development and ecological and human risk. *Environ. Int.* 114: 131-142.

Hansen S F, von Krauss M K, Tickner J A. 2008. The precautionary principle and risk-risk tradeoffs. *J. Risk Res.* 11(4): 423-464.

Harden T J. 1996. The reduction of BOD and production of biomass from acid whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Food Aust.* 48(10): 456-457.

Harnisz M. 2013. Total resistance of native bacteria as an indicator of changes in the water environment. *Environ. Pollut.* 174: 85-92.

Harrison T R, Fauci A S. 2009. *Principios de Medicina Interna* (N° 616). McGraw-Hill Interamericana.

Harshman L. G, Zera A. J. 2007. The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends in Ecol. Evol.* 22(2): 80-86.

Hartmann A, Alder A C, Koller T, Widmer R M. 1998. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(3): 377-382.

Hassan H F, Saidy L, Haddad R, Hosri C, Asmar S, Jammoul A, Jammoul R, Hassan H, Serhan M. 2021. Investigation of the effects of some processing conditions on the fate of oxytetracycline and tylosin antibiotics in the making of commonly consumed cheeses from the East Mediterranean. *Vet. World.* 14(6): 1644-1649.

- He X, Wang Z, Nie X, Yang Y, Pan D, Leung A O, Cheng Z, Yang Y, Li K, Chen K. 2012. Residues of fluoroquinolones in marine aquaculture environment of the Pearl River Delta, South China. *Environ. Geochem. Health.* 34(3): 323-335.
- Hector R F. 1993. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 6(1): 1-21.
- Henzenn H I. 2013. Relevamiento de antibióticos en la leche procedente de pequeños tambos de la región centro de Santa Fe y su relación con la calidad higiénico-sanitaria y factores ambientales. (Tesis Mg. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Argentina).
- Hernando M D, De Vettori S, Bueno M M, Fernández-Alba A R. 2007. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere* 68(4): 724-730.
- Herrero M A, Maldonado May V, Sardi G, Flores F, Orlando A, Carbó L. 2000. Distribución de la calidad de agua subterránea en sistemas de producción agropecuarios bonaerenses. Condiciones de manejo y grado de contaminación. *Rev. Argentina Prod. Animal* 20(3-4): 237-252.
- Hillis D G, Fletcher J, Solomon K R, Sibley P K. 2011. Effects of ten antibiotics on seed germination and root elongation in three plant species. *Arch. Environ. Con. Tox.* 60(2): 220-232.
- Hirsch A G, Pollak J, Glass T A, Poulsen M N, Bailey-Davis L, Mowery J, Schwartz B S. 2017. Early-life antibiotic use and subsequent diagnosis of food allergy and allergic diseases. *Clin. Exp. Allergy* 47(2): 236-244.
- Homem V, Santos L. 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices—a review. *J. Environ. Manage.* 92(10): 2304-2347.
- Hooper D C, Jacoby G A. 2016. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *CSH Perspect. Med.* 6(9): a025320.  
<http://doi.org/10.1002/wer.1631>
- Hua W, Bennett E R, Letcher R J. 2006. Ozone treatment and the depletion of detectable pharmaceuticals and atrazine herbicide in drinking water sourced from the upper Detroit River Ontario Canada. *Water Res.* 40(12): 2259-2266.
- Huang F, Zou S, Deng D, Lang H, Liu F. 2019. Antibiotics in a typical karst river

system in China: spatiotemporal variation and environmental risks. *Sci. Total Environ.* 650: 1348-1355.

Huang J J, Hu H Y, Lu S Q, Li Y, Tang F, Lu Y, Wei B. 2012. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environ. Int.* 42: 31-36.

Huang J J, Hu H Y, Lu S Q, Li Y, Tang F, Lu Y, Wei B. 2012. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environ. Int.* 42: 31-36.

Huang L, Mo Y, Wu Z, Rad S, Song X, Zeng H, Chen Z. 2020. Occurrence, distribution, and health risk assessment of quinolone antibiotics in water, sediment, and fish species of Qingshitan reservoir, South China. *Scientific Reports*, 10(1): 15777.

Huang S, Cauty C, Dolivet A, Le Loir Y, Chen X D, Schuck P, Jan G, Jeantet R. 2016. Double use of highly concentrated sweet whey to improve the biomass production and viability of spray-dried probiotic bacteria. *J. Funct. Foods* 23: 453-463.

Huang Y H, Liu Y, Du P P, Zeng L J, Mo C H, Li Y W, Lü H, Cai Q Y. 2019. Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistant genes in water and sediments of urban rivers with black-odor water in Guangzhou, South China. *Sci. Total Environ.* 670: 170-180.

Huertas R A P. 2010. Digestión anaerobia de lactosuero: efecto de altas cargas puntuales. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellin.* 63(1): 5385-5394.

Hurtado F K, Souza M J, Melo J D, Rolim C. 2008. Ensayo microbiológico y método por HPLC para la determinación de Fluconazol en formulaciones farmacéuticas inyectables. *Lat. Am. J. Pharm.* 27: 224-228.

Iannacone J, Alvariño L. 2009. Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. *Ecol. Apl.* 8(1-2): 71-80.

Ikem A, Lin C H, Broz B, Kerley M, Le Thi H. 2017. Occurrence of enrofloxacin in overflows from animal lot and residential sewage lagoons and a receiving-stream. *Heliyon.* 3(10): e00409.

International Federation for Animal Health (IFAH). 2006. Improving the quality of

- life for animals and people. Annual Report. IFAH. Bruselas Bélgica.
- Inyinbor A A, Bello O S, Fadiji A E, Inyinbor H E. 2018. Threats from antibiotics: A serious environmental concern. *J. Environ. Chem. Eng.* 6(1): 784-793.
- Isidori M, Lavorogna M, Nardelli A, Pascarella L, Parrella A. 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Total Environ.* 346(1-3): 87-98.
- ISO. 1989. ISO-6060, Water quality—Determination of the chemical oxygen demand. International Standard Organization.
- Janssen C R, Persoone G, Snell T W. 1994. Cyst-based toxicity tests. VIII. Short-chronic toxicity tests with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquat. Toxicol.* 28(3-4): 243-258.
- Janssens J H, Burris N, Woodward A, Bailey R B. 1983. Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 598-602.
- Jarnheimer P Å, Ottoson J, Lindberg R, Stenström T A, Johansson M, Tysklind M, Olsen B. 2004. Fluoroquinolone antibiotics in a hospital sewage line; occurrence, distribution and impact on bacterial resistance. *Scand. J. Infect. Dis.* 36(10): 752-755.
- Jasim S Y, Irabelli A, Yang P, Ahmed S, Schweitzer L. 2006. Presence of pharmaceuticals and pesticides in Detroit river water and the effect of ozone on removal. *Ozone Sci. Eng.* 28(6): 415-423.
- Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W, Smalla K. 2014. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol.* 22(9): 536-545.
- Jia A, Wan Y, Xiao Y, Hu J. 2012. Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant. *Water Res.* 46(2): 387-394.
- Jiang J, Zhang D, Zhang H, Yu K, Li N, Zheng G. 2020. Degradation mechanism study of fluoroquinolones in UV/Fe<sup>2+</sup>/peroxydisulfate by on-line mass spectrometry. *Chemosphere* 239: 124737.
- Jiang L, Hu X, Yin D, Zhang H, Yu Z. 2011. Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere.* 82(6): 822-828.

- Jjemba P K. 2002a. The effect of chloroquine quinacrine and metronidazole on both soybean plants and soil microbiota. *Chemosphere* 46(7): 1019-1025.
- Jjemba P K. 2002b. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agr. Ecosyst. Environ.* 93(1-3): 267-278.
- Jjemba P K. 2006. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotox. Environ. Safe.* 63(1): 113-130.
- Johnson M A A, Madona C X, Almeida R S, Martins N, Coutinho H D. 2020. *In vitro* toxicity antioxidant anti-inflammatory and antidiabetic potential of *Sphaerostephanos unitus* (L.) Holttum. *Antibiotics* 9(6): 333-346.
- Jones G M, Seymour E H. 1988. Cowside antibiotic residue testing. *Int. J. Dairy Sci.* 71(6): 1691-1699.
- Jones O A H, Voulvoulis N, Lester J N. 2004. Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. *Crit. Rev. Toxicol.* 34(4): 335-350.
- Kafantaris I, Stagos D, Kotsampasi B, Kantas D, Koukoumis V, Moschonas N D, Skaperda Z, Gerasopoulos K, Makri M, Goutzourelas N, Mitsagga C. 2019. Whey protein concentrate improves antioxidant capacity faecal microbiota and fatty acid profile of growing piglets. *J. Agr. Sci.* 157(1): 72-82.
- Kalunke R M, Grasso G, D'Ovidio R, Dragone R, Frazzoli C. 2018. Detection of ciprofloxacin residues in cow milk: a novel and rapid optical  $\beta$ -galactosidase-based screening assay. *Microchem. J.* 136: 128-132.
- Kanh C M, Line S. 2007. *El manual Merck de veterinaria.* (6<sup>o</sup> edición). Barcelona: Océano
- Kaplan D M, Criddle R S. 1970. Effects of antibiotic substances on the respiration of yeast grown in 1% glucose. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 222(3): 611-620.
- Karthikeyan K G, Meyer M T. 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin USA. *Sci. Total Environ.* 361(1-3): 196-207.
- Karthikeyan, K. G., & Meyer, M. T. (2006). Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of the Total*



Environment, 361(1-3): 196-207.

Katzung B G, Masters S B, Trevor A J. (Eds.) 2012. Basic & clinical pharmacology. McGraw Hill Educación.

Katzung B G. 2007. Basic & Clinical Pharmacology (9° edición). McGraw-Hill.

Keimer B, Kröger S, Röhe I, Pieper R, Simon A, Zentek J. 2018. Influence of differently processed yeast (*Kluyveromyces fragilis*) on feed intake and gut physiology in weaned pigs. Anim. Sci. J. 96(1): 194-205.

Kemper N. 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecol. Indic. 8(1): 1-13.

Khachatryan A, Besser T, Dale H, Hancock D, Call D R. 2006 Use of a nonmedicated dietary supplement correlates with increased prevalence of streptomycin-sulfa-tetracycline-resistant *Escherichia coli* on a dairy farm. Applied Environ. Microbiol. 72(7): 4583-4588.

Khan Academy. 2016. Biología. Fermentación y respiración anaeróbica. Recuperado de: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/cellular-respiration-ap/a/fermentation-and-anaerobic-respiration>. Consultado en Julio de 2021.

Khaskheli M, Malik R, Arain M, Soomro A, Arain A. 2008. Detection of  $\beta$ -lactam antibiotic residues in market milk. Pakistan J. Nutr. 7 (5): 682-685.

Kiers J, Zeeman A M, Luttik M, Thiele C, Castrillo J I, Steensma H Y, Van Dijken J P, Pronk J T. 1998. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. Yeast. 14(5): 459-469

Kiki C, Rashid A, Wang Y, Li Y, Zeng Q, Yu C P, Sun Q. 2020. Dissipation of antibiotics by microalgae: Kinetics identification of transformation products and pathways. J. Hazard. Mater. 387: 121985.

Kim H Y, Lee M J, Yu S H, Kim S D. 2012. Los efectos individuales y poblacionales de la tetraciclina sobre *Daphnia magna* en exposición multigeneracional. Ecotoxicología. 21: 993-1002.

Kim B, Ji K, Kho Y, Kim P G, Park K, Kim K, Kim Y, Kim K, Choi K. 2017. Effects of chronic exposure to cefadroxil and cefradine on *Daphnia magna* and *Oryzias latipes*. Chemosphere, 185: 844-851.

- Kiss A A, Flores Landaeta S J, Infante Ferreira C A. 2012. Towards energy efficient distillation technologies: Making the right choice. *Energy* 47: 531-542.
- Klanicova B, Seda J, Slana I, Slany M, Pavlik I. 2013. The tracing of mycobacteria in drinking water supply systems by culture, conventional, and real time PCRs. *Current Microbiol.* 67(6) : 725-731.
- Klavarioti M, Mantzavinos D, Kassinos D. 2009. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environ. Int.* 35(2): 402-417.
- Knapp C W, Cardoza L A, Hawes J N, Wellington E M H, Larive C K, Graham D W. 2005. Fate and effects of enrofloxacin in aquatic systems under different light conditions. *Env. Sci. Technol.* 39(23): 9140-9146.
- Knapp C W, Cardoza L A, Hawes J N, Wellington E M H, Larive C K, Graham D. W. 2005. Fate and effects of enrofloxacin in aquatic systems under different light conditions. *Environ. Sci. Technol.* 39(23): 9140-9146.
- Knapp C W, Dolfing J, Ehlert P A, Graham D W. 2010. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Env. Sci. Technol.* 44(2): 580-587.
- Koba O, Golovko O, Kodešová R, Fér M, Grabic R. 2017. Antibiotics degradation in soil: A case of clindamycin trimethoprim sulfamethoxazole and their transformation products. *Environ. Pollut.* 220: 1251-1263.
- Kolpin D W, Furlong E T, Meyer M T, Thurman E M, Zaugg S D, Barber L B, Buxton H T. 2002. Pharmaceuticals hormones and other organic wastewater contaminants in US streams 1999– 2000: A national reconnaissance. *Env. Sci. Technol.* 36(6): 1202-1211.
- Kong W D, Zhu Y G, Liang Y C, Zhang J, Smith F A, Yang M. 2007. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa L.*). *Environ. Poll.* 147(1): 187-193.
- Koutinas A, Papapostolou H, Dimitrellou D, Kopsahelis N, Katechaki E, Bekatorou A, Bosnea L. 2009. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology* 100(15): 3734-3739.

- Kress C, Seidler C, Kerp B, Schneider E, Usleber E. 2007. Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples. *Anal. Chim. Acta.* 586(1-2): 275-279.
- Kuhn H, Angehrn P, Havas L. 1986. Autoradiographic evidence for penetration of 3H-ceftriaxone (Rocephin®) into cells of spleen, liver and kidney of mice. *Chemotherapy.* 32(2): 102-112.
- Kumar A, Pal D. 2018. Antibiotic resistance and wastewater: correlation, impact and critical human health challenges. *J. Environ. Chem. Eng.* 6(1): 52-58.
- Kumar K, Gupta S C, Baidoo S K, Chander Y, Rosen C J. 2005a. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J. Environ. Qual.* 34(6): 2082-2085.
- Kumar K, Gupta S C, Chander Y, Singh A K. 2005b. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Adv. Agron.* 87: 1-54.
- Kumarswamy N P, Latha C, Vrinda K M, Sethukekshmi C, Mercy K A. 2018. Detection of antibiotic residues in raw cow milk in Thrissur India. *TPI Journal* 7(8): 452-454.
- Kümmerer K, Henninger A. 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clin. Microbiol. Infect.* 9(12): 1203-1214.
- Kümmerer K. 2003. Significance of antibiotics in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 52(1): 5-7.
- Kümmerer K. 2009a. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use—present knowledge and future challenges. *J. Environ. Manage.* 90(8): 2354-2366.
- Kümmerer K. 2009b. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I. *Chemosphere* 75(4): 417-434.
- Kümmerer K. 2010. Pharmaceuticals in the environment. *Annu. Rev. Env. Resour.* 35: 57-75.
- Kurasam J, Sihag P, Mandal P K, Sarkar S. 2018. Presence of fluoroquinolone resistance with persistent occurrence of *gyrA* gene mutations in a municipal wastewater treatment plant in India. *Chemosphere.* 211: 817-825.

- Kurjogi M, Mohammad Y. H. I, Alghamdi S, Abdel-Rahman M, Satapute P, Jogaiah S. 2019. Detection and determination of stability of the antibiotic residues in cow's milk. *PLoS One* 14(10): 1-14.
- Kwan C N, Medoff G, Kobayashi G S, Schlessinger D, Raskas H J. 1972. Potentiation of the antifungal effects of antibiotics by amphotericin B. *Antimicrob. Agents Ch.* 2(2): 61-65.
- Lampi M A, Gurska J, McDonald K I, Xie F, Huang X D, Dixon D G, Greenberg B M. 2006. Photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*: Ultraviolet-mediated effects and the toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon photoproducts. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(4): 1079-1087.
- Lane M M, Morrissey J P. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biol. Rev.* 24(1-2): 17-26.
- Lara F J, García-Campaña A M, Alés-Barrero F, Bosque-Sendra J M, García-Ayuso L E. 2006. Multiresidue method for the determination of quinolone antibiotics in bovine raw milk by capillary electrophoresis– tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78(22): 7665-7673.
- Lattuada R M, Menezes C T B, Pavei P T, Peralba M C R, Dos Santos J H Z. 2009. Determination of metals by total reflection X-ray fluorescence and evaluation of toxicity of a river impacted by coal mining in the south of Brazil. *J. Hazard. Mater.* 163(2-3): 531-537.
- Lavari L, Páez R, Cuatrin A, Reinheimer J, Vinderola G. 2014. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. *J. Dairy Res.* 81(3): 267-274.
- Le H T, Maguire R O, Xia K. 2018. Method of dairy manure application and time before rainfall affect antibiotics in surface runoff. *J. Environ. Qual.* 47(6): 1310-1317.
- Le T X, Muneke Y. 2004. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam. *Mar. Pollut. Bull.* 49(11-12): 922-929.
- Leung E, Weil D E, Raviglione M, Nakatani H. 2011. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. *Bull. World Health Organ.* 89: 390-392.

Leung H W, Minh T B, Murphy M B, Lam J C, So M K, Martin M, Lam K S, Richardson B J. 2012. Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. *Environ. Int.* 42: 1-9.

Leyva C. 2010. Caracterización química de harinas de frutos y hojas del árbol del pan (*Artocarpus altilis*) y su empleo en la alimentación de pollos, conejos y ovinos de ceiba (Doctoral dissertation, Tesis Dr. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba).

Lhermie G, Dupouy V, El Garch F, Ravinet N, Toutain P L, Bousquet-Mélou A, Assié S. 2017. Impact of low and high doses of marbofloxacin on the selection of resistant Enterobacteriaceae in the commensal gut flora of young cattle: discussion of data from 2 study populations. *Foodborne Pathog. Dis.* 14(3): 152-159.

Li B, Zhang T, Xu Z, Fang H H P. 2009. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 645(1-2): 64-72.

Li H, Sheng G, Chiou C T, Xu O. 2005. Relation of organic contaminant equilibrium sorption and kinetic uptake in plants. *Environ. Sci. Technol.* 39(13): 4864-4870.

Li J, Cheng W, Xu L, Jiao Y, Baig S A, Chen H. 2016. Occurrence and removal of antibiotics and the corresponding resistance genes in wastewater treatment plants: effluents' influence to downstream water environment. *Environ. Sci. Pollut. R.* 23(7): 6826-6835.

Li S, Shi W, Li H, Xu N, Zhang R, Chen X, Su W, Wen D, He S, Pan J, He Z. 2018. Antibiotics in water and sediments of rivers and coastal area of Zhuhai City Pearl River estuary south China. *Sci. Total Environ.* 636: 1009-1019.

Li W, Shi Y, Gao L, Liu J, Cai Y. 2012. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere.* 89(11): 1307-1315.

Li W, Shi Y, Gao L, Liu J, Cai Y. 2013. Occurrence and removal of antibiotics in a municipal wastewater reclamation plant in Beijing, China. *Chemosphere.* 92(4): 435-444.

- Li Y, Niu J, Wang W. 2011. Photolysis of enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: kinetics mechanism and toxicity of photolysis products. *Chemosphere* 85(5): 892-897.
- Li Y, Niu J, Wang W. 2011. Photolysis of enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products. *Chemosphere*. 85(5): 892-897.
- Liang X, Wang L, Ou R, Nie X, Yang Y, Wang F, Li K. 2015. Effects of norfloxacin on hepatic genes expression of P450 isoforms (CYP1A and CYP3A), GST and P-glycoprotein (P-gp) in swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Ecotoxicology*. 24(7): 1566-1573.
- Lin A Y C, Yu T H, Lateef S K. 2009. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *J. Hazard. Mater.* 167(1-3): 1163-1169.
- Lin A Y C, Yu T H, Lin C F. 2008. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere*. 74(1): 131-141.
- Lindberg R H, Wennberg P, Johansson M I, Tysklind M, Andersson B A. 2005. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environ. Sci. Technol.* 39(10): 3421-3429.
- Lindberg R, Jarnheimer P Å, Olsen B, Johansson M, Tysklind M. 2004. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*. 57(10): 1479-1488.
- Litchfield J. 2009. Lactic acid, microbially produced. Mosel O. Schaechter (Ed.). *Enciclopedia de la microbiología*, Academic Press, Oxford.
- Litterio N. 2009. Diuréticos. Rubio M. R, Boggio J. C. *Farmacología veterinaria*. (2° edición). Córdoba Universitaria Católica de Córdoba 337-343.
- Liu D, Lu L, Wang M, Hussain B, Tian S, Luo W, Zhou J, Yang X. 2019. Tetracycline uptake by pak choi grown on contaminated soils and its toxicity in human liver cell line HL-7702. *Environ. Pollut.* 253 : 312-321.

- Liu F, Ying G G, Tao R, Zhao J L, Yang J F, Zhao L F. 2009. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environ. Pollut.* 157(5): 1636-1642.
- Liu H H. 2004. Use of the respiratory fluoroquinolones for the outpatient management of community-acquired pneumonia. *Curr. Ther. Res.* 65(3): 225-238.
- Liu J H, Kitashiba H, Wang J, Ban Y, Moriguchi T. 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotech.* 24(1): 117-126.
- Liu J, Lu G, Wu D, Yan Z. 2014. A multi-biomarker assessment of single and combined effects of norfloxacin and sulfamethoxazole on male goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotox. Environ. Safe.* 102: 12-17.
- Liu J, Lu G, Xie Z, Zhang Z, Li S, Yan Z. 2015. Occurrence, bioaccumulation and risk assessment of lipophilic pharmaceutically active compounds in the downstream rivers of sewage treatment plants. *Sci. Total Environ.* 511: 54-62.
- Liu M, Zhang Y, Yang M, Tian Z, Ren L, Zhang S. 2012. Abundance and distribution of tetracycline resistance genes and mobile elements in an oxytetracycline production wastewater treatment system. *Env. Sci. Technol.* 46(14): 7551-7557.
- Liu X, Lu S, Guo W, Xi B, Wang W. 2018. Antibiotics in the aquatic environments: a review of lakes China. *Sci. Total Environ.* 627: 1195-1208.
- Liu Y, Liao W, Liu C, Chen S. 2006. Optimization of L-(+)-lactic acid production using pelletized filamentous *Rhizopus oryzae* NRRL 395. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 131: 844–853.
- López-Roldán R, de Alda M L, Gros M, Petrovic M, Martín-Alonso J, Barceló D. 2010. Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography–triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography–time of flight-mass spectrometry. *Chemosphere.* 80(11): 1337-1344.
- López-Serna R, Petrović M, Barceló D. 2011. Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters

based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)–tandem mass spectrometry (MS/MS). *Chemosphere*. 85(8): 1390-1399.

Löser C, Haas C, Liu W, Grahl S, Bley T. 2018. Uptake of iron by *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 cultivated in a whey-based medium. *Eng. Life Sci.* 18(7): 459-474.

Luan X, Liu X, Fang C, Chu W, Xu Z. 2020. Ecotoxicological effects of disinfected wastewater effluents: a short review of *in vivo* toxicity bioassays on aquatic organisms. *Environ. Sci-Wat. Res.* 6(9): 2275-2286.

Lucas M F, Mestorino O N, Errecalde J O. 2007. Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. *Anal. Vet.* 27(1): 36-45.

Luha A A, Sarcoe L E, Whittaker P A. 1971. Biosynthesis of yeast mitochondria. Drug effects on the peptide negative yeast *kluyveromyces lactis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44(2): 396-402.

Lukić B, Huguenot D, van Hullebusch E D, Panico A, Esposito G. 2015. Landfarming of PAH contaminated soils combined with composting of organic waste. *Book of Abstract* 15-16.

Luo Y, Xu L, Rysz M, Wang Y, Zhang H, Alvarez P J. 2011. Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China. *Environ. Sci. Technol.* 45(5): 1827-1833.

Lupton S J, Shappell N W, Shelver W L, Hakk H. 2018. Distribution of spiked drugs between milk fat skim milk whey curd and milk protein fractions: Expansion of partitioning models. *J. Agric. Food Chem.* 66(1): 306-314.

Lyu J, Yang L, Zhang L, Ye B., Wang L. 2020. Antibiotics in soil and water in China—a systematic review and source analysis. *Environ. Pollut.* 266(1): 115147.

Machado M D, Soares E V. 2019. Sensitivity of freshwater and marine green algae to three compounds of emerging concern. *J. Appl. Phycol.* 31(1): 399-408.

Macwan S R, Dabhi B K, Parmar S C, Aparnathi K D. 2016. Whey and its utilization. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 5(8): 134-155.

Madikizela L M, Tavengwa N T, Chimuka L. 2017. Status of pharmaceuticals in African water bodies: occurrence, removal and analytical methods. *J. Environ. Manage.* 193: 211-220.



Maia A. 2018. Fluoroquinolone antibiotics in the environment: biodegradation studies and presence in several environmental matrices (Doctoral dissertation Universidad Católica Portuguesa).

Mala A A, Dutta J. 2019. Acute and chronic toxicity of fluoroquinolone antibiotics through fresh water cladoceran *Daphnia magna*. Indian J. Ecol. 46(4): 874-879.

Mannazzu I, Angelozzi D, Belviso S, Budroni M, Farris G A, Goffrini P, Lodi T, Marzona M, Bardi L. 2008. Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. Int. J. Food Microbiol. 121(1): 84-91.

Mannetje A T, Dryson E, Walls C, McLean D, McKenzie F, Maule M, Cheng C, Cunningham C, Kromhout H, Boffeta P, Blair A, Pearce N. 2008. High risk occupations for non-Hodgkin's lymphoma in New Zealand: case-control study. J. Occup. Environ. Med. 65(5): 354-363.

Maragkaki A E, Vasileiadis I, Fountoulakis M, Kyriakou A, Lasaridi K, Manios T. 2018. Improving biogas production from anaerobic co-digestion of sewage sludge with a thermal dried mixture of food waste cheese whey and olive mill wastewater. Waste Manag. Res. 71: 644-651.

Marín M, Gudiol F. 2003. Antibióticos betalactámicos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 21(1): 42-55.

Marjan S, Kanta Das K, Kishore Munshi S, Noor R. 2014. Drug-resistant bacterial pathogens in milk and some milk products. Food Sci. Nutr. 44(3): 241-248.

Marques A M, da Cruz C, Paiva M J T R, Da Silva A F, Garlich N, Carraschi S P, Florencio T. 2015. Ecotoxicology of drugs used in fish disease treatment. J. Environ. Chem. Ecotoxicol. 7(3): 31-36.

Martinez J L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environ. Pollut. 157(11): 2893-2902.

Martinez M, McDermott P, Walker R. 2006. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. Vet. J. 172(1): 10-28.

- Martínez-Carballo E, González-Barreiro C, Scharf S, Gans O. 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environ. Pollut.* 148(2): 570-579.
- Martins A F, Vasconcelos T G, Henriques D M, Frank C D S, König A, Kümmerer K. 2008. Concentration of ciprofloxacin in Brazilian hospital effluent and preliminary risk assessment: a case study. *Clean.* 36(3): 264-269.
- Martins N, Pereira R, Abrantes N, Pereira J, Gonçalves F, Marques C R. 2012. Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. *Ecotoxicology* 21(4): 1167-1176.
- Martins N, Pereira R, Abrantes N, Pereira J, Gonçalves F, Marques C R. 2012. Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4): 1167-1176.
- Mathew A G, Cissell R, Liamthong S. 2007. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog. Dis.* 4(2): 115-133.
- Matsumoto M, Kojima K, Nagano H A, Matsubara S, Yokota T. 1992. Photostability and biological activity of fluoroquinolones substituted at the 8 position after UV irradiation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36(8): 1715-1719.
- Máttar S, Calderón A, Sotelo D, Sierra M, Tordecilla G. 2009. Detección de antibióticos en leches: un problema de salud pública. *Rev. Salud Pub.* 11: 579-590.
- Mawson AJ. 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresour. Technol.* 47(3): 195-203.
- McCormick P V, Cairns J. 1997. Algal indicators of aquatic ecosystem condition and change. *Plants Environ. Stud.* 177-208.
- McCracken D I, Foster G N. 1993. The effect of ivermectin on the invertebrate fauna associated with cow dung. *Environ. Toxicol. Chem.* 12(1): 73-84.
- McLoughlin N, Yin D, Maltby L, Wood R M, Yu H. 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environ. Toxicol.*

Chem. 19(8): 2085-2092.

McManus M C. 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. American Am. J. Health-Syst. Pharm. 54(12): 1420-1433.

Mehta R J, Nash C H. 1978.  $\beta$ -Lactamase activity in yeast. J. Antibiot. 31(3): 239-240.

Mejía-Barajas J A, Montoya-Pérez R, Cortés-Rojo C, Saavedra-Molina A. 2016. Levaduras termotolerantes: aplicaciones industriales, estrés oxidativo y respuesta antioxidante. Inf. Tecnol. 27(4): 03-16.

Mella S, Zemelman C, Bello H, Gonzalez G, Zemelman R. 2001. Propiedades microbiológicas clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. Rev. Chil. Infectol 18(1): 7-19.

Midya S, Ganguly R. K, Islam S S, Chakraborty S K. 2019. Attachment and antimicrobial susceptibility of bacterial associates of zooplanktonic copepod: Lesson for environmental safety. Ecotox. Environ. Safe. 180: 749-755.

Miege C, Choubert J M, Ribeiro L, Eusèbe M, Coquery M. 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants—conception of a database and first results. Environ. Pollut. 157(5): 1721-1726.

Migliore L, Brambilla G, Cozzolino S, Gaudio L. 1995. Effect on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (*Panicum miliaceum* *Pisum sativum* and *Zea mays*). Agr. Ecosyst. Environ. 52(2-3): 103-110.

Migliore L, Civitareale C, Cozzolino S, Casoria P, Brambilla G, Gaudio L. 1998. Laboratory models to evaluate phytotoxicity of sulphadimethoxine on terrestrial plants. Chemosphere 37(14-15): 2957-2961.

Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. 2003. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. Chemosphere. 52(7): 1233-1244.

Minh T B, Leung H W, Loi I H, Chan W H, So M K, Mao J Q, Richardson B J. 2009. Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: ubiquitous distribution and fate in Victoria Harbour. Mar. Pollut. Bull. 58(7): 1052-1062.

Ministerio de Agroindustria de la Nación (MinAgri) & Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca (MAGyP). 2013. Resolución Conjunta N° 739 y N° 495.

Ministerio de Agroindustria de la Nación (MinAgri). 2016. Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca. Dirección Nacional de Lácteos. Informe final preliminar.

Ministerio de Agroindustria de la Nación (MinAgri). 2018. Secretaría de Agroindustria. Dirección Nacional de Lácteos. Recopilación técnica para el Programa Argentino de Calidad de Leche.

Mirzaei R, Yunesian M, Nasser S, Gholami M, Jalilzadeh E, Shoeibi S, Mesdaghinia A. 2018. Occurrence and fate of most prescribed antibiotics in different water environments of Tehran, Iran. *Sci. Total Environ.* 619: 446-459.

Mitani K, Kataoka H. 2006. Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 562(1): 16-22.

Morrissey J P, Etschmann M M, Schrader J, de Billerbeck G M. 2015. Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. *Yeast* 32(1): 3-16.

Motwani D N, Mehta P. 2018. Effect of veterinary antibiotics on the seed germination of indica rice varieties. *Ann. Plant Sci.* 7: 2321-2327.

Munk P, Knudsen B E, Lukjancenko O, Duarte A S R, Van Gompel L, Luiken R E, Van Gompel L, Smit L A M, Schmitt H, Dorado Garcia A, Hansen B R, Petersen T N. 2018. Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nat. Microbiol.* 3(8): 898-908.

Muñi A, Paez G, Faría J, Ferrer J, Ramones E. 2005. Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Rev. Cientif.* 15(4): 361–367.

Myers R H, Montgomery D C. 1995. *Response Surface Methodology.* Wiley Inter-Science.

Nagel O G, Molina M P, Althaus R L. 2011. Optimization of bioassay for tetracycline detection in milk by means of chemometric techniques. *Lett. Appl. Microbiol.* 52(3): 245-252.

- Nagel O, Molina M P, Althaus R. 2013. Microbiological system in microtitre plates for detection and classification of antibiotic residues in milk. *Int. Dairy J.* 32(2): 150-155.
- Nagel O, Zapata M, Basílico J, Gapel C, Molina P, Althaus R. 2009. Estudio del sinergismo en sulfamidas en leche y trimetoprim en un bioensayo que utiliza *Geobacillus Stearothermophilus*. *FAVE Cs. Vet.* 8(1): 67-79.
- Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann N B, Filser J, Miao A J, Quigg A, Santschi P H, Sigg L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae plants and fungi. *Ecotoxicology* 17(5): 372-386.
- NaVrátiloVá P. 2008. Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk—a review. *Czech J. L, Food Sci.* 26(6): 393-401.
- Neifar M, Jaouani A, Ayari A, Abid O, Salem H B, Boudabous A, Najjar T, Ghorbel R E. 2013. Improving the nutritive value of olive cake by solid state cultivation of the medicinal mushroom *Fomes fomentarius*. *Chemosphere* 91(1): 110-114.
- Nie X, Wang X, Chen J, Zitko V, An T. 2008. Response of the freshwater alga *Chlorella vulgaris* to trichloroisocyanuric acid and ciprofloxacin. *Environ. Toxicol. Chem.* 27(1): 168-173.
- Nosetti L, Herrero M A, Pol M, Maldonado May V, Iramain M S, Flores M. 2002. Cuantificación y caracterización de agua y efluentes en establecimientos lecheros. Demanda de agua y manejo de efluentes. *InVet.* 4(1): 37-43.
- Novaes S F D, Schreiner L L, Franco R M. 2017. Residues of veterinary drugs in milk in Brazil. *CR.* 47(8): 1-7.
- Nunes B, Leal C, Rodrigues S, Antunes S C. 2018. Assessment of ecotoxicological effects of ciprofloxacin in *Daphnia magna*: life-history traits, biochemical and genotoxic effects. *Water Sci. Technol.* 2017(3) : 835-844.
- Observatorio de la Cadena Láctea Argentina (OCLA). 2016. Lechería Argentina. Producción y Destino. Informe Final Preliminar.
- Olaitan O J, Anyakora C, Bamiro T, Tella A T. 2014. Determination of pharmaceutical compounds in surface and underground water by solid phase

extraction-liquid chromatography. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 6(3): 20-26.

Oliver J P, Gooch C A, Lansing S, Schueler J, Hurst J J, Sassoubre L, Crossette E M, Aga D S. 2020. Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. *Int. J. Dairy Sci.* 103(2): 1051-1071.

Olkova A. 2021. Control of Suitability of the Culture *Daphnia magna* Straus for Bioassays of Aquatic Environments, Taking into Account Demographic Indicators of Model Populations. *Water.* 13(1): 47-55.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2004 Test Guideline 452. Chronic Toxicity Studies 202.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2012. Guidelines for Testing of Chemicals 211.

Oriel J D, Waterworth P M. 1975. Effects of minocycline and tetracycline on the vaginal yeast flora. *J. Clin. Pathol.* 28(5): 403-406.

Overview of evidence of antimicrobial use and antimicrobial resistance in the food chain. *Antibiotics* 9(2): 49-67.

Ozdek S C, Miller D, Flynn P M, Flynn Jr H W. 2006. *In vitro* antifungal activity of the fourth generation fluoroquinolones against *Candida* isolates from human ocular infections. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 14(6): 347-351.

Packham W, Broome M C, Limsowtin G K Y, Roginski H. 2001. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Aust. J. Dairy Technol.* 56(1): 15.-18.

Padín González C, Díaz Fernández M. 2006. Efecto de la concentración inicial del lactosuero sobre la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces fragilis*. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 26(1): 35-41.

Páez G, Jiménez E, Mármol Z, Ferrer J, Sulbarán B, Ojeda G, Araujo K, Rincón M. 2008. Perfil de aminoácidos de la proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus var marxianus*. *Interciencia.* 33: 297-300.

Pan C, Bao Y, Xu B. 2020. Seasonal variation of antibiotics in surface water of Pudong New Area of Shanghai, China and the occurrence in typical wastewater sources. *Chemosphere.* 239: 124816.

- Pan M, Chu L M. 2016. Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. *Ecotox. Environ. Safe.* 126: 228-237.
- Papapostolou H, Servetas Y, Bosnea L A, Kanellaki M, Koutinas A A. 2012. Novel technology development through thermal drying of encapsulated *Kluyveromyces marxianus* in micro-and nano-tubular cellulose in lactose fermentation and its evaluation for food production. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 168(8): 2148-2159.
- Parente C E T, Sierra J, Martí E. 2018. Ecotoxicity and biodegradability of oxytetracycline and ciprofloxacin on terrestrial and aquatic media. *Orbital: Electron. J. Chem.* 10(4): 262-271.
- Park S, Choi K. 2008. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology.* 17(6): 526-538.
- Parrondo J, Garcia L A, Diaz M. 2000. Production of an alcoholic beverage by fermentation of whey permeate with *Kluyveromyces fragilis* I: primary metabolism. *J. Inst. Brew.* 106(6): 367-375.
- Parween T, Bhandari P, Sharma R, Jan S, Siddiqui Z. H, Patanjali P K. 2018. Bioremediation: a sustainable tool to prevent pesticide pollution. In *Modern Age Environmental Problems and their Remediation* (pp. 215-227). Springer.
- Paul T, Dodd M C, Strathmann T J. 2010. Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin: transformation products and residual antibacterial activity. *Water Res.* 44(10): 3121-3132.
- Paul T, Miller P L, Strathmann T J. 2007. Visible-light-mediated TiO<sub>2</sub> photocatalysis of fluoroquinolone antibacterial agents. *Environ. Sci. Technol.* 41(13): 4720-4727.
- Pedersen J A, Yeager M A, Suffet I H. 2003. Xenobiotic organic compounds in runoff from fields irrigated with treated wastewater. *J. Agric. Food Chem.* 51(5): 1360-1372.
- Pena A, Chmielova D, Lino C M, Solich P. 2007. Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column. *J. Sep. Sci.* 30(17): 2924-2928.

- Peng X, Wang Z, Kuang W, Tan J, Li K. 2006. A preliminary study on the occurrence and behavior of sulfonamides, ofloxacin and chloramphenicol antimicrobials in wastewaters of two sewage treatment plants in Guangzhou, China. *Sci. Total Environ.* 371(1-3): 314-322.
- Peterson E M, Shaw K R, Smith P N. 2019. Toxicity of agrochemicals among larval painted lady butterflies (*Vanessa cardui*). *Environ. Toxicol. Chem.* 38(12): 2629-2636.
- Petrik M, Kppeli O, Fiechter A. 1983. An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short-and long-term regulation. *Microbiology.* 129(1): 43-49.
- Picó Y, Andreu V. 2007. Fluoroquinolones in soil—risks and challenges. *Analytical BioAnal. Chem.* 387(4): 1287-1299.
- Piddock L J. 2016. Reflecting on the final report of the O'Neill Review on Antimicrobial Resistance. *Lancet Infect. Dis.* 16(7): 767-768.
- Pikkemaat M, Rapallini M, Ostra-van Dijk S, Elferinka J. 2009. Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples. *Anal. Chim. Acta.* 637: 298-304.
- Pilatti M A, Ghiberto P J, Felli O M, Badino O. 2017. Suelos de baja capacidad productiva en Santa Fe: mejora con residuos líquidos de la industria alimentaria. *FAVE Cs. Agrar.* 16(1): 99.
- Piotrowicz-Cieślak A I, Michalczyk D J, Adomas B, Górecki R J. 2007. Different effects of soil drought on soluble carbohydrates of developing *Lupinus pilosus* and *Lupinus luteus* embryos. *Acta Soc. Bot. Pol.* 76(2): 119-125.
- Piotrowicz-Cieślak A I. 2005. Composition of seed soluble carbohydrates and ultrastructural diversity of testa in lupins from the mediterranean region. *Acta Soc. Bot. Pol.* 74(4): 281-286.
- Pope L, Boxall A, Corsing C, Halling-Sørensen B, Tait A, Topp E, Crane M. 2009. Exposure assessment of veterinary medicines in terrestrial systems. *Vet. Med. Environ.* 129-153.



