



**Aplicación de una nueva lacasa recombinante  
proveniente de *Bacillus* sp. FNT en la biodegradación  
de tres familias de antibióticos**

**Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico**

**Jorge Ignacio Sánchez San Martín**

Patrocinador de Memoria  
**Dr. Mauricio Báez**  
Depto Bioquímica y Biología  
Molecular

Directora de Memoria  
**Dra. Jenny Blamey**  
Fundación Científica y  
Cultural Biociencia

Santiago, Chile

Abril 2023

Esta Memoria de Título se realizó en la Fundación Científica y Cultural Biociencia y fue financiada por el proyecto ANID/CONICYT PCI NSFC190024 y CORFO INNOVA N°15IPPID-45682.

*“Every rejection, every disappointment has led  
you here, to this moment. Don't let anything  
distract you from it.”*

*Alpha Waymond Wang  
(Everything Everywhere All at Once)*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, Claudia y Jorge, quienes con su esfuerzo, trabajo y cariño me impulsaron a cumplir mis metas y seguir mis sueños. También a mi hermana y mi cuñada, Cami y Kathy quienes indudablemente me han acompañado y entregado ánimo en todo este proceso. Los amo. Finalmente agradecer a Victoria, mi abuela, quién desde pequeño me incentivó y motivó a creer en las capacidades que tengo. Siempre estas presente en mis pensamientos.

Quiero agradecer a mis amigos de la vida Andreosa, Sofi, Aline, Basti, Vale, Ofe, Berta y Xali por las conversaciones, consejos, las risas, los bailes y el apaño durante todos estos años. También a Andrea la mejor compañera de lab, Diego, Lore, Wilo y Pete, quienes a base de carretes, risas, viajes a congreso, viajes en metro y largas conversaciones hicieron mucho más agradable los años dentro de la facultad. No puedo dejar pasar a mi querido grupo de teatro “Ciencia Absurda” con quienes pude mantener y compartir mi amor por el teatro dentro de la facultad, conocer personas increíbles y ser siempre un refugio ante el estrés universitario, gracias chiques y profe Ángela.

Agradecer también a mi directora de tesis, la profe Jenny quién desde el primer día que fui a visitar la fundación me aceptó con los brazos abiertos, aportó a mi crecimiento personal y profesional como bioquímico y que además me permitió vivir la experiencia de ir a una expedición científica donde conocí las maravillas del norte de Chile. A Giannina quién me acompañó desde el momento inicial en el laboratorio con enseñanzas, consejos y motivándome a seguir adelante. A Max por toda la ayuda, la buena onda, risas y las galletas de los journal club. Y a todos los miembros de Biociencia, en particular a Litsy por las largas conversaciones que siempre tenemos y por haber hallado una amiga en la fundación. A Diego y Coni, por el apaño, las innumerables risas, recomendaciones de películas, series y animes, además de hacer siempre los almuerzos más amenos durante todos estos meses en los que hemos estado trabajando y sufriendo en nuestras tesis.

Finalmente, a Seba por su compañía y amor en estos últimos meses de tesis, *this is a work in progress*. A Maxito, mi perrito, por su amor incondicional. A las innumerables películas que vi en busca de refugio y ayuda en momentos de estrés. Por último, a todas las personas que conocí en mi vida universitaria que de alguna u otra forma me acompañaron en este proceso.

# PRESENTACIONES EN CONGRESOS DERIVADAS DE ESTA MEMORIA DE TÍTULO

## PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

Jorge Sánchez – San Martín, Giannina Espina, Jenny M. Blamey. “Biorremediación de aguas contaminadas por antibióticos mediante el uso de una lacasa termófila recombinante”. XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 25 al 28 de agosto de 2021, Paraguay, modalidad en línea.

Jorge Sánchez – San Martín, Giannina Espina, Jenny M. Blamey. “Aplicación de una nueva lacasa termofílica recombinante en la biodegradación de tres familias de antibióticos”. IV Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones (IV SiLaByB) y III Jornada de Biocatálisis (III Jbiocat), 8 al 12 de noviembre de 2022, Santiago, Chile.

## PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

Jorge Sánchez – San Martín, Giannina Espina, Jenny M. Blamey. “Aplicación de una lacasa recombinante en la biorremediación de aguas contaminadas con antibióticos”. XXXVII Congreso Nacional de Estudiantes de Bioquímica y Carreras Afines, 16 al 20 de agosto de 2021, Chile, modalidad en línea. **Premio 1er lugar competencia de póster.**

Jorge Sánchez – San Martín, Giannina Espina, Jenny M. Blamey. “Application of a new recombinant laccase in the biodegradation of antibiotics.” XLIV Annual meeting of the Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology, 26 al 28 de octubre de 2021, Santiago, Chile, modalidad en línea.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

PRESENTACIONES EN CONGRESOS DERIVADAS DE ESTA MEMORIA DE TÍTULO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS y ECUACIONES .....	viii
ABREVIATURAS .....	ix
RESUMEN .....	xi
SUMMARY .....	xiii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Contaminación de aguas .....	1
1.2 Contaminación con antibióticos .....	3
1.3 Biorremediación .....	6
1.4 Lacasas .....	8
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 Objetivo General .....	14
3.2 Objetivo Específicos .....	14
<b>4. MATERIALES Y METODOLOGÍAS .....</b>	<b>15</b>
4.1 Reactivos .....	15
4.2 Obtención de la lacasa recombinante .....	16
4.3 Concentración de la fracción <i>heat shock</i> .....	17
4.4 Determinación de la concentración de proteínas .....	17
4.5 Ensayo de actividad lacasa .....	18
4.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) .....	19
4.7 Ensayos iniciales de biodegradación de antibióticos .....	20
4.8 Análisis de degradación de antibióticos mediante cromatografía de fase reversa .....	20
4.9 Ensayos de ecotoxicidad .....	22
4.10 Análisis estadístico .....	23
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
5.1 Obtención de la lacasa recombinante .....	24

5.2 Determinación de la actividad específica de la lacasa.....	25
5.3 Ensayos iniciales para definir condiciones de trabajo.....	26
5.3.1 Ensayos iniciales de ecotoxicidad sin evaluación del pH .....	26
5.3.2 Efecto del pH en los ensayos de ecotoxicidad en <i>E. coli</i> C41 .....	31
5.4 Evaluación de porcentaje de biodegradación mediante cromatografía de fase reversa.....	35
5.4.1 Porcentaje de biodegradación a 2 h de reacción .....	35
5.4.2 Porcentaje de biodegradación a 24 h de reacción .....	40
5.5 Disminución en la ecotoxicidad de antibióticos producto de la biodegradación producida por la lacasa. ....	44
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
6.1 Efecto del pH sobre la biodegradación de antibióticos evaluado con ensayos de ecotoxicidad en <i>E. coli</i> C41 .....	49
6.2 Análisis del porcentaje de biodegradación de antibióticos mediante cromatografía de fase reversa.....	51
6.3 Efecto de la biodegradación sobre la ecotoxicidad de antibióticos .....	60
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>64</b>

# ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS y ECUACIONES

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Reactivos y volúmenes necesarios para la reacción enzimática .....	19
<b>Tabla 2.</b> Purificación parcial y rendimiento de obtención de la lacasa FNT.....	26
<b>Tabla 3.</b> Tamaño de halos de inhibición para cada pH.....	33

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de las tres familias de antibióticos .....	5
<b>Figura 2.</b> Esquema de sitios T1 y T2/T3 .....	9
<b>Figura 3.</b> SDS-PAGE para fracciones celulares y lacasa parcialmente purificada .....	25
<b>Figura 4.</b> Controles para ensayos iniciales de ecotoxicidad en <i>E. coli</i> C41 .....	29
<b>Figura 5.</b> Ensayos iniciales de ecotoxicidad en <i>E. coli</i> C41. ....	30
<b>Figura 6.</b> Evaluación de ecotoxicidad en <i>E. coli</i> C41 a 4 pH distintos.....	32
<b>Figura 7.</b> Cromatogramas de la separación de TC mediante cromatografía de fase reversa .....	36
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de biodegradación luego de 2 horas de incubación en presencia y ausencia de mediadores redox.....	38
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de biodegradación luego de 24 horas de incubación en presencia y ausencia de acetosiringona. ....	41
<b>Figura 10.</b> Cinética de biodegradación de antibióticos en el tiempo .....	43
<b>Figura 11.</b> Controles para ensayos de ecotoxicidad en <i>Bacillus subtilis</i> .....	45
<b>Figura 12.</b> Ensayos de ecotoxicidad a 40°C .....	46
<b>Figura 13.</b> Ensayos de ecotoxicidad a 30°C .....	47
<b>Figura 14.</b> Ensayos de ecotoxicidad a 20°C .....	48

## ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Actividad (U) .....	18
<b>Ecuación 2.</b> Porcentaje de biodegradación .....	21