- Postma E, Verduyn C, Scheffers W A, Van Dijken J P. 1989. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environ. Microbiol.* 55(2): 468-477.
- Pruden E L. 1995. *Clinical guide to laboratory tests* (Vol. 624). N. W. Tietz, & P. R. Finley (Eds.). Philadelphia: WB Saunders company.
- Qiao M, Ying G G, Singer A C, Zhu Y G. 2018. Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environ. Int.* 110: 160-172.
- Quintanilla P, Beltrán M C, Molina A, Escriche I, Molina M P. 2019a. Characteristics of ripened Tronchón cheese from raw goat milk containing rely admissible amounts of antibiotics. *J. Dairy Sci.* 102: 2941-2953.
- Quintanilla P, Beltrán M C, Peris B, Rodríguez M, Molina M P. 2018. Antibiotic residues in milk and cheeses after the off-label use of macrolides in dairy goats. *Small Ruminant Res.* 167: 55-60.
- Quintanilla P, Domenech E, Escriche I, Beltrán M C, Molina M P. 2019b. Food safety margin assessment of antibiotics: pasteurized goat's milk and fresh cheese. *J. Food Prot.* 82(9): 1553-1559.
- Quintero H, Marval M R, Páez G, Ferrer J, Mármol Z, Rincón M. 2001. Producción continua de proteína microbiana (*K. fragilis*) a partir de suero de leche. *FAVE Cs. Vet.* 11(2): 87-95.
- Ramírez A, Gutiérrez R, González C, Escobar I, Castro G, Díaz G, Noa M. 2001. Detección de antibióticos en leche comercializada en la ciudad de México. *Rev. Salud Anim.* 23(1): 37-41.
- Ramírez-Navas J S. 2013. Uso de la fermentación para el aprovechamiento del lactosuero. *Tecnol. Lact. Latin:* 77: 52-61.
- Rand G M, Wells P G, McCarty L S. 1995. Introduction to aquatic toxicology. In" *Fundamentals of Aquatic Toxicology*" Rand GM ed. Washington EEUU.
- Rao R N, Venkateswarlu N, Narsimha R. 2008. Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1187(1-2): 151-164.
- Ray P, Chen C, Knowlton K F, Pruden A, Xia K. 2017. Fate and effect of

antibiotics in beef and dairy manure during static and turned composting. J. Environ. Qual. 46(1): 45-54.

Regaldo L, Gagneten A M, Troiani H. 2009. Accumulation of chromium and interaction with other elements in *Chlorella vulgaris* (Cloroficeae) and *Daphnia magna* (Crustacea Cladocera). J. Environ. Biol. 30(2): 213-216.

Regaldo, L., Gagneten, A.M., & Troiani, H. (2014b). Comparative study of the effects of Cu, Cr, Pb on *Daphnia magna* and two cladocerans representatives of the Argentinean Fluvial Littoral (AFL). Journal Environmental Biology, 35(4): 689-697.

Regaldo, L., Reno, U, Gervasio, S., Troiani, H., & Gagneten, A. M. (2014a). Effect of metals on *Daphnia magna* and cladocerans representatives of the Argentinean Fluvial Littoral. Journal of Environmental Biology, 35(4): 689-697.

Reno U, Doyle S. R, Momo F R, Regaldo L, Gagneten A M. 2018. Effects of glyphosate formulations on the population dynamics of two freshwater cladoceran species. Ecotoxicology 27(7): 784-793.

Reno U, Gutierrez M F, Longo M, Vidal E, Regaldo L, Negro A, Mariani M, Zalazar C, Gagneten A M. 2015. Microcrustaceans: biological models to evaluate a remediation process of glyphosate-based formulations. Water Air Soil Pollut.226: 349-359.

Reno U, Gutierrez M F, Regaldo L, Gagneten A M. 2014. The impact of Eskoba® a glyphosate formulation on the freshwater plankton community. Water Environ. Res. 86(12): 2294-2300.

Reno U, Regaldo L, Vidal E, Mariani M, Zalazar C, Gagneten A M. 2016. Water polluted with glyphosate formulations: effectiveness of a decontamination process using *Chlorella vulgaris* growing as bioindicator. J. Appl. Phycol. 28(4): 2279-2286.

Reverté S, Borrull F, Pocurull E, Marcé R M. 2003. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–(electrospray) mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1010(2): 225-232. .

Riaz L, Mahmood T, Khalid A, Rashid A, Siddique M B A, Kamal A, Coyne M S.

2018. Fluoroquinolones (FQs) in the environment: a review on their abundance sorption and toxicity in soil. *Chemosphere* 191: 704-720.

Ribeiro D M, Zanetti G T, Julião M H M, Masetto T E, Gelinski J M L N, Fonseca G G. 2019. Effect of different culture media on growth of *Chlorella sorokiniana* and the influence of microalgal effluents on the germination of lettuce seeds. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 7(1): 6-10.

Richards S M, Wilson C J, Johnson D J, Castle D M, Lam M, Mabury S A, Sibley P M, Solomon K R. 2004. Effects of pharmaceutical mixtures in aquatic microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(4): 1035-1042.

Rico A, Dimitrov M R, Van Wijngaarden R P, Satapornvanit K, Smidt H, Van den Brink P J. 2014. Effects of the antibiotic enrofloxacin on the ecology of tropical eutrophic freshwater microcosms. *Aqua. Toxicol.* 147: 92-104.

Rivas J, Prazeres A R, Carvalho F, Beltrán F. 2010. Treatment of cheese whey wastewater: combined coagulation-flocculation and aerobic biodegradation. *J. Agric. Food Chem.* 58(13): 7871-7877.

Roberts M C, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen L B, Rood J, Seppala H. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Ch.* 43(12): 2823-2830.

Robinson A A, Belden J B, Lydy M J. 2005. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(2): 423-430.

Robinson A A, Belden J B, Lydy M J. 2005. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(2): 423-430.

Roca M, Castillo M, Marti P, Althaus R L, Molina M P. 2010. Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *J. Agric. Food Chem.* 58(9): 5427-5431.

Roca M, Villegas L, Kortabitarte M L, Althaus R L, Molina M P. 2011. Effect of heat treatments on stability of  $\beta$ -lactams in milk. *Int. J. Dairy Sci.* 94(3): 1155-1164.

Roca M. 2008. Termoestabilidad de sustancias antimicrobianas en la leche (Doctoral dissertation Universitat Politècnica de València).

Rodrigues-Silva C, Maniero M G, Peres M S, Guimaraes J R. 2014. Occurrence and degradation of quinolones by advanced oxidation processes. *Quím. Nova.*

37: 868-885.

Rodríguez-Mozaz S, Chamorro S, Martí E, Huerta B, Gros M, Sánchez-Melsió A, Borrego C M, Barceló D, Balcázar J L. 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Res.* 69: 234-242.

Rojas A M, Montaña L P, Bastidas M J. 2015. Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Rev. Colombiana Quím.* 44(3): 5-10.

Rosal R, Rodríguez A, Perdigón-Melón J A, Petre A, García-Calvo E, Gómez M J, Agüera A, Fernández-Alba A R. 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* 44(2): 578-588.

Sabourin E P, Patrouilleau M M, Le Coq J F, Vásquez L, Niederle P A. 2017. Políticas públicas a favor de la agroecología en América Latina y el Caribe. *Red Políticas Públicas en América Latina y el Caribe (Red PP-LA)*.

Sachi S, Ferdous J, Sikder M H, Hussani S A K. 2019. Antibiotic residues in milk: past present and future. *J. Adv. Vet* 6(3): 315-332.

Sádaba B, Azanza J R. 2005. Antibióticos macrólidos y otros antibióticos. En: Leza Cerro J C, Lizasoain Hernández I, Lorenzo Fernández P, Moreno González A, Moro Sánchez M A. (eds): Velásquez. *Farmacología básica y clínica (20° edición)* Buenos Aires: Panamericana (pp. 825-839)

Saddoud A, Hassaïri I, Sayadi S. 2007. Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresour. Technol.* 98 (11): 2102-2108.

Saini P, Beniwal A, Kokkiligadda A, Vij S. 2017. Evolutionary adaptation of *Kluyveromyces marxianus* strain for efficient conversion of whey lactose to bioethanol. *Process Biochem.* 62: 69-79.

Salisbury J G, Nicholls T J, Lammerding A M, Turnidge J, Nunn M J. 2002. A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic resistance in food-producing animals. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 20(3): 153-164.

Sandoval A, Enciso E, Dinatale F, Acosta P. 2017. B-lactam antibiotics residues

determination in raw milk marketed in four cities of central departmente Republic of Paraguay. *Compend.Cienc. Vet.* 7(1): 21-24.

Santorum P, García R, Fernández B. 2007. Characterization os small-to middle-scale dairies´manure. Storing and land farming models in Cantabria (Northern Spain). En: XI International Waste Manag. Res. and Landfill Symposium Sardinia Italia (pp. 1-5).

Sanyal A K, Chowdhury B, Banerjee A B. (1992). Generation of high antimycotic activity during degradation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* 14(5): 221-223.

Sarakinos H C, Bermingham N, White P A, Rasmussen J B. 2000. Correspondence between whole effluent toxicity and the presence of priority substances in complex industrial effluents. *Environ. Toxicol. Chem.* 19(1): 63-71.

Sarmah A K, Meyer M T, Boxall A B. 2006. A global perspective on the use sales exposure pathways occurrence fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere.* 65(5): 725-759.

Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala J A, Charlier P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32(2): 234-258.

Sawant A A, Sordillo L M, Jayarao B M. 2005. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *Int. J. Dairy Sci.* 88(8): 2991-2999.

Schröder P, Collins C. 2002. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *Int. J. Phytoremediation.* 4(4): 247-265.

Schulz J, Kemper N, Hartung J, Janusch F, Mohring S A, Hamscher G. 2019. Analysis of fluoroquinolones in dusts from intensive livestock farming and the co-occurrence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 9(1): 1-7.

Schwartz S N, Medoff G, Kobayashi G S, Kwan C N, Schlessinger D. 1972. Antifungal properties of polymyxin B and its potentiation of tetracycline as an antifungal agent. *Antimicrob. Agents Ch.* 2(1): 36-40.

Schwarz S, Chaslus-Dancla E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* 32(3-4): 201-225.

- Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh T R. 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 17(6): 431-437.
- Segura P A, García-Ac A, Lajeunesse A, Ghosh D, Gagnon C, Sauvé S. 2007. Determination of six anti-infectives in wastewater using tandem solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Environ. Monit. Assess.* 9(4): 307-313.
- Seifrtová M, Pena A, Lino C M, Solich P. 2008. Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 391(3): 799-805.
- Seluy L G. 2015. Procesos de tratamiento y valorización de efluentes líquidos de la industria cervecera (Doctoral dissertation, thesis).
- Senta I, Terzić S, Ahel M. 2008. Simultaneous determination of sulfonamides, fluoroquinolones, macrolides and trimethoprim in wastewater and river water by LC-tandem-MS. *Chromatographia*, 68(9): 747-758.
- Senta I, Terzic S, Ahel M. 2013. Occurrence and fate of dissolved and particulate antimicrobials in municipal wastewater treatment. *Water Res.* 47(2): 705-714.
- Serna-Galvis E A, Ferraro F, Silva-Agredo J, Torres-Palma R A. 2017. Degradation of highly consumed fluoroquinolones, penicillins and cephalosporins in distilled water and simulated hospital wastewater by UV<sub>254</sub> and UV<sub>254</sub>/persulfate processes. *Water Res.* 122: 128-138.
- Serrat-Díaz M, Vallejo-Vidal J A, Ageitos-Martínez J M, Llauradó-Mauri G, Urdaneta-Laffita I G, Villa T. 2017. Influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y contenido de pared celular en una cepa floculante de *Kluyveromyces marxianus*. *Revista Cuba. Quim.* 29(1): 89-102.
- Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 2001. Dirección de Agroquímicos y Productos Farmacológicos y veterinarios. Prohibiciones y Restricciones en la utilización de drogas en medicina veterinaria. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/agro/prohibiciones>.

Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 2009. Dirección de Agroquímicos y Productos Farmacológicos y veterinarios. Resolución 63/2009. Disponible en Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar>.

Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 2015. Dirección de Agroquímicos y Productos Farmacológicos y veterinarios. Cap. IX del Dec. 4238/68 - Resolución 290/95 modificada. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar>.

Sguanci S, Lotti T, Caretti C, Caffaz S, Dockhorn T, Lubello C. 2017. Inhibitory effects of veterinary antibiotics on anammox activity: short-and long-term tests. *Environ. Technol.* 38(21): 2661-2667.

Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan A U. 2008. Aminoglycosides versus bacteria—a description of the action resistance mechanism and nosocomial battleground. *J. Biomed. Sci.* 15(1): 5-14.

Shappell N W, Shelver W L, Lupton S J, Fanaselle W, Van Doren J M, Hakk H. 2017. Distribution of animal drugs among curd whey and milk protein fractions in spiked skim milk and whey. *J. Agric. Food Chem.* 65(4): 938-949.

Sharma H D, Reddy K R. 2004. *Geoenvironmental Engineering: Site Remediation Waste Containment and Emerging Waste Manag. Res. Technologies.* John Wiley & Sons Hoboken.

Shi L, Zhou X, Zhang Y, Gu G. 2009. Occurrence and removal of fluoroquinolone antibiotics in a sewage treatment plant in Shanghai, China. In 2009 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (pp. 1-4). IEEE. doi: 10.1109/ICBBE.2009.5163140.

Shi W J, Yue T X, Du Z P, Wang Z, Li X W. 2016. Surface modeling of soil antibiotics. *Sci.Total Environ.* 543: 609-619.

Shitandi A, Sternesjö Å. 2004. Factors contributing to the occurrence of antimicrobial drug residues in Kenyan milk. *J. Food Prot.* 67(2): 399-402.

Siljanoski A, Ciglarič R, Pezdir T, Lainšček P R, Dolenc J, Starič J, Šinigoj-Gačnik K. 2018. Detection of tetracycline and other antimicrobial residues in milk from cows with clinical mastitis treated by combination therapy. *J. Dairy Res.* 85(3): 321-326.

Silva A R R, Cardoso D N, Cruz A, Lourenço J, Mendo S, Soares A M, Loureiro S. 2015. Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. *Ecotox. Environ. Safe.* 115: 279-290.

Silva-Castro G A, Uad I, Rodríguez-Calvo A, González-López J, Calvo C. 2015. Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. *Environ. Res.* 137: 49-58.

Silveira W B, Passos F J V, Mantovani H C, Passos F M L. 2005. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: a flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme and Microb. Tech.* 36(7): 930-936.

Sim W J, Lee J W, Lee E S, Shin S K, Hwang S R, Oh J E. 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere.* 82(2): 179-186.

Sim W J, Lee J W, Oh J E. 2010. Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and rivers in Korea. *Environ. Pollut.* 158(5): 1938-1947.

Singh V, Pandey B, Suthar S. 2018. Phytotoxicity of amoxicillin to the duckweed *Spirodela polyrhiza*: growth oxidative stress biochemical traits and antibiotic degradation. *Chemosphere.* 201: 492-502.

Singh V, Pandey B, Suthar S. 2019. Phytotoxicity and degradation of antibiotic ofloxacin in duckweed (*Spirodela polyrhiza*) system. *Ecotox. Environ. Safe.* 179: 88-95.

Sinistro R. 2010. Top-down and bottom-up regulation of planktonic communities in a warm temperate wetland. *J. Plankton Res.* 32(2): 209-220.

Sirtori C, Zapata A, Malato S, Gernjak W, Fernández-Alba A R, Agüera A. 2009. Solar photocatalytic treatment of quinolones: intermediates and toxicity evaluation. *Photoch. Photobio. Sci.* 8(5): 644-651.

Słomczyńska B, Słomczyński T. 2004. Physico-chemical and toxicological characteristics of leachates from MSW landfills. *Pol. J. Environ. Stud.* 13(6): 627-637.



- Sniegocki T, Gbylik-Sikorska M, Posyniak A. 2015. Transfer of chloramphenicol from milk to commercial dairy products—experimental proof. *Food Control*. 57: 411-418.
- Sobieski R J, Brewer A R. 1976. Toxicity of Nalidixic Acid on *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Kluyveromyces lactis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9(3): 485-492.
- Sodré F F, Locatelli M A F, Jardim W F. 2010. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. *Water Air Soil Pollut.*206(1): 57-67.
- Spadoto M, Sueitt A P E, Galinaro C A, Pinto T D S, Pompei C M E, Botta C M R, Vieira E M. 2018. Ecotoxicological effects of bisphenol A and nonylphenol on the freshwater cladocerans *Ceriodaphnia silvestrii* and *Daphnia similis*. *Drug Chem. Toxicol.* 41(4): 449-458.
- Spongberg A L, Witter J D. 2008. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Sci. Total Environ.* 397(1-3): 148-157.
- Stergiopoulou T, Meletiadis J, Sein T, Papaioannidou P, Tsiouris I, Roilides E, Walsh T J. 2009. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63(2): 343-348.
- Stergiopoulou T, Meletiadis J, Sein T, Papaioannidou P, Walsh T J, Roilides E. 2011. Synergistic interaction of the triple combination of amphotericin B ciprofloxacin and polymorphonuclear neutrophils against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Ch.* 55(12): 5923-5929.
- Strumberg D, Nitiss J L, Rose A, Nicklaus M C, Pommier Y. 1999. Mutation of a conserved serine residue in a quinolone-resistant type II topoisomerase alters the enzyme-DNA and drug interactions. *Int. J. Biol. Chem.* 274(11): 7292-7301.
- Stone Jr C A, Trubiano J, Coleman D T, Rukasin C R, Phillips E J. 2020. The challenge of de-labeling penicillin allergy. *Allergy*, 75(2): 273-288.
- Sturini M, Speltini A, Maraschi F, Profumo A, Pretali L, Irastorza E. A, Fasani E, Albini A. 2012a. Photolytic and photocatalytic degradation of fluoroquinolones in

untreated river water under natural sunlight. *Appl. Catal B-Environ.* 119: 32-39.

Sturini M, Speltini A, Maraschi F, Pretali L, Profumo A, Fasani E, Albin A, Migliavacca R, Nucleo E. 2012b. Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts. *Water Res.* 46(17): 5575-5582.

Sturini M, Speltini A, Maraschi F, Profumo A, Pretali L, Fasani E, Albin A. 2010. Photochemical degradation of marbofloxacin and enrofloxacin in natural waters. *Env. Sci. Technol.* 44(12): 4564-4569.

Sturini M, Speltini A, Pretali L, Fasani E, Profumo A. 2009. Solid-phase extraction and HPLC determination of fluoroquinolones in surface waters. *J. Sep. Sci.* 32(17): 3020-3028.

Suárez C, Gudiol F. 2009. Antibióticos betalactámicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 27(2): 116-129.

Suhren G, Hammer P, Heeschen W. 1994. Inhibitors antibiotics and sulfonamides. *Kiel Dairy Res. Rep.* 46(3): 237-248.

Sun Y, Guo Y, Shi M, Qiu T, Gao M, Tian S, Wang X. 2021. Effect of antibiotic type and vegetable species on antibiotic accumulation in soil-vegetable system, soil microbiota, and resistance genes. *Chemosphere.* 263: 128099. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128099>

Tabanelli G, Verardo V, Pasini F, Cavina P, Lanciotti R, Caboni M F, Gardini F, Montanari C. 2016. Survival of the functional yeast *Kluyveromyces marxianus* B0399 in fermented milk with added sorbic acid. *Int. J. Dairy Sci.* 99(1): 120-129.

Tahrani L, Van Loco J, Ben Mansour H, Reyns T. 2016. Occurrence of antibiotics in pharmaceutical industrial wastewater treatment plant and sea waters in Tunisia. *J. Water Health,* 14(2): 208-213.

Takasu H, Suzuki S, Reungsang A, Viet P H. 2009. Fluoroquinolone (FQ) contamination does not correlate with occurrence of FQ-resistant bacteria in aquatic environments of Vietnam and Thailand. *Microbes Environ.,* 1103080279-1103080279.

Tamtam F, Mercier F, Le Bot B, Eurin J, Dinh Q T, Clément M, Chevreuil M. 2008. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various

- hydrological conditions. *Sci. Total Environ.* 393(1): 84-95.
- Teglia C M, Perez F A, Michlig N, Repetti M R, Goicoechea H C, Culzoni M J. 2019. Occurrence, distribution, and ecological risk of fluoroquinolones in rivers and wastewaters. *Environ. Toxicol. Chem.* 38(10): 2305-2313.
- Teijon G, Candela L, Tamoh K, Molina-Díaz A, Fernández-Alba A R. 2010. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Sci. Total Environ.* 408(17): 3584-3595.
- Tenover F C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.* 119(6): 3-10.
- Ter Schure E G, van Riel N A, Verrips C T. 2000. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24(1): 67-83.
- Ternes T A, Meisenheimer M, McDowell D, Sacher F, Brauch H J, Haist-Gulde B, Preuss G, Wilme U, Zulei-Seibert N. 2002. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environ Sci Technol.* 36(17): 3855-3863.
- Terzić S, Senta I, Ahel M, Gros M, Petrović M, Barcelo D, Müller J, Knepper T, Martí I, Ventura F, Jovančić P, Jabučar D. 2008. Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Sci. Total Environ.* 399(1-3): 66-77.
- Tewari S, Jindal R, Kho Y L, Eo S, Choi K. 2013. Major pharmaceutical residues in wastewater treatment plants and receiving waters in Bangkok, Thailand, and associated ecological risks. *Chemosphere.* 91(5): 697-704.
- Thassitou P K, Arvanitoyannis I S. 2001. Bioremediation: a novel approach to food waste management. *Trends Food Sci. Tech.* 12: 185–196.
- Thiele S, Beck I C. 2001. Effects of pharmaceutical antibiotics on soil microflora determination using selected soil biological test methods. *Messages from the German Soil Science Society*, 96: 383-384.
- Thiele S. 2000. Adsorption of the antibiotic pharmaceutical compound sulfapyridine by a long-term differently fertilized loess Chernozem. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163(6): 589-594.

- Thomas D J L, Tyrrel S F, Smith R, Farrow S. 2009. Bioassays for the evaluation of landfill leachate toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health B.* 12(1): 83-105.
- Thomas K V, Dye C, Schlabach M, Langford K H. 2007. Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works. *Environ. Monit.* 9(12): 1410-1418.
- Thomé S, Bizarro C R, Lehmann M, de Abreu B R R, de Andrade H H R, Cunha K S, Dihl R R. 2012. Recombinogenic and mutagenic activities of fluoroquinolones in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 742(1-2): 43-47.
- Thompson J K, Hobson P N. 1971. Polysaccharide synthesis and degradation by rumen microorganisms *in vitro*. *J. Agric. Sci. Camb.* 76: 423-432.
- Tien N T C, Huyen T T B, Hien L P T, Huy N N. 2021. A study on the optimization of photocatalytic removal of enrofloxacin using TiO<sub>2</sub> material. In *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 652(1): 012010. IOP Publishing.
- Tollefson L, Karp B E. 2004. Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Med. Mal. Infec.* 34(11): 514-521.
- Tona G O, Olusola A D. 2014. Determination of tetracycline antibiotic residues in dairy products sold in Ogbomoso, South western Nigeria. *Int. J. Food, Agric. Vet. Sci.* 4 (1): 136-140.
- Tong C, Zhuo X, Guo Y. 2011. Occurrence and risk assessment of four typical fluoroquinolone antibiotics in raw and treated sewage and in receiving waters in Hangzhou, China. *J. Agric. Food Chem.* 59(13): 7303-7309.
- Topp E, Chapman R, Devers-Lamrani M, Hartmann A, Marti R, Martin-Laurent F, Sabourin L, Scott A, Sumarah M. 2013. Accelerated biodegradation of veterinary antibiotics in agricultural soil following long-term exposure and isolation of a sulfamethazine-degrading *Microbacterium sp.* *J. Environ. Qual.* 42(1): 173-178.
- Tran N H, Hoang L, Nghiem L D, Nguyen N M H, Ngo H H, Guo W, Trinh Q T, Mai N H, Chen H, Nguyen D D, Ta T T, Gin K Y H. 2019. Occurrence and risk assessment of multiple classes of antibiotics in urban canals and lakes in Hanoi, Vietnam. *Sci. Total Environ.* 692: 157-174.
- Tuan X L, Munekage Y. 2004. Residues of selected antibiotics in water and mud

from shrimp ponds in mangrove areas in Vietnam. *Mar. Pollut. Bull.* 49: 922–929.

Tumini M, Nagel O G, Althaus R L. 2015. Microbiological bioassay using *Bacillus pumilus* to detect tetracycline in milk. *J. Dairy Res.* 82(2): 248-255.

Tumini M, Nagel O G, Molina Pons M, Althaus R L. 2016. Microbiological method using *Bacillus megaterium* with fusidic acid for detection of macrolides in milk. *Czech J. Food Sci.* 34(1): 9-15.

Tumini M, Nagel O, Molina M P, Althaus R. 2017. Microbiological assay with *Bacillus licheniformis* for the easy detection of quinolones in milk. *Int. Dairy J.* 64: 9-13.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1997. Exposure factors handbook. Office research and Development Washington DC 20460 2-6.

Valcárcel Y, Alonso S G, Rodríguez-Gil J L, Gil A, Catalá M. 2011. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere.* 84(10): 1336-1348.

Valdés M E, Amé M V, de los Angeles Bistoni M, Wunderlin D A. 2014. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Sci. Total Environ.* 472, 389-396.

Van Doorslaer X, Dewulf J, Van Langenhove H, Demeestere K. 2014. Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants. *Sci. Total Environ.* 500: 250-269.

van Driel M L, De Sutter A I, Habraken H, Thorning S, Christiaens T. 2016. Different antibiotic treatments for group A *streptococcal pharyngitis*. *Cochrane Database of Systematic Reviews:* (9): <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004406.pub4>

van Schaik G, Lotem M, Schukken Y H. 2002. Trends in somatic cell counts bacterial counts and antibiotic residue violations in New York State, during 1999–2000. *Int. J. Dairy Sci.* 85(4): 782-789.

van Urk H, Mark P R, Scheffers W A, Van Dijken J P. 1988. Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess. *Yeast.* 4(4): 283-291.

- van Urk H, Postma E, Scheffers W A, Van Dijken J P. 1989. Glucose transport in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts. *Microbiology*. 135(9): 2399-2406.
- van Urk H, Voll W L, Scheffers W A, Van Dijken J P. 1990. Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1): 281-287.
- Varnero M T, Rojas C, Orellana R, Sotomayor E. 2005. Fitotoxicidad de extractos de residuos orgánicos y su efecto sobre el índice de germinación de rabanito y pepino. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 5(2): 61-66.
- Vazquez-Roig P, Andreu V, Blasco C, Picó Y. 2012. Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments, soils and waters of the Pego–Oliva Marshlands (Valencia, eastern Spain). *Sci. Total Environ.* 440: 24-32.
- Verlicchi P, Al Aukidy M, Galletti A, Petrovic M, Barceló D. 2012b. Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 430: 109-118.
- Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E. 2012a. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—a review. *Sci. Total Environ.* 429: 123-155.
- VICH (2004). Veterinary International Conference on Harmonization guidelines VICH (International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products). Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products Phase II Guidance. VICH-GL38. VICH, Brussels, Belgium, 38 pp. <http://vich.eudra.org>.
- Vidal G, Carvalho A, Mendez R, Lema J. 2000. Influence of content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresour. Technol.* 74(3): 231-239.
- Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73(7): 1163-1172.
- Vieno N M, Tuhkanen T, Kronberg L. 2006. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A.* 1134(1-2): 101-111.

- Vieno N, Tuhkanen T, Kronberg L. 2007. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Res.* 41(5): 1001-1012.
- Vilca F Z, Angeles W G, Palma E T, Quiroz C N C, Flores T D, Cuba W A Z. 2018. Antibiotics and their environmental implications. *Rev. Investig. Altoandin.* 20(2): 215-224.
- von Schiller D, Acuña V, Aristi I, Arroita M, Basaguren A, Bellin A, Boyero L, Butturini A, Ginebreda A, Kalogianni E, Larrañaga A, Majone B, Matínez A, Monroy S, Muñoz I, Paunovic M, Pereda O, Petrovic M, Elosegi A. 2017. River ecosystem processes: A synthesis of approaches criteria of use and sensitivity to environmental stressors. *Sci.Total Environ.* 596–597(April): 465-480.
- Vulliet E, Cren-Olivé C. 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environ. Pollut.* 159(10): 2929-2934.
- Wagner N D, Simpson A J, Simpson M J. 2017. Metabolomic responses to sublethal contaminant exposure in neonate and adult *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 36(4): 938-946.
- Walker G M, White N A. 2005. Chapter 1, Introduction to fungal physiology, en *Fungi: Biology and Applications*. John Wiley & Sons Ltd, England. 1-34.
- Walraven N, Laane R W P M. 2008. Assessing the discharge of pharmaceuticals along the Dutch coast of the North Sea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 199: 1-18.
- Wang H, Che B, Duan A, Mao J, Dahlgren R A, Zhang M, Zhang H, Zeng A, Wang X. 2014. Toxicity evaluation of  $\beta$ -diketone antibiotics on the development of embryo-larval zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 29(10): 1134-1146.
- Wang J, Leung D. 2007. Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs raw milk and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21(19): 3213-3222.

- Wang S, Gao X, Gao Y, Li Y, Cao M, Xi Z, Zhao L, Feng Z. 2017. Tetracycline resistance genes identified from distinct soil environments in China by functional metagenomics. *Front. Microbiol.* 8:1406-1415.
- Wang S, Wang H. 2015. Adsorption behavior of antibiotic in soil environment: a critical review. *Front. Env. Sci. Eng.* 9(4): 565-574.
- Wang W, Li Z, Gan L, Fan H, Guo Y. 2018. Dietary supplemental *Kluyveromyces marxianus* alters the serum metabolite profile in broiler chickens. *Food Funct.* 9(7): 3776-3787.
- Wang W, Li Z, Lv Z, Zhang B, Lv H, Guo Y. 2017. Effects of *Kluyveromyces marxianus* supplementation on immune responses intestinal structure and microbiota in broiler chickens. *PloS one*, 12(7): e0180884.
- Waseem H, Williams M R, Stedtfeld R D, Hashham S A. 2017. Antimicrobial resistance in the environment. *Water Environ. Res.* 89(10): 921-941.
- Watkinson A J, Murby E J, Costanzo S D. 2007. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Res.* 41(18): 4164-4176.
- Watkinson A J, Murby E J, Kolpin D W, Costanzo S D. 2009. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Sci. Total Environ.* 407(8): 2711-2723.
- Wei R, Ge F, Chen M, Wang R. 2012. Occurrence of ciprofloxacin, enrofloxacin, and florfenicol in animal wastewater and water resources. *J. Environ. Qual.* 41(5): 1481-1486.
- Wei R, Ge F, Huang S, Chen M, Wang R. 2011. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere.* 82(10): 1408-1414.
- Wellington E M, Boxall A B, Cross P, Feil E J, Gaze W H, Hawkey P M, Johnson-Rollings A S, Jones D L, Lee N M, Otten W, Thomas C M. 2013. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 13(2): 155-165.
- Williams M R, Stedtfeld R D, Guo X, Hashham S A. 2016. Antimicrobial resistance in the environment. *Water Environ. Res.* 88(10): 1951-1967.



- Wolfe D, Schorr M, Hanson M, Nelson C H, Richards S M. 2015. Hazard assessment for a pharmaceutical mixture detected in the upper Tennessee River using *Daphnia magna*. Global J. Environ. Sci. Manag. 1(1): 1-14.
- Wolfe D, Schorr M, Hanson M, Nelson C H, Richards S M. 2015. Hazard assessment for a pharmaceutical mixture detected in the upper Tennessee River using *Daphnia magna*. Glob. J. Environ. Sci. Manag. 1(1): 1-14.
- Wollenberger L, Halling-Sørensen B, Kusk K O. 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. Chemosphere. 40(7): 723-730.
- World Health Organization. 2011. Evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organ. Tech. Rep. Ser (966): 1-136.
- Xiao J, VanBriesen J M. 2006. Expanded thermodynamic model for microbial true yield prediction. Biotechnol. Bioeng. 93(1): 110-121.
- Xiao Y, Chang H, Jia A, Hu J. 2008. Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1214(1-2): 100-108.
- Xiong J Q, Zhao C Y, Qin J Y, Cui P, Zhong Q L, Ru S. 2021. Metabolic perturbations of *Lolium perenne* L. by enrofloxacin: Bioaccumulation and multistage defense system. J. Hazard. Mater., 127893 (in press)
- Xu W H, Zhang G, Zou S C, Li X D, Liu Y C. 2007a. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Environ. Pollut. 145(3): 672-679.
- Xu W H, Zhang G, Zou S C, Ling Z H, Wang G L, Yan W. 2009. A preliminary investigation on the occurrence and distribution of antibiotics in the Yellow River and its tributaries, China. Water Environ. Res. 81: 248-254.
- Xu W, Zhang G, Li X, Zou S, Li P, Hu Z, Li J. 2007b. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD): South China. Water Res. 41(19): 4526-4534.
- Yamashita N, Yasojima M, Nakada N, Miyajima K, Komori K, Suzuki Y, Tanaka H. 2006. Effects of antibacterial agents' levofloxacin and clarithromycin on aquatic organisms. Water Sci. Technol. 53(11): 65-72.

- Yan C, Yang Y, Zhou J, Liu M, Nie M, Shi H, Gu L. 2013. Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: occurrence, distribution and risk assessment. *Environ. Pollut.* 175 : 22-29.
- Yang X, Flowers R C, Weinberg H S, Singer P C. 2011. Occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in an advanced wastewater reclamation plant. *Water Res.* 45(16): 5218-5228.
- Yang Y, Song W, Lin H, Wang W, Du L, Xing W. 2018. Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. *Environ. Int.* 116: 60-73.
- Yao L, Wang Y, Tong L, Deng Y, Li Y, Gan Y, Guo W, Dong C, Duan Y, Zhao K. 2017. Occurrence and risk assessment of antibiotics in surface water and groundwater from different depths of aquifers: a case study at Jiangnan Plain, central China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 135: 236-242.
- Yasojima M, Nakada N, Komori K, Suzuki Y, Tanaka H. 2006. Occurrence of levofloxacin, clarithromycin and azithromycin in wastewater treatment plant in Japan. *Water Sci. Technol.* 53(11): 227-233.
- Yin X, Wang H, Zhang Y, Dahlgren R A, Zhang H, Shi M, Gao M, Wang X. 2014. Toxicological assessment of trace  $\beta$ -diketone antibiotic mixtures on zebrafish (*Danio rerio*) by proteomic analysis. *PloS one.* 9(7): e102731.
- Yorgun M S, Balcioglu I A, Saygin O. 2008. Performance comparison of ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis on whey treatment. *Desalination.* 229(1-3): 204-216.
- Zafar S, Owais M. 2006. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem. Eng. J.* 27(3): 295-298.
- Zara G, Angelozzi D, Belviso S, Bardi L, Goffrini P, Lodi T, Budroni M, Mannazzu I. 2009. Oxygen is required to restore flor strain viability and lipid biosynthesis under fermentative conditions. *FEMS Yeast Res.* 9(2): 217-225
- Zeng Q L, Mei X, Su J, Li X H, Xiong W G, Lu Y, Zeng Z L. 2017. Integrated pharmacokinetic–pharmacodynamic (PK/PD) model to evaluate the *in vivo* antimicrobial activity of Marbofloxacin against *Pasteurella multocida* in piglets. *BMC Vet. Res.* 13(1): 1-7.

- Zhang H, Du M, Jiang H, Zhang D, Lin L, Ye H, Zhang X. 2015. Occurrence, seasonal variation and removal efficiency of antibiotics and their metabolites in wastewater treatment plants, Jiulongjiang River Basin, South China. *Environ. Sci. Process Impacts*. 17(1): 225-234.
- Zhang J, Wei Y, Chen M, Tong J, Xiong J, Ao Z. 2015. Occurrence and fate of antibiotic and heavy metal resistance genes in the total process of biological treatment and land application of animal manure: a review. *Huanjing Kexue Xuebao/Acta Sci. Circum*. 35: 935–946.
- Zhang L, Kumar K V, Geng R X, Zhou C H. 2015. Design and biological evaluation of novel quinolone-based metronidazole derivatives as potent Cu<sup>2+</sup> mediated DNA-targeting antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 25(17): 3699-3705.
- Zhang M, He L Y, Liu Y S, Zhao J L, Liu W R, Zhang J N, Chen J, He L, Zhang Q, Ying G G. 2019. Fate of veterinary antibiotics during animal manure composting. *Sci. Total Environ*. 650: 1363-1370.
- Zhang R, Zhang G, Zheng Q, Tang J, Chen Y, Xu W, Zou Y, Chen X. 2012. Occurrence and risks of antibiotics in the Laizhou Bay, China: impacts of river discharge. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 80: 208-215.
- Zhang T, Li B. 2011. Occurrence transformation and fate of antibiotics in municipal wastewater treatment plants. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec*. 41(11): 951-998.
- Zhao F, Yang L, Chen L, Li S, Sun L. 2019. Bioaccumulation of antibiotics in crops under long-term manure application: Occurrence, biomass response and human exposure. *Chemosphere*, 219: 882-895.
- Zheng M, Tang S, Bao Y, Daniels K D, How Z T, El-Din M G, Tang L. 2021. Fully-Automated SPE Coupled to UPLC-MS/MS Method for Simultaneous Detection of Trace Sulfonamides, Quinolones, and Macrolide antibiotics in Water. *Res Sq*. 1-26.
- Zhi S, Zhou J, Yang F, Tian L, Zhang K. 2018. Systematic analysis of occurrence and variation tendency about 58 typical veterinary antibiotics during animal wastewater disposal processes in Tianjin, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 165: 376-385.

- Zhou L J, Wang W X, Lv Y J, Mao Z G, Chen C, Wu Q L. 2020. Tissue concentrations trophic transfer and human risks of antibiotics in freshwater food web in Lake Taihu China. *Ecotox. Environ. Safe.* 197: 1-11.
- Zhou L J, Ying G G, Liu S, Zhang R Q, Lai H J, Chen Z F, Pan C G. 2013. Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China. *Sci. Total Environ.* 444: 183-195.
- Zhou Z C, Feng W Q, Han Y, Zheng J, Chen T, Wei Y Y, Gillings M, Zhu Y, Chen H. 2018. Prevalence and transmission of antibiotic resistance and microbiota between humans and water environments. *Environ. Int.* 121: 1155-1161.
- Zoppellari F, Bardi L. 2013. Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. *New Biotechnol.* 30(6): 607-613.
- Zorita S, Mårtensson L, Mathiasson L. 2009. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Sci. Total Environ.* 407(8): 2760-2770.
- Zorraquino M A, Althaus R L, Nagel O G, Roca Marugán M I, Molina Pons M. 2010. Efecto de los tratamientos térmicos sobre la actividad antimicrobiana de tetraciclinas en leche. *FAVE Cs. Vet.* 9(2): 47-56.
- Zorraquino M A, Althaus R L, Roca M, Molina M P. 2009. Effect of heat treatments on aminoglycosides in milk. *J. Food Prot.* 72(6): 1338-1341.
- Zorraquino M A, Althaus R L, Roca M, Molina M P. 2011. Heat treatment effects on the antimicrobial activity of macrolide and lincosamide antibiotics in milk. *J. Food Prot.* 74(2): 311-315.
- Zorraquino M A, Roca M, Castillo M, Althaus R L, Molina M P. 2008a. Effect of thermal treatments on the activity of quinolones in milk. *Milchwissenschaft,* 63(2): 192-195.
- Zorraquino M A, Roca M, Fernandez N, Molina M P, Althaus R. 2008b. Heat inactivation of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk. *J. Food Prot.* 71(6): 1193-1198.
- Zorraquino M, Berruga M, Molina M. 2007. Investigación de campo de los antibióticos (principio activo-formulación) utilizados en vacuno de leche en España y patología tratada. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

Madrid España 73.

Zorraquino M. 1996. Aplicación de un sistema de análisis de riesgos y puntos críticos para asegurar una leche libre de residuos de medicamentos veterinarios. XIII Jornadas del Grupo de Técnicos especialistas en Mamitis y Calidad de la Leche. Pamplona España.

Zorraquino M. 2008. Investigación de campo sobre tratamientos antimicrobianos en vacuno de leche en procesos patológicos no mamíticos. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Madrid España (pp 8-115).

Zou S, Xu W, Zhang R, Tang J, Chen Y, Zhang G. 2011. Occurrence and distribution of antibiotics in coastal water of the Bohai Bay, China: impacts of river discharge and aquaculture activities. *Environ. Pollut.* 159(10): 2913-2920.

Zou X, Lin Z, Deng Z, Yin D, Zhang Y. 2012. The joint effects of sulfonamides and their potentiator on *Photobacterium phosphoreum*: Differences between the acute and chronic mixture toxicity mechanisms. *Chemosphere.* 86(1): 30-35.

Zwald A G, Ruegg P L, Kaneene J B, Warnick L D, Wells S J, Fossler C, Halbert L W. 2004. Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms. *Int. J. Dairy Sci.* 87(1): 191-201.

# **Anexos**

---

## ANEXOS

### Publicaciones

Eluk D, Nagel O G, Zimmermann J, Molina M P, Althaus R L. 2016. Effect of antibiotics on the germination and root elongation of Argentine intensive crops. *Int. J. Environ. Res.* 10(4): 471-480.