## ABREVIATURAS

Abs:	Absorbancia
ABTS:	2,2'-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico
AMP:	Ampicilina
AMX:	Amoxicilina
AS:	Acetosiringona
BSA:	Albúmina de suero bovino
°C:	Grados Celsius
CIP:	Ciprofloxacino
CPEs:	Contaminantes de preocupación emergentes
CTC:	Clortetraciclina
DO <sub>600nm</sub> :	Densidad óptica medida a 600nm
EHE:	Electrodo de hidrógeno estándar
FD:	Factor de dilución
FI:	Fracción insoluble
FS:	Fracción soluble
FT:	Fracción total
g:	Gramos
<i>g</i> :	Aceleración gravitacional
h:	Horas
HBT:	1-hidroxibenzotriazol
HS:	Fracción heat shock
Kan:	Kanamicina
kDa:	Kilodaltons
L:	Litros
LB:	Caldo Luria-Bertani
LC:	Lacasa concentrada
mg/mL:	Miligramos por Mililitros
mg:	Miligramos
min:	Minutos

mL:	Mililitros
mm:	Milímetros
mM:	Milimolar
ng:	Nanogramos
nm:	Nanómetros
OTC:	Oxitetraciclina
PTA:	Planta de tratamiento de aguas
rpm:	Revoluciones por minuto
s:	Segundos
St:	Estándar de peso molecular
SYR:	Siringaldazina
TC:	Tetraciclina
TCs:	Tetraciclinas
TG-SDS:	Amortiguador Tris-glicina-SDS
U:	Actividad enzimática
UV:	Ultravioleta
µg:	Microgramos
µL:	Microlitros
µm:	Micrómetros

## RESUMEN

En ríos, lagos y océanos se ha detectado la presencia de diversas moléculas conocidas como “contaminantes de preocupación emergente”, las cuales provienen principalmente de la ganadería, acuicultura y del uso hospitalario y domiciliario de productos farmacéuticos. Esta nueva condición ambiental, se ha observado en muchos países alrededor del mundo incluyendo Chile, en donde la presencia de varios fármacos entre ellos antibióticos, se han detectado en diferentes cuerpos de agua incluso en las aguas del río Mapocho.

A nivel mundial, la utilización de antibióticos se ha incrementado anualmente y con ello el efecto nocivo de estos fármacos en el ambiente. Durante los últimos años distintos métodos de biorremediación han sido desarrollados incluyendo entre ellos el uso de enzimas como las lacasas. En Fundación Biociencia se ha caracterizado desde *Bacillus* sp. FNT una nueva lacasa termoalcalófila con gran potencial para ser aplicada en biorremediación.

Por ello, se propuso evaluar la capacidad de esta nueva lacasa en la biodegradación de tres familias de antibióticos: tetraciclinas,  $\beta$ -lactámicos y quinolonas, frente a distintos mediadores químicos.

En el presente trabajo, se evaluó la capacidad de biodegradación de esta nueva lacasa, mediante ensayos de ecotoxicidad en tres familias de antibióticos: tetraciclinas,  $\beta$ -lactámicos y quinolonas, a distintos pH, tiempos de exposición y temperaturas, utilizando como mediadores redox, acetosiringona (AS), 1-hidroxibenzotriazol (HBT) y 2,2'-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS). Mediante el uso de cromatografía líquida de fase reversa de alta presión

(HPLC), se determinó la mejor condición de degradación de los antibióticos en estudio. Finalmente, se evaluó la disminución de la ecotoxicidad mediante ensayos de biodegradación en presencia de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* luego de 24 h de incubación a 20°C.

Los resultados indicaron que a pH 6 y 7 se observó la degradación principalmente de las tetraciclinas (TCs) en presencia de AS y ABTS. El análisis mediante HPLC indicó que esta lacasa es capaz de degradar en un 80% TC en 2 h y más de un 40% oxitetraciclina (OTC) en 24 h de incubación con AS. Por otra parte, ciprofloxacino (CIP) fue degradado en un 44% en ausencia de mediador redox. Los ensayos de ecotoxicidad demostraron que la lacasa FNT fue capaz de eliminar la toxicidad de TC tanto en cultivos de *E. coli* y *B. subtilis*, luego de 24h de incubación a 20°C.

Esta Memoria de Título demuestra la capacidad de la lacasa FNT de biodegradar y de eliminar la toxicidad de ciertas clases de antibióticos en concentraciones superiores a la concentración ambiental reportada.

## SUMMARY

### **“Application of a new recombinant laccase from *Bacillus* sp. FNT in the biodegradation of three families of antibiotics”**

In rivers, lakes, and oceans the presence of various molecules known as “pollutants of emerging concern” has been detected. These compounds mainly come from livestock, aquaculture, and from the hospital and municipal use of pharmaceutical products. This environmental condition has been observed in many countries around the world, including Chile, where the presence of various drugs including antibiotics, has been detected in different water bodies, including the waters of Mapocho River.

Worldwide, the use of antibiotics increases annually and with it the harmful effect of them on the environment. Different bioremediation methods have been implemented to deal with this problem, such as the use of enzymes such as laccases. In Fundación Biociencia it has been characterized from *Bacillus* sp. FNT a new thermoalkalophilic laccase with great potential to be applied in bioremediation.

In the present work, the biodegradation capacity of this new laccase was evaluated through ecotoxicity tests in three families of antibiotics: tetracyclines,  $\beta$ -lactams and quinolones, at different pH, exposure times and temperatures, using acetosyringone (AS), 1-hydroxybenzotriazole (HBT) and 2,2'-Azinobis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) as redox mediators. Through the use of reverse phase liquid chromatography (HPLC), the best degradation condition for

the antibiotics under study was determined. Finally, the decrease in ecotoxicity was evaluated by biodegradation tests in the presence of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.

The results obtained indicate that at pH 6 and 7 the degradation was observed mainly in tetracyclines (TCs) in the presence of AS and ABTS. HPLC analysis indicated that this laccase is capable of degrading 80% TC in 2 h, and more than 40% of oxytetracycline (OTC) in 24 h of incubation with AS. On the other hand, ciprofloxacin (CIP) was degraded by 44% in the absence of a chemical mediator. Ecotoxicity assays demonstrated that FNT laccase was able to eliminate TC toxicity in both *E. coli* and *B. subtilis* cultures, after 24 h of incubation at 20°C.

This study is the first report on the ability of FNT laccase to biodegrade the toxicity of antibiotics at concentrations higher than those presently reported existing in the environment.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Contaminación de aguas

La contaminación de los recursos hídricos es un problema que afecta a muchos países a nivel mundial, incluyendo a Chile. El incremento de la polución del agua se relaciona directamente con la actividad humana, siendo el aumento en la población, el desarrollo industrial y la agricultura unas de las principales causas de esta contaminación (Owa, 2013). La descarga de compuestos contaminantes y diseminación de estos en las aguas presenta un alto riesgo para la salud de las personas generando además importantes daños al ecosistema (Wang & Yang, 2016). Gran parte de los contaminantes llegan a los cuerpos de aguas al ser liberados a través de aguas residuales provenientes de distintas industrias como la ganadería, la acuicultura, los desechos municipales y hospitalarios (Wang et al., 2023). Los avances en las técnicas analíticas han permitido identificar la presencia de los denominados “contaminantes de preocupación emergente” (CPEs) (Campos et al., 2023). Algunos de los CPEs hallados comúnmente en el agua son: hidrocarburos aromáticos policíclicos, productos desinfectantes, plastificantes, plásticos, insecticidas organofosforados, colorantes sintéticos recalcitrantes, distintos tipos de fármacos, hormonas, productos de cuidado personal y antibióticos (Guan et al., 2018; Mate & Alcalde, 2016; Patel et al., 2019). Actualmente, se han analizado 1.052 muestras de 258 ríos de 104 países, indicando la presencia de antidepresivos, antihistamínicos, analgésicos,  $\beta$ -bloqueadores y antibióticos en concentraciones de ng/L (Wilkinson et al., 2022). Debido a lo anterior y a la escasez de agua producto de las sequias que han ido

en aumento como efecto del cambio climático, resulta de vital importancia el cuidado y la mantención de este indispensable recurso.

En Chile, previo a 1990, las aguas de desechos domésticos e industriales eran liberadas a ríos y lagos sin ningún tratamiento. A comienzos de los años 90 se inició la construcción de plantas de tratamiento de aguas (PTA) y desde entonces se ha alcanzado una cobertura total de saneamiento de aguas del 99,97%, siendo la más alta de América Latina (Abello-Passteni et al., 2020). A pesar de la elevada cobertura de saneamiento, no todos los contaminantes logran ser eliminados. El trabajo realizado por Manzo y col. (2019) determinó la presencia de fármacos luego de analizar muestras de efluentes de una PTA de Santiago. Entre los contaminantes encontrados estaban: ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, ácido salicílico, naproxeno, ketoprofeno, ácido mefenámico y diclofenaco, además de paracetamol a una concentración de  $1,5 \pm 0,3$  ug/L. También se encontró estrona y estradiol en concentraciones de ng/L (Manzo et al., 2015; Manzo et al., 2019). Incluso se han identificado antihistamínicos, antidepresivos y antibióticos en las aguas del río Mapocho (Wilkinson et al., 2022). Por otro lado, se analizó agua de pozo y de un río cercano a San Antonio, se encontró etilparabeno y ácido acetilsalicílico en una concentración menor a 0,38 ug/L (Arismendi et al., 2019). Incluso en la Antártica, el agua de desagüe proveniente de las bases militares y científicas presenta concentraciones de ng/L de antibióticos macrólidos (eritromicina, azitromicina) y quinolonas (ciprofloxacino, norfloxacino). Además, al aislar bacterias presentes en el agua cercana a las bases se detectó que estas eran resistentes a los mismos antibióticos hallados en las muestras (Hernández et al., 2019).