Ceruti R J, Eluk D, Nagel O G, Molina M P, Althaus R L. 2016 Análisis de las principales variables que afectan el crecimiento y consumo de lactosa de *Kluyveromyces marxianus*. VI Congreso Internacional de Ciencia y tecnología de los Alimentos. Conservación e inocuidad: trabajos completos (ISBN 978-987-45380-3-1): 42-48.

Eluk D, Franck R, Nagel O G, Molina M P, Althaus R L. 2017. Phytotoxic effect of antibiotic residues on forage seeds. *Int. J. Agric. Innov. Res.* 5: 828- 848.

Eluk D, Ceruti R, Nagel O, Althaus R. 2019. Effect of thermal treatment of whey contaminated with antibiotics on the growth of *Kluyveromyces marxianus*. *J. Dairy Res.* 86(1): 102-107.

Eluk D, Nagel O, Gagneten A, Reno U, Althaus R. 2021. Toxicity of fluoroquinolones on the cladoceran *Daphnia magna*. *Water Environ. Res.* 1–17. <http://doi.org/10.1002/wer.1631>.

Nagel O G, Althaus R L, Eluk D. Inhibition of *Kluyveromyces marxianus* by antibiotics. *J. Dairy Res.* En etapa de corrección de estilo.

## **Anexo 1**

Eluk D, Nagel O. G, Zimmermann J, Molina M. P, Althaus R. L. 2016. Effect of antibiotics on the germination and root elongation of Argentine intensive crops. *Int. J. Environ. Res.* 10(4): 471-480.



## Effect of Antibiotics on the Germination and Root Elongation of Argentine Intensive Crops

Eluk, D.<sup>1</sup>, Nagel, O. G.<sup>1</sup>, Zimmerman, J.<sup>1</sup>, Molina, M. P.<sup>2</sup> and Althaus, R. L.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Science, National University of Litoral, Kreder 2805, (3080) Esperanza, Argentina

<sup>2</sup>Institute of Animal Science and Technology, Technical University of Valencia, Camino de Vera S/N, (46072) Valencia, Spain

Received 18 May 2016;

Revised 2 Sep. 2016;

Accepted 15 Sep. 2016

**ABSTRACT:** For small cheese-making factories, with no effluent treatment plants, whey can be a serious problem and the landfarming technique represents an alternative for its disposal. However, whey may contain antibiotic residues at the Maximum Residue Limits. Therefore, in this work, we evaluated the phytotoxic effect of different concentrations of five antibiotics (enrofloxacin, kanamycin, oxytetracycline, penicillin and tylosin) on the germination frequency and root elongation of five Argentine crops: sunflower (*Helianthus annuus*), corn (*Zea mays*), soybean (*Glycine max*), sorghum (*Sorghum bicolor*), and wheat (*Triticum aestivum*). We concluded that the antibiotic concentrations currently allowable for the dairy industry (Maximum Residue Limits) are a potential risk for *S. bicolor*, corn and *G. max* crops. Results showed that 0.10 mg/l of enrofloxacin affected *S. bicolor*, 0.15 mg/l of kanamycin affected corn and *G. max*, 0.004 mg/l of penicillin affected corn, *G. max* and *S. bicolor*, and that 0.05 mg/l of tylosin affected *G. max*. Therefore, dumping whey contaminated with antibiotic residues on the soil is not recommended.

**Key words:** Antibiotics, Phytotoxicity, Seeds, Root elongation, Germination

## INTRODUCTION

The use of antibiotics in veterinary medicine represents a widespread practice (Ghava et al., 2015). In milk-producing cattle, antibiotics are used to treat mastitis, metritis, pneumonia, enteritis, hoof diseases, etc. (Sawant et al., 2005; Cabello, 2006; Martínez, 2009; Topp et al., 2013). However, the Argentine legislation prohibits the incorporation of milk contaminated with antibiotic residues above the Maximum Residual Limits (MRLs) into the food chain, whereby, this milk must be removed from the market (Argentine Food Code, 2001). In contrast, milk containing antibiotic residues below the MRLs can be processed in the dairy industry and its effluent can be discarded to the environment (European Community, 2009; Codex Alimentarius, 2010). For small cheese-making factories, with no effluent treatment plants, whey represents a serious problem, which can be solved by landfarming (Mannetje et al., 2008). This technique involves the controlled disposal of effluents on the soil to achieve biological and chemical degradation of organic matter (Silva-Castro et al., 2015).

However, its application is limited as long times are required for organic matter biodegradation, because it depends on the microbial composition, the physicochemical properties of the soil and the concentration and type of pollutants (Thassitou and Arvanitoyannis, 2001).

In soils under conventional landfarming fertilised with manure and monitored for two years, Wang and Wang (2015) reported average concentrations of up to 199 µg/kg of tetracycline, 7 µg/kg of chlortetracycline and 11 µg/kg of sulfadimidine. In addition, numerous antibiotic molecules are not metabolised, thus being eliminated in the milk or excreted in the urine and/or feces (Chee-Sanford et al.; 2001; Kumar et al., 2005a,b; Pope et al., 2009; Finley et al., 2013; Topp et al., 2013). These molecules can reach the ground and pass to the groundwater (Pedersen et al., 2003; Aga et al., 2003; Batt et al., 2006; Zhang and Li, 2011) or to watercourses adjacent to livestock production areas (Kolpin et al., 2002; Boxall

\*Corresponding author E-mail: ralthaus@fcv.unl.edu.ar

et al 2003; Boxall et al., 2004; Hamscher et al., 2004; Davis et al., 2006; Batt et al., 2006; Aust et al., 2008; Bowman et al., 2011). Therefore, the growth and development of plants (Jjemba, 2002a,b; Liu et al., 2009), the composition of the microbial flora (Mc Cracken Foster, 1993; Chander et al., 2005) and the growth of some native microorganisms (Varnero et al., 2005) can be modified when antibiotic molecules are introduced in the soil.

When manure contaminated with antibiotic residues is dumped on the ground, resistant strains can develop (Knapp et al., 2010). When microorganisms acquire resistance via gene transfer, resistant microbial diseases affecting animals and humans may appear (Thiele Bruhn, 2003; Andersson and Hughes, 2012; Wellington et al., 2013). Therefore, resistant infections are becoming more frequent (Carlet et al., 2011; Finley et al., 2013).

Environmental damage has been assessed by several authors by means of different techniques, including phytotoxicity studies on plant growth and seed germination (Liu et al., 2009). For example, Hillis et al. (2011) studied the effect of some antibiotics on seed germination and root elongation of lettuce (*Lactuca sativa*), alfalfa (*Medicago sativa*) and carrot (*Daucus carota*). Similarly, Bowman et al. (2011) evaluated the toxicity and reduction in intracellular calcium levels due to tetracycline in *Arabidopsis*. Chen et al. (2011) analysed single and joint toxicity of chloramphenicol with Hg acting on wheat (*Triticum aestivum* L.), Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.) and corn (*Zea mays* L.). These authors report a positive correlation between root elongation inhibition and concentrations of pollutants. Liu et al. (2009) analysed the effect of various antibiotics on the growth of rice (*Oryza sativa* L), turmeric (*Cucumis sativus* L) and sweet oats (*Cichorium endive*), while Migliore et al. (1994, 1998) evaluated the phytotoxicity of sulfadimethoxine, enrofloxacin and oxytetracycline in millet (*Panicum miliaceum*), peas (*Pisum sativum*) and maize (*Zea mays*) plants. Moreover, Jjemba (2002a, b) studied the effect of chloroquine, quinacrine and metronidazole in soybean plants and the soil microbiota. However, no studies have evaluated the potential effects of antibiotics on Argentine widespread crops.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of six families of antibiotics (aminoglycosides, beta-lactams, macrolides, quinolones, sulphonamides and tetracyclines) on the germination and root elongation of five Argentine crops (*Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Sorghum bicolor*, *Triticum*

*aestivum* and *Zea mays*) to assess their possible phytotoxic effect.

## MATERIALS & METHODS

Antibiotics studied: the following antibiotic molecules, representative of each group, were selected: enrofloxacin (quinolones), kanamycin (aminoglycosides), oxytetracycline (tetracycline), penicillin (beta-lactams), and tylosin (macrolides). To assess the possible impact of landfarming with whey containing antibiotic residuals, concentrations equivalent to their MRLs (European Community, 2009; Codex Alimentarius, 2010) were chosen as minimum values for this study. Based on these threshold values, solutions containing the following concentrations in logarithmic scales were prepared: C<sub>0</sub> = 0 MRL, C<sub>1</sub> = 1 MRL, C<sub>2</sub> = 10 MRLs, C<sub>3</sub> = 100 MRLs and C<sub>4</sub> = 1000 MRLs (MRL<sub>enrofloxacin</sub>: 0.1 mg/l, MRL<sub>oxytetracycline</sub>: 0.1 mg/l, MRL<sub>kanamycin</sub>: 0.15 mg/l, MRL<sub>penicillin</sub>: 0.004 mg/l, MRL<sub>tylosin</sub>: 0.05 mg/l).

Selected seeds: *Glycine max* (51%), *Zea mays* (28%), *Triticum aestivum* (9%), *Helianthus annuus* (3%) and *Sorghum bicolor* (2%) were selected due to its significant production in Argentine (Rosario Stock Exchange, 2015). Crop seeds were provided by Department of Intensive Cultivation of Faculty of Agricultural Sciences, National University of Litoral (Argentina).

Toxicity study on seeds: the guidelines established by the standard protocol to conduct toxicity tests in terrestrial plants were followed (ASTM, 2003; Liu et al., 2009; Hillis et al. 2011; Bowman et al., 2011; Adomas et al., 2013; Ghava et al., 2015). Before starting the treatment, seeds were stored at 4°C for 1 month. After this time, 1500 experimental units of each culture were selected.

For each seed, five replicates of each antibiotic concentration were performed using polystyrene Petri plates (100 x 15 mm). In each plate, 10 seeds were distributed on Whatman cellulose filter. Subsequently, 10 ml of the antibiotic solutions were added to each plate at each concentration (C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: 25 plates/antibiotic and seed).

To prevent dehydration, plates were covered with Parafilm M (Sigma-Aldrich) and placed in an incubation chamber at 25°C for 7 days. For germination control, the acceptability criterion was set at 70% (according to the protocol).

**Relative frequency of seed germination.** The relative frequency of seed germination of each

species was calculated at 12-hour intervals during a period of seven days (14 controls). The effect of antibiotic concentration on the germination frequency of each seed was analysed. The stepwise option of the multiple logistic regression models was used:

$$Y = \text{Logistic } L_{ijk} = \beta_0 + \beta_i t_i + \sum \beta_{0j} Z_j + \epsilon_{ijk}$$

Where:  $Y = \text{Logistic } L_{ijk}$ : Logistic function =  $\ln [P_{ijkl}/(1-P_{ijkl})]$ ;  $P_{ijkl}$ : from germinated seed and  $(1-P_{ijkl})$ : probability of non-germinated seeds.  $\beta_0$ : Intercept,  $\beta_i$ ,  $\beta_{0j}$ : coefficients estimated by the logistic model,  $t_i$ : Effect of time on seed germination ( $i=12$ ),  $Z_j$ : Effect of antibiotic concentration in terms of dummy variable ( $Z_0$ :  $C_1=0, C_2=0, C_3=0$  and  $C_4=0$ ;  $Z_1$ :  $C_1=1, C_2=0, C_3=0$  and  $C_4=0$ ;  $Z_2$ :  $C_1=0, C_2=1, C_3=0$  and  $C_4=0$ ;  $Z_3$ :  $C_1=0, C_2=0, C_3=1$  and  $C_4=0$ ;  $Z_4$ :  $C_1=0, C_2=0, C_3=0$  and  $C_4=1$ ) and  $\epsilon_{ijk}$ : residual error of the model. Statistical calculations were performed using Centurion Stat Graphics® software.

**Effect of antibiotics on the root elongation of germinated crop seeds.** Seven days after the start of the experiment, the root length of each germinated seed was measured in duplicate. Measurements were made from the top of the primary root to the hypocotyl, using a Vernier calibre (accuracy 0.1 mm).

The effect of antibiotic concentration on root elongation was evaluated by means of ANOVA (Centurion Stat Graphics®). Subsequently, Turkey's test was applied to evaluate significant differences for each antibiotic concentration.

## RESULTS & DISCUSSION

### Relative frequency of seed germination:

Statistical results ("χ<sup>2</sup>" and "p" value) from the application of the stepwise option of the logistic

regression model, which predicts germination frequencies for different antibiotic concentrations, are shown in Table 1. These results show that almost all the seeds analysed were affected by enrofloxacin (except for *Zea mays*) and penicillin (except *Helianthus annuus*). The other antibiotics affected a smaller number of seeds (Table 1).

The effects of each antibiotic concentration on the germination frequencies of seeds selected by the stepwise option are shown in Fig. 1. In all the cases, the antibiotics caused a delay in the germination frequencies of seeds, showing a phytotoxic action on crop growth. In addition, the logistic equations are shown in Fig. 1. The time affected the germination frequencies significantly (positive coefficients "β<sub>i</sub>"), while the antibiotic concentration negatively affected the germination frequencies, demonstrating an inhibitory effect (negative coefficients "β<sub>0j</sub>").

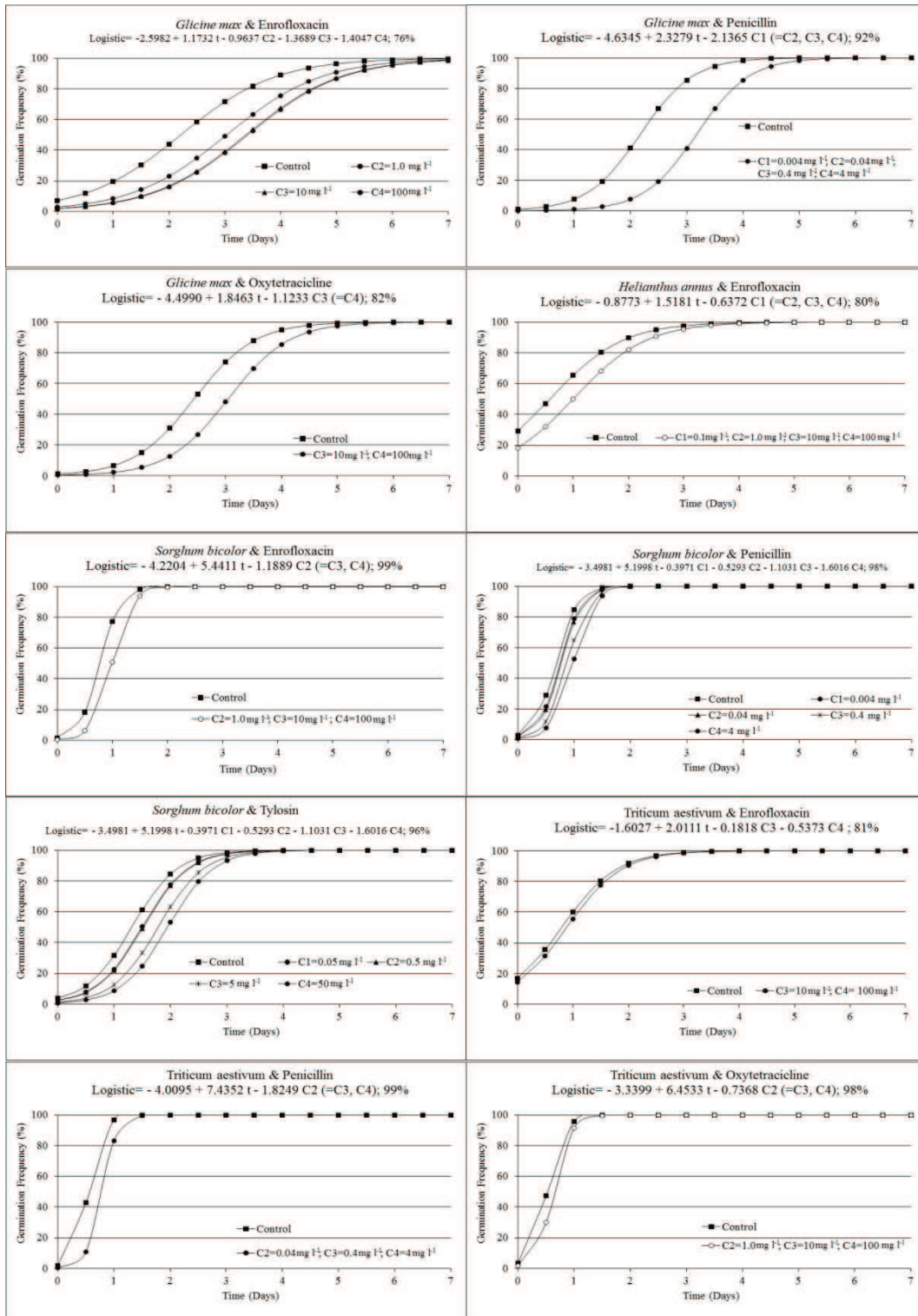
Fig. 1 show that 0.004 mg/l of penicillin, 1.0 mg/l of enrofloxacin and 10 mg/l of oxytetracycline affected the germination frequency of *Glycine max* and that 0.1 mg/l of enrofloxacin affected the germination frequency of *Helianthus annuus*. The germination frequency of *Sorghum bicolor* decreased with 0.004 mg/l of penicillin and 0.05 mg/l of tylosin, values equivalent to their respective MRLs. Higher values of enrofloxacin (1 mg/l) were necessary to affect the germination frequency of this crop. *Triticum aestivum* seeds were affected by 0.4 mg/l of penicillin, 1 mg/l of oxytetracycline and 10 mg/l of enrofloxacin. *Zea mays* seeds were more resistant to antibiotic residues, since 100 mg/l of oxytetracycline and 4 mg/l of penicillin were necessary to affect their germination frequency.

With the aim to visualize this inhibitory action of antibiotics, Fig. 2 (1a: treated group and

**Table 1. Relative frequency of seed germination - Statistical results from the application of the stepwise option of the logistic regression model for different antibiotic concentrations**

Seed	Antibiotic	Time		Concentration	
		χ <sup>2</sup> valor	P valor	χ <sup>2</sup> valor	Valor p
<i>Glicine max</i>	Oxytetracyclin	812	0.0001	32.9	0.0001
	Penicillin	935	0.0001	90.2	0.0001
	Enrofloxacin	1316	0.0001	97.9	0.0001
<i>Helianthus annuus</i>	Enrofloxacin	971	0.0001	16.3	0.0027
	Enrofloxacin	876	0.0001	12.7	0.0004
<i>Sorghum bicolor</i>	Penicillin	2066	0.0001	29.4	0.0001
	Tylosin	2219	0.0001	95.0	0.0001
	Penicillin	808	0.0001	20.3	0.0001
<i>Triticum aestivum</i>	Enrofloxacin	874	0.0001	6.79	0.0334
	Oxytetracycline	1753	0.0001	6.82	0.0090
	Oxytetracycline	1184	0.0001	10.4	0.0013
<i>Zea mays</i>	Oxytetracycline	1184	0.0001	10.4	0.0013
	Penicillin	1172	0.0001	11.9	0.0005

## Phytotoxic Effect of Antibiotic



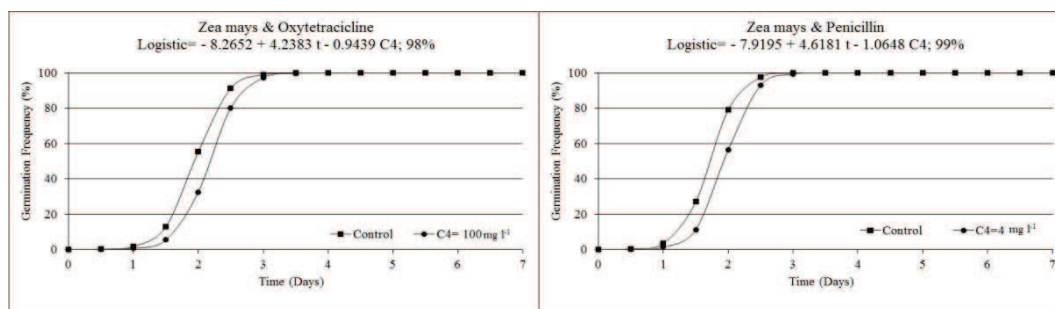


Fig. 1. Relative frequency of seed germination - Effects of antibiotics concentration on the germination frequencies of seeds

1b: control group) is presented. This image shows that low concentrations of penicillin (0.004 mg/l) affect germination frequency of *Glycine max* comparing with the control (free-antibiotic), on second day (1 vs. 4 germinated seeds) and fourth day (4 vs. 8 germinated seeds). By the fifth day, all the seeds have germinated in both groups.

To summarise, it can be established that antibiotic concentrations equivalent to the MRLs cause a phytotoxic effect on the germination rate of some crops, with 0.1 mg/l of enrofloxacin affecting *H. annuus* seeds, 0.004 mg/l of penicillin affecting *G. max* and *S. bicolor*, and 0.05 mg/l of tylosin affecting *S. bicolor*.

**Effect of antibiotics on the root elongation of germinated crop seeds:** The mean values, standard deviations and statistical parameters ("F" and "p" values) calculated with ANOVA for the antibiotics that affected seeds are shown in Table 2. Significant differences obtained by applying Turkey's test are also presented.

For *Glycine max*, all the antibiotics tested caused a phytotoxic effect. Kanamycin, penicillin and tylosin showed toxicity at their MRLs (MRL<sub>kanamycin</sub>: 0.15 mg/l, MRL<sub>penicillin</sub>: 0.004 mg/l, MRL<sub>tylosin</sub>: 0.05 mg/l), whereas 1 mg/l of oxytetracycline and 10 mg/l enrofloxacin were necessary to affect root elongation.

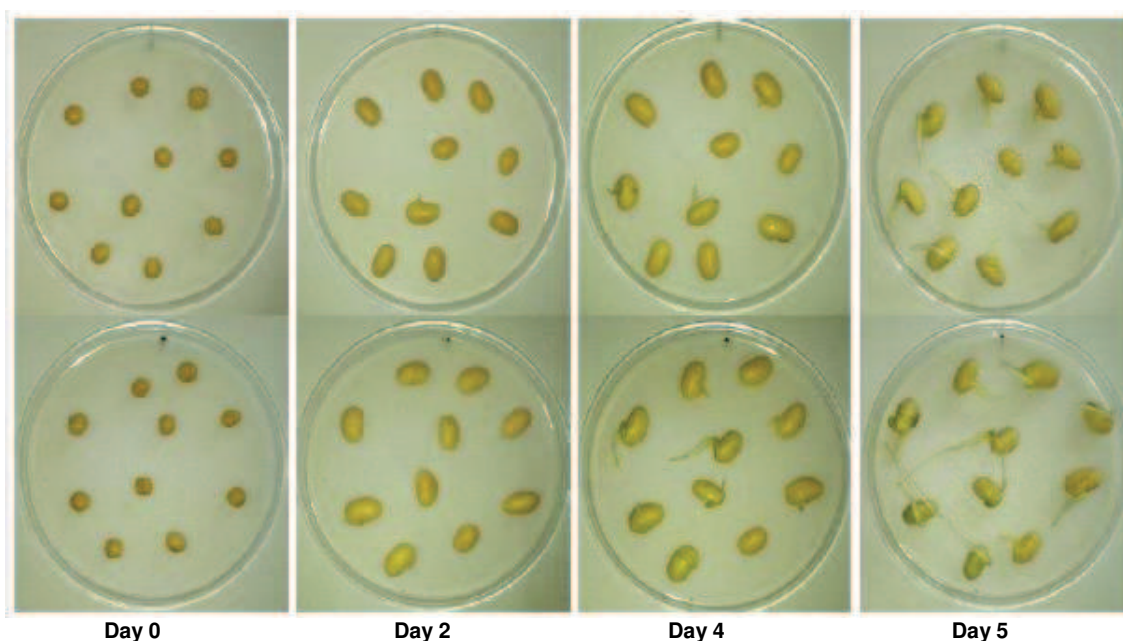


Fig. 2. Effect of 0.004 mg/l penicillin on seed germination frequency of *Glycine max*: (a) treated group, (b) control group

**Table 2. Effect of antibiotics on the root elongation of germinated crop seed - Main values, standard deviations and statistical parameters calculated with ANOVA for the antibiotics that affected seeds**

Seed	Antibiotic	Concentration (LMR)					Valor "F"	Valor "p"
		0	LMR	10LMR	100LMR	1000LMR		
<i>Glicine max</i>	Enrofloxacin	2,1 <sub>a</sub> ± 0,1	2,1 <sub>a</sub> ± 0,1	1,9 <sub>a,b</sub> ± 0,1	1,6 <sub>b,c</sub> ± 0,1	1,4 <sub>c</sub> ± 0,1	7,92	0,0001
	Kanamycin	1,8 <sub>a</sub> ± 0,1	1,4 <sub>b</sub> ± 0,1	1,5 <sub>b</sub> ± 0,1	1,4 <sub>b</sub> ± 0,1	1,4 <sub>b</sub> ± 0,1	3,74	0,0060
	Oxytetracyclin	3,6 <sub>a</sub> ± 0,2	3,2 <sub>a,b</sub> ± 0,2	2,9 <sub>b,c</sub> ± 0,2	2,3 <sub>c,d</sub> ± 0,2	1,6 <sub>d</sub> ± 0,2	19,12	0,0001
	Penicillin	2,7 <sub>a</sub> ± 0,2	1,7 <sub>b</sub> ± 0,2	1,6 <sub>b</sub> ± 0,2	1,9 <sub>b</sub> ± 0,2	1,8 <sub>b</sub> ± 0,2	5,62	0,0003
	Tylosin	3,0 <sub>a</sub> ± 0,1	2,5 <sub>b</sub> ± 0,1	2,4 <sub>b</sub> ± 0,2	2,5 <sub>b</sub> ± 0,2	1,8 <sub>c</sub> ± 0,2	9,42	0,0001
<i>Helianthus annuus</i>	Enrofloxacin	2,3 <sub>a</sub> ± 0,1	2,1 <sub>a,b</sub> ± 0,1	2,1 <sub>a,b</sub> ± 0,1	1,7 <sub>b</sub> ± 0,1	1,7 <sub>b</sub> ± 0,1	6,54	0,0001
	Oxytetracyclin	2,9 <sub>a</sub> ± 0,2	2,9 <sub>a</sub> ± 0,2	2,7 <sub>a</sub> ± 0,2	2,3 <sub>a</sub> ± 0,2	1,6 <sub>b</sub> ± 0,2	6,76	0,0001
<i>Sorghum bicolor</i>	Enrofloxacin	7,4 <sub>a</sub> ± 0,2	6,2 <sub>b</sub> ± 0,2	3,9 <sub>c</sub> ± 0,2	2,8 <sub>d</sub> ± 0,2	2,8 <sub>d</sub> ± 0,2	110,91	0,0001
	Kanamycin	4,7 <sub>a</sub> ± 0,3	5,1 <sub>a</sub> ± 0,3	5,1 <sub>a</sub> ± 0,3	2,8 <sub>b</sub> ± 0,3	1,4 <sub>b</sub> ± 0,2	61,41	0,0001
	Oxytetracyclin	6,8 <sub>a</sub> ± 0,2	6,0 <sub>a</sub> ± 0,2	5,3 <sub>a</sub> ± 0,2	1,9 <sub>b</sub> ± 0,2	2,0 <sub>b</sub> ± 0,2	41,97	0,0001
	Penicillin	8,3 <sub>a</sub> ± 0,3	6,2 <sub>b</sub> ± 0,3	6,6 <sub>b</sub> ± 0,3	6,6 <sub>b</sub> ± 0,3	6,4 <sub>b</sub> ± 0,3	6,53	0,0001
<i>Triticum aestivum</i>	Enrofloxacin	5,4 <sub>a</sub> ± 0,2	4,3 <sub>a</sub> ± 0,2	3,9 <sub>a</sub> ± 0,2	2,4 <sub>b</sub> ± 0,2	1,9 <sub>b</sub> ± 0,2	38,50	0,0001
	Kanamycin	5,1 <sub>a</sub> ± 0,2	5,4 <sub>a</sub> ± 0,2	5,3 <sub>a</sub> ± 0,2	2,3 <sub>b</sub> ± 0,2	1,1 <sub>b</sub> ± 0,2	78,38	0,0001
	Oxytetracyclin	5,1 <sub>a</sub> ± 0,1	5,2 <sub>a</sub> ± 0,1	3,5 <sub>b</sub> ± 0,1	1,4 <sub>c</sub> ± 0,1	0,8 <sub>c</sub> ± 0,1	175,59	0,0001
	Penicillin	6,4 <sub>a</sub> ± 0,3	6,0 <sub>a</sub> ± 0,3	5,7 <sub>a,b</sub> ± 0,3	5,1 <sub>b</sub> ± 0,3	5,1 <sub>b</sub> ± 0,3	3,78	0,0078
<i>Zea mays</i>	Enrofloxacin	1,8 <sub>a</sub> ± 0,1	1,8 <sub>a</sub> ± 0,1	1,7 <sub>a</sub> ± 0,1	1,7 <sub>a</sub> ± 0,1	1,5 <sub>b</sub> ± 0,1	3,33	0,0117
	Kanamycin	1,4 <sub>a</sub> ± 0,1	1,2 <sub>b</sub> ± 0,1	1,2 <sub>b</sub> ± 0,1	1,1 <sub>b,c</sub> ± 0,1	0,9 <sub>c</sub> ± 0,1	7,45	0,0001
	Oxytetracyclin	2,9 <sub>a</sub> ± 0,1	3,1 <sub>a</sub> ± 0,1	2,9 <sub>a</sub> ± 0,1	1,9 <sub>b</sub> ± 0,1	1,7 <sub>b</sub> ± 0,1	37,15	0,0001
	Penicillin	2,0 <sub>a</sub> ± 0,1	1,6 <sub>b</sub> ± 0,1	1,7 <sub>b</sub> ± 0,1	1,7 <sub>b</sub> ± 0,1	1,7 <sub>b</sub> ± 0,1	3,47	0,0091

a, b, c: Different subscripts values in the same row indicate significant differences at a level of  $p < 0.05$

MRL<sub>enrofloxacin</sub>: 0.1 mg/l, MRL<sub>kanamycin</sub>: 0.15 mg/l, MRL<sub>oxytetracycline</sub>: 0.1 mg/l, MRL<sub>penicillin</sub>: 0.004 mg/l, MRL<sub>tylosin</sub>: 0.05 mg/l.

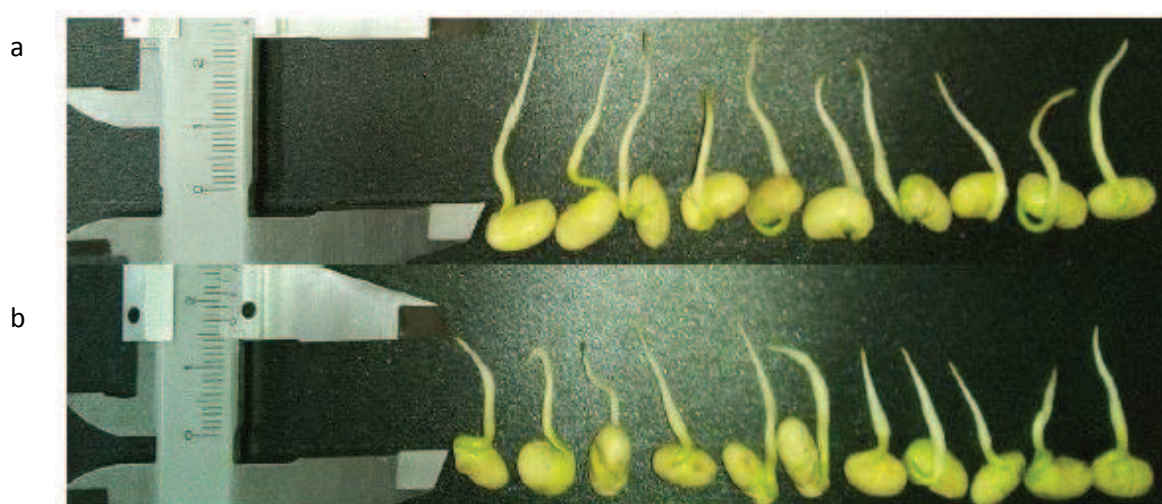
Regarding *Helianthus annuus*, the inhibitory effect was observed at 10 mg/l of enrofloxacin and 100 mg/l of oxytetracycline, higher values than MRLs.

*Sorghum bicolor* root elongation was affected by 0.1 mg/l of enrofloxacin (MRL), 0.004 mg/l of penicillin (MRL), 15 mg/l of kanamycin and 10 mg/l of oxytetracycline. It must be noted that oxytetracycline caused a decrease in root length greater than 85%.

*Triticum aestivum* root elongation was affected by 1 mg/l of oxytetracycline, 10 mg/l of enrofloxacin, 15 mg/l of kanamycin and 0.4 mg/l of penicillin, higher values than MRLs. It should be noted that the presence of 10 mg/l of enrofloxacin and 15 mg/l of kanamycin caused a decrease in root length greater than 50%. Ghava et al. (2015) studied the effects of amoxicillin, levofloxacin and tetracycline over three wheat species (*Triticum aestivum*) and did not observe phytotoxic effect of these antibiotics (except for tetracycline).

For *Zea mays*, inhibitory effects were observed at low concentrations of kanamycin (0.15 mg/l) and penicillin (0.004 mg/l) but at high values of oxytetracycline (10 mg/l) and enrofloxacin (100 mg/l). In summary, oxytetracycline affected the root elongation of all seeds studied. This is in agreement with the results of Hillis et al. (2011), who reported inhibitory effect of oxytetracycline in root elongation of *Lactuca sativa*, *Medicago sativa* and *Daucus carota*. When comparing the germination frequency of seeds (Table 1) with their root elongation (Table 2), we found that the second parameter was more sensitive, as also noted by Ghava et al. (2015) and Basset et al. (2002).

In order to appreciate the impacts of low antibiotic concentrations on the roots elongation, the effect of penicillin (0.004 mg/l) on *Glycine max* was chosen. In Fig. 3 is displayed that penicillin produced a significant decrease in the length of the roots (Fig. 3a) compared to free-antibiotics seeds (Fig. 3b) at the seventh day of treatment.



**Fig. 3. Effect of penicillin (0.004 mg/l) on root elongation of *Glycine max* determined the seventh day of treatment. (a) Control group, (b) treated group**

In summary, our results showed that low concentrations of some antibiotics affect the root elongation of the main Argentine crops: 0.15 mg/l of kanamycin, 0.004 mg/l of penicillin and 0.05 mg/l of tylosin affected *Glycine max* seeds; 0.1 mg/l of enrofloxacin and 0.004 mg/l of penicillin affected *Sorghum bicolor*, and 0.15 mg/l of kanamycin and 0.004 mg/l of penicillin affected *Zea mays*. Therefore, the landfarming technique for disposal of whey contaminated with antibiotics at the MRLs values established by the law should be avoided.

In order to avoid the environmental impact of these antibiotics, heat treatment or photocatalytic processes of contaminated whey should be evaluated. Studies in milk indicate that sterilization process (120°C-20min) produces significant losses in the antimicrobial activity of penicillin (Zorraquino et al., 2008, Roca et al., 2011), kanamycin (Zorraquino et al., 2009), tylosin (Zorraquino et al., 2011), except enrofloxacin (Roca et al., 2010). For degradation of quinolones residues in water, Sirtori et al. (2009) suggest a solar photocatalytic processes.

## CONCLUSIONS

Due to the possibility of using the landfarming technique for the treatment of contaminated whey, here we evaluated the effect of different antibiotics on the germination frequency and root elongation of some Argentinean crops. We concluded that values equivalent to the Maximum Residue Limits cause phytotoxic effects. Results showed that 0.1 mg/l of enrofloxacin affects the germination of *Sorghum bicolor*, that 0.15 mg/l of kanamycin affects *Zea mays* and *Glycine max*, that 0.004 mg/l of

penicillin affects *Zea mays*, *Glycine max* and *Sorghum bicolor*, and that 0.05 mg/l of tylosin affects *Glycine max*.

These studies show that antibiotic concentrations acceptable for the dairy industry can cause a decrease in the germination frequency and/or a reduction in the root elongation of *Glycine max*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*, widely spread crops in Argentine. *Helianthus annuus* and *Triticum aestivum* were more resistant. Therefore, the discharge of effluents from the dairy industry contaminated with antibiotics in the soil constitutes an environmental problem.

In order to improve these findings, other aminoglycosides, beta-lactams, macrolides and quinolones should be investigated. It would also be appropriate to assess potential ecotoxicological effects of antibiotics on other biomarkers such as bacteria (*Vibrio fischeri*), algae (*Chlorella vulgaris*, *Cyclotella meneghiniana*, *Lemna gibba*, *Pseudokirchneriella subcapitata*), invertebrates (*Artemia salina*, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna*), and fish (*Danio rerio*, *Lepomis punctatus*, *Lepomis macrochirus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta*, *Salvelinus fontinalis*, *Salvelinus namaycush*) to select the most suitable biosensor to be used in the future to control the environmental impact of antibiotics.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research work has been carried out as part of the CAI+D'11 Projects (50120110100052 LI, Res. 444/13- List II year 2013, National University of Litoral, Santa Fe, Argentine) and

PICT 455-2012 (National Agency for Scientific and Technological Promotion) and to Prof. Horacio Imvinkelried, Intensive Cultivation Department of the Faculty of Agricultural Sciences, National University of Litoral.

## REFERENCES

Adomas, B., Antczak-Marecka, J., Nalecz-Jawecki, G. and Piotrowicz-Cieslak, A. I. (2013). Phytotoxicity of enrofloxacin soil pollutant to narrow-leaved lupin plant. *Polish Journal of Environmental Studies*, **22** (1), 71-76.

Aga, D., Goldfish, S. R. and Kulshrestha, P. (2003). Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes. *Analyst*, **128**, 658–662.

Andersson, D. I. and Hughes, D. (2012). Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resistance Update*, **15**, 162–72.

American Society for Testing Materials – ASTM. (2003). Standard guide for conducting terrestrial plant toxicity tests. ASTM International: West Conshohocken.

Argentine Food Code. (2001). Chapter VIII: Dairy foods. Artículos 555, 556, 556 bis, Decree 2126/71, Buenos Aires, Argentine.

Aust, M. O., Godlinski, F., Travis, G. R., Hao, X. Y., McAllister, T. A., Leinweber, P. and Thiele-Bruhn, S. (2008). Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environmental Pollution*, **156**, 1243–1251.

Basset, G., Quinlivan, E. P., Ziemak, M. J., Díaz de la Garza, R., Fischer, M., Schiffmann, S., et. al. (2002). Folate synthesis in plants: the first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 12489–12494.

Batt, A. L., Snow, D. D. and Aga, D. S. (2006). Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington country, Idaho, USA. *Chemosphere*, **64**, 1963-1971. <https://www.bcr.com.ar/Pages/Publicaciones/anuario.a.spx>

Bowman, S. M., Drzewiecki, K. E., Mojica, E. R. E., Zielinski, A. M., Siegel, A., Aga, D. S. and Berry, J.O. (2011). Toxicity and reductions in intracellular calcium levels following uptake of a tetracycline antibiotic in *Arabidopsis*. *Environmental Science and Technology*, **45** (20), 8958-8964.

Boxall, A. B. A., Fogg, L. A., Blackwell, P. A., Kay, P., Pemberton, E. J. and Croxford, A. (2004). Veterinary Medicines in the Environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **180**, 1–91.

Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Halling-Sorensen, B. and Tolls, J. (2003). Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environmental Science Technology*, **37**, 286A–294A.

Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, **8**, 1137–1144.

Carlet, J., Collignon, P., Goldmann, D., Goossens, H., Gyssens, I. C., Harbarth, S., ... and Richtmann, R. (2011). Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. *The Lancet*, **378**, 369-371.

Codex Alimentarius. (2010). Codex committee on residues of veterinary drugs in foods. 9th session of the 30 August – 3 September 2010. Discussion paper on methods of analysis for residues of veterinary drugs in foods (CX/RVDF 10/19/ 6). Vermont, USA. Available on line: [ftp://ftp.fao.org/codex/ccrvdf19/rv19\\_06e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/ccrvdf19/rv19_06e.pdf).

European Community. (2009). Council Regulation N°37/ 2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, **15**, 1-72.

Chander, Y., Kumar, K., Sagar, M. L. and Goyalb Gupta, S. (2005). Antibacterial Activity of Soil-Bound Antibiotics. *Journal Environmental Quality*, **34**, 1952-1957.

Chee- Sanford, J. C., Aminov, R. I., Krapac, I. J., Garrigues- Jeanjean and N. , Mackie, R. I. (2001). Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 1494-1502.

Chen, Q. Y., Wu, Z. H. and Liu, J. L. (2011). Ecotoxicity of Chloramphenicol and Hg Acting on the Root Elongation of Crops in North China. *International Journal of Environmental Research*, **5** (4), 909-916.

Davis, J. G., Truman, C. C., Kim, S. C., Ascough, J. C. and Carlson, K. (2006). Antibiotic transport via runoff and soil loss. *Journal Environmental Quality*, **35**, 2250–2260.