## **1.2 Contaminación con antibióticos**

Durante las últimas décadas, grandes cantidades de antibióticos se han producido y utilizado para el tratamiento y prevención de enfermedades, tanto en humanos como en animales. El uso de antibióticos se ha distribuido ampliamente, llegando a un consumo anual aproximado de 200.000 toneladas (Zhang et al., 2020), incrementándose rápidamente con el paso de los años y con ello aumentando la resistencia antimicrobiana y colocando en peligro la salud pública global (Hou et al., 2023). La diseminación de estos compuestos en el ambiente presenta un riesgo para organismos acuáticos y terrestres.

Las PTAs reciben desechos hospitalarios, domiciliarios, industriales y de otras fuentes que pueden contener desinfectantes, bacterias resistentes a antibióticos, genes de resistencia a antimicrobianos, antibióticos y metabolitos de estos (Zhong et al., 2023). La presencia de todos estos elementos en los afluentes y efluentes de las PTAs generan un ambiente óptimo para el surgimiento de nuevos organismos resistentes a antibióticos (Bueno et al., 2020).

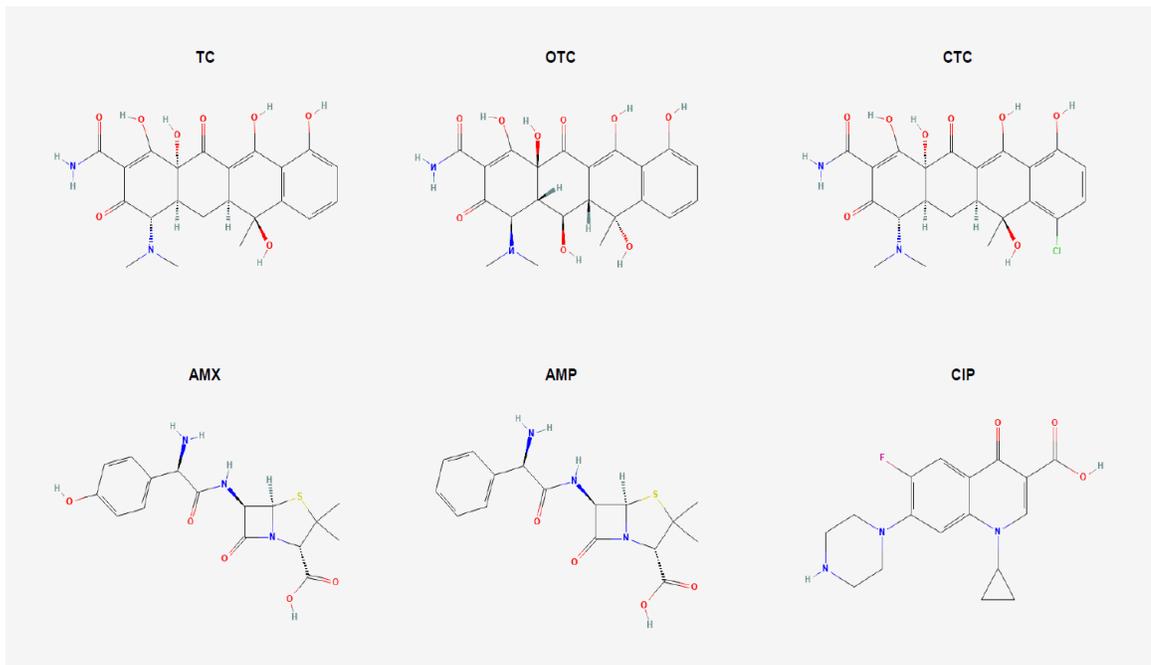
En las PTAs se utilizan lodos activados para reducir la cantidad de antibióticos presentes en el agua, pero la capacidad para eliminar estos compuestos es limitada (Wang et al., 2020). La presencia de antibióticos en un afluente de una PTA disminuye la bioactividad del lodo activado produciendo efluentes que promueven la generación, persistencia y transporte de genes de resistencia y bacterias resistentes a antibióticos (Wang et al., 2020).

Las aguas tratadas son vertidas comúnmente en ríos y lagos por lo que las PTAs podrían tener un rol en la diseminación de genes de resistencia antimicrobiana (Bueno et al., 2020; Patel et al., 2019). La presencia de estos puede causar un

desbalance ecológico afectando a microorganismos como zooplancton, algas, peces y disminuir la efectividad de tratamientos terapéuticos de antibióticos tanto en humanos como en animales (Homem & Santos, 2011; Kovalakova et al., 2020). Un estudio realizado en Chile en la región de Los Ríos analizó aguas de ríos donde se vierten los efluentes de una PTA, indicando que hay una mayor abundancia de microorganismos resistentes a antimicrobianos en comparación a zonas río arriba donde no se han vertido las aguas tratadas (Bueno et al., 2020). Además, se ha descrito que concentraciones de ng/L de antibióticos tienen un efecto de hormesis en los microorganismos, generando florecimientos de microalgas y cianobacterias, causando desbalances ecológicos debido a la ecotoxicidad producida por los antibióticos, afectando la calidad del agua y la liberación de cianotoxinas (Xu et al., 2021).

Los antibióticos presentes en ambientes acuáticos han sido hallados en un rango de ng/L – µg/L (Grenni et al., 2018). Parte importante de esta contaminación producida por los antibióticos no solo está relacionada con la continua descarga de estos, sino también con la persistencia de estas moléculas en el ambiente. Los antibióticos presentan distintos comportamientos, por ejemplo: las penicilinas son más lábiles por lo que son fácilmente degradadas, pero las tetraciclinas y fluoroquinolonas son mucho más persistentes y se acumulan en mayores concentraciones (Grenni et al., 2018). Las penicilinas presentan un anillo betalactámico, siendo el anillo tiazolidínico presente en amoxicilina (AMX) y ampicilina (AMP) (**Figura 1**) la estructura característica en ellos. Estos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular (Suárez & Gudiol, 2009).

Por otra parte, las tetraciclinas son ampliamente utilizadas tanto en humanos como en veterinaria. Dentro de este grupo se encuentra la tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) y clortetraciclina (CTC), estos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas. Estos antibióticos, presentan un núcleo de estructura tetracíclica lineal formado por 4 anillos fusionados (**Figura 1**), capaces de formar complejos quelantes con cationes (Vicente & Pérez-Trallero, 2010). Las quinolonas se caracterizan por estar formadas por dos anillos con un nitrógeno en la posición 1. Pueden presentar un átomo de flúor y un grupo piperacínico, como es el caso de ciprofloxacino (CIP) (**Figura 1**), aumentando la potencia y el espectro de acción. Estos antibióticos actúan sobre el ADN cromosómico bacteriano, inhibiendo la acción de las topoisomerasas (Alos, 2009).



**Figura 1: Estructura de las tres familias de antibióticos.** En azul se indican los átomos de nitrógeno, en rojo los de oxígeno, en celeste los de hidrógeno y en verde los de azufre. Las familias de antibióticos son: Tetraciclinas (TC, OTC y CTC), Penicilinas (AMX y AMP) y Quinolonas (CIP). Obtenido desde *National Center for Biotechnology Information* (2023).

Los antibióticos mencionados anteriormente se han encontrado ampliamente en el ambiente, ya que son utilizados en humanos, en ganadería y acuicultura (Suda et al., 2012; Marshall & Levy, 2011). TC, OTC y CTC han sido hallados incluso a concentraciones de  $\mu\text{g/L}$  o  $\mu\text{g/kg}$  en alimentos como leche y carne, respectivamente (Qamar et al., 2023). CIP ha sido detectado a concentraciones de 14.000 ng/L en efluentes de PTAs en India, OTC 1.410 ng/L en Corea del Sur y TC a 15  $\mu\text{g/L}$  en Portugal (Fick et al., 2009; Charuaud et al., 2019).

Los antibióticos más utilizados alrededor del mundo son las penicilinas, incrementando su consumo en un 36% entre el 2000 y 2015, seguido de las cefalosporinas, quinolonas y macrólidos (Klein et al., 2018). En EE.UU. en 2010 los antibióticos más prescritos fueron: penicilinas, tetraciclinas, macrólidos y quinolonas. Mientras que en China en el 2013 los más utilizados fueron cefalexina, amoxicilina, ofloxacino, tetraciclina y norfloxacin (Qiao et al., 2018). En Chile entre 2018 y 2019 los antibióticos más consumidos fueron amoxicilina, ciprofloxacino, azitromicina y cefadroxilo (Ministerio de Salud, 2019).

### **1.3 Biorremediación**

La contaminación ambiental ha incrementado en las últimas décadas principalmente debido a causas antropogénicas. Asimismo, la presencia de compuestos xenobióticos puede tener efectos nocivos tanto para el medio ambiente (ecotoxicidad) como para los organismos que están en contacto con ellos, incluyendo al humano (Mate & Alcalde, 2016). Por ello, las técnicas de biorremediación para tratar de manera eficaz los ambientes contaminados con un enfoque ecológico y a bajo costo está siendo cada vez más utilizada. La

biorremediación se define como un proceso basado en mecanismos biológicos para reducir, degradar, desintoxicar, mineralizar o transformar la concentración de contaminantes a un estado inocuo para el medio ambiente (Azubuike et al., 2016).