Finley, R. L., Collignon, P., Larsson, D. J., McEwen, S. A., Li, X. Z., Gaze, W. H., ... and Topp, E. (2013). The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases*, **cit355**, 1-7.

Ghava, K., Rathod, M. C. and Dhale, D. A. (2015). Effect of antibiotics on seed germination and root elongation of wheat. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, **4** (1), 516-527.

Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Hoepfer, H. and Nau, H. (2004). Antibiotics in soil: Routes of entry, environmental concentrations, fate and possible effects. (In: Kümmerer., (Ed), *Pharmaceuticals in the Environment* (pp. 139-147). pringer: Berlin).

Hillis, D. G., Fletcher, J., Solomon, K. R. and Sibley, P. K. (2011). Effects of Ten Antibiotics on Seed Germination and Root Elongation in Three Plant Species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **60**, 220– 232.



- Jjemba, P. K. (2002a). The effect of chloroquine, quinacrine, and metronidazole on both soybean plants and soil microbiota. *Chemosphere*, **46**, 1019–1025.
- Jjemba, P. K. (2002b). The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **93**, 267–278.
- Knapp, C. W., Dolfing, J. Ehlert, P. A. I. and Graham, D. W. (2010). Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science Technology*, **44**, 580–587.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B. and Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science Technology*, **36**, 1202–1211.
- Kumar, K., Gupta, S. C., Baidoo, S. K., Chander, Y. and Rosen, C. J. (2005a). Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal Environmental Quality*, **34**, 2082–208.
- Kumar, K., Gupta, S. C., Cher, Y. and Singh, A. K. (2005b). Antibiotics in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy*, **87**, 1-54.
- Liu, F., Ying, G. G., Tao, R., Zhao, J. L., Yang, J. F. and Zhao, L. F. (2009). Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution*, **157** (5), 1636-1642.
- Mannetje, A. T., Dryson, E., Walls, C., McLean, D., McKenzie, F., Maule, M. and Pearce, N. (2008). High risk occupations for non-Hodgkin's lymphoma in New Zealand: case-control study. *Occupational and Environmental Medicine*, **65** (5), 354-363.
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinant. *Environmental Pollution*, **157**, 2893–2902.
- Mc Cracken Foster, G. N. (1993). The effect of ivermectin on the invertebrate fauna associated with cow dung. *Environmental Toxicology Chemistry*, **12**, 73-84.
- Migliore, L., Brambilla, G., Cozzolino, S. and Gaudio, L. (1994). Effect on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* *Zea mays*). *Agriculture, Ecosystems and Environmental*, **52**, 103-110.
- Migliore, L., Civitareale, C., Cozzolino, S., Casoria, P., Brambilla, G. and Gaudio, L. (1998). Laboratory models to evaluate phytotoxicity of sulphadimethoxine on terrestrial plants. *Chemosphere*, **37**, 2957-2961.
- Pedersen, J., Yeager, M. and Suffet, I. (2003). Xenobiotic organic compounds in runoff from fields irrigated with treated wastewater. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 1360-1372.
- Pope, L., Boxall, A., Corsing, C., Halling-Sørensen, B., Tait, A. and Topp E. (2009). Exposure assessment of veterinary medicines in terrestrial systems. (In: Crane, M., Boxall, A. B. A., Barrett, K. (Eds), *Veterinary Medicines in the Environmental*, (pp. 129–153). CRC Press: New York).
- Roca, M., Castillo, M., Marti, P., Althaus, R. L. and Molina, M. P. (2010). Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, **58** (9), 5427-5431.
- Roca, M., Villegas, L., Kortabitarte, M. L., Althaus, R. L. and Molina, M. P. (2011). Effect of heat treatments on stability of  $\beta$ -lactams in milk. *Journal of Dairy Science*, **94** (3), 1155-1164.
- Rosario Stock Exchange (2015). *Statistical Annuary*. Ed. Poston Rogelio. Rosario Stock Exchange, Argentine. ISSN 2250-8988, 76pp. Available in:
- Sawant, A. A., Sordillo, L. M. and Jayarao, B. M. (2005). A Survey on Antibiotic Usage in Dairy Herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, **88**, 2991-2999.
- Silva-Castro, G. A., Uad, I., Rodríguez-Calvo, A., González-López, J. and Calvo, C. (2015). Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. *Environmental Research*, **137**, 49-58.
- Sirtori, C., Zapata, A., Malato, S., Gernjak, W., Fernández-Alba, A. R. and Agüera, A. (2009). Solar photocatalytic treatment of quinolones: intermediates and toxicity evaluation. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **8** (5), 644-651.
- Thassitou, P. K. and Arvanitoyannis, I. S. (2001). Bioremediation : a novel approach to food waste management. *Trends in Food Science and Technology*, **12**, 185–196.
- Thiele-Bruhn, S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **166** (2), 145-167.
- Topp, E., Chapman, R., Devers-Lamrani, M., Hartmann, A., Marti, R., Martin-Laurent, F., ... and Sumarah, M. (2013). Accelerated Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-degrading sp. *Journal Environmental Quality*, **42** (1), 173-178.
- Varnero, M. T. C., Rojas, R. O. and Sotomayor, E. (2005). Fitotoxicidad de extractos de residuos orgánicos y su efecto sobre el índice de germinación de rabanito y pepino. *Revista Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, **5** (2), 61-66.
- Wang, S. and Wang, H. (2015). Adsorption behavior of antibiotic in soil environment: a critical review. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, **9** (4), 565-574.
- Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M. and Williams, A. P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet infectious diseases*, **13** (2), 155-165.

Zhang, T. and Li, B. (2011). Occurrence, transformation, and fate of antibiotics in municipal waste water treatment plants. *Critical Review in Environmental Science and Technology*, 41, 951–98.

Zorraquino, M. A., Roca, M., Fernández, N., Molina, M. P. and Althaus, R. (2008). Heat inactivation of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk. *Journal of Food Protection*, 71 (6), 1193-1198.

Zorraquino, M. A., Althaus, R. L., Roca, M. and Molina, M. P. (2009). Effect of heat treatments on aminoglycosides in milk. *Journal of Food Protection*, 72 (6), 1338-1341.

Zorraquino, M. A., Althaus, R. L., Roca, M. and Molina, M. P. (2011). Heat treatment effects on the antimicrobial activity of macrolide and lincosamide antibiotics in milk. *Journal of Food Protection*, **74(2)**, 311-315

## **Anexo 2**

Eluk D, Franck R, Nagel O. G, Molina M. P, Althaus R. L. 2017. Phytotoxic effect of antibiotic residues on forage seeds. *Int. J. Agric. Innov. Res.* 5: 828- 848.

## Phytotoxic Effect of Antibiotic Residues on Forage Seeds

Eluk, D.<sup>1</sup>; Frank, R.<sup>1</sup>; Nagel O. G.<sup>1</sup>; Molina; M. P.<sup>2</sup>; Althaus, R. L.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Kreder 2805, (3080) Esperanza, Argentina. \* Fax number: 54-3496-426304, email: ralthaus@fcv.unl.edu.ar

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera S/N, (46072) Valencia España

**Abstract** – In veterinary medicine, antibiotics are used for the treatment of infectious diseases. Some of these antibiotics are not completely metabolized and can be eliminated through the milk, urine and/or feces. In this way, antibiotic residues can reach the soil and affect the development of seeds and plants. The aim of this work was to study the effect of different concentrations of five antibiotics (enrofloxacin, kanamycin, oxytetracycline, penicillin and tylosin) on the germination frequency and root elongation of seeds of three forage species (alfalfa (*Medicago sativa*), melilotus (*Melilotus albus*) and white clover (*Trifolium repens*)). The results showed that the antibiotic concentrations allowed for the dairy industry (maximum residue limits) were detrimental to the germination and growth of these seeds: 0.10 mg/L of enrofloxacin affected the three species studied, whereas 0.10 mg/L of oxytetracycline affected *M. sativa* and *T. repens*. Due to the negative effect of antibiotic residues on forage seeds, the whey contaminated with these residues should be treated before being discarded into the soil.

**Keywords:** Antibiotics, Forage Seeds, Germination Frequency, Root Elongation.

### I. INTRODUCTION

In veterinary medicine, antibiotics are frequently used for the treatment of infectious diseases such as enteritis, hoof diseases, mastitis, metritis and pneumonia [1]-[2]. Some of these antibiotics are not completely metabolized and can be eliminated through the milk, urine and/or cattle manure [5]-[9]. Thus, these bioactive molecules can reach the soil and affect both the composition of the microbiota [10]-[13] and the development of plants [14]-[16]. In addition, antibiotic residues can reach the rivers adjacent to livestock farms [17]-[21] or cross the soil, reaching the groundwater [22]-[25]. This problem can be exacerbated in the case of small cheese industries that use landfarming to treat whey contaminated with antibiotics [26]-[27]. This bioremediation technique requires the use of large land plots, presents slow degradation rates, and needs long periods of stabilization to complete the treatment. So, the impact of landfarming on the [21] indicated that 20 mg/L of chlortetracycline produces yellowing, growth retardation and reduction of the leaf expansion in *Arabidopsis thaliana*. Similarly, [29] analyzed the effect of ten antibiotics (amoxicillin, chlortetracycline,

levofloxacin, lincomycin, oxytetracycline, sulfamethazine, sulfamethoxazole, tetracycline, trimethoprim and tylosin) on the germination and development of lettuce (*Lactuca sativa*), alfalfa (*Medicago sativa*) and carrots (*Daucus carota*). These authors indicated a wide range of dangerous antibiotic concentrations, ranging from 3.9 µg/L levofloxacin for *L. sativa* to 10000 µg/L trimethoprim for *M. sativa* and *D. carota*, and emphasized that levofloxacin, chlortetracycline and tetracycline are the compounds with highest toxicity and that amoxicillin and trimethoprim are those with lowest toxicity. Reference [30] also evaluated the phytotoxic effects of some veterinary antibiotics (chloramphenicol, erythromycin, norfloxacin, sulfamethazine and tetracycline) on the seed germination and root elongation of lettuce (*L. sativa*), tomato (*Solanum lycopersicum*), carrots (*D. carota*) and cucumber (*C. sativus* L.). Their results showed that these compounds significantly inhibit the root elongation ( $p < 0.05$ ) of the four species studied, highlighting that tetracycline was associated with the highest level of toxicity and that lettuce was the most sensitive crop. Reference [31] studied the effect of five antibiotics (enrofloxacin, kanamycin, oxytetracycline, penicillin and tylosin) on the germination frequency and root elongation of five crops and found phytotoxic effects of 0.10 mg/L enrofloxacin on sorghum (*Sorghum bicolor*), 0.15 mg/L kanamycin on corn (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*), 0.004 mg/L penicillin on corn (*Z. mays*), soybean (*G. max*) and sorghum (*S. bicolor*) and 0.05 mg/L tylosin on soybean (*G. max*).

The purpose of this work was to study the phytotoxicity of five antibiotics (enrofloxacin, kanamycin, oxytetracycline, penicillin and tylosin) on the germination frequency and root elongation of three forage species frequently cultivated in Argentina: alfalfa (*Medicago sativa*), melilotus (*Melilotus albus*) and white clover (*Trifolium repens*).

### II. MATERIALS

#### A. Antibiotics

Representative drugs were selected from five groups of antibiotics: enrofloxacin (quinolones), kanamycin (aminoglycosides), oxytetracycline (tetracyclines), penicillin (beta-lactams) and tylosin (macrolides). To evaluate the possible phytotoxic effect of whey containing antibiotic residues

deproteinized whey was used. To this end whey was treated at 120°C for 20 minutes, followed by a removal of the precipitated proteins by filtration. Subsequently antibiotic aliquots at concentrations equivalent to their acceptable maximum residue limits (MRLs) in milk [32]-[33] were added as minimum study values (MRL<sub>enrofloxacin</sub>: 0.10 mg/L, MRL<sub>oxytetracycline</sub>: 0.10 mg/L, MRL<sub>kanamycin</sub>: 0.15 mg/L, MRL<sub>penicillin</sub>: 0.004 mg/L, MRL<sub>tylosin</sub>: 0.05 mg/L). Based on these levels, solutions containing the following concentrations of antibiotics were prepared using a logarithmic scale: C<sub>0</sub>= 0 MRL, C<sub>1</sub>= 1 MRL, C<sub>2</sub>= 10 MRLs, C<sub>3</sub>= 100 MRLs and C<sub>4</sub>= 1000 MRLs.

### B. Forage Seeds

Seeds from the following forage species were provided by the Department of Intensive Cultivation of Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, (Argentina): alfalfa (*M. sativa*), melilotus (*M. albus*) and white clover (*T. repens*).

### C. Phytotoxicity Studies

The standard protocol to perform toxicity tests on terrestrial plants was followed [4]-[29]-[34]. Seeds from the chosen species were stored for one month at 4°C. Subsequently, 900 experimental units of each species were selected according to the toxicity tests in the protocol for terrestrial plants [35]. For each seed and antibiotic concentration, five replicates were made in Petri plates (100 x 15 mm) using 25 Petri plates/antibiotic and seed. On each plate, 10 seeds were placed on a Whatman cellulose filter. Subsequently, 10 ml of each of the deproteinized whey solutions containing different levels of antibiotics (C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub>) was added.

The plates were covered with Parafilm M (Sigma-Aldrich) to avoid drying and incubated for seven days at 25°C in a chamber. According to the protocol for the control of germination, the criterion of acceptability was set at 70%.

## III. METHODS

### 1. Relative Germination Frequency.

For each seed and antibiotic concentration, relative germination frequencies were calculated at 12-hour intervals and over a period of seven days (14 controls). For this, the following Logistic Regression Model (LRM) of the statistical software Stat Graphics® Centurion was used:

$$Y_{ijk} = L_{ijk} \left[ \frac{P_{ijk}}{1-P_{ijk}} \right] = \gamma_0 + \gamma_{1i} t_i + \sum \gamma_{2j} W_j + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

Table 1: Statistical parameters of the effects of time and concentration of antibiotics on the germination frequency of seeds calculated using the logistic regression model

Antibiotic	Seeds	Time		Antibiotic concentration	
		$\chi^2$ valor	P valor	$\chi^2$ valor	Valor p
Enrofloxacin	<i>Medicago sativa</i>	433	0.0001	112	0.0001
	<i>Trifolium repens</i>	250	0.0001	65.0	0.0001
Kanamycin	<i>Medicago sativa</i>	19.2	0.0001	12.9	0.0003
	<i>Melilotus albus</i>	778	0.0001	6.24	0.0124
Oxytetracycline	<i>Medicago sativa</i>	252	0.0001	12.0	0.014
	<i>Melilotus albus</i>	777	0.0001	301	0.0001
	<i>Trifolium repens</i>	338	0.0001	5.53	0.0192

Copyright © 2017 IJAIR, All right reserved  
245

Where:  $Y_{ijk} = L_{ijk}$ : Logistic function=  $\ln [P_{ijk}/(1-P_{ijk})]$ ;  $P_{ijk}$ : Seed germination frequency (1- $P_{ijk}$ ): Absence of germination frequency;  $\gamma_0, \gamma_{1i}, \gamma_{2j}$ : Coefficients estimated by the logistic model;  $t_i$ : Effect of the germination time (i=14);  $W_j$ : Effect of antibiotic concentration in terms of dummy variables ( $W_0$ : C<sub>1</sub>=0, C<sub>2</sub>=0, C<sub>3</sub>=0 and C<sub>4</sub>=0;  $W_1$ : C<sub>1</sub>=1, C<sub>2</sub>=0, C<sub>3</sub>=0 and C<sub>4</sub>=0;  $W_2$ : C<sub>1</sub>=0, C<sub>2</sub>=1, C<sub>3</sub>=0 and C<sub>4</sub>=0;  $W_3$ : C<sub>1</sub>=0, C<sub>2</sub>=0, C<sub>3</sub>=1 and C<sub>4</sub>=0;  $W_4$ : C<sub>1</sub>=0, C<sub>2</sub>=0, C<sub>3</sub>=0 and C<sub>4</sub>=1) and  $\varepsilon_{ijk}$ : Residual error.

### II. Root Elongation.

Seven days after the start of the experiment, the lengths of each root were measured in duplicate. Measurements were made from the tip of the radicle to the hypocotyl, using a Vernier calliper with a precision sensitivity of 0.05 mm. Analysis of Variance (ANOVA, Stat Graphics® Centurion) was used to evaluate the effect of the different concentrations of antibiotics on root elongation. Then, the Tukey test was applied to analyze significant differences in each antibiotic concentration.

## IV. RESULTS AND DISCUSSION

### 1. Relative Germination Frequency.

Table 1 shows the statistical results (“ $\chi^2$ ” and “p” value) of the application of the logistic regression model for the different concentrations of antibiotics that significantly affected the germination frequencies of the seeds (p < 0.05). In that sense, enrofloxacin affected *Medicago sativa* and *T. repens*, whereas kanamycin inhibited *M. sativa* and *M. albus*. Oxytetracycline negatively affected the germination of the three forage species, whereas penicillin and tylosin were the most harmless ones.

Table 2 presents the significant effect (p < 0.05) of the time on the germination frequencies ( $\gamma_1$  positive coefficients) and the action of the different concentrations of antibiotics on the seeds ( $\gamma_2$  negative coefficients). The phytotoxicity of antibiotics was evidenced by the increase in the magnitude of the  $\gamma_2$  coefficients. Thus, the effect of enrofloxacin on *T. repens* was stronger ( $\gamma_2 = -2.4049$ ) than that of kanamycin on *M. albus* ( $\gamma_2 = -0.5021$ ).

Table 2: Logistic equations relating the germination frequency of seeds forage with time and concentrations of antibiotics

Antibiotic	Seeds	L= Y <sub>0</sub> + Y <sub>1</sub> t + Σ Y <sub>2</sub> W			C <sub>r</sub> %	
		Y <sub>0</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub> Concentration		
Enrofloxacin	<i>Medicago sativa</i>	-2.0385	0.914	- 1.2529	C <sub>1</sub> =C <sub>2</sub> =C <sub>3</sub> =C <sub>4</sub>	82
	<i>Trifolium repens</i>	-3.9283	1.1798	- 2.4049	C <sub>1</sub> =C <sub>2</sub> =C <sub>3</sub> =C <sub>4</sub>	78
Kanamycin	<i>Medicago sativa</i>	-1.2559	1.3593	- 1.3379	C <sub>4</sub>	75
	<i>Melilotus albus</i>	-1.7020	1.6749	- 0.5021	C <sub>1</sub> =C <sub>2</sub> =C <sub>3</sub> =C <sub>4</sub>	80
Oxytetracycline	<i>Medicago sativa</i>	-0.6633	0.9637	- 0.9481	C <sub>2</sub> =C <sub>3</sub> =C <sub>4</sub>	70
	<i>Melilotus albus</i>	-1.7802	0.7856	- 1.4885	C <sub>1</sub> =C <sub>2</sub> =C <sub>3</sub> =C <sub>4</sub>	79
	<i>Trifolium repens</i>	-3.6733	2.0077	- 0.9481	C <sub>1</sub> =C <sub>2</sub> =C <sub>3</sub> =C <sub>4</sub>	90

Y<sub>0</sub>, Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>= Coefficients estimated by the model. t= Test time. C<sub>r</sub>%= Percentage relative agreement.

C<sub>1</sub>= 1 MRL, C<sub>2</sub>= 10 MRL, C<sub>3</sub>= 100 MRL, C<sub>4</sub>=1000 MRL.

MRL<sub>enrofloxacin</sub>: 0.10 mg/L, MRL<sub>oxytetracycline</sub>: 0.10 mg/L, MRL<sub>kanamycin</sub>: 0.15 mg/L, MRL<sub>penicillin</sub>: 0.004 mg/L, MRL<sub>tylosin</sub>: 0.05 mg/L

Fig. 1 shows that low concentrations of enrofloxacin (0.10 mg/L) negatively affected the germination of *M. sativa* and *T. repens*. In contrast, higher concentrations of kanamycin (150 mg/L) were required to inhibit the germination of *M. albus* and *M. sativa* (Fig. 2). Fig. 3 shows that low concentrations of oxytetracycline (0.10 mg/L) affected *M. albus* and *T. repens*, whereas higher concentrations (1.0 mg/L) were necessary to inhibit *M. sativa* germination.

Fig. 4 shows photos illustrating the inhibitory effect of the antibiotics on the germination frequency of forage seeds. These show that a low concentration of enrofloxacin (0.1 mg/L) affected *M. sativa* (a: treated group and b: control group). A decrease in the number of germinated seeds compared to the control group (without antibiotic) was observed on day 2 (a: 2 vs. b: 4), day 4 (a: 6 vs. b: 8) and day 6 (a: 9 vs. b: 10) of the experiment.

The phytotoxic action of low concentrations of enrofloxacin (0.10 mg/L) on *M. sativa* and *T. repens* observed in this study is in agreement with that reported by [31], who evaluated the effect of this quinolone on the germination frequency of sunflower (*Helianthus annuus*). Whereas in the present study, penicillin and tylosin had no effect on any of the three forage species studied, these authors noted that low concentrations of penicillin

(0.004 mg/L) had a phytotoxic effect on *G. max* and *S. bicolor* and that 0.05 mg/L of tylosin had a phytotoxic effect on *S. bicolor*. Also, [16] indicated that a high concentration of tylosin (300 mg/L) affects the germination of rice (*O. sativa* L.) and cucumber (*C. sativus* L.). However, [29] observed no phytotoxic effect of tylosin (10 mg/L) on the germination of alfalfa (*M. sativa*), carrot (*D. carota*) or lettuce (*L. sativa*).

In summary, it can be established that concentrations of enrofloxacin (0.10 mg/L) and oxytetracycline (0.10 mg/L) equivalent to their MRLs cause phytotoxic effects on the germination frequency of the forage seeds studied.

### II. Root Elongation.

Table 3 shows the mean values, standard deviations and statistical parameters ("F" and "p" values) calculated with ANOVA for the antibiotics that presented phytotoxic effect (p <0.05) on the forage seeds studied. It also shows the significant differences obtained with the Tukey Test. This table shows that enrofloxacin and oxytetracycline significantly affected (p <0.05) the three forage species studied, whereas kanamycin inhibited *M. sativa* and *M. albus*, and that tylosin only affected *M. albus*. Penicillin was innocuous to all the forage seeds studied.

Table 3: Effect of antibiotic levels on whey on root lengths of forage seed measured at the seven day.

Antibiotic	Seeds	Concentration (MRL)					Valor "F"	Valor "p"
		0	MRL	10MRL	100MRL	1000MRL		
Enrofloxacin	<i>Medicago sativa</i>	5,1 <sub>a</sub> ± 0,2	3,5 <sub>b</sub> ± 0,3	3,8 <sub>b</sub> ± 0,2	4,5 <sub>b</sub> ± 0,2	4,2 <sub>b</sub> ± 0,2	18,67	0,0001
	<i>Melilotus albus</i>	7,2 <sub>a</sub> ± 0,2	5,0 <sub>b</sub> ± 0,3	3,0 <sub>c</sub> ± 0,3	2,9 <sub>c</sub> ± 0,4	3,4 <sub>c</sub> ± 0,3	45,98	0,0001
	<i>Trifolium repens</i>	4,7 <sub>a</sub> ± 0,3	1,7 <sub>b</sub> ± 0,4	1,3 <sub>b</sub> ± 0,4	0,9 <sub>b</sub> ± 0,3	1,8 <sub>b</sub> ± 0,3	22,76	0,0001
Kanamycin	<i>Medicago sativa</i>	5,4 <sub>a</sub> ± 0,2	5,1 <sub>a</sub> ± 0,2	4,7 <sub>a</sub> ± 0,2	4,4 <sub>a</sub> ± 0,2	3,4 <sub>b</sub> ± 0,2	17,59	0,0001
	<i>Melilotus albus</i>	5,9 <sub>a</sub> ± 0,4	6,1 <sub>a</sub> ± 0,4	5,7 <sub>a</sub> ± 0,4	5,2 <sub>a</sub> ± 0,4	2,9 <sub>b</sub> ± 0,5	6,84	0,0001
Oxytetracycline	<i>Medicago sativa</i>	2,8 <sub>a</sub> ± 0,1	2,6 <sub>a</sub> ± 0,1	2,2 <sub>b</sub> ± 0,1	1,0 <sub>c</sub> ± 0,1	1,1 <sub>c</sub> ± 0,1	52,33	0,0001
	<i>Melilotus albus</i>	4,4 <sub>a</sub> ± 0,2	4,3 <sub>a</sub> ± 0,2	3,1 <sub>b</sub> ± 0,2	2,2 <sub>c</sub> ± 0,2	1,7 <sub>c</sub> ± 0,3	30,27	0,0001
	<i>Trifolium repens</i>	4,0 <sub>a</sub> ± 0,3	3,6 <sub>a,b</sub> ± 0,2	2,9 <sub>b</sub> ± 0,2	1,2 <sub>c</sub> ± 0,2	1,1 <sub>c</sub> ± 0,2	28,80	0,0001
Tylosin	<i>Melilotus albus</i>	5,3 <sub>a</sub> ± 0,3	5,4 <sub>a</sub> ± 0,2	4,8 <sub>a</sub> ± 0,3	4,3 <sub>a,b</sub> ± 0,3	3,3 <sub>b</sub> ± 0,3	10,09	0,0001

a, b, c: Different subscripts for values of the same row indicate significant differences at a level of p <0.05.

MRL<sub>enrofloxacin</sub>: 0.10 mg/L, MRL<sub>oxytetracycline</sub>: 0.10 mg/L, MRL<sub>kanamycin</sub>: 0.15 mg/L, MRL<sub>penicillin</sub>: 0.004 mg/L, MRL<sub>tylosin</sub>: 0.05 mg/L

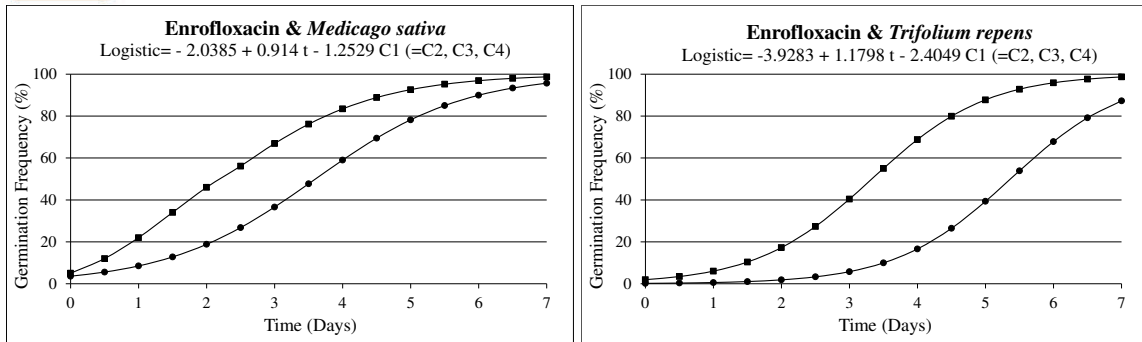


Fig. 1. Effect of different concentrations of enrofloxacin on the germination frequency of seeds tested (■: control; ●: C<sub>1</sub>= 0.10 mg/L, C<sub>2</sub>= 1.0 mg/L, C<sub>3</sub>= 10 mg/L y C<sub>4</sub>= 100 mg/L)

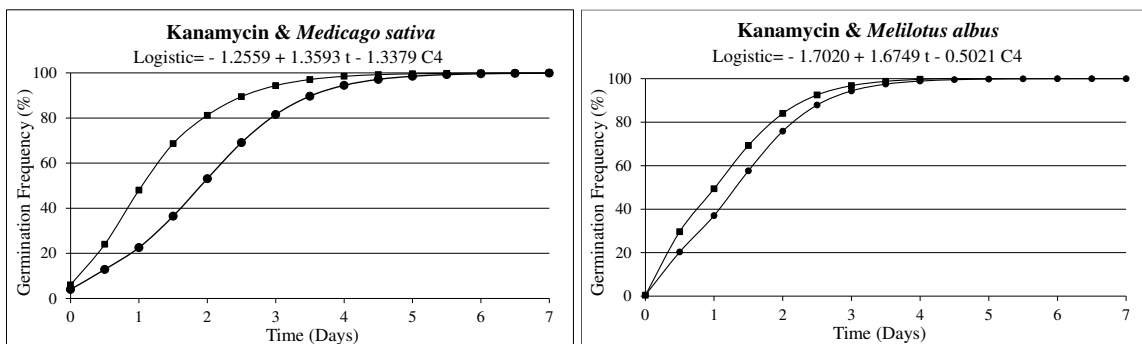


Fig. 2. Effect of different concentrations of kanamycin on the germination frequency of seeds tested (■: control; ●: C<sub>4</sub>= 150 mg/L)

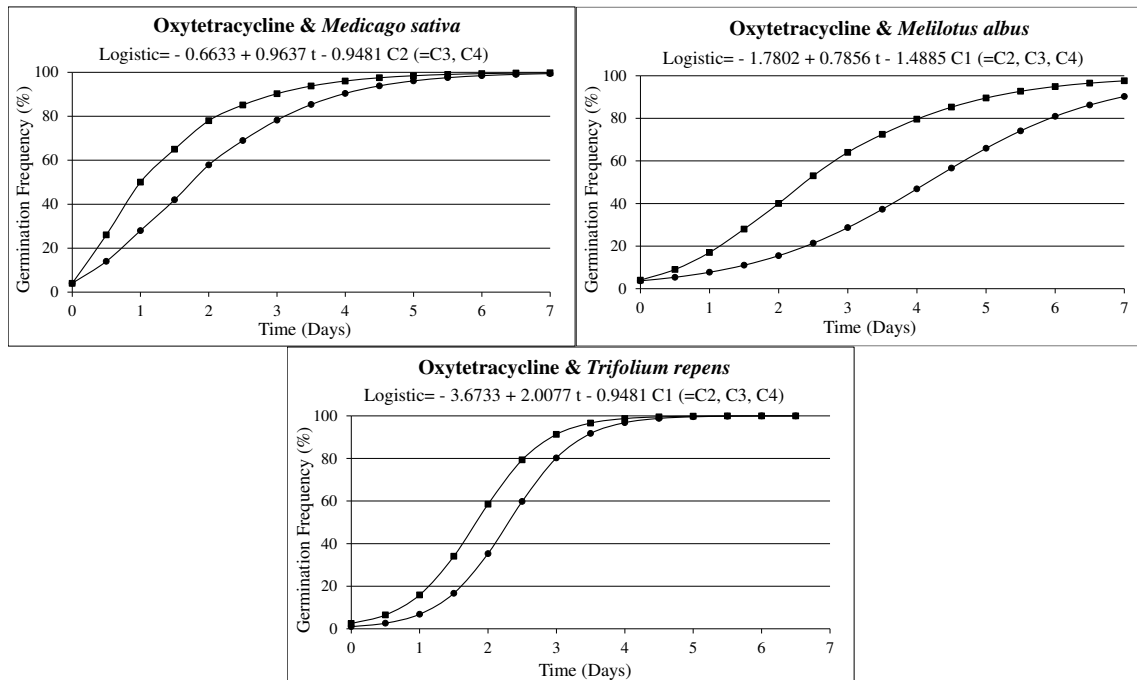


Fig. 3. Effect of different concentrations of oxytetracycline on the germination frequency of seeds tested (■: control; ●: C<sub>1</sub>= 0.10 mg/L, C<sub>2</sub>= 1.0 mg/L, C<sub>3</sub>= 10 mg/L y C<sub>4</sub>= 100 mg/L)

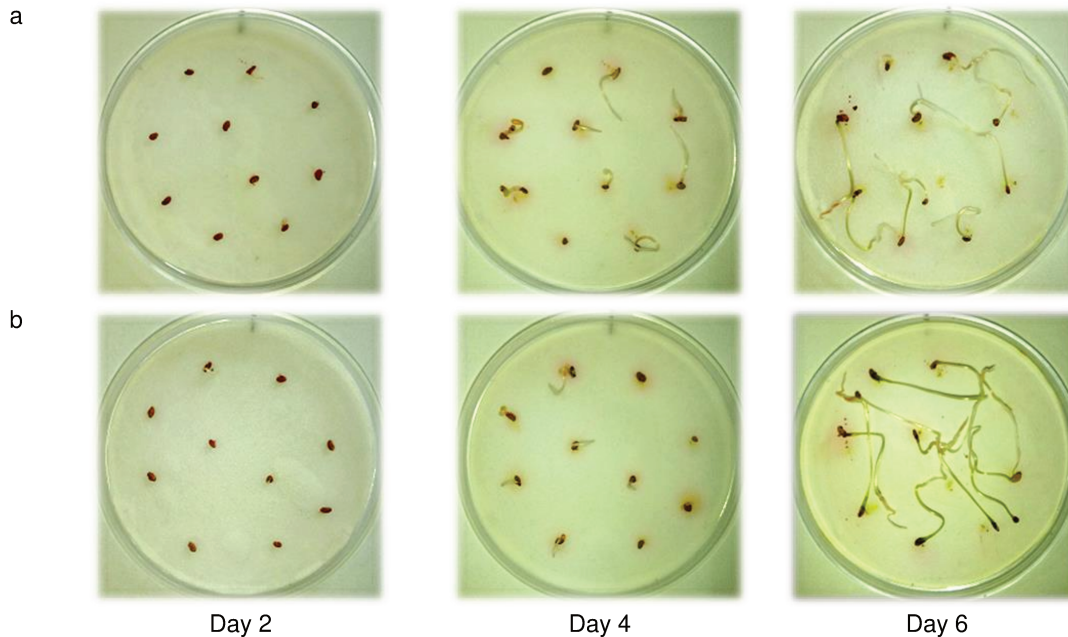


Fig. 4. Effect of 0.10 mg/L of enrofloxacin on the germination frequency of *Medicago sativa* seeds: (a) treated group, (b) control group

It is observed that 0.10 mg/L enrofloxacin and oxytetracycline (1.0 mg/L) affected the root lengths of the three forage seeds, but that higher concentrations of kanamycin (150 mg/L) were necessary to affect *M. albus* and *M. sativa*, similar to that observed in the germination frequency (Figures 1 and 2). In contrast, 50 mg/L of tylosin inhibited the elongation of *M. albus* roots, but did not impair their germination frequency. This can be attributed to the fact that root elongation represents a more sensitive variable than the germination frequency, according to [4].

Similarly, [31] indicated that a low concentration of enrofloxacin (0.10 mg/L) affects *S. bicolor*, kanamycin (0.15 mg/L) inhibits *G. max* and *Z. mays* and tylosin (0.05 mg/L) affect *G. max*. In contrast, these authors indicated that a low concentration of penicillin (0.004 mg/L) is detrimental to the roots of *G. max*, *S. bicolor* and *Z. mays*.

Reference [29] reported the phytotoxic effect of oxytetracycline on the root elongation of *M. sativa* (10 mg/L), *L. sativa* (4.8 mg/L) and *D. carota* (1.6 mg/L). These authors also mentioned that tylosin (10 mg/L) inhibited the root elongation of *L. sativa* and *M. sativa*.

The effect of low antibiotic concentrations on root elongation can be seen in Fig. 5, where the action of enrofloxacin (0.10 mg/L) on *M. sativa* appears on day 7 of the experiment. This figure shows the significant decrease in root length due to enrofloxacin (Fig. 5a) compared to untreated seeds (Fig. 5b).

In summary, 0.10 mg/L enrofloxacin (MRL) caused a delay in the root elongation of the three

forage species studied, with an average decrease of 60% in the length of *T. repens* roots, whereas higher concentrations of kanamycin (150 mg/L), oxytetracycline (1.0 mg/L) and tylosin (50 mg/L) were needed to produce effects on the roots of some forage seeds (Table 3). Similar to that observed in the study of germination frequencies, penicillin had no effect on the root elongation of any of the three forage species studied.

To avoid the environmental impact of these antibiotics, different technological alternatives tending to inactivate these molecules should be analyzed. For example, for the degradation of quinolone residues in water, [36] suggested solar photocatalytic processes. Another alternative for the degradation of antibiotic residues in milk is the use of thermal treatments. In fact, the sterilization process (120°C– 20 min) of milk contaminated with antibiotics causes a significant decrease in the antimicrobial activity of kanamycin [37], penicillin [38]-[39] and tylosin [40], but is not enough to inactivate enrofloxacin [41].

## V. CONCLUSIONS

The results presented in this work show that antibiotics cause a phytotoxic effect on forage seeds. In fact, concentrations equivalent to the maximum residue limits (MRLs) established for the dairy industry are harmful to crops. In this sense, 0.10 mg/L enrofloxacin (MRL) affected alfalfa (*Medicago sativa*), melilotus (*Melilotus albus*) and white clover (*Trifolium repens*), whereas 0.10 mg/L oxytetracycline (MRL) affected *M. sativa* and *T. repens*.



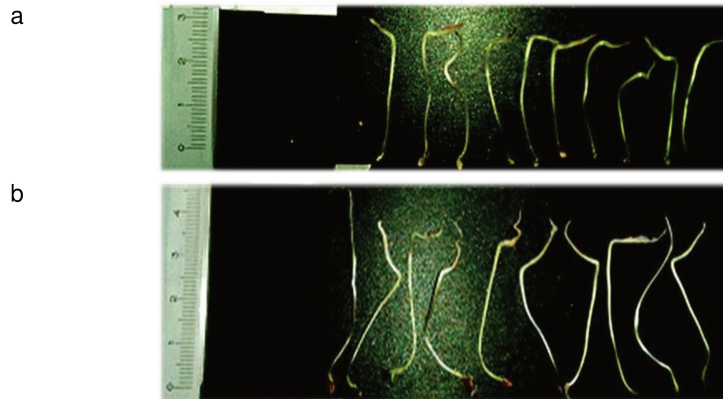


Fig. 5. Phytotoxicity of enrofloxacin (0.10 mg/L) on *Medicago sativa* root elongation after seven days of testing: (a) treated group, (b) control group

With the aim to expand these findings, other antibiotics should be evaluated. On the other hand, to find a suitable biosensor to evaluate the environmental impact of antibiotics, it would be interesting to continue these studies with other biomarkers such as bacteria (e.g. *Vibrio fischeri*), algae (e.g. *Chlorella vulgaris*) and invertebrates (e.g. *Daphnia magna*) or fish (e.g. *Salmo trutta*).

#### ACKNOWLEDGMENT

This research was carried out as part of the CAI+D'11 (50120110100052 LI, Res. 444 / 13- List II year 2013, Universidad Nacional del Litoral, Argentina). PICT 455-2012 (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) and Professor Horacio Imvinkelried, from the Department of Intensive Cultivation of Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, (Argentina), are also acknowledged.

#### REFERENCES

- [1] A. A. Sawant, L. M. Sordillo, B. M. Jayarao, 2005. A Survey on Antibiotic Usage in Dairy Herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*. 88, pp. 2991-2999
- [2] J. L. Martinez. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinant. *Environmental Pollution*. 157, pp 2893-2902
- [3] E. Topp, R. Chapman, M. Devers-Lamrani, A. Hartmann, R. Marti, F. Martin-Laurent, L. Sabourin, A. Scott, M. Sumarah. 2013. Accelerated Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-degrading sp. *Journal of environmental quality*. 42(1), pp. 173-178
- [4] K. Ghava, M. C. Rathod, D. A. Dhale. 2015. Effect of antibiotics on seed germination and root elongation of wheat. *International Journal Current Microbiology Applied Science*. 4(1), pp. 516-527.
- [5] J. C. Chee-Sanford, R. I. Aminov, I. J. Krapac, N. Garrigues-Jeanjean, R. I. Mackie. 2001. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, pp. 1494-1502
- [6] K. Kumar, S. C. Gupta, S. K. Baidoo, Y. Chander, J. C. Rosen. 2005a. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal Environmental Quality*. 34, pp. 2082-2083
- [7] K. Kumar, S. C. Gupta, Y. Cher, A. K. Singh. 2005b. Antibiotics in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy*. 87, pp. 1-54.
- [8] Pope, L., Boxall, A., Corsing, C., Halling-Sørensen, B., Tait, A., Topp, E. "Exposure assessment of veterinary medicines in terrestrial systems", in: *Veterinary medicines in the environment*, Crane, ABA. Boxall, K Barrett, Eds. CRC Press, New York, New York, 2009, pp. 129-153
- [9] R. L. Finley, P. Collignon., D. J. Larsson, S. A. McEwen, X. Z. Li, W. H. Gaze, R. Reid-Smith, M. Timinouni, D. W. Graham, Topp. 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases*, cit355.
- [10] G. N. Mc Cracken Foster. 1993. The effect of ivermectin on the invertebrate fauna associated with cow dung. *Environmental Toxicology Chemistry*, 12, pp. 73-84
- [11] Y. Chander, K. Kumar, M. L. Sagar, S. C. Goyalb Gupta. 2005. Antibacterial Activity of Soil-Bound Antibiotics. *Journal of Environmental Quality*. 34, pp. 1952-1957
- [12] S. Thiele-Bruhn. 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 166(2), pp. 145-167
- [13] C. Rojas, R. Orellana, E. Sotomayor. 2005. Phytotoxicity of extracts of organic residues and their effect on the rate of germination of radish and cucumber. Fitotoxicidad de extractos de residuos orgánicos y su efecto sobre el índice de germinación de rabanito y pepino. *Ciencia del Suelo Nutrición Vegetal*. 5(2), pp. 61-66
- [14] P. K. Jjemba. 2002a. The effect of chloroquine, quinacrine, and metronidazole on both soybean plants and soil microbiota. *Chemosphere*. 46, pp. 1019-1025
- [15] P. K. Jjemba. 2002b. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 93, pp. 267-278. F. Liu, G. G. Ying, R. Tao, J. L. Zhao, J. F. Yang, L. F. Zhao. 2009. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution*. 157(5), pp. 1636-1642

- [16] D. W. Kolpin, E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber, H. T. Buxton. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science Technology*. 36, pp. 1202–1211
- [17] A. B. A. Boxall, D. W. Kolpin, B. Halling-Sorensen, J. Tolls. 2003. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environmental Science Technology*. 37, pp. 286–294
- [18] A. B. A. Boxall, L. A. Fogg, P. A. Blackwell, P. Kay, E. J. Pemberton, A. Croxford. "Veterinary medicines in the environment", in: *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer New York, 2004, pp. 1-91
- [19] M. O. Aust, F. Godlinski, G. R. Travis, X. Y. Hao, T. A. McAllister, P. Leinweber, S. Thiele-Bruhn. 2008. Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environmental Pollution*. 156, pp. 1243–1251
- [20] S. M. Bowman, K. E. Drzewiecki, E. R. E. Mojica, A. M. Zielinski, A. Siegel, D. S. Aga, J. O. Berry. 2011. Toxicity and reductions in intracellular calcium levels following uptake of a tetracycline antibiotic in *Arabidopsis*. *Environmental science & technology*. 45(20), pp. 8958-8964
- [21] J. Pedersen, M. Yeager, I. Suffet. 2003. Xenobiotic organic compounds in runoff from fields irrigated with treated wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, pp. 1360-1372
- [22] D. Aga, S. R. Goldfish, P. Kulshrestha. 2003. Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes. *Analyst*. 128, pp. 658–662
- [23] A. L. Batt, D. D. Snow, D. S. Aga. 2006. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. *Chemosphere*. 64, pp.1963–1971
- [24] T. Zhang, B. Li. 2011. Occurrence, transformation, and fate of antibiotics in municipal waste water treatment plants. *Critical reviews in environmental science and Technology*. 41, pp. 951– 98
- [25] J. C. Corey. 1983. Management of soil systems for industrial wastes. *Chemical Mobility and Reactivity in Soil Systems*. pp. 257-262
- [26] A. T. Manneje, E. Dryson, C. Walls, D. McLean, F. McKenzie, M. Maule, N. Pearce. (2008). High risk occupations for non-Hodgkin's lymphoma in New Zealand: case-control study. *Occupational and Environmental Medicine*. 65 (5), pp. 354-363
- [27] M. Vidali. (2001). Bioremediation, an overview. *Pure and Applied Chemistry*. 73(7), pp. 1163-1172
- [28] D. G. Hillis, J. Fletcher, K. R. Solomon, P. K. Sibley. 2011. Effects of ten antibiotics on seed germination and root elongation in three plant species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 60, pp. 220–232
- [29] M. Pan, L. M. Chu. 2016. Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. *Ecotoxicology and environmental safety*. 126, pp. 228-237
- [30] D. Eluk, O. G. Nagel, J. Zimmermann, M. P. Molina, R. L. Althaus. 2016. Effect of antibiotics on the germination and root elongation of Argentine intensive crops. *International Journal of Environmental Research*. 10(4), pp. 471-480
- [31] European Community. Council Regulation N°37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*. 2009. 15, pp. 1-72
- [32] Codex Alimentarius. Codex committee on residues of veterinary drugs in foods. 9th session of the 30 August – 3 September 2010. Discussion paper on methods of analysis for residues of veterinary drugs in foods (CX/RVDF 10/19/6). Vermont, USA. [Online]. Available: [ftp://ftp.fao.org/codex/ccrvdf19/rv19\\_06e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/ccrvdf19/rv19_06e.pdf).
- [33] T. Mir-Mahmoodi, S. K. Golizadeh, N. Khalilqhdam, S. Yazdanseta. 2014. The effect of salicylic acid on rate germination and seedling establishment on rapeseed (*Brassica napus* L.). *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 2(6), pp. 1122-1125
- [34] ASTM. American Society for Testing Materials. Standard guide for conducting terrestrial plant toxicity tests. ASTM International, West Conshohocken, 2003, pp. 1534–15 54
- [35] C. Sirtori, A. Zapata, S. Malato, W. Gernjak, A. R. Fernández-Alba, A. Agüera. 2009. Solar photocatalytic treatment of quinolones: intermediates and toxicity evaluation. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 8 (5), pp. 644-651
- [36] M. A. Zorraquino, R. L. Althaus, M. Roca, M. P. Molina. 2009. Effect of heat treatments on aminoglycosides in milk. *Journal of Food Protection*. 72 (6), pp. 1338-1341
- [37] M. A. Zorraquino, M. Roca, N. Fernández, M. P. Molina, R. Althaus. 2008. Heat inactivation of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk. *Journal of Food Protection*. 71 (6), pp. 1193-1198
- [38] M. Roca, L. Villegas, M. L. Kortabitarte, R. L. Althaus, M. P. Molina. 2011. Effect of heat treatments on stability of  $\beta$ -lactams in milk. *Journal of Dairy Science*. 94 (3), pp. 1155-1164
- [39] M. A. Zorraquino, R. L. Althaus, M. Roca, M. P. Molina. 2011. Heat treatment effects on the antimicrobial activity of macrolide and lincosamide antibiotics in milk. *Journal of Food Protection*, 74(2), pp. 311-315
- [40] M. Roca, M. Castillo, P. Marti, R. L. Althaus, M. P. Molina. (2010). Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58(9), pp. 5427-5431

#### AUTHOR'S PROFILE

Eluk D. was born in La Paz, Bolivia (1975). In 2002 she graduated in Biotechnology (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral). She continued her studies and in 2007 she obtained a Master's degree in Food Sciences and Technology (Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral). She is currently a doctoral student in Veterinary Sciences of the Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional del Litoral). She is Professor of Physics and Chemistry in the Department of Basic Sciences of the Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional del Litoral). Among her publications, a recent article is stand out: Eluk, D., Nagel, O.G., Zimmermann, J., Molina, M.P., Althaus, R.L. 2016. Effect of antibiotics on the germination and root elongation of Argentine intensive crops. *International Journal of Environmental Research*. 10(4), 471-480. MSc. Eluk served as a jury in several theses to obtain a Degree in Nutrition at the University of Concepción del Uruguay. Among the prizes obtained by Eluk, is the 1st Prize of the contest "Thesis in 3 minutes" organized in 2015 by the Ministry of Science and Technology (National University of the Litoral), the mention obtained by a paper presented at the XVI Argentine Congress of Health and Environment in 2008 and the Postgraduate Scholarship obtained in 2014 to carry out her PhD studies.

### **Anexo 3**

Eluk D, Nagel O, Gagneten A, Reno U, Althaus R. 2021. Toxicity of fluoroquinolones on the cladoceran *Daphnia magna*. *Water Environ. Res.* 1–17. <http://doi.org/10.1002/wer.1631>.

## RESEARCH ARTICLE

# Toxicity of fluoroquinolones on the cladoceran *Daphnia magna*

Dafna Eluk<sup>1</sup>    Orlando Nagel<sup>1</sup>    Ana Gagneten<sup>2</sup>    Ulises Reno,<sup>2</sup>  
Rafael Althaus<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias,  
Universidad Nacional del Litoral,  
Argentina.

<sup>2</sup> Facultad de Humanidades y Ciencias.  
Universidad Nacional del Litoral,  
Argentina.

## Correspondence

Rafael Althaus, Facultad de Ciencias  
Veterinarias, Universidad Nacional del  
Litoral, Argentina. Kreder 2805 -  
(3080) Esperanza, Argentina.

## E-mail

ralthaus@fcv.unl.edu.ar

## Funding information

Agencia Nacional de Promocion  
Científica y Tecnológica, Grant/Award  
Number: PICT-2017-2841;  
Universidad Nacional del Litoral.

## Abstract

This study evaluates the acute and chronic toxicological effects of six fluoroquinolones on the mortality and growth of *Daphnia magna*. The NOECs calculated with the Multivariate Probit Regression Model for the chronic study were 56 µg/L ciprofloxacin, 63 µg/L enrofloxacin, 78 µg/L levofloxacin, 85 µg/L marbofloxacin, 69 µg/L norfloxacin and 141 µg/L ofloxacin. The Risk Quotients were determined using the Measure Environmental Concentrations reported in water sources from different countries. The risks were low and moderate in water samples from rivers and lakes, although concentrations of ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin reported in some countries can cause toxicological damage to *D. magna*. In addition, urban wastewater and hospital wastewater samples constitute a threat to *D. magna* (high and moderate risks), requiring the treatment of these wastewater.

## Practitioner points

The NOECs calculated with the multivariate Probit model for the six fluoroquinolonas are between 56 µg/L ciprofloxacin and 141 µg/L ofloxacin.

The levels of ciprofloxacin, norfloxacin, and ofloxacin in urban wastewater

and hospital wastewater produce moderate and high risks for *D. magna*.

Water and river samples from some countries containing ciprofloxacin, norfloxacin, and ofloxacin present high risks for *D. magna*

## KEYWORDS

chronic toxicity, *Daphnia magna*, fluoroquinolones, multivariate Probit model, risk

## INTRODUCTION

The antibiotics used for the treatment and prevention of diseases in animals represent an important source of environmental contamination. Many antimicrobials are not completely metabolized and are thus excreted through feces, urine and milk (NaVrátilová, 2008; Ghava et al., 2015; Ray et al., 2017).

In this regard, fluoroquinolones (FQs) were detected in river water in various countries, such as Argentina (Valdés et al., 2014; Teglia et al., 2019), Australia (Watkinson et al., 2009), China (Huang et al., 2020; Li et al., 2012; Lyu et al., 2020; Pan et al., 2020; Wei et al., 2012; Zheng et al., 2021; Zou et al., 2011), Finland (Vieno et al., 2006), France (Coetsier et al., 2009; Conley et al., 2008; Cui et al.,

Hong Kong (Minh et al., 2009), Ghana (Azanu et al. (2018), Iran (Mirzaei et al. (2018), Italy (Sturini et al. (2009), Kenia (Madikizela et al. (2017), South Africa (Agunbiade & Moodley, 2016), Romania (Chitescu et al., 2015), Spain (López-Serna et al., 2011), Sri Lanka (Guruge et al. (2019), USA (He et al., 2015), among others. Also, FQs molecules have been reported in lake surface water in various countries such as Brazil (Sodré et al., 2010), China (Tong et al., 2011), India (Rao et al., 2008), Italy (Sturini et al., 2009) and Vietnam (Duong et al., 2021).

The presence of these antibiotics in environmental water is due to use in both human (residential areas, hospitals) and veterinary (animal farms) applications (Van Doorslaer et al., 2014). In fact, FQs are present in urban wastewater (Blair et al., 2013; Dólar et al., 2012; Gracia-Lor et al., 2012; Jia et al., 2012; Li et al., 2013; Senta et al., 2013; Tewari et al., 2013; Verlicchi et al., 2012), hospital wastewater (Verlicchi et al., 2012; Watkinson et al.; 2009; Yang et al., 2011; Zorita et al., 2009), wastewater from livestock production (Lin et al., 2008) and aquaculture water (Minh et al., 2009; Xu et al., 2009).

The presence of these FQs in different water sources can affect diverse non-target species (Andrieu et al., 2015; Dalla Bona et al., 2015; 2016; Dionísio et al., 2020). Furthermore, although FQs are photodegraded by light (Knapp et al., 2005; Sturini et al., 2010), they may persist in soils (Li et al., 2011), and this persistence leads to their accumulation and slow desorption in aquatic environments (Picó & Andreu, 2007).

To evaluate the environmental impact of FQs, researchers have used different bioindicators of the zooplankton community (Carraschi et al., 2015; Midya et al., 2019), which are sensitive to environmental stress, abundant in nature, and have known biological cycles. Cladocerans represent an ideal group for the evaluation of toxicity at global level, due to their wide geographical distribution, ease of culture, high sensitivity to different xenobiotics, parthenogenetic reproduction and short life cycle. Among them, *Daphnia magna* is frequently used to study chemical substances in ecotoxicological tests (Regaldo et al., 2014b; Reno et al. 2014; 2016; 2018; Silva et al., 2015).

Because the toxicity mechanisms of FQs may be different in acute and chronic tests, ecotoxicological tests should include both short- and long-term lethality and sublethality studies (de Oliveira et al., 2016). Lethality studies by means of acute tests provide valuable information to determine the toxicity of the

compounds of interest, whereas sub-lethality studies by means of chronic tests allow obtaining information of greater ecological relevance. The latter include the analysis of survival, growth and fertility parameters of the bioindicator organisms. Thus, they are useful to predict imbalances in natural populations and long-term effects, since they provide information about the stability of a population and its potential ability to maintain itself over time in ecosystems (Wagner et al., 2017). In addition, multigenerational tests complement chronic toxicity studies, since low concentrations of antibiotics are evaluated during numerous life cycles (Kim et al., 2012; Dalla Bona et al., 2015).

With regard to FQs, previous studies have focused mainly on assessing the acute effects caused by ciprofloxacin (Dionísio et al., 2020; Halling-Sørensen et al., 2000; Martins et al., 2012; Robinson et al., 2005), enrofloxacin (Dalla Bona et al., 2015; Park & Choi, 2008) and levofloxacin (Robinson et al., 2005; Yamashita et al., 2006) in freshwater species. However, chronic tests with this type of molecules are less frequent (Dalla Bona et al., 2015, 2016; Dionísio et al., 2020; Park & Choi, 2008; Wolfe et al., 2015; Wollenberger et al., 2000; Yamashita et al., 2006).

Due to the wide use of FQs in human and veterinary applications, their low biodegradability in the environment (Parente et al., 2018; Riaz et al.; 2018), their high thermostability (Roca et al., 2010) and the scarce knowledge about their possible effects on non-target organisms, the aim of this work was to evaluate the acute and chronic toxicological effect of six FQs (ciprofloxacin, enrofloxacin, levofloxacin, marbofloxacin, norfloxacin and ofloxacin) by using *Daphnia magna* as a bioindicator.

## METHODOLOGY

### Quinolones

Six fluoroquinolones (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, supplementary material, Table 1S) were used: ciprofloxacin, enrofloxacin, levofloxacin, marbofloxacin, norfloxacin and ofloxacin. Stock solutions of FQs (10 g/L) were prepared in distilled water considering the % purity for the calculation. The final concentrations were achieved by making serial dilutions of the stock solution, considering a volume of the quinolone solution that does not exceed 1% of the final volume.

## Culture of test organism

### *Daphnia magna*

The guidelines of the protocol proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development OECD 202 (2004) were followed. For this, a stock culture of adult *D. magna* Straus 1820 females obtained from Laboratory of Ecotoxicology from the Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina (Gutierrez et al., 2012; Regalado et al., 2014a; Reno et al., 2015, 2016) was prepared in a synthetic culture medium composed of 2.4 g MgSO<sub>4</sub>, 3.84 g NaHCO<sub>3</sub>, 0.16 g KCl and 2.4 g CaSO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O in 20 L of Milli-Q water (APHA, 1998). The pH was adjusted to 7.5 by adding 1M NaOH. The media was aerated for at least 24 h and used to change the stock cultures weekly. The cultures were kept, under optimal culture conditions of temperature (20±2°C), photoperiod 16L:8D and density of groups (25 individuals/dm<sup>3</sup>). The dissolved oxygen had a concentration higher than 6 mg/L. For homogenization and standardization purposes, all the experiments were carried out with individuals <24 h old, born between the third and fifth brood Olkova (2021).

### *Chlorella vulgaris*

*C. vulgaris* (CLV2, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California, CISECE, México) was cultivated in 2 L bottles, under sterile conditions, using Bold Basal Medium (BBM). The culture was maintained under constant conditions: continuous aeration, agitation (100 rpm), light intensity (8000 lux), temperature 24±1°C, pH (6.5) and conductivity of the medium (1.4 mS/cm). Subsequently, the suspension was centrifuged (500 rpm for 7 min) to eliminate the saline medium and resuspended in culture of *D. magna* to obtain a working stock concentration with a density of algae of 1.02 x 10<sup>6</sup> cells/mL measured directly in a Neubauer chamber and indirectly, by spectrophotometry (absorbance=1.5, λ=650 nm) (Regalado et al., 2014a; Reno et al., 2014, 2018).

## Ecotoxicity tests

### Acute toxicity tests (48 hours)

Acute toxicity tests were performed in accordance with the OECD 202 (2004) working protocol. Neonates <24h (5 neonates per replicate, 4 replicates per concentration) were exposed to eight FQ concentrations (0, 0.1, 1.0, 5.0, 10, 25, 50 and 100 mg/L) in conditions identical to those of the stock culture. The range of concentrations used

was chose based on preliminary tests not reported here. No food was added and the solutions were not renewed during the tests. During the tests, the dissolved oxygen concentration and pH were kept within the limits established by OECD 202 (2004). At 48 hours, the number of immobilized organisms, recognized by the lack of mobility when the containers were shaken in a circular manner for 10 seconds was recorded. The results were considered acceptable for mortalities ≤10% in the control groups. The sensitivity of cladocerans to FQs was expressed as the concentration (g/L) in which lack of mobility was observed for 50% of the organisms after 48 h of exposure (48 h EC<sub>50</sub>). These values were calculated with the Probit method, with a confidence level of 95% (Finney, 1971).

### Chronic toxicity tests (21 days)

The OECD 211 (2012) working protocol for chronic toxicity tests was applied with neonates (<24h) of *D. magna* for 21 days. The highest concentration used (C<sub>1</sub>) for each FQ was 50% of the Effective Concentration at 48 hours of exposure (48 h EC<sub>50</sub>) obtained in the acute tests (Table 1). The successive concentrations were obtained by performing 50% dilutions until obtaining results acceptable for mortalities ≤ 10% in the control groups (OECD 211, 2012) as shown in Table 2. The neonates were transferred to glass containers containing 30 mL of fortified synthetic medium (culture of *D. magna*) with different concentrations of FQs (Table 2). For each FQ concentration, 10 neonates were used. Thus, a total of 80-100 neonates were used according to the molecule tested. Three times a week *D. magna* were feeding with *C. vulgaris*, just after the exposure solutions were renewed. The values of pH and dissolved oxygen remained within the ranges proposed by OECD 211 (2012). Data of mortality and growth were recorded. Mortality was recognized by the lack of mobility when the containers were shaken in a circular manner for 10 seconds, while growth was determined by counting the number of molts of each cladoceran.

**Table 1** Effective concentration (mg/L) that produces 10, 50 and 90% mortality in the acute toxicity study at 48 hours with fluoroquinolones with *D. magna* (n=4).

Fluoroquinolones	48 h	48 h	48 h
	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>
<b>Ciprofloxacin</b>	0.7	7.2	81.7
<b>Enrofloxacin</b>	0.4	7.9	166.6
<b>Levofloxacin</b>	1.0	19.5	387.1
<b>Marbofloxacin</b>	0.3	5.4	100.3
<b>Norfloxacin</b>	0.5	8.7	140.8
<b>Ofloxacin</b>	4.8	36.0	250.8

**Table 2** Concentrations tested (mg/L) for each antibiotic in chronic tests.

Chronic Tests	C <sub>Control</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>
Ciprofloxacin	0	3.600	1.800	0.900	0.450	0.225	0.113	0.056		
Enrofloxacin	0	4.000	2.000	1.000	0.500	0.250	0.125	0.063		
Levofloxacin	0	10.000	5.000	2.500	1.250	0.625	0.313	0.156	0.078	
Marbofloxacin	0	2.700	1.350	0.675	0.338	0.170	0.085			
Norfloxacin	0	4.400	2.200	1.100	0.550	0.275	0.138	0.069		
Ofloxacin	0	18.000	9.000	4.500	2.250	1.125	0.563	0.281	0.141	0.070

**Statistical analysis of the data**

**Acute toxicity tests (48 hours)**

For each FQ, the 48 h EC<sub>50</sub> was calculated by the Probit method, with a confidence level of 95% (Mala & Dutta, 2019).

**Chronic toxicity tests (21 days)**

In a first stage, the relative mortality and relative cumulative growth of *D. magna* were calculated during the 21 days of the test, for each concentration of FQ.

To evaluate the chronic effect of the low concentrations of FQs for a period of time, the Probit analysis with interaction was used. The interaction term allowed determining (p<0.05) the magnitude of this chronic effect. This model allows analyzing the effect that produces low concentrations of FQs during prolonged exposure periods. The statistical analysis was performed using the stepwise option of the Multivariate Probit Regression Model contained in the statistical program StatGraphics® Centurion, according to the following equation:

$$Y_{ijk} = \Phi^{-1}(P_{ijk}) = \beta_0 + \beta_1 * t_i + \beta_2 * FQ_j + \beta_{12} * FQ_j * t_i + \varepsilon_{ijk} \tag{Eq. 1}$$

where: Y<sub>ijk</sub>= Probit Model,  $\Phi^{-1}(P_{ijk})$ : Inverse of the Cumulative Normal Distribution Function; P<sub>ijk</sub>: Probability of mortality (M) or cumulative growth (G) according to the case.  $\beta_0$ : intercept;  $\beta_1, \beta_2, \beta_{12}$ : coefficients estimated by the Probit model; t<sub>i</sub>: test time effect (i=8: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 days); FQ<sub>j</sub>: effect of the FQ concentration (mg/L) (j= 7, 8, 9 or 10 according to Table 2), FQ<sub>j</sub> \* t<sub>i</sub>: interaction between FQ concentration (mg/L) an test time and  $\varepsilon_{ijk}$ : residual error of the model.

Subsequently, the NOEC (No Observed Effect Concentration) was calculated for each FQs as the highest concentration tested at which the curves analyzed with the Multivariate Model Probit shows no significant (p<0.05) for each registered parameter (mortality or growth).

**Risk Quotient**

The Risk Quotient (RQ) for each FQ was calculated by dividing the Measured Environmental Concentrations (MEC) by the Predicted Not Effect Concentrations (PNEC) for *Daphnia magna* using follow equation

$$RQ = \frac{MEC}{PNEC} \tag{Eq. 2}$$

Risks were calculated for different MEC values reported in the literature for various surface water sources, while the PNEC was calculated for each quinolone by dividing the NOEC by an Assessment Factor AF= 1000 for acute toxicity test (VICH, 2004) or AF= 100 for chronic toxicity tests (EMEA, 2003).

**RESULTS**

**Acute toxicity tests (48 hours)**

Table 1 shows the values of the effective concentrations of each FQ that caused 10% (48 h EC<sub>10</sub>), 50% (48 h EC<sub>50</sub>) and 90% (48 h EC<sub>90</sub>) of mortality at 48 hours of exposure, estimated by the Probit method. The following order of toxicity was observed (48 h EC<sub>50</sub>): marbofloxacin (5.4 mg/L) > ciprofloxacin (7.2 mg/L) > enrofloxacin (7.9 mg/L)>norfloxacin (8.7 mg/L) > levofloxacin (19.5 mg/L) > ofloxacin (36.0 mg/L).

**Chronic toxicity tests (21 days)**

These studies included the evaluation of mortality and growth.

Table 3 shows the Probit equations that represent the effects of FQs on life attributes of *D. magna* (relative cumulative mortality and relative cumulative growth) for those effects that were significant ( $p < 0.05$ ). The adjustments obtained through the Probit Model with interaction (Eq.1) were good, because the regression coefficients are included between  $R = 0.955$  (effect of levofloxacin on growth) and  $R = 0.879$  (effect of marbofloxacin on mortality), indicating the adequacy of this Probit Multivariate Regression Model.

This table indicates a positive effect of the exposure time ( $\beta_1 > 0$ ) on the development of the cladocerans, since the number of organisms increases according to the exposure time. In addition, the effect of the concentration of these FQs ( $\beta_2$ ) was not significant ( $p > 0.05$ ) for both life attributes. This is because the successive dilutions used in this study were lower than the concentrations used in the acute tests (concentrations lower than 48 h  $EC_{50}$ ). Nevertheless, the chronic effect of FQs ( $p < 0.05$ ) was evidenced by their interaction with time (FQ \* t) for both mortality and growth.

In fact, the inhibitory action of FQs was visualized by increasing mortality to the extent that *D. magna* was exposed to low concentrations of FQs for prolonged periods ( $\beta_{12,M} > 0$ ). The sum of this positive interaction in the Probit model produces an increase in the relative cumulative mortality of *D. magna*. In contrast, the  $\beta_{12,G}$  coefficient of growth is negative ( $\beta_{12,G} < 0$ ). This negative interaction of the model produces a decrease in the relative cumulative frequency with respect to the control group. Because the coefficients  $\beta_{12,M}$  are greater than the values of  $\beta_{12,G}$ , the mortality is a

better attribute than growth since it shows greater sensitivity to FQs during prolonged periods of time (chronic toxicity study).

It should be noted that the magnitude of parameter " $\beta_{12,M}$ " indicates the ecotoxicity of the FQs at long times. This coefficient is higher for enrofloxacin ( $\beta_{12,M} = 0.1743$ ), followed by marbofloxacin ( $\beta_{12,M} = 0.1283$ ), ciprofloxacin ( $\beta_{12,M} = 0.1054$ ), norfloxacin ( $\beta_{12,M} = 0.0435$ ), levofloxacin ( $\beta_{12,M} = 0.0427$ ) and ofloxacin ( $\beta_{12,M} = 0.0341$ ), as observed in Table 3.

To visualize these significant effects, Figure 1 (relative mortality) and Figure 2 (cumulative growth) were made. These figures show the significant effects ( $p < 0.05$ , Table 3) of the FQs on life history attributes of *D. magna* exposed to different concentrations using the Probit Multivariate Regression Model. It is observed in Figure 1 that the presence of FQs caused a significant increase in mortality with respect to the control ( $p < 0.05$ ), in a synergistic manner with the FQs concentration and the time of exposure to them.

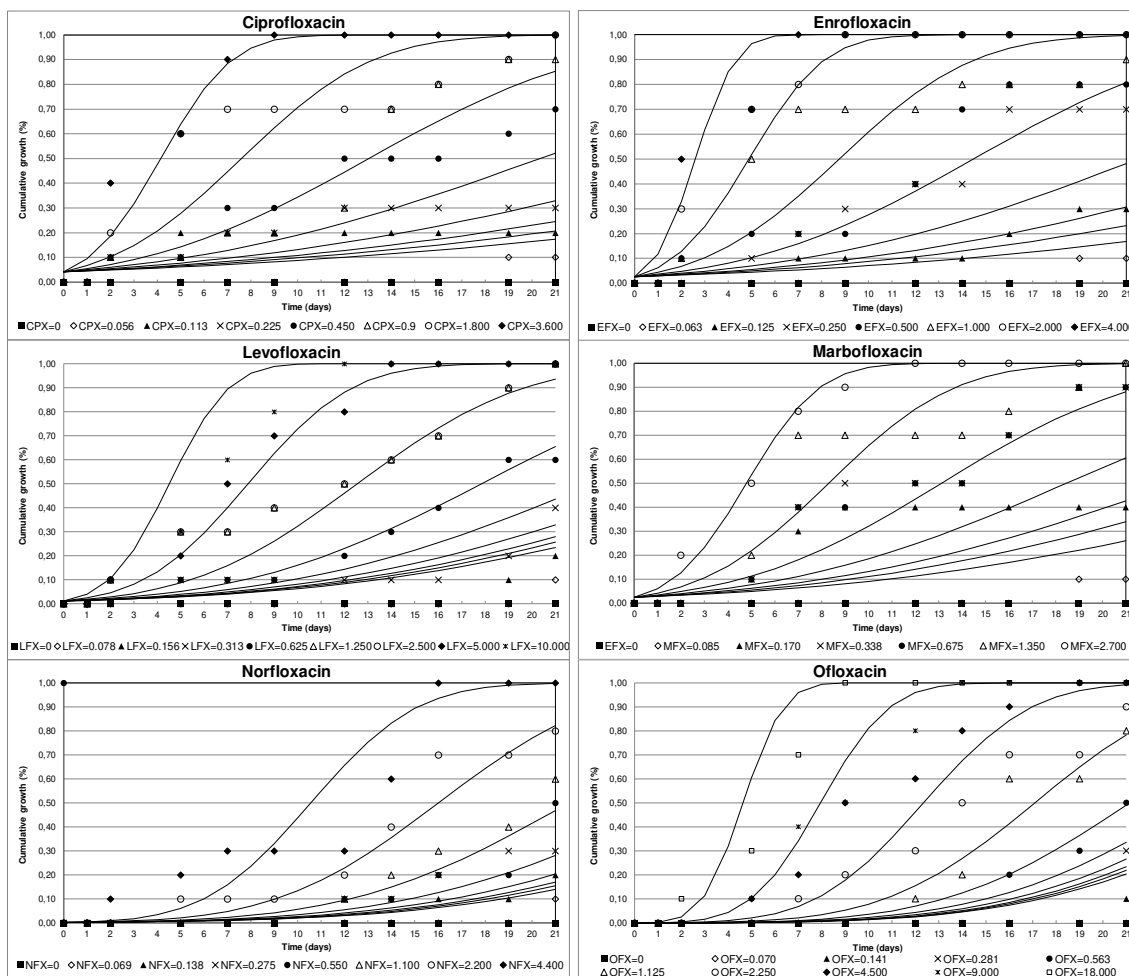
Regarding the growth of cladocerans, Figure 2 shows a decrease in the cumulative frequency of molts with increasing time and co-concentration of FQs. It should be noted that low concentrations of FQs produce a small effect on the cumulative growth frequencies due to  $\beta_{12,G} < 0$ . In contrast, the cumulative mortality frequency curves show small increases in CF concentrations due to  $\beta_{12,M} > 0$ . Therefore, the mortality curves are more sensitive than the growth curves. Thus, the NOEC values were calculated using the mortality curves determined in the chronic study.

**Table 3** Probit Model equations expressing the cumulative relative mortality and the cumulative relative growth (number of molts) of *D. magna* exposed to six fluoroquinolones.

Mortality	Probit= $\beta_{0,M} + \beta_{1,M} * t + \beta_{12,M} * t * FQ$	R
Ciprofloxacin	Probit= -1.7269 + 0.0375*t + 0.1054*t*FQ	0.908
Enrofloxacin	Probit= -1.9287 + 0.0461*t + 0.1743*t*FQ	0.922
Levofloxacin	Probit= -2.2581 + 0.0731*t + 0.0427*t*FQ	0.898
Marbofloxacin	Probit= -1.9555 + 0.0626*t + 0.1283*t*FQ	0.879
Norfloxacin	Probit= -2.9676 + 0.0897*t + 0.0435*t*FQ	0.927
Ofloxacin	Probit= -3.4177 + 0.1234*t + 0.0341*t*FQ	0.937
Growth	Probit= $\beta_{0,G} + \beta_{1,G} * t + \beta_{12,G} * t * FQ$	R
Ciprofloxacin	Probit= -1.6741 + 0.1481*t - 0.0298*t*FQ	0.950
Enrofloxacin	Probit= -1.7217 + 0.1315*t - 0.0333*t*FQ	0.942
Levofloxacin	Probit= -1.6930 + 0.1784*t - 0.0093*t*FQ	0.955
Marbofloxacin	Probit= -1.6017 + 0.1426*t - 0.0266*t*FQ	0.924
Norfloxacin	Probit= -1.6707 + 0.1773*t - 0.0137*t*FQ	0.951
Ofloxacin	Probit= -1.6115 + 0.1484*t - 0.0014*t*FQ	0.945

$\beta_0$ : intercept;  $\beta_1$ ,  $\beta_{12}$ : coefficients estimated; t: test time (days); FQ: Fluoroquinolone concentration (mg/L); t\*FQ\*: interaction between test time and FQ concentration; M: mortality; G: cumulative growth; R: regression coefficients.





**Figure 1** Relative mortality of *D. magna* due to the presence of six fluoroquinolones at different concentrations (mg/L)

The NOEC parameters were calculated applying the Probit Model equations (Eq. 1, Table 3) as the concentrations that do not produce significant differences ( $p > 0.05$ ) for ciprofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, norfloxacin ( $\chi^2 = 2.8946$ ;  $p = 0.0889$ ) and levofloxacin, ofloxacin ( $\chi^2 = 1.4361$ ;  $p = 0.2308$ ), as shown in Table 4.

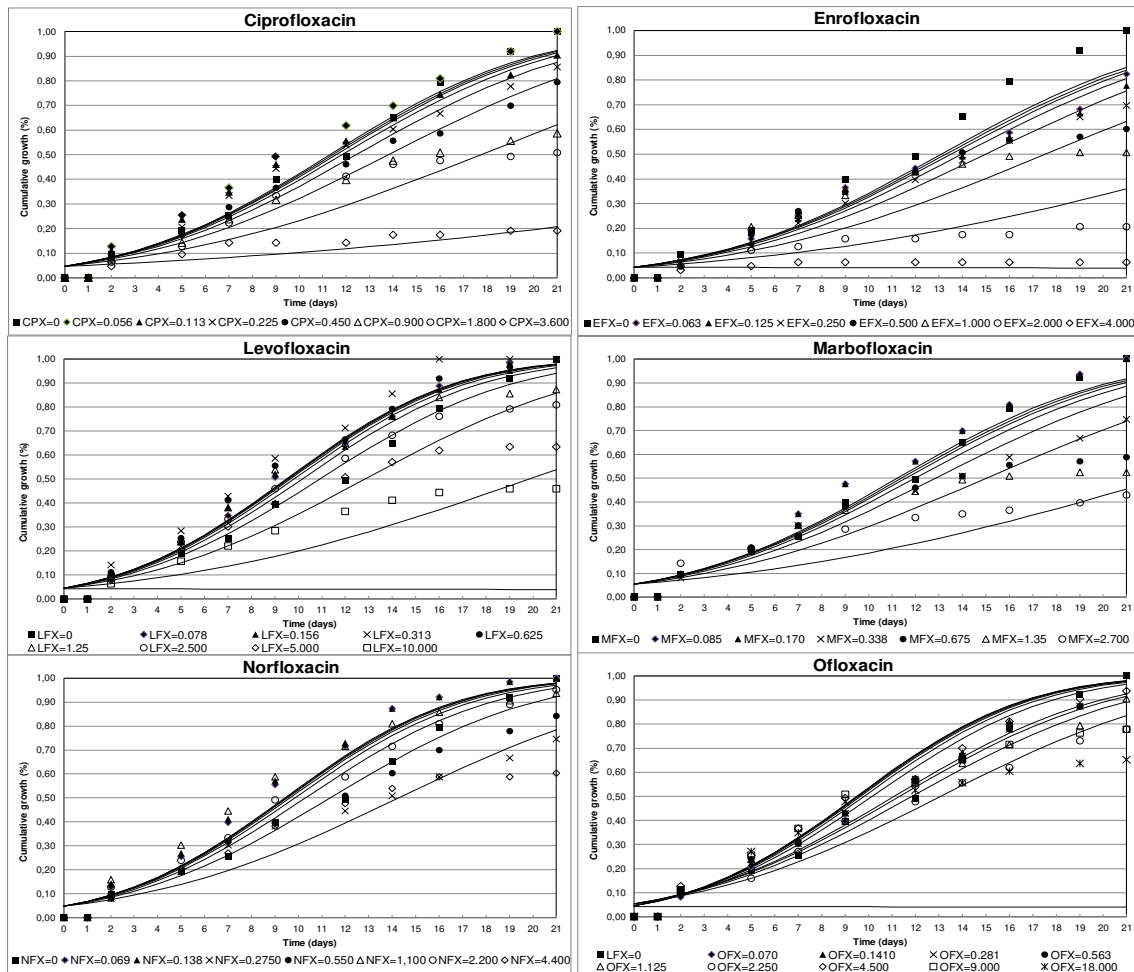
PNEC values were calculated in the acute (48 h  $EC_{50}$ ,  $FA = 1000$ ) and chronic (NOEC,  $FA = 100$ ) tests for ciprofloxacin (7.2  $\mu\text{g/L}$  vs. 0.56  $\mu\text{g/L}$ ), enrofloxacin (7.9  $\mu\text{g/L}$  vs. 0.63  $\mu\text{g/L}$ ), levofloxacin (19.5  $\mu\text{g/L}$  vs. 0.78  $\mu\text{g/L}$ ), marbofloxacin (5.4  $\mu\text{g/L}$  vs. 0.85  $\mu\text{g/L}$ ), norfloxacin (8.7  $\mu\text{g/L}$  vs. 0.69  $\mu\text{g/L}$ ) and ofloxacin (36  $\mu\text{g/L}$  vs. 1.41  $\mu\text{g/L}$ ), respectively.

Therefore, the Risk Quotients were calculated in water samples from different sources using the PNECs from chronic tests because they were lower than the values from acute tests.

## DISCUSSION

### Acute toxicity tests (48 hours)

The values of 48 h  $EC_{50}$  (Table 1) calculated in this study for the acute toxicity tests of ciprofloxacin (7.2 mg/L) and enrofloxacin (7.9 mg/L) were lower than those reported by other authors. For example, for ciprofloxacin, Dionísio et al. (2020) report 48 h  $EC_{50}$  values of 36.49 mg/L, while Dalla Bona et al. (2016) accounts an even higher value of 87.14 mg/L for ciprofloxacin and 16.34 mg/L for enrofloxacin. Similarly, Park & Choi (2008) reported high 48 h  $EC_{50}$  values of 56.7 mg/L for enrofloxacin. In contrast, for levofloxacin, Yamashita et al. (2006) reported a lower value (0.34 mg/L) than that calculated in this work (19.5 mg/L). Finally, Robinson et al. (2005) informed 48 h NOEC for 10 mg/L of ciprofloxacin and 10 mg/L of levofloxacin.



**Figure 2** Relative cumulative growth (number of accumulated molts) of *D. magna* due to the presence of six fluoroquinolones at different concentrations (mg/L).

whereas Halling-Sørensen et al. (2000) also showed no toxic effect when testing 60 mg/L of ciprofloxacin

These differences in 48 h  $EC_{50}$  can be attributed to experimental factors such as food, temperature, photoperiod, light intensity, composition of the medium and water hardness, among others; since they influence the results of the bioassay (de Oliveira et al., 2015).

The toxicity of FQs on *D. magna* is due to the inhibition of the eukaryotic topoisomerase II enzyme that participates in the cellular replication of this cladocero (Hooper & Jacoby, 2016). In this regard, Nunes et al. (2018) demonstrated that concentrations of 0.013 mg/L of ciprofloxacin induce genotoxic effects on *D. magna*.

Furthermore, FQs can change the conformation of binding sites of acetylcholine receptors (Gregory et al., 2007) and allow the accumulation of these neurotransmitters in the synaptic cleft, causing an increase in the activity of the cholinesterase enzyme.

Fluoroquinolones may change or block the conformation of binding sites of acetylcholine receptors (Gregory et al., 2007), allowing acetylcholine to accumulate in the synaptic cleft and consequently resulting in an increase of cholinesterase activity (Andrieu et al., 2015). In addition, Dionisio et al. (2020) report an increase in cholinesterase activity due to the exposure of *D. magna* to 36.493 mg/L of ciprofloxacin.

Moreover, high concentrations of ciprofloxacin (mg/L) can cause oxidative stress due to an increase in the activity of the enzyme catalase and subsequently increase the susceptibility to FQs due to the formation of reactive oxygen species (Nunes et al., 2018).

### Chronic toxicity tests (21 days)

Only few studies have evaluated the chronic toxicity of some FQs molecules (ciprofloxacin, enrofloxacin and levofloxacin) on *D. magna*. In this regard, it should be mentioned that the

value found for ciprofloxacin (NOEC/21-d= 0.056 mg/L) was similar a 0.054 mg/L reported Wolfe et al. (2015). With respect to enrofloxacin, the concentration that caused NOEC/21-d (0.063 mg/L) in this work was lower than that reported by Park & Choi (2008) (11.5 mg/L) and that found by Dalla Bona et al. (2015) (13 mg/L) for 100% mortality. The NOEC/21-d value of levofloxacin (0.156 mg/L) is between 0.059 mg/L (Wolfe et al., 2015) and 0.340 mg/L (Yamashita et al., 2006).

In addition, Dionisio et al. (2020) highlighted that low levels of ciprofloxacin (0.0125-0.0625 mg/L) produced damage to the neuronal membrane due to an increase in Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) in a chronic study (21 days) of *D. magna*. Similarly, Nunes et al. (2018) report an increase in TBARS levels in adults exposed to 0.078 mg/L of ciprofloxacin (concentration in the range 0.056-3,600 mg/L, Table 2) causing a decrease in the antioxidant defence of *D. magna*.