Diferentes técnicas de remediación se han implementado a lo largo de los años, destacando entre ellas: oxidación de Fenton, ozonización, fotólisis mediante luz UV, fotocatalisis. También se han desarrollado técnicas como: filtración, coagulación, floculación y sedimentación. A pesar de la vasta investigación realizada, estas técnicas presentan desventajas debido a que necesitan la presencia de catalizadores y oxidantes que son costosos y pueden generar productos secundarios contaminantes (Homem & Santos, 2011; Deng & Zhao, 2015; Wang & Chen, 2020; Campos et al., 2023). El interés hacia la utilización de métodos enzimáticos para la biorremediación ha ido en aumento, porque estos son más amigables con el medio ambiente, presentando una alta eficiencia y un menor costo (Azubuike et al., 2016; Wen et al., 2019).

Dentro de las clases de enzimas utilizadas en biorremediación se encuentran las oxido reductasas, donde particularmente las lacasas toman mayor protagonismo. Actualmente, existen en el mercado lacasas fúngicas que se utilizan en industria textil, alimentaria y del papel, pero en la actualidad no hay disponibilidad comercial de lacasas para el tratamiento de aguas (Arregui et al., 2019). La biorremediación de agua es un área en la cual las lacasas pueden ser ampliamente utilizadas. Gracias a la capacidad de utilizar oxígeno molecular para producir agua como producto, las lacasas son clasificadas como biocatalizadores

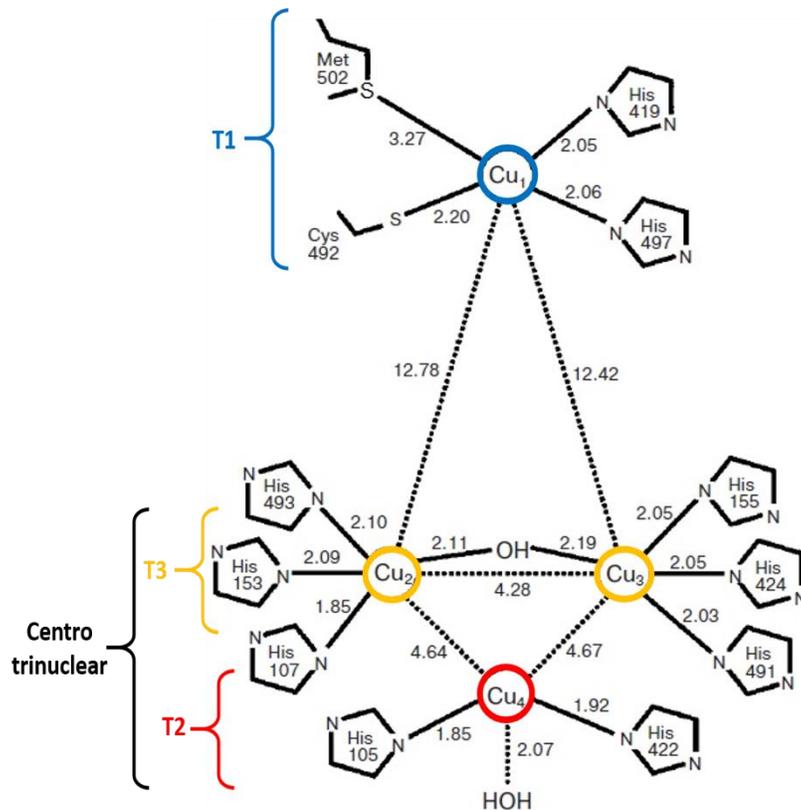
versátiles y amigables con el medioambiente y es por ello que se ha generado un gran interés biotecnológico en estas enzimas (Mate & Alcalde, 2016).

#### 1.4 Lacasas

La primera lacasa fue descubierta y descrita en 1883 por Yoshida desde la resina de *Toxicodendron vernicifluum* (árbol de la laca) (Yoshida, 1883) y caracterizada por Bertrand en 1985 como una enzima con actividad oxidasa, que presentaba metales en su estructura (Morozova et al., 2007). Las lacasas (EC 1.10.3.2, bencenodiol: oxígeno reductasa) pertenecen a la familia de enzimas multicobre oxidadas, las cuales son capaces de oxidar un amplio rango de sustratos como: fenoles, anilinas, aminofenoles, diaminas, ácido ascórbico y compuestos inorgánicos (Guan et al., 2018; Morozova et al., 2007). Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en distintos organismos, entre ellos, plantas, insectos, moluscos, bacterias y hongos. En estos últimos, las lacasas han sido ampliamente estudiadas y descritas, particularmente la proveniente del hongo *Trametes versicolor* (Mate & Alcalde, 2016).