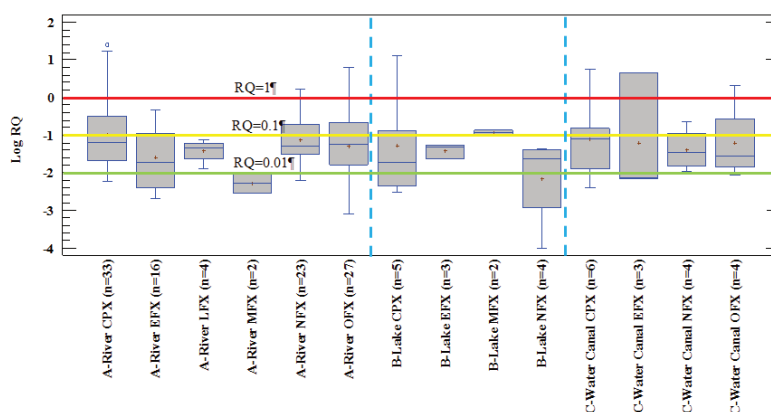
For the other three FQs analyzed, the NOECs (Table 4) calculated for marbofloxacin (0.085 mg/L) and norfloxacin (0.069 mg/L) were similar to those obtained for enrofloxacin (0.063 mg/L), ciprofloxacin (0.056 mg/L) and levofloxacin (0.078 mg/L), with the exception of ofloxacin which presented a higher NOEC (0.141 mg/L). It should be noted that NOEC values for these three FQs were not found in the consulted bibliography.

### Risk Quotient (RQ)

In order to evaluate the risks that FQs present on *D. magna*, the Risk Quotient (RQ) were determined using the PNEC of the six FQs analyzed (Table 4) and the Measured Environmental Concentrations (MEC) reported for 51 river, 6 water canal and 6 lake samples. Figure 3 show the BoxPlots of the logarithmic transformations of the RQs (Log RQs) for river, lakes and channels water. In this Figure, three risk zones are observed: High Risks with  $RQ > 1$  ( $\text{Log RQ} > 0$ ), Moderate Risks with  $0.1 < RQ < 1$  ( $-1 < \text{Log RQ} < 0$ ) and Low Risks with  $RQ < 0.1$  ( $\text{Log RQ} < -1$ ).

The RQs for *D. magna* calculated for concentrations of FQs present in river water samples (Figure 3) have ranges from 0.06-25.53 for ciprofloxacin (with 6 samples of  $RQ > 1$ ), 0.02-0.48 for enrofloxacin, 0.003-0.010 for marbofloxacin, 0.01-0.05 for levofloxacin, 0.06-1.67 for norfloxacin (with 1 sample of  $RQ > 1$ ) and 0.01-6.22 for ofloxacin (with 1 sample of  $RQ > 1$ ). In general, these samples present moderate and low risks for *D. magna*, since 50% of the risks are between  $\text{Log RQ} = -2$  ( $RQ = 0.01$ ) and  $\text{Log RQ} = -1$  ( $RQ = 0.1$ ).

**Figure 3** Boxplots of Logarithmic transformation of Risk Quotient (Log RQ) of six fluoroquinolones in River, Lake and Water Canal



CPX: ciprofloxacin, EFX: enrofloxacin, LFX: levofloxacin, MFX: marbofloxacin, NFX: norfloxacin, OFX: ofloxacin, n: number of samples containing each FQs, RQ: Risk Quotient.

Data obtained from:

**River:** Agunbiade & Moodley (2016), Azanu et al. (2018), Chitescu et al. (2015), Christian et al. (2003), Coetsier et al. (2009), Conley et al. (2008), Costanzo et al. (2005), Dinh et al. (2011), Feitosa-Felizzola & Chiron (2009), García-Galán et al. (2011), Ginebreda et al. (2010), Golet et al. (2009), Gros et al. (2010), Gulkowska et al. (2007), Guruge et al. (2019), Hanna et al. (2018), Huang et al. (2019), Huang et al. (2020), Li et al. (2012), López-Roldán et al. (2010), López-Serna et al. (2011), Luo et al. (2011), Lyu et al. (2020), Madikizela et al. (2017), Minh et al. (2009), Mirzaei et al. (2018), Olaitan et al. (2014), Pena et al. (2007), Rao et al. (2008), Sturini et al. (2009), Tamtam et al. (2008), Teglia et al. (2019), Tong et al. (2011), Valcárcel et al. (2011), Valdés et al. (2014), Vieno et al. (2006), Vulliet & Cren-Olivé (2011), Watkinson et al. (2009), Wei et al. (2012), Wolfe et al. (2015), Xiao et al. (2008), Xu et al. (2007b), Xu et al. (2020), Yan et al. (2010), Yang et al. (2011), Yao et al. (2017), Zang et al. (2012), Zheng et al. (2021), Zou et al. (2011) and Zuccato et al. (2005).

**Lake:** Sodré et al. (2010), Duong et al. (2021), Fick et al. (2009), Rao et al. (2008), Sturini et al. (2009) and Tong et al. (2011).

**Water Canal:** Golet et al. (2002), Li et al. (2012), Tewari et al. (2013), Tran et al. (2019), Vazquez-Roig et al. (2012) and Yan et al. (2010).

It should be noted that, ciprofloxacin presents high risks in six river waters (18.2%) from Australia (Watkinson et al., 2009), France (Feitosa-Felizzola & Chiron, 2009), Ghana (Azanu et al., 2018), Iran (Mirzaei et al., 2018), Nigeria (Olaitan et al., 2014) and South Africa (Agunbiade & Moodley, 2016). Also, norfloxacin (4.3%; 1/23) and ofloxacin (7.4%; 2/27) molecules represent a risk ( $RQ > 1$ ) for river water samples from Australia (Watkinson et al., 2009) and Spain (Ginebreda et al., 2010; López-Roldán et al., 2010), respectively. On the contrary, low risks are presented for levofloxacin ( $RQ$ : 0.013-0.076) and marbofloxacin ( $RQ$ : 0.003-0.010), due to the low concentrations reported in countries such as China (Xu et al., 2020; Zheng et al., 2021), Kenya (Madikizela et al., 2017) and USA (Conley et al., 2008; Wolfe et al., 2015).

It should be noted that marbofloxacin is present at low frequencies in samples from rivers (3.9%, 2/51) and lakes (16%, 1/6) analyzed in Figure 3 and that it comes mainly from the treatment of diseases of pigs (Zeng et al., 2017) and dairy cows (Lhermie et al., 2017).

In six samples of lake water, ciprofloxacin presents a high risk ( $RQ = 4.46$ ) for *D. magna* due to its high concentration (2.5  $\mu\text{g/L}$ ) in water sample from Patancheru lake in India (Fick et al., 2009). This high pollution can be attributed to the presence of a pharmaceutical industry near the lake.

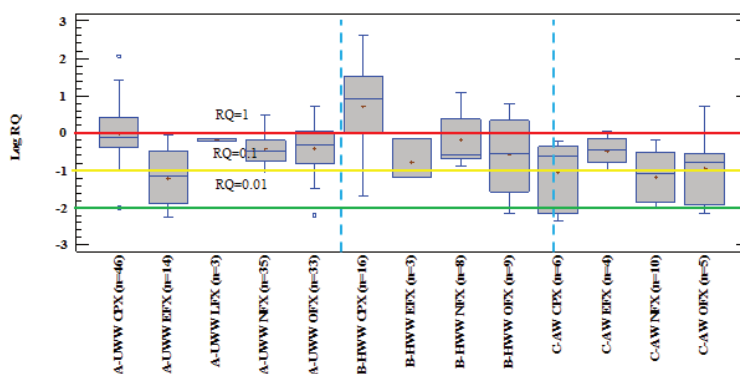
With regard to channel waters, it should be noted that only the sample from Hanoi canals (Vietnam) presents a high risk for ciprofloxacin ( $RQ = 5.420$ , 3.04  $\mu\text{g/L}$ ), enrofloxacin ( $RQ = 4.554$ , 2.869  $\mu\text{g/L}$ ) and ofloxacin ( $RQ = 2.033$ ,

2.867  $\mu\text{g/L}$ ). It should be noted that the Hanoi (Vietnam) is the second most populous city with more than 7.6 million inhabitants (Tran et al., 2019).

Due to the high risks of FQs in river, lake and canal waters, it was decided to analyze the RQs of the six molecules from Urban Wastewater (UWW), Hospital Wastewater (HWW) and Aquaculture Water (AW) because these water samples can contain high concentrations of these antibiotics. For this, Figure 4 represents a Boxplots of the Logarithmic transformation of Risk Quotient (Log RQ) calculated for FQs present in 65 UWW, 20 HWW and 15 WA samples from different countries and the PNEC values calculated in this studio (Table 4).

In Figure 4 shows that the molecules with High Risk ( $RQ > 1$ ) are ciprofloxacin (43.5%; 20/46), followed by norfloxacin (20.0%; 7/35) and ofloxacin (30.3%; 10/33), whereas enrofloxacin, levofloxacin and marbofloxacin present Moderate and Low Risks from 67 UWW samples. Moreover, in hospital wastewater (HWW) samples, ciprofloxacin (75%; 12/16), norfloxacin (37.5%; 3/8) and ofloxacin (44.4%; 4/9) present High Risk values for *D. magna*. Finally, the samples of aquaculture water present Low Risk values.

Figure 4 shows that ciprofloxacin, norfloxacin, and ofloxacin have higher RQs in hospital wastewater samples than in urban wastewater. In addition, Verlicchi et al. (2010) and Van Doorslaer et al. (2014) point out that the concentrations of these quinolones are 8-10 and 30 times higher in HWW than in UWW, respectively.



**Figure 4** Boxplots of Logarithmic transformation of Risk Quotient (Log RQ) of six fluoroquinolones in Urban Wastewater (UWW), Hospital Wastewater (HWW) and Aquaculture Water (AW)

CPX: ciprofloxacin, EFX: enrofloxacin, LFX: levofloxacin, MF: marbofloxacin, NFX: norfloxacin, OFX: ofloxacin, n: number of samples containing each FQs, RQ: Risk Quotient

Data obtained from: UWW: Agunbiade and Moodley (2016), Alexy et al. (2006), Azanu et al. (2018), Batt et al. (2007), Bernabeu et al. (2011), Blair et al. (2013), Brown et al. (2006), Costanzo et al. (2005), Cui et al. (2011), Dan et al. (2020), Danner et al. (2019), Deblonde et al. (2011), Dólar et al. (2012), Ferdig et al. (2005), Gao et al. (2012), Golet et al. (2001), Golet et al. (2002), Golet et al. (2003), Gracia-Lor et al. (2012), Gros et al. (2009), Gulkowska et al. (2008), Huang et al. (2019), Jia et al. (2012), Karthikeyan and Meyer (2006), Kurasam et al. (2018), Leung et al. (2012), Li et al. (2009), Li et al. (2013), Lin et al. (2008), Lin et al. (2009), Lindberg et al. (2005), Martins et al. (2008), Miège et al. (2009), Oliver et al. (2020), Peng et al. (2006), Reverté et al. (2003), Rodriguez-Mozaz et al. (2015), Rosal et al. (2010), Segura et al. (2007), Seifrtová et al. (2008), Senta et al. (2008), Senta et al. (2013), Shi et al. (2009), Sim et al. (2010), Sim et al. (2011), Sponberg and Witter (2008), Takasu et al. (2009), Teijon et al. (2010), Terzić et al. (2008), Tewari et al. (2013), Thomas et al. (2007), Tong et al. (2011), Verlicchi et al. (2012a), Verlicchi et al. (2012b), Vieno et al. (2006), Vieno et al. (2007), Walraven and Laane (2008), Watkinson et al. (2007), Watkinson et al. (2009), Wei et al. (2012), Xiao et al. (2008), Xu et al. (2007a), Yang et al. (2011), Yasojima et al. (2006) and Zorita et al. (2009). HWW: Watkinson et al. (2009), Ahmed (2017), Ajibola et al. (2021), Azanu et al. (2018), Brown et al. (2006), Castiglioni et al. (2005), Duong et al. (2008), Hartmann et al. (1998), Jarnheimer et al. (2004), Jiang et al. (2011), Lin et al. (2008), Lindberg et al. (2004), Mitani and Kataoka (2006), Rodriguez-Mozaz et al. (2015), Rodriguez-Silva et al. (2019), Seifrtová et al. (2008), Thomas et al. (2007), Verlicchi et al. (2012b), Yang et al. (2011) and Zorita et al. (2009). AW: Andrieu et al. (2015), Costanzo et al. (2005), Giang et al. (2015), Gulkowska et al. (2007), He et al. (2012), Ikem et al. (2017), Le and Muneke (2004), Lin et al. (2008), Takasu et al. (2009), Tuan et al. (2004), Xu et al. (2007b), Zou et al. (2011).

The RQ of the 15 aquaculture water (AW) are low (Figure 4), except for two samples from Vietnam that contain enrofloxacin (RQ= 1.08, 0.680 µg/L, Andrieu et al., 2015) and ofloxacin (RQ=5.25, 7.40 µg/L, Takasu et al., 2009). Regarding to contamination with FQs from livestock wastewater (LWW), Zhi et al. (2018) analyze veterinary drug residues in water from a pig farm and two dairy cattle farms in northern Tianjin (China). These authors report elevated concentrations of ciprofloxacin (13.56 µg/L; RQ= 24.214), enrofloxacin (1.69 µg/L; RQ= 2.68) and ofloxacin (10.46 µg/L; RQ= 7.42) in the wastewater from the pig farm, while the concentrations and FQs in dairy cattle farms are low. The limited amount of research that analyzes the levels of FQs in animal husbandry and the high concentrations reported in this work, suggest further studies on contamination from veterinary treatment in livestock.

Finally, considering that, FQs are metabolized between 30% (norfloxacin) and 70% (ofloxacin) according to Kümmerer & Henninger (2003), the ecotoxicity of effluents could be worsened due to the metabolites of these FQs in fresh surface waters (Darweesh & Ahmed, 2017).

## CONCLUSION

In summary, the present study establishes that concentrations of six fluoroquinolones between 56 µg/L (ciprofloxacin) and 141 µg/L (ofloxacin) produce significant chronic effects on the mortality curves of *D. magna*. In general, the concentrations of these antibiotics reported in river and lake waters present moderate risks. However, the levels of ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin in urban wastewater and hospital wastewater constitute a threat to *D. magna*, as they can produce both moderate and high risks.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Universidad Nacional del Litoral and the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina (PICT-2017-2841), for the funding received. We thank María Victoria Gonzalez Eusevi for revising the English of the manuscript.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Rafael Althaus

<https://orcid.org/0000-0002-9460-9946>

## REFERENCES

- Agunbiade, F. O., & Moodley, B. (2016). Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu Natal, South Africa. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(1), 36-46. <https://doi.org/10.1002/etc.3144>.
- Ahmed, M. J. (2017). Adsorption of quinolone, tetracycline, and penicillin antibiotics from aqueous solution using activated carbons. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 50, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.004>
- Ajibola, A. S., Amoniyani, O. A., Ekoja, F. O., & Ajibola, F. O. (2021). QuEChERS Approach for the Analysis of Three Fluoroquinolone Antibiotics in Wastewater: Concentration Profiles and Ecological Risk in Two Nigerian Hospital Wastewater Treatment Plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(2), 389-401. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00789-w>.
- Alexy, R., Sommer, A., Lange, F. T., & Kümmerer, K. (2006). Local use of antibiotics and their input and fate in a small sewage treatment plant—significance of balancing and analysis on a local scale vs. nationwide scale. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 34(6), 587-592. <https://doi.org/10.1002/ahch.200400657>.
- Andrieu, M., Rico, A., Phu, T. M., Phuong, N. T., & Van den Brink, P. J. (2015). Ecological risk assessment of the antibiotic enrofloxacin applied to Pangasius catfish farms in the Mekong Delta, Vietnam. *Chemosphere*, 119, 407-414. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.062>.
- Azanu, D., Styriahave, B., Darko, G., Weisser, J. J., & Abaidoo, R. C. (2018). Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *Science of the Total Environment*, 647, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.088>.

- Environment*, 622, 293-305.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.287>
- Bártíková, H., Podlípna, R., & Skálová, L. (2016). Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*, 144, 2290-2301.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.137>.
- Batt, A. L., Kim, S., & Aga, D. S. (2007). Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. *Chemosphere*, 68(3), 428-435.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.01.008>.
- Bernabeu, A., Vercher, R. F., Santos-Juanes, L., Simón, P. J., Lardín, C., Martínez, M. A., & Amat, A. M. (2011). Solar photocatalysis as a tertiary treatment to remove emerging pollutants from wastewater treatment plant effluents. *Catalysis Today*, 161(1), 235-240.  
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2010.09.025>.
- Blair, B. D., Crago, J. P., Hedman, C. J., Treguer, R. J., Magruder, C., Royer, L. S., & Klaper, R. D. (2013). Evaluation of a model for the removal of pharmaceuticals, personal care products, and hormones from wastewater. *Science of the Total Environment*, 444, 515-521.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.103>
- Brown, K. D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T. H., & Mawhinney, D. B. (2006). Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*, 366(2-3), 772-783.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.10.007>
- Carraschi, S. P., Florêncio, T., Garlich, N., Ferreira da Silva, A., Marcari Marques, A., da Cruz, C., & Tavares Ranzani Paiva, M. J. (2015). Ecotoxicology of drugs used in fish disease treatment. *Journal Environmental Chemistry Ecotoxicology*, 7, 31-36.  
<https://doi.org/10.5897/JECE2015.0341>.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., & Zuccato, E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1092(2), 206-215.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.012>.
- Chitescu, C. L., Kaklamanos, G., Nicolau, A. I., & Stolker, A. A. M. L. (2015). High sensitive multiresidue analysis of pharmaceuticals and antifungals in surface water using U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. Application to the Danube river basin on the Romanian territory. *Science of the Total Environment*, 532, 501-511.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.010>
- Christian, T., Schneider, R. J., Färber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T., & Goldbach, H. E. (2003). Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 31(1), 36-44.  
<https://doi.org/10.1002/aheh.200390014>.
- Coetsier, C. M., Spinelli, S., Lin, L., Roig, B., & Touraud, E. (2009). Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs?. *Environment International*, 35(5), 787-792.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.01.008>.
- Conley, J. M., Symes, S. J., Schorr, M. S., & Richards, S. M. (2008). Spatial and temporal analysis of pharmaceutical concentrations in the upper Tennessee River basin. *Chemosphere*, 73(8), 1178-1187.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.062>.
- Costanzo, S. D., Murby, J., & Bates, J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*, 51(1-4), 218-223.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.10.038>.
- Cui, J., Zhang, K., Huang, Q., Yu, Y., & Peng, X. (2011). An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of norfloxacin in waters using a specific polyclonal antibody. *Analytica Chimica Acta*, 688(1), 84-89.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.12.030>
- Dalla Bona, M., Zounková, R., Merlanti, R., Blaha, L., & De Liguoro, M. (2015). Effects of enrofloxacin, ciprofloxacin, and trimethoprim on two generations of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology Environment Safety*, 113, 152-158.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.018>.
- Dalla Bona, M., Lizzi, F., Borgato, A., & De Liguoro, M. (2016). Increasing toxicity of enrofloxacin over four generations of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 132, 397-402.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.032>.
- Dan, A., Zhang, X., Dai, Y., Chen, C., & Yang, Y. (2020). Occurrence and removal of quinolone, tetracycline, and macrolide antibiotics from urban wastewater in constructed wetlands. *Journal of Cleaner Production*, 252, 119677.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119677>.
- Danner, M. C., Robertson, A., Behrends, V., & Reiss, J. (2019). Antibiotic pollution in surface fresh waters: occurrence and effects. *Science of the Total Environment*, 664, 793-804.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.406>

- de Oliveira, L. L. D., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Rocha, O., & Nunes, B. (2016). Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna*. *Drug and Chemical Toxicology*, 39(1), 13-21. <https://doi.org/10.3109/01480545.2015.1029048>.
- de Oliveira, L. L., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Rocha, O., & Nunes, B. (2015). Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.028>.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., & Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 442-448. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>.
- Deng, W., Li, N., Zheng, H., & Lin, H. (2016). Occurrence and risk assessment of antibiotics in river water in Hong Kong. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 125, 121-127. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.002>.
- Dinh, Q. T., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Eurin, J., Chevreuil, M., & Labadie, P. (2011). Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. *Talanta*, 85(3), 1238-1245. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.05.013>.
- Dionísio, R., Daniel, D., de Alkimin, G. D., & Nunes, B. (2020). Multi-parametric analysis of ciprofloxacin toxicity at ecologically relevant levels: Short-and long-term effects on *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 74, 103295. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103295>.
- Dolar, D., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Moreno, J., Comas, J., Rodriguez-Roda, I., & Barceló, D. (2012). Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an integrated membrane system, MBR-RO. *Journal of Hazardous Materials*, 239, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.03.029>.
- Duong, H. A., Pham, N. H., Nguyen, H. T., Hoang, T. T., Pham, H. V., Pham, V. C., & Alder, A. C. (2008). Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere*, 72(6), 968-973. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.009>.
- Duong, H. A., Phung, T. V., Nguyen, T. N., Phan Thi, L. A., & Pham, H. V. (2021). Occurrence, distribution, and ecological risk assessment of antibiotics in selected urban lakes of Hanoi, Vietnam. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2021, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2021/6631797>.
- EMA. (2003). Note for guidance on environmental risk assessment of medicinal products for human use. CPMP/SWP/44447/00 drage corr. Available from <<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf>>.
- Feitosa-Felizzola, J., & Chiron, S. (2009). Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). *Journal of Hydrology*, 364(1-2), 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.10.006>.
- Ferdig, M., Kaleta, A., & Buchberger, W. (2005). Improved liquid chromatographic determination of nine currently used (fluoro) quinolones with fluorescence and mass spectrometric detection for environmental samples. *Journal of Separation Science*, 28(13), 1448-1456. <https://doi.org/10.1002/jssc.200400065>.
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R. H., Phan, C., Tysklind, M., & Larsson, D. J. (2009). Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2522-2527. <https://doi.org/10.1897/09-073.1>.
- Gao, L., Shi, Y., Li, W., Niu, H., Liu, J., & Cai, Y. (2012). Occurrence of antibiotics in eight sewage treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere*, 86(6), 665-671. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.11.019>.
- García-Galán, M.J., Díaz-Cruz, M.S., & Barceló, D., 2011. Occurrence of sulfonamide residues along the Ebro River basin: removal in wastewater treatment plants and environmental impact assessment. *Environment International*, 37, 462-473. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.11.011>.
- Ghava, K., Rathod, M. C., & Dhale, D. A. (2015). Effect of antibiotics on seed germination and root elongation of wheat. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 4(1), 516-527. <http://www.ijcmas.com/vol-4-1/Kiran%20>.
- Giang, C.N.D., Sebesvari, Z., Renaud, F., Rosendahl, I., Minh, Q.H., & Amelung, W. (2015). Occurrence and dissipation of the antibiotics sulfamethoxazole, sulfadiazine, trimethoprim, and enrofloxacin in the Mekong delta, Vietnam. *PLoS One* 10.
- Ginebreda, A., Muñoz, I., de Alda, M. L., Brix, R., López-Doval, J., & Barceló, D. (2010). Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the

- Llobregat River (NE Spain). *Environment International*, 36(2), 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.003>.
- Golet, E. M., Alder, A. C., Hartmann, A., Ternes, T. A., & Giger, W. (2001). Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Chemistry*, 73(15), 3632-3638. <https://doi.org/10.1021/ac0015265>.
- Golet, E. M., Alder, A. C., & Giger, W. (2002). Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental Science & Technology*, 36(17), 3645-3651. <https://doi.org/10.1021/es0256212>.
- Golet, E. M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A. C., & Giger, W. (2003). Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environmental Science & Technology*, 37(15), 3243-3249. <https://doi.org/10.1021/es0264448>.
- Gracia-Lor, E., Sancho, J. V., Serrano, R., & Hernández, F. (2012). Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*, 87(5), 453-462. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.025>.
- Gregory, K. J., Sexton, P. M., & Christopoulos, A. (2007). Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Current neuropharmacology*, 5(3), 157-167. <https://doi.org/10.2174/157015907781695946>.
- Gros, M., Petrovic, M., & Barceló, D. (2009). Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Analytical Chemistry*, 81(3), 898-912. <https://doi.org/10.1021/ac801358e>.
- Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A., & Barceló, D. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International*, 36(1), 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.09.002>.
- Gulkowska, A., He, Y., So, M. K., Yeung, L. W., Leung, H. W., Giesy, J. P., & Richardson, B. J. (2007). The occurrence of selected antibiotics in Hong Kong coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 54(8), 1287-1293. [doi:10.1016/j.marpolbul.2007.04.008](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.04.008).
- Gulkowska, A., Leung, H. W., So, M. K., Taniyasu, S., Yamashita, N., Yeung, L. W., & Lam, P. K. (2008). Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. *Water Research*, 42(1-2), 395-403. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.031>.
- Guruge, K. S., Goswami, P., Tanoue, R., Nomiya, K., Wijesekara, R. G. S., & Dharmaratne, T. S. (2019). First nationwide investigation and environmental risk assessment of 72 pharmaceuticals and personal care products from Sri Lankan surface waterways. *Science of the Total Environment*, 690, 683-695. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.042>.
- Gutierrez, M.F., Paggi, J.C., & Gagneten, A.M. (2012). Microcrustaceans escape behavior as an early bioindicator of copper, chromium and endosulfan toxicity. *Ecotoxicology*, 21, 428-438. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0803-1>.
- Halling-Sørensen, B., Lützhøft, H. C. H., Andersen, H. R., & Ingerslev, F. (2000). Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(1), 53-58. [https://doi.org/10.1093/jac/46.suppl\\_1.53](https://doi.org/10.1093/jac/46.suppl_1.53).
- Hanna, N., Sun, P., Sun, Q., Li, X., Yang, X., Ji, X., Zou, H., Ottoson, J., Nilsson, L. E., Berglund, B., Dyar, O. J., Tamhankar, A. J., & Lundborg, C. S. (2018). Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: it's potential for resistance development and ecological and human risk. *Environment International*, 114, 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.003>.
- Hartmann, A., Alder, A. C., Koller, T., & Widmer, R. M. (1998). Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(3), 377-382. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170305>.
- He, X., Wang, Z., Nie, X., Yang, Y., Pan, D., Leung, A. O., Cheng, Z., Yang, Y., Li, K., & Chen, K. (2012). Residues of fluoroquinolones in marine aquaculture environment of the Pearl River Delta, South China. *Environmental Geochemistry and Health*, 34(3), 323-335. <https://doi.org/10.1007/s10653-011-9420-4>.
- Hong, P. Y., Al-Jassim, N., Ansari, M. I., & Mackie, R. I. (2013). Environmental and public health implications of water reuse: antibiotics, antibiotic resistant bacteria, and antibiotic resistance genes. *Antibiotics*, 2(3), 367-399. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2030367>.
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2016). Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone



- mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(9), a025320.  
<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org>.
- Huang, F., Zou, S., Deng, D., Lang, H., & Liu, F. (2019). Antibiotics in a typical karst river system in China: spatiotemporal variation and environmental risks. *Science of the Total Environment*, 650, 1348-1355.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.131>
- Huang, L., Mo, Y., Wu, Z., Rad, S., Song, X., Zeng, H., & Chen, Z. (2020). Occurrence, distribution, and health risk assessment of quinolone antibiotics in water, sediment, and fish species of Qingshitan reservoir, South China. *Scientific Reports*, 10(1), 15777.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72324-9>.
- Huang, Y. H., Liu, Y., Du, P. P., Zeng, L. J., Mo, C. H., Li, Y. W., Lü, H., & Cai, Q. Y. (2019). Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistant genes in water and sediments of urban rivers with black-odor water in Guangzhou, South China. *Science of the Total Environment*, 670, 170-180.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.168>
- Ikem, A., Lin, C. H., Broz, B., Kerley, M., & Le Thi, H. (2017). Occurrence of enrofloxacin in overflows from animal lot and residential sewage lagoons and a receiving-stream. *Heliyon*, 3(10), e00409.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00409>.
- Jarnheimer, P. Å., Ottoson, J., Lindberg, R., Stenström, T. A., Johansson, M., Tysklind, M., & Olsen, B. (2004). Fluoroquinolone antibiotics in a hospital sewage line; occurrence, distribution and impact on bacterial resistance. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 36(10), 752-755.  
<https://doi.org/10.1080/00365540410021027a>.
- Jia, A., Wan, Y., Xiao, Y., & Hu, J. (2012). Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant. *Water Research*, 46(2), 387-394.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.055>.
- Jiang, L., Hu, X., Yin, D., Zhang, H., & Yu, Z. (2011). Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere*, 82(6), 822-828.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.028>.
- Karthikeyan, K. G., & Meyer, M. T. (2006). Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of the Total Environment*, 361(1-3), 196-207.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.06.030>
- Kim, H.Y., Lee, M. J., Yu, S.H., & Kim, S. D. (2012). Los efectos individuales y poblacionales de la tetraciclina sobre *Daphnia magna* en exposición multigeneracional. *Ecotoxicología*, 21, 993-1002.  
<https://doi.org/10.1007/s10646-012-0853-z>.
- Knapp, C. W., Cardoza, L. A., Hawes, J. N., Wellington, E. M. H., Larive, C. K., & Graham, D. W. (2005). Fate and effects of enrofloxacin in aquatic systems under different light conditions. *Environmental Science & Technology*, 39(23), 9140-9146.  
<https://doi.org/10.1021/es050895l>.
- Kümmerer, K. (2010). Pharmaceuticals in the environment. *Annual Review of Environment and Resources*, 35, 57-75.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-environ-052809-161223>.
- Kümmerer, K., & Henninger, A. (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(12), 1203-1214. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2003.00739.x>.
- Kurasam, J., Sihag, P., Mandal, P. K., & Sarkar, S. (2018). Presence of fluoroquinolone resistance with persistent occurrence of gyrA gene mutations in a municipal wastewater treatment plant in India. *Chemosphere*, 211, 817-825.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.011>.
- Le, T. X., & Munekage, Y. (2004). Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam. *Marine Pollution Bulletin*, 49(11-12), 922-929.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.06.016>.
- Leung, H. W., Minh, T. B., Murphy, M. B., Lam, J. C., So, M. K., Martin, M., Lam, K. S., & Richardson, B. J. (2012). Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. *Environment International*, 42, 1-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.004>.
- Lhermie, G., Dupouy, V., El Garch, F., Ravinet, N., Toutain, P. L., Bousquet-Mélou, A., & Assié, S. (2017). Impact of low and high doses of marbofloxacin on the selection of resistant Enterobacteriaceae in the commensal gut flora of young cattle: discussion of data from 2 study populations. *Foodborne pathogens and disease*, 14(3), 152-159.  
<https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2176>.
- Li, B., Zhang, T., Xu, Z., & Fang, H. H. P. (2009). Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 645(1-2), 64-72.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.042>.

- Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J., & Cai, Y. (2012). Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere*, *89*(11), 1307-1315. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.079>.
- Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J., & Cai, Y. (2013). Occurrence and removal of antibiotics in a municipal wastewater reclamation plant in Beijing, China. *Chemosphere*, *92*(4), 435-444. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.040>.
- Li, Y., Niu, J., & Wang, W. (2011). Photolysis of enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products. *Chemosphere*, *85*(5), 892-897. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.008>.
- Lin, A. Y. C., Yu, T. H., & Lin, C. F. (2008). Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere*, *74*(1), 131-141. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.08.027>.
- Lin, A. Y. C., Yu, T. H., & Lateef, S. K. (2009). Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *Journal of Hazardous Materials*, *167*(1-3), 1163-1169. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.108>.
- Lindberg, R., Jarnheimer, P. Å., Olsen, B., Johansson, M., & Tysklind, M. (2004). Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*, *57*(10), 1479-1488. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.015>.
- Lindberg, R. H., Wennberg, P., Johansson, M. I., Tysklind, M., & Andersson, B. A. (2005). Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environmental Science & Technology*, *39*(10), 3421-3429. <https://doi.org/10.1021/es048143z>.
- López-Roldán, R., de Alda, M. L., Gros, M., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., & Barceló, D. (2010). Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography–triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography–time of flight-mass spectrometry. *Chemosphere*, *80*(11), 1337-1344. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.042>.
- López-Serna, R., Petrović, M., & Barceló, D. (2011). Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)–tandem mass spectrometry (MS/MS). *Chemosphere*, *85*(8), 1390-1399. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.071>.
- Luo, Y., Xu, L., Rysz, M., Wang, Y., Zhang, H., & Alvarez, P. J. (2011). Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China. *Environmental Science & Technology*, *45*(5), 1827-1833. <https://doi.org/10.1021/es104009s>.
- Lyu, J., Yang, L., Zhang, L., Ye, B., & Wang, L. (2020). Antibiotics in soil and water in China—a systematic review and source analysis. *Environmental Pollution*, *266*(1), 115147. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115147>.
- Madikizela, L. M., Tavengwa, N. T., & Chimuka, L. (2017). Status of pharmaceuticals in African water bodies: occurrence, removal and analytical methods. *Journal of Environmental Management*, *193*, 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.022>.
- Mala, A. A., & Dutta, J. (2019). Acute and Chronic Toxicity of Fluoroquinolone Antibiotics through Fresh Water cladocera *Daphnia magna*. *Indian Journal of Ecology*, *46*(4), 874-879.
- Martins, A. F., Vasconcelos, T. G., Henriques, D. M., Frank, C. D. S., König, A., & Kümmerer, K. (2008). Concentration of ciprofloxacin in Brazilian hospital effluent and preliminary risk assessment: a case study. *CLEAN—Soil, Air, Water*, *36*(3), 264-269. <https://doi.org/10.1002/clen.200700171>.
- Martins, N., Pereira, R., Abrantes, N., Pereira, J., Gonçalves, F., & Marques, C. R. (2012). Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. *Ecotoxicology*, *21*(4), 1167-1176. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0871-x>.
- Midya, S., Ganguly, R. K., Islam, S. S., & Chakraborty, S. K. (2019). Attachment and antimicrobial susceptibility of bacterial associates of zooplanktonic copepod: Lesson for environmental safety. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *180*, 749-755. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.046>.
- Miege, C., Choubert, J. M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., & Coquery, M. (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants—conception of a

- database and first results. *Environmental Pollution*, 157(5), 1721-1726. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.045>.
- Minh, T. B., Leung, H. W., Loi, I. H., Chan, W. H., So, M. K., Mao, J. Q., & Richardson, B. J. (2009). Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: ubiquitous distribution and fate in Victoria Harbour. *Marine Pollution Bulletin*, 58(7), 1052-1062. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.02.004>.
- Mirzaei, R., Yunesian, M., Nasser, S., Gholami, M., Jalilzadeh, E., Shoeibi, S., & Mesdaghinia, A. (2018). Occurrence and fate of most prescribed antibiotics in different water environments of Tehran, Iran. *Science of the Total Environment*, 619, 446-459. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.272>
- Mitani, K., & Kataoka, H. (2006). Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 562(1), 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.01.053>.
- NaVrátiloVá, P. (2008). Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk—a review. *Czech Journal of Food Science*, 26(6), 393-401.
- Nunes, B., Leal, C., Rodrigues, S., & Antunes, S. C. (2018). Assessment of ecotoxicological effects of ciprofloxacin in *Daphnia magna*: life-history traits, biochemical and genotoxic effects. *Water Science and Technology*, 2017(3), 835-844.
- OECD (2004) Test Guideline 452. Chronic Toxicity Studies, 202.
- OECD. (2012). Guidelines for Testing of Chemicals, 211.
- Olaitan, O. J., Anyakora, C., Bamiro, T., & Tella, A. T. (2014). Determination of pharmaceutical compounds in surface and underground water by solid phase extraction-liquid chromatography. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 6(3), 20-26. <https://doi.org/10.5897/JECE2013.0312>.
- Oliver, J.P., Gooch, C.A., Lansing, S., Schueler, J., Hurst, J.J., Sassoubre, L., Crossette, E. M., & Aga, D.S. (2020). Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1051-1071. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16778>.
- Olkova, A. (2021). Control of Suitability of the Culture *Daphnia magna* Straus for Bioassays of Aquatic Environments, Taking into Account Demographic Indicators of Model Populations. *Water*, 13(1), 47-55. <https://doi.org/10.3390/w13010047>.
- Pan, C., Bao, Y., & Xu, B. (2020). Seasonal variation of antibiotics in surface water of Pudong New Area of Shanghai, China and the occurrence in typical wastewater sources. *Chemosphere*, 239, 124816. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.12.4816>.
- Parente, C. E. T., Sierra, J., & Martí, E. (2018). Ecotoxicity and Biodegradability of Oxytetracycline and Ciprofloxacin on Terrestrial and Aquatic Media. *The Electronic Journal of Chemistry*, 10(4), 262-271. <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v10i4.1063>.
- Park, S., & Choi, K. (2008). Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*, 17(6), 526-538. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0209-x>.
- Pena, A., Chmielova, D., Lino, C. M., & Solich, P. (2007). Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column. *Journal of Separation Science*, 30(17), 2924-2928. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700363>.
- Peng, X., Wang, Z., Kuang, W., Tan, J., & Li, K. (2006). A preliminary study on the occurrence and behavior of sulfonamides, ofloxacin and chloramphenicol antimicrobials in wastewaters of two sewage treatment plants in Guangzhou, China. *Science of the Total Environment*, 371(1-3), 314-322. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.07.001>.
- Picó, Y., & Andreu, V. (2007). Fluoroquinolones in soil—risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 387(4), 1287-1299. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0843-1>.
- Rao, R. N., Venkateswarlu, N., & Narsimha, R. (2008). Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1187(1-2), 151-164. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.021>.
- Ray, P., Chen, C., Knowlton, K. F., Pruden, A., & Xia, K. (2017). Fate and effect of antibiotics in beef and dairy manure during static and turned composting. *Journal of Environmental Quality*, 46(1), 45-54. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.07.0269>.
- Regaldo, L., Reno, U, Gervasio, S., Troiani, H., & Gagnetten, A. M. (2014a). Effect of metals on *Daphnia magna* and cladocerans representatives of the Argentinean Fluvial Littoral. *Journal of Environmental Biology*, 35(4), 689-697.
- Regaldo, L., Gagnetten, A.M., & Troiani, H. (2014b). Comparative study of the effects of

- Cu, Cr, Pb on *Daphnia magna* and two cladocerans representatives of the Argentinean Fluvial Littoral (AFL). *Journal Environmental Biology*, 35(4): 689-697.
- Reno, U., Gutierrez, M.F., Regaldo, L., Gagnetten, A. M. (2014). Impact of Eskoba<sup>®</sup>, a glyphosate formulation, on the freshwater plankton community. *Water Environmental Research*, 86(12): 2294-2300. <https://doi.org/10.2175/106143014X13896437493580>.
- Reno, U., Gutierrez, M.F., Longo, M., Vidal, E., Regaldo, L., Negro, A., Mariani, M., Zalazar, C., & Gagnetten, A.M. (2015). Microcrustaceans: biological models to evaluate a remediation process of glyphosate-based formulations. *Water, Air & Soil Pollution*, 226, 349-359. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2616-y>.
- Reno, U., Regaldo, L., Vidal, E., Mariani, M., Zalazar, C., & Gagnetten, A. M. (2016). Water polluted with glyphosate formulations: effectiveness of a decontamination process using *Chlorella vulgaris* growing as bioindicator. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 2279-2286. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0755-6>.
- Reno, U., Doyle, S. R., Momo, F. R., Regaldo, L., & Gagnetten, A. M. (2018). Effects of glyphosate formulations on the population dynamics of two freshwater cladoceran species. *Ecotoxicology*, 27(7), 784-793. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1891-3>.
- Reverté, S., Borrull, F., Pocurull, E., & Marcé, R. M. (2003). Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1010(2), 225-232. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01064-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01064-1).
- Riaz, L., Mahmood, T., Khalid, A., Rashid, A., Siddique, M. B. A., Kamal, A., & Coyne, M. S. (2018). Fluoroquinolones (FQs) in the environment: a review on their abundance, sorption and toxicity in soil. *Chemosphere*, 191, 704-720. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.092>.
- Rico, A., Dimitrov, M. R., Van Wijngaarden, R. P., Satapornvanit, K., Smidt, H., & Van den Brink, P. J. (2014). Effects of the antibiotic enrofloxacin on the ecology of tropical eutrophic freshwater microcosms. *Aquatic Toxicology*, 147, 92-104. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.008>.
- Robinson, A. A., Belden, J. B., & Lydy, M. J. (2005). Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(2), 423-430. <https://doi.org/10.1897/04-210R.1>.
- Roca, M., Castillo, M., Marti, P., Althaus, R. L., & Molina, M. P. (2010). Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5427-5431. <https://doi.org/10.1021/jf9040518>.
- Rodrigues-Silva, C., Porto, R. S., Santos, S. G. D., Schneider, J., & Rath, S. (2019). Fluoroquinolones in hospital wastewater: analytical method, occurrence, treatment with ozone and residual antimicrobial activity evaluation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30, 1447-1458. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190040>.
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Barceló, D., & Balcázar, J.L. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J. A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M. J., Agüera, A., & Fernández-Alba, A. R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, 44(2), 578-588. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.004>.
- Segura, P. A., García-Ac, A., Lajeunesse, A., Ghosh, D., Gagnon, C., & Sauvé, S. (2007). Determination of six anti-infectives in wastewater using tandem solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(4), 307-313. <https://doi.org/10.1039/B618801J>.
- Seifrtová, M., Pena, A., Lino, C. M., & Solich, P. (2008). Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(3), 799-805. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2020-1>.
- Senta, I., Terzić, S., & Ahel, M. (2008). Simultaneous determination of sulfonamides, fluoroquinolones, macrolides and trimethoprim in wastewater and river water by LC-tandem-MS. *Chromatographia*, 68(9), 747-758. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0780-6>.
- Senta, I., Terzic, S., & Ahel, M. (2013). Occurrence and fate of dissolved and particulate antimicrobials in municipal wastewater treatment. *Water Research*, 47(2), 705-714. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.041>.

- Shi, L., Zhou, X., Zhang, Y., & Gu, G. (2009, June). Occurrence and removal of fluoroquinolone antibiotics in a sewage treatment plant in Shanghai, China. In 2009 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (pp. 1-4). IEEE. doi: 10.1109/ICBBE.2009.5163140.
- Silva, A. R. R., Cardoso, D. N., Cruz, A., Lourenço, J., Mendo, S., Soares, A. M., & Loureiro, S. (2015). Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 279-290. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.022>.
- Sim, W. J., Lee, J. W., & Oh, J. E. (2010). Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and rivers in Korea. *Environmental Pollution*, 158(5), 1938-1947. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.036>.
- Sim, W. J., Lee, J. W., Lee, E. S., Shin, S. K., Hwang, S. R., & Oh, J. E. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere*, 82(2), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.026>.
- Sodré, F. F., Locatelli, M. A. F., & Jardim, W. F. (2010). Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. *Water, Air, and Soil Pollution*, 206(1), 57-67. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0086-9>.
- Spongberg, A. L., & Witter, J. D. (2008). Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Science of the Total Environment*, 397(1-3), 148-157. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.042>.
- Sturini, M., Speltini, A., Pretali, L., Fasani, E., & Profumo, A. (2009). Solid-phase extraction and HPLC determination of fluoroquinolones in surface waters. *Journal of Separation Science*, 32(17), 3020-3028. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900135>.
- Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Profumo, A., Pretali, L., Fasani, E., & Albini, A. (2010). Photochemical degradation of marbofloxacin and enrofloxacin in natural waters. *Environmental Science & Technology*, 44(12), 4564-4569. <https://doi.org/10.1021/es100278n>.
- Tahrani, L., Van Loco, J., Ben Mansour, H., & Reyns, T. (2016). Occurrence of antibiotics in pharmaceutical industrial wastewater, wastewater treatment plant and sea waters in Tunisia. *Journal of Water and Health*, 14(2), 208-213. <https://doi.org/10.2166/wh.2015.224>.
- Takasu, H., Suzuki, S., Reungsang, A., & Viet, P. H. (2009). Fluoroquinolone (FQ) contamination does not correlate with occurrence of FQ-resistant bacteria in aquatic environments of Vietnam and Thailand. *Microbes and Environments*, 1103080279-1103080279. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10204>.
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Dinh, Q. T., Clément, M., & Chevreuil, M. (2008). Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of the Total Environment*, 393(1), 84-95. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.12.009>.
- Teglia, C. M., Perez, F. A., Michlig, N., Repetti, M. R., Goicoechea, H. C., & Culzoni, M. J. (2019). Occurrence, distribution, and ecological risk of fluoroquinolones in rivers and wastewaters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(10), 2305-2313. <https://doi.org/10.1002/etc.4532>.
- Tejion, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina-Díaz, A., & Fernández-Alba, A. R. (2010). Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Science of the Total Environment*, 408(17), 3584-3595. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.041>.
- Terzić, S., Senta, I., Ahel, M., Gros, M., Petrović, M., Barcelo, D., Müller, J., Knepper, T., Martí, I., Ventura, f., Jovančić, P., & Jabučar, D. (2008). Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of the Total Environment*, 399(1-3), 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.003>.
- Tewari, S., Jindal, R., Kho, Y. L., Eo, S., & Choi, K. (2013). Major pharmaceutical residues in wastewater treatment plants and receiving waters in Bangkok, Thailand, and associated ecological risks. *Chemosphere*, 91(5), 697-704. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.042>.
- Thomas, K. V., Dye, C., Schlabach, M., & Langford, K. H. (2007). Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(12), 1410-1418. <https://doi.org/10.1039/B709745J>.
- Tong, C., Zhuo, X., & Guo, Y. (2011). Occurrence and risk assessment of four typical fluoroquinolone antibiotics in raw and treated sewage and in receiving waters in Hangzhou, China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7303-7309. <https://doi.org/10.1021/jf2013937>.

- Tuan, X.L., & Munekage, Y. (2004). Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Vietnam. *Marine Pollution Bulletin* 49: 922–929. PMID:15556177.
- Tran, N. H., Hoang, L., Nghiem, L. D., Nguyen, N. M. H., Ngo, H. H., Guo, W., Trinh, Q. T., Mai, N. H., Chen, H., Nguyen, D. D., Ta, T. T., & Gin, K. Y. H. (2019). Occurrence and risk assessment of multiple classes of antibiotics in urban canals and lakes in Hanoi, Vietnam. *Science of the Total Environment*, 692, 157-174. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.092>
- Valcárcel, Y., Alonso, S. G., Rodríguez-Gil, J. L., Gil, A., & Catalá, M. (2011). Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere*, 84(10), 1336-1348. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.014>.
- Valdés, M. E., Amé, M. V., de los Angeles Bistoni, M., & Wunderlin, D. A. (2014). Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Science of the Total Environment*, 472, 389-396. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.124>
- Van Doorslaer, X., Dewulf, J., Van Langenhove, H., & Demeestere, K. (2014). Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants. *Science of the Total Environment*, 500, 250-269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.075>
- Vazquez-Roig, P., Andreu, V., Blasco, C., & Picó, Y. (2012). Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments, soils and waters of the Pego–Oliva Marshlands (Valencia, eastern Spain). *Science of the Total Environment*, 440, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.036>
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., & Zambello, E. (2012a). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—a review. *Science of the Total Environment*, 429, 123-155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., & Barceló, D. (2012b). Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 430, 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.055>
- VICH (2004). Veterinary International Conference on Harmonization guidelines VICH (International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products). Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products Phase II Guidance. VICH-GL38. VICH, Brussels, Belgium, 38 pp. <http://vich.eudra.org>.
- Vieno, N. M., Tuhkanen, T., & Kronberg, L. (2006). Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1134(1-2), 101-111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.077>.
- Vieno, N., Tuhkanen, T., & Kronberg, L. (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research*, 41(5), 1001-1012. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.017>.
- Vulliet, E., & Cren-Olivé, C. (2011). Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution*, 159(10), 2929-2934. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.033>.
- Wagner, N. D., Simpson, A. J., & Simpson, M. J. (2017). Metabolomic responses to sublethal contaminant exposure in neonate and adult *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(4), 938-946. <https://doi.org/10.1002/etc.3604>.
- Walraven, N., & Laane, R. W. P. M. (2008). Assessing the discharge of pharmaceuticals along the Dutch coast of the North Sea. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 199, 1-18. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-09808-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-09808-1_1).
- Watkinson, A. J., Murby, E. J., & Costanzo, S. D. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*, 41(18), 4164-4176. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.005>.
- Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., & Costanzo, S. D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Science of the Total Environment*, 407(8), 2711-2723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.059>
- Wei, R., Ge, F., Huang, S., Chen, M., & Wang, R. (2011). Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere*, 82(10), 1408-1414. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.067>.

- Wei, R., Ge, F., Chen, M., & Wang, R. (2012). Occurrence of ciprofloxacin, enrofloxacin, and florfenicol in animal wastewater and water resources. *Journal of Environmental Quality*, *41*(5), 1481-1486. <https://doi.org/10.2134/jeq2012.0014>.
- Wolfe, D., Schorr, M., Hanson, M., Nelson, C. H., & Richards, S. M. (2015). Hazard assessment for a pharmaceutical mixture detected in the upper Tennessee River using *Daphnia magna*. *Global Journal of Environmental Science and Management*, *1*(1), 1-14. <https://doi.org/10.7508/gjesm.2015.01.001>.
- Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., & Kusk, K. O. (2000). Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, *40*(7), 723-730. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00443-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00443-9).
- Xiao, Y., Chang, H., Jia, A., & Hu, J. (2008). Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1214*(1-2), 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.090>.
- Xu, W. H., Zhang, G., Zou, S. C., Li, X. D., & Liu, Y. C. (2007a). Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Environmental Pollution*, *145*(3), 672-679. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.05.038>.
- Xu, W., Zhang, G., Li, X., Zou, S., Li, P., Hu, Z., & Li, J. (2007b). Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. *Water Research*, *41*(19), 4526-4534. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.023>.
- Xu, W.H., Zhang, G., Zou, S.C., Ling, Z.H., Wang, G.L., Yan, W. (2009). A preliminary investigation on the occurrence and distribution of antibiotics in the Yellow River and its tributaries, China. *Water Environmental Research*, *81*, 248-254. <https://doi.org/10.2175/106143008X325719>.
- Yamashita, N., Yasojima, M., Nakada, N., Miyajima, K., Komori, K., Suzuki, Y., & Tanaka, H. (2006). Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. *Water Science and Technology*, *53*(11), 65-72. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.338>.
- Yan, C., Yang, Y., Zhou, J., Liu, M., Nie, M., Shi, H., & Gu, L. (2013). Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: occurrence, distribution and risk assessment. *Environmental Pollution*, *175*, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.12.008>.
- Yang, X., Flowers, R. C., Weinberg, H. S., & Singer, P. C. (2011). Occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in an advanced wastewater reclamation plant. *Water Research*, *45*(16), 5218-5228. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.07.026>.
- Yao, L., Wang, Y., Tong, L., Deng, Y., Li, Y., Gan, Y., Guo, W., Dong, C., Duan, Y., & Zhao, K. (2017). Occurrence and risk assessment of antibiotics in surface water and groundwater from different depths of aquifers: a case study at Jiangnan Plain, central China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *135*, 236-242. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.006>.
- Yasojima, M., Nakada, N., Komori, K., Suzuki, Y., & Tanaka, H. (2006). Occurrence of levofloxacin, clarithromycin and azithromycin in wastewater treatment plant in Japan. *Water Science and Technology*, *53*(11), 227-233. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.357>.
- Zeng, Q. L., Mei, X., Su, J., Li, X. H., Xiong, W. G., Lu, Y., & Zeng, Z. L. (2017). Integrated pharmacokinetic–pharmacodynamic (PK/PD) model to evaluate the *in vivo* antimicrobial activity of Marbofloxacin against *Pasteurella multocida* in piglets. *BMC veterinary research*, *13*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1099-z>
- Zhang, R., Zhang, G., Zheng, Q., Tang, J., Chen, Y., Xu, W., Zou, Y., & Chen, X. (2012). Occurrence and risks of antibiotics in the Laizhou Bay, China: impacts of river discharge. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *80*, 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.002>.
- Zheng, M., Tang, S., Bao, Y., Daniels, K. D., How, Z. T., El-Din, M. G., & Tang, L. (2021). Fully-Automated SPE Coupled to UPLC-MS/MS Method for Simultaneous Detection of Trace Sulfonamides, Quinolones, and Macrolide antibiotics in Water. *Research Square*, 1-26. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-196420/v1>.
- Zhi, S., Zhou, J., Yang, F., Tian, L., & Zhang, K. (2018). Systematic analysis of occurrence and variation tendency about 58 typical veterinary antibiotics during animal wastewater disposal processes in Tianjin, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *165*, 376-385. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.10>.
- Zhou, L. J., Ying, G. G., Liu, S., Zhang, R. Q., Lai, H. J., Chen, Z. F., & Pan, C. G. (2013). Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China. *Science of the Total Environment*, *444*, 183-195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.087>.

Zorita, S., Mårtensson, L., & Mathiasson, L. (2009). Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of the Total Environment*, 407(8), 2760-2770. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.12.030>

Zou, S., Xu, W., Zhang, R., Tang, J., Chen, Y., & Zhang, G. (2011). Occurrence and distribution of antibiotics in coastal water of the Bohai Bay, China: impacts of river discharge and aquaculture activities. *Environmental Pollution*, 159(10), 2913-2920. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.037>

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

**How to cite this article:** Eluk, D., Nagel, O., Gagnetten, A., Reno, U., & Althaus, R. (2021). Toxicity of fluoroquinolones on the cladoceran *Daphnia magna*. *Water Environment Research*, 1–17. <https://doi.org/10.1002/wer.1631>



## **Anexo 4**

Nagel O G, Althaus R L, Eluk D. Inhibition on *Kluyveromyces marxianus* by antibiotics. Dairy Research. Trabajo enviado para su evaluación.

## Inhibition on *Kluyveromyces marxianus* by antibiotics

Nagel O. G., Althaus R. L.\*, Eluk D.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder 2805 - (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina.

Althaus Rafael Lisandro – Mailing address: R.P.L. Kreder 2805 - (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina – E-mail: ralthaus@fcv.unl.edu.ar – Phone: (54) 03496 - 420639

Short title: Inhibition of *Kluyveromyces marxianus* by antibiotics

### Summary

Whey can be used for biomass production by fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. However, the growth of this yeast can be inhibited due to the presence of antibiotic residues in the whey. Therefore, the aim of this research communications was to evaluate the possible inhibition of *K. marxianus* due to the antibiotics present in whey, by means of a simple and low-cost bioassay in microtiter plates. The bioassays contained *K. marxianus*, culture medium and bromothymol blue were used to determine the inhibitory effect of 27 antibiotics in whey. For each antibiotic, two bioassays were used to analyze dose response curve. The microtiter plates were incubated at 40°C for 6 h and the absorbances were measured using a spectrophotometer (450 nm). The concentration that inhibits 50% (IC50) of yeast growth was calculated using the logistic regression model. We concluded that whey contaminated with cephalosporins, quinolones and tetracyclines at levels close to the Maximum Residue Limits inhibits *K. marxianus* growth.

**Keywords:** *Kluyveromyces marxianus*, inhibition test, antibiotic, logistic model.

### INTRODUCTION

Antibiotics are widely used to treat different pathologies of dairy cattle. As a consequence, milk containing antibiotic residues at concentrations close to the Maximum Residue Limits (MRLs) can enter dairy companies and these antibiotic residues can remain in dairy by-products such as whey (Giraldo et al., 2017).

Among the various industrial uses of whey, it is important to highlight the production of biomass (Lavari et al., 2014) through fermentative processes with yeasts, preferably with *Kluyveromyces marxianus* (Díaz-Vergara et al., 2017). However, antibiotics residues in whey at concentrations close to the MRLs could inhibit the fermentative processes of *K. marxianus*.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the possible inhibition of *K. marxianus* due to the antibiotics present in whey, by means of a simple and low-cost bioassay.

### MATERIALS AND METHODS

A yeast inhibition bioassay in microtiter plates was developed according to the following sections:

1. *Culture medium with yeast:* A semisynthetic matrix made up of antibiotic-free whey deproteinized by heat treatment at 120°C for 20 min was used. This medium was fortified with 0.5% yeast extract (Merck Millipore, USA), 3% casein peptone (Biokar Diagnostics, France), 20% suspension of *K. marxianus* (ATCC 8554) in exponential phase and 50 mg/l of bromothymol blue (acid-base indicator). Then, the pH was adjusted to 7.0.

2. *Antibiotic-fortified solutions in culture medium:* Aqueous solutions (1000 mg/l) were prepared for the following 27 antibiotics (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA): 3 aminoglycosides, 10 beta-lactams, 3 macrolides, 4 quinolones, 3 tetracyclines and 4 sulfonamides. For each antibiotic, 12 concentrations were prepared (Table 1S online Supplementary File) using the culture medium described in section 1.

3. *Yeast inhibition bioassay:* Two microtiter plates were used for each antibiotic and 16 replicates of the 12 solutions in whey according to section 2 were tested. In each well of the microtiter plates, 200 µl of antibiotic-fortified medium solution was added using an electronic dispenser

(Eppendorf Research® Pro, Hamburg, Germany). The plates were incubated at 40°C for 6 h, until the color of the negative controls changed from blue to yellow.

Subsequently, the absorbances were measured at 450 nm with a Biotek ELx800TM reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA) and the Relative Absorbances in each bioassay were calculated.

4. *Statistical analysis*: The Relative Absorbances (RA) were analyzed using the following logistic regression model (logit):

$$\text{Logit}_{ij} \left[ \frac{RA}{1-RA} \right] = \beta_0 + \beta_1 [ATB]_i + \varepsilon_{ij}$$

where:  $\beta_0$  and  $\beta_1$  = parameters calculated with the logistic model;  $[ATB]_i$  = antibiotic concentration; and  $\varepsilon_{ij}$  = model error. The IC50 was calculated as the antibiotic concentration causing 50% inhibition of yeast growth.

## RESULTS

The application of the logistic regression model was adequate because the high concordance coefficients were between 82.3% for ampicillin and 97.3% for ciprofloxacin, as observed in Table 1. The values of the coefficient  $\beta_1$  represent the decrease in growth of *K. marxianus* due to the increase in antibiotic concentration. Thus, higher values of this parameter indicate greater inhibition by the antibiotic. The  $\beta_1$  parameters for cephalosporins (from  $\beta_{1,\text{cefadroxil}} = -0.0294$  to  $\beta_{1,\text{cefuroxime}} = -0.0108$ ), quinolones (from  $\beta_{1,\text{ciprofloxacin}} = -0.0391$  to  $\beta_{1,\text{marbofloxacin}} = -0.0120$ ) and tetracyclines (from  $\beta_{1,\text{oxytetracyclin}} = -0.0508$  to  $\beta_{1,\text{tetracyclin}} = -0.0359$ ) were higher than those for the other antibiotics studied (Table 1). To visualize the growth inhibition of *K. marxianus* due to the concentrations of cephalosporins, tetracyclines and quinolones, dose-response curves were constructed (Figure 1).

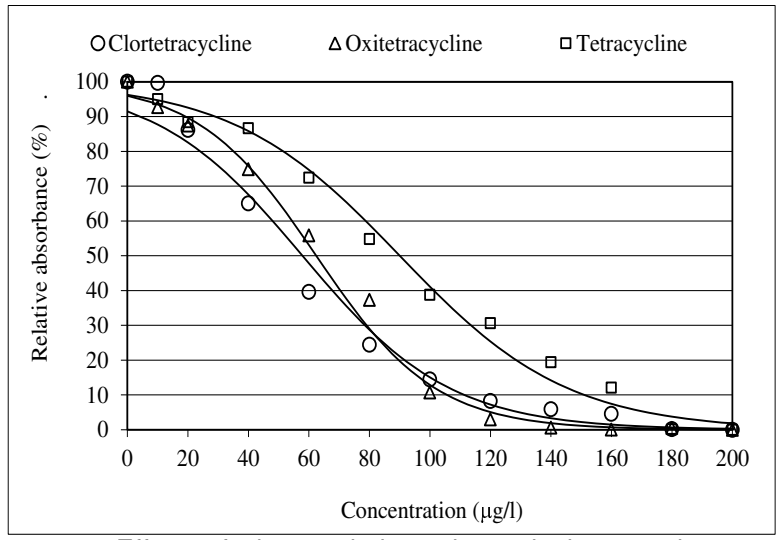
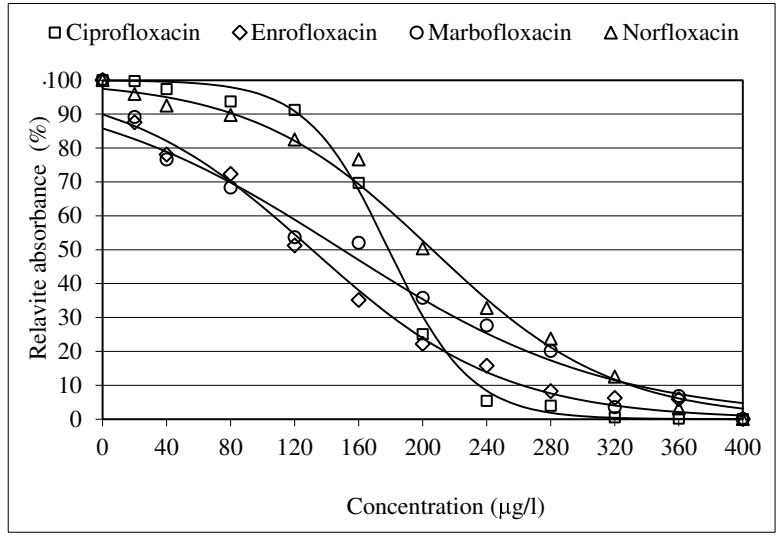
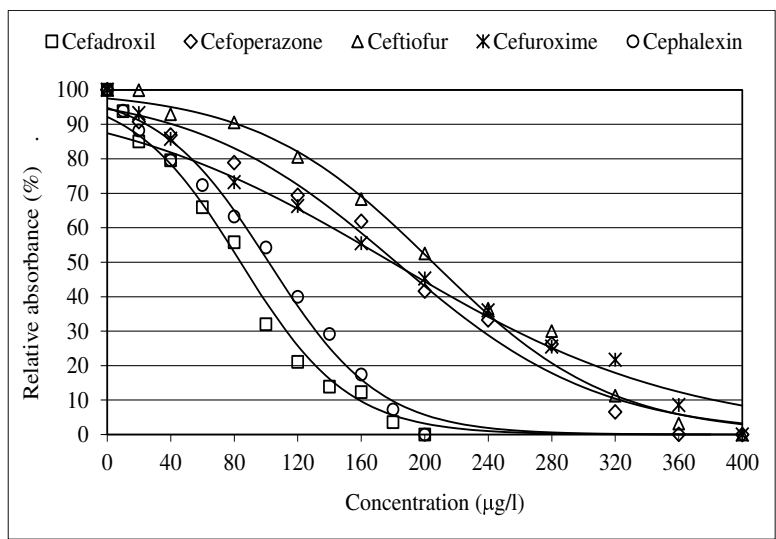
The IC50 ( $\mu\text{g/l}$ ) values in whey were close to the MRLs ( $\mu\text{g/l}$ ) in milk for cephalixin (100 vs 100), cefoperazone (180 vs 50), ceftiofur (205 vs 100), chlortetracycline (57 vs 100) oxytetracycline (62 vs 100), tetracycline (90 vs 100), ciprofloxacin (178 vs 100), enrofloxacin (130 vs 100), marbofloxacin (130 vs 75) and norfloxacin (130 vs 100). In contrast, the IC50 values of penicillins, aminoglycosides, macrolides and sulfonamides, except neomycin (Table 1), were very high compared to their MRLs (>30 MRLs).

## Discussion

With respect to cephalosporins, Hamilton-Miller (1999) observed growth inhibition of some pathogenic yeasts and filamentous fungi when analyzing semisynthetic cephalosporins that possess an N-benzylthiocarbamate side group. Similarly, Sanyal *et al.* (1992) reported that cephalosporin degradation products inhibit the growth of *Trichophyton mentagrophytes* (dermatophytes) and *Macrophomina phaseolina* (pathogenic plant), but are not effective against *Candida albicans* (pathogenic yeast) or *Aspergillus niger* (saprophyte). In the present study, the difference observed in the sensitivity of cephalosporins and penicillins (Table 1) may be due to the production of penicillinase by *K. marxianus*, which decreases the action of penicillins, thus allowing the normal fermentation of yeast.

Regarding quinolones, growth inhibition of *K. marxianus* by these antibiotics (Figure 1) can be attributed to their effect on the topoisomerase enzyme that participates in the relaxation of the DNA double helix. Zhang *et al.* (2015) indicated genotoxic effects against non-target species due to the binding of quinolones to topoisomerase. Similarly, Stergiopoulou *et al.* (2009) reported growth inhibition of *Candida* spp. by fluoroquinolones.

Finally, regarding tetracyclines, their effect on *K. marxianus* growth (Figure 1) can be attributed to the inhibition of yeast protein synthesis, since these substances interfere with the binding of aa-tRNA to the 30S ribosomal subunit (Tenover, 2006). In this regards, Oriol & Waterworth (1975) highlighted that minocycline can inhibit the growth of the yeast *C. albicans*, while Schwartz *et al.* (1972) suggested that the combined effect of polymyxin B and tetracycline can inhibit the growth of *C. albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figure 1.** Effect of the cephalosporin, quinolone and tetracycline concentrations on the growth of *Kluveromyces marxianus*.

**Table 1.** Logistic equations that represent the effect of antibiotic concentrations in whey on the growth inhibition of *Kluyveromyces marxianus*

Antibiotics	Logistic [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [ATB]			IC50	MRL
	$\beta_0$	$\beta_1$	C%		
<b>Beta lactams</b>					
Penicillin G	2.0971	-0.0064	86.2	330	4
Amoxicillin	2.4839	-0.0009	94.1	2680	4
Ampicillin	1.6418	-0.0006	82.3	2700	4
Cloxacillin	1.6090	-0.0014	86.7	1200	30
Oxacillin	2.3871	-0.0014	90.6	1700	30
Cefadroxil	2.4659	-0.0294	91.6	84	100
Cephalexin	2.8972	-0.0284	89.8	100	-
Cefoperazone	2.8371	-0.0156	93.0	180	50
Cefuroxime	1.9394	-0.0108	83.5	175	-
Ceftiofur <sup>®</sup>	3.6675	-0.0179	90.9	205	100
<b>Aminoglycosides</b>					
Streptomycin	3.5496	-0.0031	92.9	1140	-
Kanamycin	4.3517	-0.00036	95.4	12000	150
Neomycin	3.0491	-0.0025	89.4	1200	1500
<b>Macrolides</b>					
Erythromycin	2.1208	-0.00005	86.3	41000	-
Tilcomisin	1.9330	-0.00023	86.6	8200	50
Tylosin	3.3525	-0.0029	95.3	1160	50
<b>Tetracyclines</b>					
Chlortetracycline	2.3751	-0.0410	89.6	57	100
Oxytetracyclin	3.1727	-0.0508	97.1	62	100
Tetracycline	3.2406	-0.0359	95.3	90	100
<b>Quinolones</b>					
Ciprofloxacin	6.9824	-0.0391	97.2	178	100
Enrofloxacin	2.1906	-0.0167	93.2	130	100
Marbofloxacin	1.7982	-0.0120	85.5	130	75
Norfloxacin	3.6517	-0.0177	96.1	200	100

Logit [P]: logistic model;  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ : parameters estimated by the model; ATB: antibiotic; C%: Concordance percentage; IC50: concentrations producing 50% of inhibition of yeast growth ( $\mu\text{g/l}$ ); MRL: Maximum Residual Limits ( $\mu\text{g/l}$ ).

## ACKNOWLEDGEMENTS

### Acknowledgements

This research work was carried out as part of the projects PICT 455-2012 and PICT 2017-2841 of the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica of Argentina (ANPCyT). We thank María Victoria Gonzalez Eusevi for revising the English of the manuscript.

## REFERENCES

Díaz-Vergara L, Pereyra CM, Montenegro M, Pena GA, Aminahuel CA and Cavaglieri, LR (2017) Encapsulated whey–native yeast *Kluyveromyces marxianus* as a feed additive for animal production. *Food Additives & Contaminants: Part A* 34, 750-759.

Giraldo J, Althaus RL, Beltrán, MC and Molina MP (2017) Antimicrobial activity in cheese whey as an indicator of antibiotic drug transfer from goat milk. *International Dairy Journal* 69, 40-44.

Hamilton-Miller JMT (1999) Beta-lactams: variations on a chemical theme, with some surprising biological results. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44, 729–734.

Lavari L, Páez R, Cuatrin A, Reinheimer J and Vinderola, G (2014) Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. *Journal Dairy Research* 81, 267-274.

Oriel JD and Waterworth PM (1975) Effects of minocycline and tetracycline on the vaginal yeast flora. *Journal of Clinical Pathology* 28, 403-406.

Sanyal AK, Chowdhury B and Banerjee AB (1992). Generation of high antimycotic activity during degradation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Letter in Applied Microbiology* 14, 221-223.

Schwartz SN, Medoff G, Kobayashi GS, Kwan CN and Schlessinger D (1972) Antifungal properties of polymyxin B and its potentiation of tetracycline as an antifungal agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2, 36-40.

Stergiopoulou T, Meletiadis J, Sein T, Papaioannidou P, Tsiouris I, Roilides E and Walsh TJ (2009) Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63, 343–348.

Tenover FC (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria.

American Journal of Medicine 119, 3-10.

Zhang L, Kumar KV, Geng RX and Zhou CH (2015) Design and biological evaluation of novel quinolone-based metronidazole derivatives as potent Cu<sup>2+</sup>-mediated DNA-targeting antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25, 3699-3705.

**Supplementary table**

<b>Antibiotics</b>	<b>Concentrations (<math>\mu\text{g/l}^1</math>)</b>											
<b><i>Beta lactams</i></b>												
Penicillin G	0	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
Amoxicillin	0	400	800	1200	1600	2000	2400	2800	3200	3600	4000	4400
Ampicillin	0	400	800	1200	1600	2000	2400	2800	3200	3600	4000	4400
Cloxacillin	0	200	400	800	1200	1600	2000	2400	2800	3200	3600	4000
Oxacillin	0	200	400	800	1200	1600	2000	2400	2800	3200	3600	4000
Cefadroxil	0	10	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Cephalexin	0	10	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Cefoperazone	0	20	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400
Cefuroxime	0	20	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400
Ceftiofur <sup>®</sup>	0	20	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400
<b><i>Aminoglycosides</i></b>												
Streptomycin	0	100	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000
Kanamycin	0	1000	2000	4000	6000	8000	10000	12000	14000	16000	18000	20000
Neomycin	0	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000	2200
<b><i>Macrolides</i></b>												
Erythromycin	0	5000	10000	20000	30000	40000	50000	60000	70000	80000	90000	100000
Tilcomisin	0	1000	2000	4000	6000	8000	10000	12000	14000	16000	18000	20000
Tylosin	0	100	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000
<b><i>Tetracyclines</i></b>												
Chlortetracycline	0	10	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Oxytetracyclin	0	10	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Tetracycline	0	10	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
<b><i>Quinolones</i></b>												
Ciprofloxacin	0	20	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400
Enrofloxacin	0	20	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400
Marbofloxacin	0	20	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400
Norfloxacin	0	20	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400



## **Anexo 5**

Eluk D, Ceruti R, Nagel O, Althaus R. 2019. Effect of thermal treatment of whey contaminated with antibiotics on the growth of *Kluyveromyces marxianus*. J. Dairy Res. 86(1): 102-107.

Cite this article: Eluk D, Ceruti R, Nagel O and Althaus R. Effect of thermal treatment of whey contaminated with antibiotics on the growth of *Kluyveromyces marxianus*. Journal of Dairy Research <https://doi.org/10.1017/S0022029919000098>

Received: 16 March 2018

Revised: 19 September 2018

Accepted: 30 December 2018

Keywords:

Antibiotics; fermentation; inactivation; *Kluyveromyces marxianus*; Milk

Author for correspondence:

Rafael Althaus, E-mail: [ralthaus@fcv.unl.edu.ar](mailto:ralthaus@fcv.unl.edu.ar)

## Effect of thermal treatment of whey contaminated with antibiotics on the growth of *Kluyveromyces marxianus*

Dafna Eluk, Roberto Ceruti, Orlando Nagel and Rafael Althaus

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder 2805 - (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina

### Abstract

The objective of the studies reported in this research communication was to investigate the use of whey contaminated with antibiotics such as cephalosporins, quinolones and tetracyclines as a nutrient medium for the growth of *Kluyveromyces marxianus* with particular attention to the effect of thermal treatment used to overcome the inhibitory effects of antibiotic concentrations close to the Maximum Residue Limits. The heat treatments at 120°C for 40 min, 120°C for 83 min, and 120°C for 91 min caused total inactivation of cephalosporins, tetracyclines and quinolone residues in whey respectively.

Antibiotics are used for the treatment of numerous diseases of dairy cows, such as mastitis, metritis, pneumonia, and enteritis. However, some antibiotic molecules are not fully metabolized and can thus be found as antibiotic residues in milk (Siljanoski et al., 2018). The presence of antibiotic residues in milk and whey is a problem for the dairy industry and the environment. Whey can be utilized for the production of yeast biomass by whey fermentation. Among the various yeasts that can be used, *Kluyveromyces marxianus* is important because of its good ability to assimilate lactose. However, Althaus et al. (2014) emphasize that the fermentative capacity of *K. marxianus* decreases when residues of cephalosporins, quinolones and tetracyclines are present at levels close to the Maximum Residue Limits (MRLs) (European Community, 2009) established in milk. The information available on the inactivation of anti-biotics in whey is limited, and for this reason it is necessary to better understand thermal degradation of antibiotics in whey to enable its use as a growth matrix. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of the thermal treatment time at 120°C of whey fortified with cephalosporins, quinolones and tetracyclines, through the growth of *Kluyveromyces marxianus* and its lactose consumption.

### Materials and methods

#### Antibiotics

The antibiotics (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) used were three cephalosporins (cephalexin, cefoperazone and ceftiofur), three quinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin and marbofloxacin), and three tetracyclines (chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline). In all cases, a concentration of antibiotics equal to the MRLs established by the European Community (2009) and Codex Alimentarius (2010) was used, with a limit of 100 µg/l for the antibiotics tested, except for cefoperazone and marbofloxacin for which the limit was 75 µg/l and 50 µg/l, respectively.

#### Yeast

*Kluyveromyces marxianus* (ATCC 8554) obtained from the collection of strains of the Department of Microbiology of the Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) was used.

#### Culture medium

Antibiotic-free whey was deproteinized by heat treatment at 120 °C for 20 min followed by filtration of precipitated proteins, and then fortified with 5 g/l yeast extract (Merck Millipore, USA) and 25 g/l peptone casein (Biokar Diagnostics, Allonne, France). Then, the pH was initially adjusted to 7.5 (with 1 M NaOH) for the fermentation to develop for a time of 12 h (final pH 5.5).

### Experimental design

Five aliquots of the above-described medium were used for each treatment, which were: [Control], without antibiotic or heat treatment; [ATB], with antibiotic and without heat treatment; [TT<sub>20</sub>], [TT<sub>40</sub>], [TT<sub>60</sub>], with antibiotic and heat-treated at 120 °C for 20, 40 or 60 min, respectively. In total, 45 fermenters (five aliquots for nine antibiotics) were used in borosilicate glass flasks. Each fermenter was inoculated with 20% of a *K. marxianus* suspension, to obtain uniformity in the initial optical density (OD<sub>0</sub> = 0.210 ± 0.015). Subsequently, each fermenter was stirred at 42 °C for 12 h. Triplicates of samples from each fermenter were taken every 2 h (21 samples per treatment) to determine yeast biomass and residual lactose concentrations.

### Biomass

Cell growth was determined by OD readings at 620 nm by using a Boeco Model S-20 Vis & S-22 UV/Vis spectrophotometer (Hamburg, Germany). With the biomass data obtained for each sample, the relative growth (RG) was calculated.

### Lactose consumption

The lactose concentration (L) was determined using a colorimetric enzymatic technique based on the hydrolysis of lactose into galactose and glucose in the presence of β-galactosidase according to the technique proposed by Aktaş et al. (2006). The lactose relative consumption (LRC) was determined in relative terms to the initial concentration of lactose.

### Statistical analysis

The results were analysed using the stepwise option of the General Linear Regression Model procedure included in the statistical package StatGraphics Centurion XVI (StatGraphics®, 2008). Eq. (1) describes the effects of time, antibiotic and heat treatment on the fermentation of *K. marxianus*:

$$Y_{ijkl} = (b_1 - b_2 \cdot ATB_j + b_3 \cdot ATB_j \cdot TT_k) \cdot t_i + 1 \quad (1)$$

where:  $Y_{ijkl}$  = variable response (RG<sub>ijkl</sub>: relative growth, LRC<sub>ijkl</sub>: lactose relative consumption);  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  coefficients estimated by the model;  $t_i$ : effect of fermentation time ( $i = 7: 0, 2, 4, 6, 8, 10$  and 12 h);  $ATB_j$ : effect of the antibiotic in terms of dummy variable ( $j = 2, ATB = 0$ : without antibiotic,  $ATB = 1$ : with antibiotic);  $TT_k$ : effect of the heat treatment time at 120 °C ( $k = 4, TT = 0, 20, 40$  and 60 min) and  $\varepsilon_{ijkl}$ : residual error of the model.

Subsequently, the percentage of relative degradation (% RD) for each antibiotic ( $ATB = 1$ ) and thermal treatment ( $TT_k = 20, 40$  and 60 min) was calculated using Eq. 1 for the relative growth (RG). The percentage of relative degradation due to the heat treatment was calculated according to the following equation:

$$\%RD = \frac{(RG_{(ATB=1,TT=K)} - RG_{(ATB=1,TT=0)})}{(RG_{(ATB=0,TT=0)} - RG_{(ATB=1,TT=0)})} \cdot 100 \quad (2)$$

Replacing the values of RG for their predictor variables (Eq. 1) yields the following equation:

$$\%RD = \frac{(\beta_1 - \beta_2 \cdot ATB_j + \beta_3 \cdot ATB_j \cdot TT_k) \cdot t_i - (\beta_1 - \beta_2 \cdot ATB_j + \beta_3 \cdot ATB_j \cdot TT_0) \cdot t_i}{(\beta_1 - \beta_2 \cdot ATB_0 + \beta_3 \cdot ATB_0 \cdot TT_0) \cdot t_i - (\beta_1 - \beta_2 \cdot ATB_0 + \beta_3 \cdot ATB_0 \cdot TT_0) \cdot t_i} \cdot 100 \quad (3)$$

After replacing the dummy variables by their respective values ( $ATB_0 = 0$ ,  $TT_0 = 0$  and  $ATB_1 = 1$ ) and simplifying 'ti' (note that the degradation percentage is independent of the fermentation time), the following equation is obtained:

$$\%RD = \frac{(\beta_1 - \beta_2 \cdot 1 + \beta_3 \cdot 1 \cdot TT_k) - (\beta_1 - \beta_2 \cdot 1 + \beta_3 \cdot 1 \cdot 0)}{(\beta_1 - \beta_2 \cdot 0 + \beta_3 \cdot 0 \cdot 0) - (\beta_1 - \beta_2 \cdot 1 + \beta_3 \cdot 1 \cdot 0)} \cdot 100 \quad (4)$$

Simplifying terms allows reaching the reduced expression for the calculation of degradation (Eq. 5), which in turn allows estimating the treatment times to achieve the total inactivation of each antibiotic:

$$\%RD = \frac{\beta_3 \cdot TT_k}{\beta_2} \cdot 100 \quad (5)$$

### Results and discussion

To visualize the significant effects of the antibiotics and times of the thermal treatment on the growth of *K. marxianus* and the relative lactose consumption, please refer to Fig. 1 (cephalosporins), Fig. 2 (quinolones) and Fig. 3 (tetracyclines). In each Figure the logistic equation obtained by applying the stepwise option of Eq. 1 is shown. The coefficients of treatment time ( $\beta_1$ ) indicate an increase in cell growth and lactose consumption as the fermentation time increased. The inhibitory action of the antibiotics on *K. marxianus* was manifested by the negative coefficients of parameter ' $\beta_2$ ', indicating a decrease in biomass production and lactose consumption as the fermentation time increased. In addition, the thermolability of antimicrobials is manifested by the positive terms of ' $\beta_3$ ', indicating an increase in biomass and lactose consumption as the heat treatment time increased. The figures show that the relative cell growths increased as the fermentation time increased. In addition, the presence of antibiotics at levels equivalent to their respective MRLs caused a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in cell growth, whereas the heat treatments inactivated the antibiotics, thus improving the cell growth of these samples.

Regarding lactose consumption by *K. marxianus*, it decreased ( $P < 0.05$ ) due to the presence of the antibiotics studied, whereas samples heated at 120 °C for 60 min showed an increase in lactose consumption ( $P < 0.05$ ) (Figs 1–3). However, shorter heating times (20 and 40 min) did not significantly ( $P > 0.05$ ) improve lactose consumption. This indicates that the analysis of lactose consumption is a less sensitive parameter than cell growth.

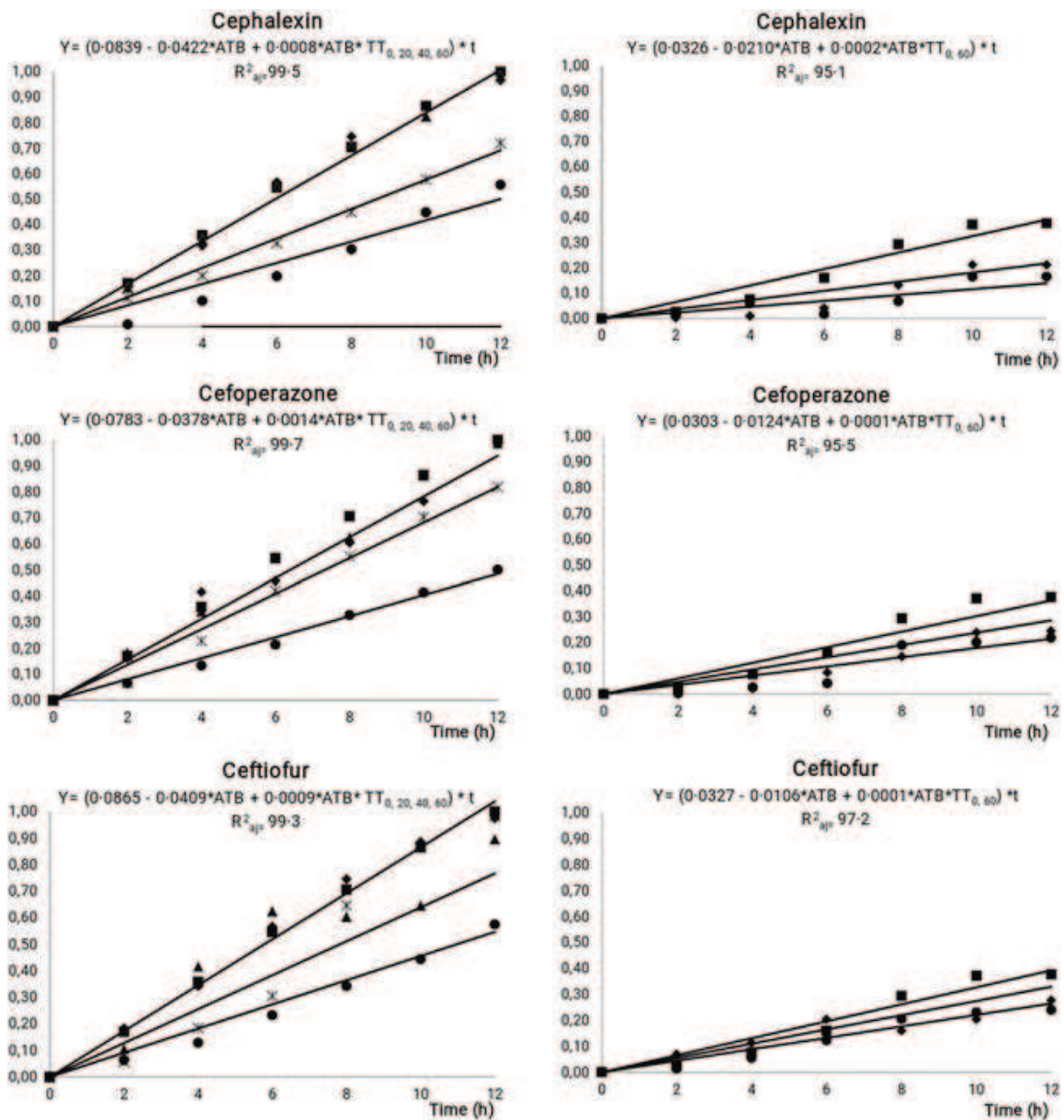


Fig. 1: Effect of thermal treatment and cephalosporins on the growth of *K. marxianus* and consumption of lactose. (t= test time. ATB= antibiotic. TT= thermal treatment. ■: control; ◆: TT 60 min; ▲: TT 40 min; \*: TT 20 min; ●: TT 0 min).

#### Cephalosporins

These antibiotics showed a great thermolability, because the heat treatment at 120 °C for 20 min was statistically different from the control group ( $P < 0.05$ ), while longer heating times (TT = 40 min) allowed total degradation of these antibiotics (% RD = 100). Therefore, in Fig. 1, the relative growth lines for the treatments for 40 and 60 min are superimposed with those of the control group ( $P > 0.05$ ), whereas heating at 120 °C for 20 min, inactivated 69% of cephalexin, 82% of cefoperazone and 77% of ceftiofur. Zorraquino et al. (2008b) reported values of thermal inactivation

of cephalosporins slightly higher (>92% for cefoperazone and >90% for cephalexin) than those obtained in this work when sterilizing milk samples at 120 °C for 20 min. Similarly, Roca et al. (2011) achieved high thermal degradations (99% for cephalexin and 100% for cefoperazone) with a sterilization process of 120 °C for 20 min and a quantification of these molecules by HPLC. Quinolones

The high effect of quinolones on cell growth due to the high values of coefficient 'β2' ( $\beta_{2,\text{ciprofloxacin}} = 0.0689$ ,  $\beta_{2,\text{enrofloxacin}} = 0.0682$  and  $\beta_{2,\text{marbofloxacin}} = 0.0686$ ) completely prevented the growth of *K. marxianus*.

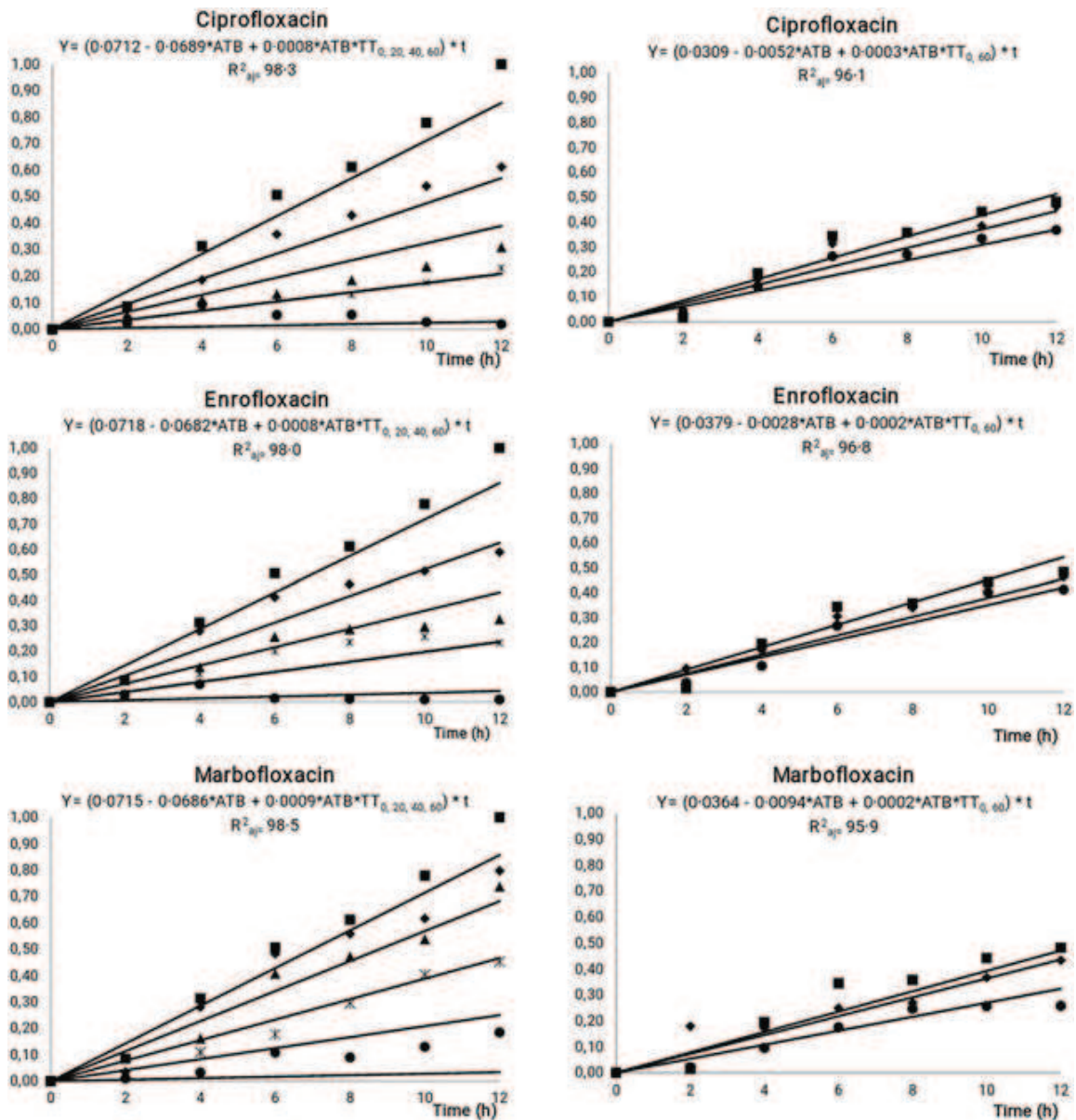


Fig. 2: Effect of thermal treatment and quinolones on the growth of *K. marxianus* and consumption of lactose. (t= test time. ATB= antibiotic. TT= thermal treatment. ■: control; ◆ : TT 60 min; ▲: TT 40 min; \*: TT 20 min; ● : TT 0 min).

This inhibitory action was also manifested in a decrease in lactose consumption ( $\beta_{2,\text{ciprofloxacin}} = 0.0052$ ,  $\beta_{2,\text{enrofloxacin}} = 0.0028$ , and  $\beta_{2,\text{marbofloxacin}} = 0.0094$ ). An increase in the heat treatment time caused partial inactivation of the quinolones, which increased as the heating time increased (Fig. 2). Heating for 20 min caused mild inactivations, resulting in low % RD increases (% RD<sub>ciprofloxacin</sub> = 21, % RD<sub>enrofloxacin</sub> = 24, and % RD<sub>marbofloxacin</sub> = 25). Similarly, Zorraquino et al. (2008a) reported low percentages of inactivation (18% for enrofloxacin and 34% for

marbofloxacin) when sterilizing milk samples at 120 °C for 20 min, using *Escherichia coli* as a bacterium test. Also, Roca et al. (2010) reported low thermal inactivations (120 °C-20 min) for ciprofloxacin (13%) and enrofloxacin (5%) when using HPLC with UV detection. Our results showed that the treatment times used in this study were not enough to completely inactivate the quinolones. However, the use of Eq. 5 allowed us to estimate the time needed to reach the total degradation of ciprofloxacin (91 min), enrofloxacin (84 min) and marbofloxacin (76 min).

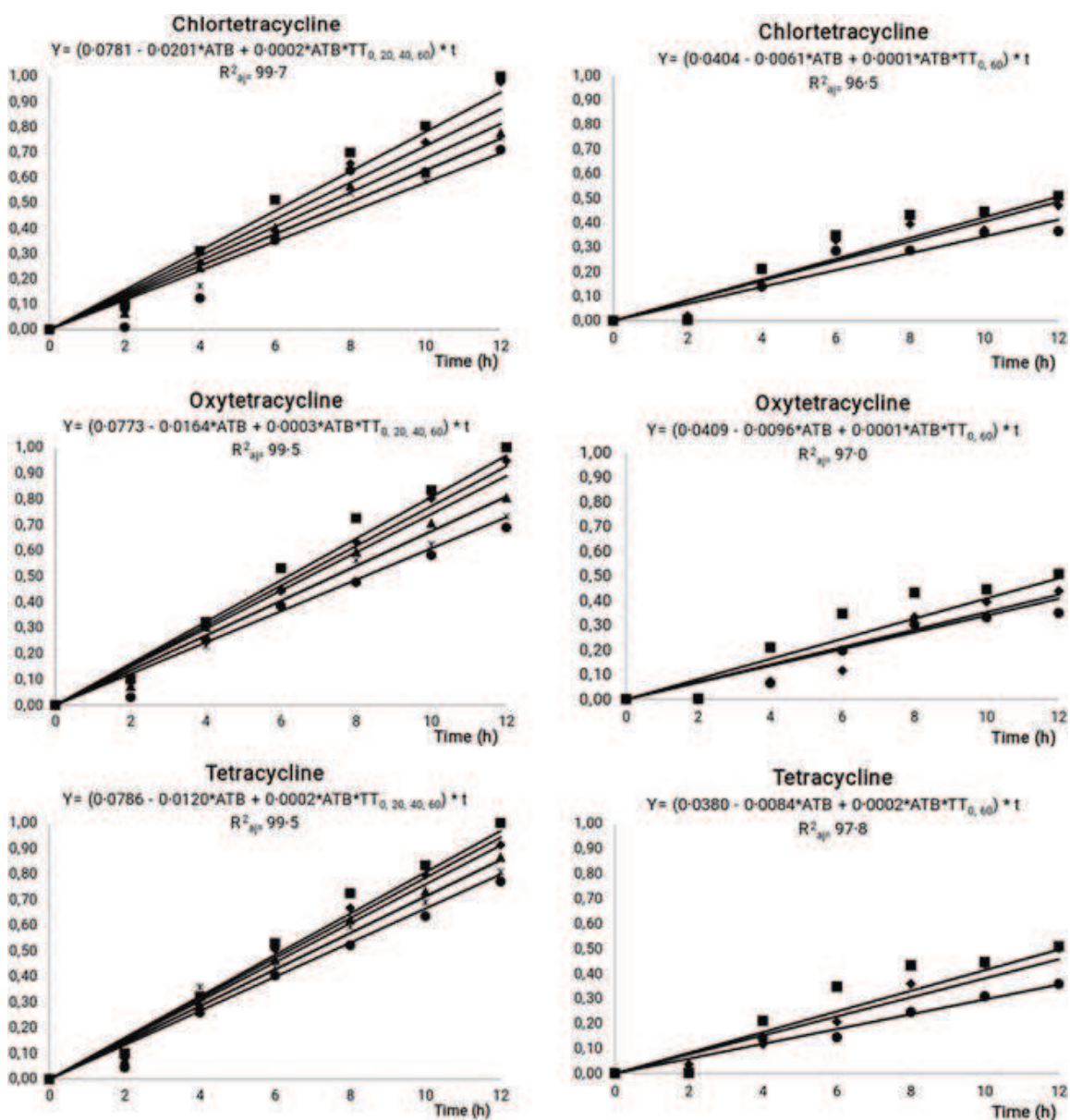


Fig.3: Effect of thermal treatment and tetracyclines on the growth of *K. marxianus* and consumption of lactose. (t= test time. ATB= antibiotic. TT= thermal treatment. ■: control; ◆: TT 60 min; ▲: TT 40 min; \*: TT 20 min; ●: TT 0 min).

#### Tetracyclines

Figure 3 shows that heating at 120 °C for 60 min causes total inactivation of oxytetracycline and tetracycline, but is insufficient to inactivate chlortetracycline (72%). For this molecule, the total degradation time (83 min) can be estimated by Eq. 5. The thermal inactivations of the tetracyclines obtained in this study were similar to those reported by Zorraquino et al. (2010) in milk samples (90% for chlortetracycline, 89% for oxytetracycline and 91% for tetracycline). In conclusion, thermal treatments at 120 °C for 40, 83 and 91 min are necessary for the total

inactivation of cephalosporins, tetracyclines and quinolone residues in whey respectively. Therefore, we conclude that these thermal treatments to whey contaminated with these antibiotics could be applied for cell bio-mass production with *K. marxianus*.

**Acknowledgements.** This research work has been carried out as part of the CAI + D'11 Projects (50120110100052 LI, Res. 444/13- List II year 2013, Universidad Nacional del Litoral, Argentina) and PICT 455-2012 (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica).

## References

- Aktaş N, Boyacı İH, Mutlu M and Tanyolaç A (2006) Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). *Bioresource Technology* 97, 2252–2259.
- Althaus R, Nagel O and Molina P (2014) Efecto de antibióticos en suero de leche sobre la fermentación de *K. marxianus* [Effect of antibiotics in whey on the fermentation of *K. marxianus*]. Argentina. Concordia, Argentina Libro. Resumen. Congreso. Food Innova – International Conference in Food Innovation – 978-950698340-6.
- European Community (2009) Council regulation No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union* 15, 1–72.
- Roca M, Castillo M, Martí P, Althaus RL and Molina MP (2010) Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 58, 5427–5431.
- Roca M, Villegas L, Kortabitarte ML, Althaus RL and Molina MP (2011) Effect of heat treatments on stability of  $\beta$ -lactams in milk. *Journal of Dairy Science* 94, 1155–1164.
- Siljanoski A, Cigliarič R, Pezdir T, Lainšček PR, Dolenc J, Starič J and Šinigoj-Gačnik K (2018) Detection of tetracycline and other antimicrobial residues in milk from cows with clinical mastitis treated by combination therapy. *Journal of Dairy Research* 85, 321–326.
- Zorraquino MA, Roca M, Castillo M, Althaus RL and Molina MP (2008a) Effect of thermal treatments on the activity of quinolones in milk. *Milchwissenschaft* 63, 192–195.
- Zorraquino MA, Roca M, Fernandez N, Molina MP and Althaus RL (2008b) Heat inactivation of beta-lactam antibiotics in milk. *Journal Food Protein* 71, 1193–1198.
- Zorraquino MA, Althaus RL, Nagel OG, Roca M and Molina P (2010) Efecto de los Tratamientos Térmicos sobre la Actividad Antimicrobiana de Tetraciclinas en Leche [Effect of thermal treatments on the antimicrobial activity of tetracyclines in milk]. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral* 9, 47–56.

## **Anexo 6**

Ceruti R, Eluk D, Nágel O, Molina M. P, Althaus R. 2016 Análisis de las principales variables que afectan el crecimiento y consumo de lactosa de *Kluyveromyces marxianus*. VI Congreso Internacional de Ciencia y tecnología de los Alimentos. Conservación e inocuidad: trabajos completos (ISBN 978-987-45380-3-1), 42-48.



## **Análisis de las principales variables que afectan el crecimiento y consumo de lactosa de *Kluyveromyces marxianus***

Ceruti R.<sup>(1)</sup>, Eluk D.<sup>(1)</sup>, Nágel O.<sup>(1)</sup>, Molina, M.P.<sup>(2)</sup>, Althaus R.<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder 2805 - (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina.

<sup>(2)</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n (46021) Valencia, España.  
Dirección de e-mail: robertojul@hotmail.com

### **RESUMEN**

Resulta de interés encontrar diferentes alternativas para el tratamiento del lactosuero, a fin de reducir el impacto ambiental de su descarte. Por ello, se propone a menudo el uso de *Kluyveromyces marxianus*, por su capacidad de utilizar lactosa como fuente de carbono, como una alternativa eficiente para el futuro tratamiento del lactosuero. En el presente trabajo se evaluó la influencia de las variables pH, temperatura y fuente nitrogenada sobre el crecimiento y la concentración de lactosa residual durante el crecimiento de *K. marxianus*, utilizando una matriz compuesta por lactosa (4%), extracto de levadura (0,5%) y fuente nitrogenada (2,5%). Se observó mayor consumo de lactosa y crecimiento celular para valores de pH cercanos a la neutralidad. Se verificó también un mayor crecimiento a valores más elevados de temperatura (40°C), mientras que no se observó efecto significativo de las diferentes fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento celular, aunque el consumo de lactosa fue mayor cuando se utilizó peptona de caseína o triptona de soja. Los resultados obtenidos establecen condiciones de referencia (pH=6,5, T=40°C, peptona de caseína o triptona de soja) para una futura optimización en un biorreactor, a fin de maximizar la producción de biomasa y el consumo de lactosa por parte de *K. marxianus*.

**Palabras claves:** *Kluyveromyces marxianus*, consumo de lactosa, crecimiento celular, variables operativas.

### **ABSTRACT**

There is an increasing interest in different alternatives for cheese whey treatment, aimed at reducing the impact of its disposal to the environment. Due to lactose utilization as carbon source and other growth characteristics, the yeast *Kluyveromyces marxianus* has been proposed as an efficient alternative for whey treatment. In the present work, the influence of pH, temperature and nitrogen source on cellular growth of *Kluyveromyces marxianus* and residual lactose concentration was studied, using a matrix containing lactose (4%), yeast extract (0,5%) and a nitrogen source (2,5%). Higher lactose consumption and cellular growth was observed at pH values near neutrality. High temperature values (40°C) also increased yeast growth, and nitrogen source type showed no effect on this quantity, but caused lower residual lactose values when casein peptone or soy tryptone were used. The results obtained in this work may be a starting point for future optimization in a bioreactor, aimed at maximizing biomass production and lactose consumption by *K. marxianus*.

**Keywords:** *Kluyveromyces marxianus*, lactose consumption, cellular growth, operational variables



## INTRODUCCIÓN

El descarte del lactosuero sin la aplicación previa de tratamientos depurativos constituye una fuente muy importante de contaminación ambiental, debido a los grandes volúmenes que se producen y su alta carga orgánica. La mayor parte de la demanda bioquímica y química de oxígeno (BOD, COD) del lactosuero se debe a la lactosa (Koutinas et al. 2009). Por ello, el excedente de lactosuero constituye un desafío para la industria, y debe ser considerado como un recurso más que como un desecho (Guimarães et al. 2010).

La disponibilidad de lactosa y la presencia de otros nutrientes esenciales para el crecimiento de microorganismos hacen del lactosuero un sustrato adecuado para el crecimiento de levaduras. Por ello, algunos autores sugieren utilizar este material como base para la producción de biomasa microbiana por su buen valor nutritivo (Panesar et al. 2008, Guimarães et al. 2010). Entre las especies de levaduras que poseen la capacidad de asimilar lactosa, *Kluyveromyces marxianus* es muy utilizada por su elevada tasa de crecimiento, alta capacidad de secreción proteica, posibilidad de obtener energía del medio por respiración o fermentación, y termotolerancia (todas las cepas pueden crecer a temperaturas de 44°C) (Morrissey et al. 2015). Debido a sus características particulares, diversas investigaciones han propuesto a *K. marxianus* como una alternativa eficiente para el tratamiento del lactosuero (Fonseca et al. 2008). Sin embargo, existen notorias discrepancias en estos trabajos con respecto a cuáles son las mejores condiciones para el crecimiento y la utilización de lactosa por parte de *K. marxianus*. Así, Aktaş et al. (2006) establecen un consumo máximo de lactosa a 35°C y pH=6,0, mientras otros autores optimizan el crecimiento celular, proponiendo condiciones diferentes, con temperaturas cercanas a 31°C y valores de pH más próximos a 5,0 (Moresi et al. 1980, Belem y Lee, 1999). Por su parte, Rech et al. (1999) reportan el mayor crecimiento de la levadura a una temperatura de 37°C y un pH de 5,5. En cuanto a la fuente nitrogenada adicionada para lograr el crecimiento de *K. marxianus*, se debe destacar que son muy variadas en la bibliografía, incluyendo fuentes complejas como proteínas del lactosuero solas (Revillion et al. 2003) o suplementadas con extracto de levadura y sales de amonio (Belem y Lee 1999, Rech et al. 1999, Aktaş et al. 2006) o el uso de fuentes nitrogenadas más simples como peptonas, extracto de levadura y/o sales de amonio (Grubb y Mawson 1993, Yönten 2013).

Por todo ello, y en virtud de las discrepancias reportadas en la literatura consultada, el objetivo de este trabajo ha sido determinar las mejores condiciones de trabajo (temperatura, pH y fuente nitrogenada) para lograr una mayor producción de biomasa y menores valores de lactosa residual.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño de los experimentos

Se realizaron experimentos a fin de evaluar la influencia del pH (5,0; 5,5; 6,0 y 6,5), temperatura (30, 37 y 40°C) y fuente nitrogenada (peptona de caseína, peptona de carne y triptona de soja) sobre el crecimiento celular y el consumo de lactosa por parte de *K. marxianus*. Para ello, se utilizó un medio base compuesto por 4g/100 ml de lactosa (Laboratorios Cicarelli, Argentina), 0,5 g/100 ml de extracto de levadura (Laboratorios Britania, Argentina) y 2,5 g/100 ml de fuente nitrogenada.

Los cultivos se realizaron en 10 frascos de vidrio de boro silicato de 100mL para evaluar los 4 valores de pH, 3 de temperatura y las 3 fuentes nitrogenadas diferentes, utilizando 50 mL de medio de cultivo en cada frasco. Se analizó la fermentación de *K. marxianus* durante un tiempo de 12hs, realizando agitaciones cada 1h y muestreos cada 2hs (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas de iniciado el cultivo) para evaluar el crecimiento celular y la concentración de lactosa residual relativa. En todos los casos el pH fue ajustado en cada muestreo mediante el agregado de NaOH 1N.

Para la activación de la levadura, se utilizó un medio base con una composición iguala la empleada posteriormente en cada experimento. Se utilizó un volumen de inóculo correspondiente al 20% del volumen final. Previamente se estandarizó la concentración del inóculo a una densidad óptica DO = 1.200.



### Crecimiento celular

El crecimiento celular se analizó a través de mediciones de Densidad Óptica (DO) a 620nm utilizando un espectrofotómetro Boeco Modelo S-20 Vis & S-22 UV/Vis (Hamburg, Germany). Para esto, se tomaron muestra de 2 mL de cada frasco (por duplicado) y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. Luego, los sedimentos se re-suspendieron en igual volumen con solución fisiológica estéril y se determinaron las absorbancias. Estas lecturas se convirtieron a peso seco a utilizando una curva de calibración previamente construida. Los resultados se expresan en términos de biomasa (g/L).

### Concentración de lactosa residual

La cuantificación de la lactosa fue realizada mediante una técnica enzimática colorimétrica basada en la hidrólisis de lactosa a galactosa y glucosa, utilizando la enzima  $\beta$ -galactosidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.E.U.U.) y posterior determinación enzimática-colorimétrica de la glucosa obtenida con un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina) en el que se produce un compuesto coloreado que se leyó a 505nm, utilizando un espectrofotómetro Boeco Modelo S-20 Vis & S-22 UV/Vis (Hamburg, Germany). Para interpretar los resultados en términos de consumo de lactosa, las lecturas de absorbancia en cada muestra y para cada tiempo fueron expresadas como lactosa residual (LR), cantidad adimensional definida como el cociente entre dicha lectura ( $L_t$ ) y su valor inicial al comienzo de la fermentación ( $L_0$ ),  $LR = L_t/L_0$ .

### Análisis estadístico

Para evaluar los efectos de pH, temperatura y naturaleza de la fuente nitrogenada sobre el crecimiento celular y la concentración residual de lactosa, se utilizó la opción stepwise del modelo lineal general (GLM: General linear model) de segundo grado con interacción, que permite incluir en el modelo aquellas variables significativas ( $p < 0.05$ ). Para ello, se empleó el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics, 2009). El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \beta_0 + \beta_{1i}t + \beta_{2j}x_2 + \beta_{11i}t^3 + \beta_{22j}x_2^2 + \beta_{12ij}t x_2 + \varepsilon_{ijk}$$

Siendo: Y: Variable dependiente (biomasa en g/L, o lactosa relativa residual),  $\beta_0$ : intercepto, t: tiempo ( $i = 6: 0, 2, 4, 6, 8, 10$  y  $12$  horas),  $x_2$ : efecto de temperatura ( $j=4$ ), pH ( $j=3$ ), o fuente nitrogenada (FN) en términos de variable dummy ( $j=3$ : FN= peptona de caseína:  $X_{21}=0$  y  $X_{22}=0$ , FN= triptona de soja:  $X_{21}=1$  y  $X_{22}=0$  y peptona de carne:  $X_{21}=0$  y  $X_{22}=1$ ),  $\beta_{11i}$ : efecto cuadrático del tiempo,  $\beta_{22j}$ : efecto cuadrático del pH (o temperatura),  $\beta_{12ij}$ : interacción del tiempo con pH (o temperatura o fuente nitrogenada),  $\varepsilon_{ijk}$ : error residual aleatorio del modelo.

Además, se calculó el coeficiente de regresión cuadrático ajustado como parámetro del ajuste logrado con el modelo.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se exponen las ecuaciones matemáticas calculadas mediante el Modelo Lineal General para los efectos de pH, temperatura y fuente nitrogenada (FN) sobre el crecimiento celular y concentración de lactosa residual relativa. Como puede apreciarse, los coeficientes porcentuales de regresión ajustados ( $R_{aj2}$ ) resultaron en todos los casos mayores a 87%, indicando de esta manera que hubo un adecuado nivel de ajuste de los datos experimentales a los modelos propuestos.

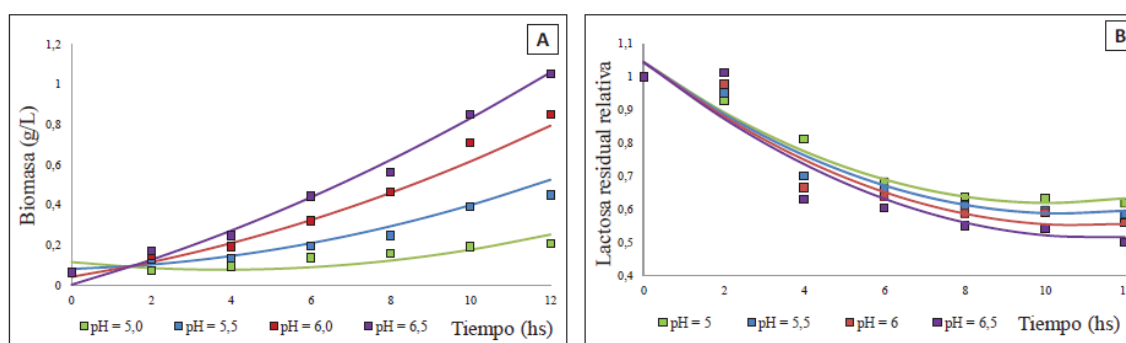


**Tabla 1:** El crecimiento celular se analizó a través de mediciones de Densidad Óptica (DO) a 620nm

Variable	$Y = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_{11} t^2 + \beta_2 X + \beta_{22} X^2 + \beta_{12} t * X$	$R_{aj}^2$
<b>Crecimiento celular</b>		
pH	$Y = 0,2772 - 0,2773 t + 0,0026 t^2 - 0,0066 pH^2 + 0,0515 t * pH$	97.36
Temperatura (T)	$Y = 0,0519 - 0,0700 t + 0,0027 t^2 + 0,0027 t * T$	98.43
Fuente Nitrogenada	$Y = 0,0482 + 0,0312 t + 0,0044 t^2$	98.52
<b>Lactosa residual relativa</b>		
pH	$Y = 1,044 - 0,0508 t + 0,0041 t^2 - 0,0065139 t * pH$	89.13
Temperatura (T)	$Y = 1,041 - 0,0853 t + 0,0037 t^2$	87.79
Fuente Nitrogenada	$Y = 1,035 - 0,0351t - 0,0019 * X_{21} * t + 0,0067 * X_{22} * t$	95,52

$R_{aj}^2$ : Coeficiente porcentual de regresión ajustado, X: variable independiente, Y: Variable dependiente (biomasa o lactosa residual relativa),  $X_{21}$ : triptona de soja,  $X_{22}$ : Peptona de carne.

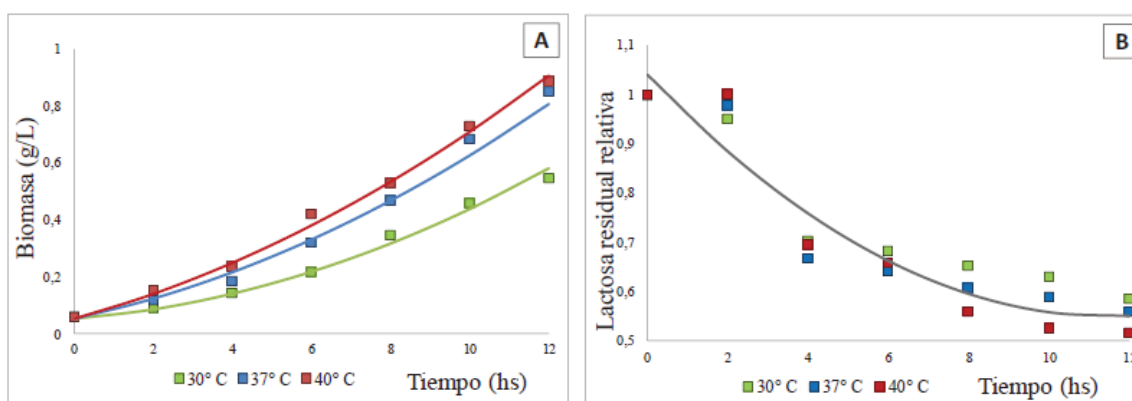
Para todas las condiciones ensayadas se observó el crecimiento de *K. marxianus* en el medio de cultivo utilizado a lo largo de la experiencia (Fig. 1A, 2A y 3A), debido a la capacidad de esta levadura para utilizar lactosa como fuente de carbono. Se observó de esta manera que el crecimiento de la levadura acompañó a una disminución en la concentración de lactosa residual (Fig. 1B, 2B y 3B). El hecho que el crecimiento de la levadura se haya producido a lo largo de cada experimento pone de manifiesto que la levadura se encuentra en fase cuadrática ( $\beta_{11} > 0$ ) y aún no ha comenzado la fase estacionaria de crecimiento. Esto último coincide con lo observado en trabajos anteriores, donde se ha reportado una fase de crecimiento exponencial con una duración mayor del tiempo de cultivo (20 hs) en condiciones aeróbicas (Beausejour et al. 1981, Belem y Lee 1999) y 14 hs en condiciones de anaerobiosis (Zafar y Owais, 2006). 45 Con respecto al efecto del pH, los resultados indican que valores más bajos (5,0; 5,5) disminuyeron de manera significativa ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de la levadura en comparación con valores cercanos a la neutralidad (pH 6,0 o 6,5) (Fig. 1A). Pudo observarse también un consumo de lactosa significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) a valores más altos de pH (Fig. 1B). En forma similar, Aktaş et al. (2006) destacan un mayor consumo de lactosa a pH 6,0 por parte de *K. marxianus* cuando estudian un rango de pH comprendido entre 3,0 y 6,0.



**Figura 1.** Efecto del pH sobre los valores de biomasa (A) y lactosa residual relativa (B) en cultivos de *K. marxianus* a 37°C y fortificado con peptona de caseína como fuente nitrogenada.



Con respecto a la temperatura, se debe destacar que los mayores crecimientos celulares ( $p < 0,05$ ) se obtuvieron a temperaturas más elevadas ( $37^{\circ}\text{C}$  y  $40^{\circ}\text{C}$ ) en comparación con una temperatura menor ( $30^{\circ}\text{C}$ ), según se muestra en la ecuación de **Tabla 1** y **Fig. 2A**, mientras que esta variable no afectó al consumo de lactosa ( $p > 0,05$ ), **Fig. 2B**. Numerosos autores señalan que el crecimiento celular y el consumo de lactosa resultan óptimos a temperaturas comprendidas entre  $30$  y  $37^{\circ}\text{C}$  (Belem y Lee 1999, Aktaş et al. 2006, Diniz et al. 2014) en experimentos que emplearon diferentes condiciones de cultivo y fuentes nitrogenadas, aunque no debe descartarse la posibilidad de llevar a cabo futuras investigaciones a mayores temperaturas debido a la termotolerancia de *K. marxianus* puesto que pueden crecer a temperaturas mayores a  $40^{\circ}\text{C}$  (Lane y Morrissey 2010).

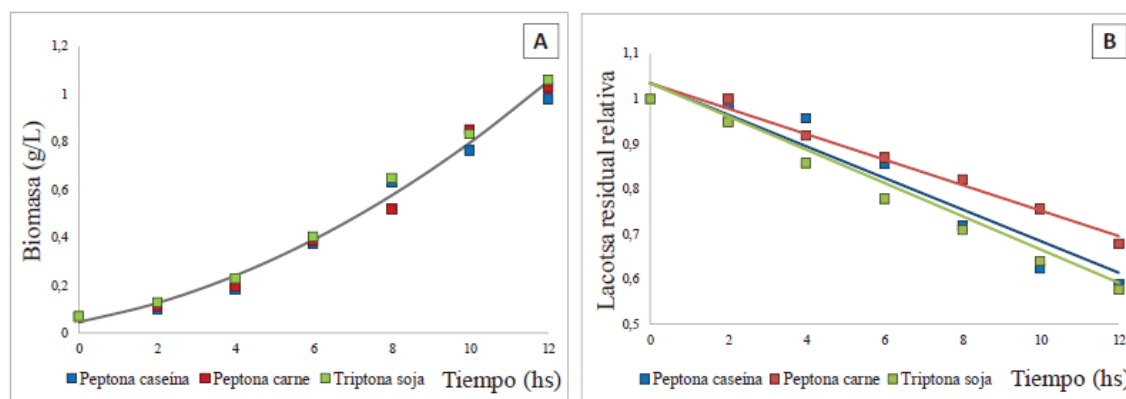


**Figura 2.** Efecto de la temperatura sobre los valores de biomasa (**A**) y lactosa residual relativa (**B**) en cultivos de *K. marxianus* a pH 6,0 y fortificado con peptona de caseína como fuente nitrogenada.

En cuanto a las diferentes fuentes nitrogenadas empleadas en este trabajo, no se observó efecto significativo ( $p > 0,05$ ) sobre el crecimiento celular (**Fig. 3A**), mientras que el mayor consumo de lactosa se obtuvo cuando se adiciona peptona de caseína o triptona de soja en comparación con la peptona de carne (**Fig. 3B**).

Con respecto al consumo de lactosa, es de destacar que las muestras (con un nivel de lactosa inicial en las muestras del 4%, cercano al que suele encontrarse en el lactosuero, De Jesús et al. 2015) experimentaron un consumo del 50% transcurridas 12 h de incubación cuando se utiliza peptona de caseína como fuente nitrogenada a pH 6,5 y  $37^{\circ}\text{C}$ . Belem y Lee (1999) obtienen un consumo de cerca del 70% a las 12 h en condiciones de aerobiosis en un biorreactor tipo batch. En forma similar, Aktaş et al. 2006 logran que se consuma prácticamente la totalidad de la lactosa inicial, para algunas de las condiciones ensayadas y también con una elevada oxigenación del medio. Estos resultados resultan alentadores para estudios futuros donde las variables temperatura y pH sean un punto de partida, y donde se incluya otras variables tales como oxigenación y velocidad de agitación, con el propósito de incrementar la producción celular y el consumo de lactosa. Es de esperar que con un adecuado nivel de oxigenación se logre una elevada remoción de la lactosa en el medio, debido a que *K. marxianus* tiene mejores niveles de crecimiento en condiciones aeróbicas (Belem y Lee 1999, Silveira et al. 2005).





**Figura 3.** Efecto de la fuente nitrogenada (FN) sobre los valores de biomasa (A) y lactosa residual relativa (B) en cultivos de *K. marxianus* a pH 6,0 y 37°C.

### CONCLUSIONES

En el presente estudio se observó que el crecimiento de *K. marxianus* se ve favorecido a temperaturas comprendidas entre 37 y 40°C y valores de pH cercanos a la neutralidad, mientras que el mayor consumo de lactosa se obtuvo a 37°C y pH 6,5 cuando se emplea triptona de soja o peptona de caseína como fuente nitrogenada, siendo en este caso que la lactosa residual relativa disminuyó un 50% en un tiempo de 12 horas. Sin embargo, se realizarán estudios futuros con el propósito de optimizar parámetros en un biorreactor, tales como oxigenación y velocidad de agitación para disminuir aún 47 más esta concentración residual de lactosa, de modo tal de contribuir a estrategias para disminuir el impacto ambiental del efluente lactosuero mediante el tratamiento con *K. marxianus*.

### BIBLIOGRAFÍA

- Aktaş N, Boyacı İH, Mutlu M, Tanyolaç A 2006. Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). *Bioresource Technology*, 97(18): 2252-2259.
- Beausejour D, Leduy A, Ramalho RS 1981. Batch cultivation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 59(4): 522-526.
- Belem MAF y Lee, BH 1999. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Process biochemistry*, 34(5): 501-509.
- Diniz RH, Rodrigues MQ, Fietto LG, Passos FM, Silveira WB. 2014. Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2): 111-117.
- Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(3): 339-354.
- Grubb CF, & Mawson AJ. 1993. Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. *Biotechnology letters*, 15(6): 621-626.
- Guimarães PM, Teixeira JA, Domingues L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 8(3): 375-384.
- Koutinas AA, Papapostolou H, Dimitrellou D, Kopsahelis N, Katechaki E, Bekatorou A, Bosnea LA. 2009. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology*, 100(15): 3734-3739.



- Lane MM, Morrissey JP. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24(1): 17-26.
- Moresi M, Colicchio A, Sansovini F. 1980. Optimization of whey fermentation in a jar fermenter. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 9(3): 173-183.
- Morrissey JP, Etschmann MM, Schrader J, Billerbeck GM. 2015. Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. *Yeast*, 32(1): 3-16.
- Panesar PS. 2008. Production of  $\beta$ -D-Galactosidase from Whey Using *Kluyveromyces marxianus*. *Research Journal of Microbiology*, 3(1): 24-29.
- Rech R, Cassini CF, Secchi A, Ayub, MAZ. 1999. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(2): 91-96.
- Revillion JP, Brandelli A, Ayub, MAZ. 2003. Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(1): 121-128.
- Silveira WB, Passos FJV, Mantovani HC, Passos FML. 2005. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: a flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(7): 930-936.
- Yönten V. 2013. Detecting optimum and cost-efficient of microbial growth rate and lactose consumption of *Kluyveromyces lactis* Y-8279 using RSM. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures*, 8(3): 1023-1035
- Zafar S, Owais M 2006. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemical Engineering Journal*, 27(3): 295-298.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional del Litoral y a la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología.