Las lacasas contienen cuatro átomos de Cu organizados en tres sitios distintos según sus características magnéticas y espectroscópicas, denominados como T1, T2 y T3. El sitio activo de las lacasas está conformado por los sitios mencionados anteriormente, con la particularidad que T2 y T3 se organizan en un centro trinuclear de Cu (**Figura 2**) (Morozova et al., 2007). La catálisis realizada por estas enzimas requiere únicamente de la presencia de O<sub>2</sub> y de un sustrato que pueda ser oxidado. Inicialmente el O<sub>2</sub> se une al centro trinuclear T2/T3 donde ocurre su reducción para formar agua. Este proceso va

acompañado de la oxidación de un sustrato reductor, el que se une al sitio T1. Es necesaria la oxidación de cuatro moléculas de sustrato para lograr la reducción de  $O_2$  a  $H_2O$  (Shekher et al., 2011).



**Figura 2: Esquema de sitios T1 y T2/T3.** Sitios de unión a cobre de lacasa CotA de *Bacillus subtilis*. Se indican los átomos de Cu, la distancia entre ellos y entre los aminoácidos más cercanos. Azul: Cu<sub>1</sub> (T1); Amarillo: Cu<sub>2</sub> y Cu<sub>3</sub> (T3); Rojo: Cu<sub>4</sub> (T2). Imagen modificada de Morozova et al. (2007).

Las lacasas solo pueden oxidar compuestos que presenten un potencial redox menor que el del sitio T1, por lo que comúnmente para lograr la oxidación de compuestos que tienen un potencial redox mayor que el del sitio T1 se utilizan mediadores redox. Estos son moléculas que tienen la característica de ser

oxidadas con facilidad por las lacasas. Una vez que se oxidan abandonan el sitio activo en forma de radical libre, el cual puede variar dependiendo el tipo de mediador, siendo así capaces de oxidar moléculas que las lacasas no pueden oxidar (Atalah et al., 2019). Los mediadores se pueden clasificar según su origen. Están los sintéticos como lo son: 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y 1-hidroxibenzotriazol (HBT). También existen los de origen natural, principalmente derivados de la lignina como lo son: siringaldazina (SYR) y acetosiringona (AS) (Yang et al., 2017; Mani et al., 2018).

Las lacasas por su versatilidad como biocatalizadores y al ser amigables con el medioambiente generan un gran interés a nivel industrial. Gracias a su capacidad de oxidar variados sustratos, estas enzimas se han utilizado con éxito en diversas aplicaciones biotecnológicas: en la industria textil, alimentaria, del papel, en síntesis, orgánica (polímeros bioactivos, compuestos fenólicos, fármacos), en cosmética, en la fabricación de biocombustibles y biosensores, en el tratamiento de efluentes y biorremediación de contaminantes ambientales (Mate & Alcalde, 2016; Shekher et al., 2011, Guan et al., 2018; Atalah et al., 2018).

Si bien las lacasas más estudiadas y utilizadas son las provenientes de hongos, estas presentan problemas a nivel industrial, debido a que las enzimas industrialmente se someten a extensos periodos de fermentación y altas presiones. Además, tienen bajo rendimiento y su rango de aplicación es acotado en condiciones ácidas y de temperatura moderadas (Guan et al., 2018). Asimismo, la mayoría de las lacasas presentes en el mercado son de origen fúngico y mesófilo, lo que implica que la temperatura óptima de crecimiento de estos microorganismos se encuentre entre 20 y 45°C (Atalah et al., 2019). Es por

ello que se han investigado otros organismos en la búsqueda de nuevas lacasas con mayor estabilidad y actividad.

Se ha descrito que las lacasas de origen bacteriano presentan mejores características en cuanto a rangos de temperatura, pH y tolerancia a haluros, en comparación a las lacasas fúngicas, por lo que son más atractivas para aplicaciones biotecnológicas (Chauhan et al., 2017). Más aún, las provenientes de bacterias extremófilas, pueden funcionar en condiciones de temperatura y pH extremos, ya que estos microorganismos viven en ambientes como aguas termales, desiertos, incluso la Antártica. En particular, los microorganismos termófilos tienen un amplio rango de temperatura óptima entre los 50 y 80°C (Atalah et al., 2019), por lo que las enzimas provenientes de ellos son más termoactivas y termoestables. Además, presentan mayor tolerancia a presiones elevadas, a solventes y agentes desnaturalizantes (Brander et al., 2015). Las condiciones mencionadas anteriormente son comunes en procesos industriales, por lo que las enzimas termófilas serían superiores a las enzimas mesófilas al momento de aplicarlas a nivel industrial.

Durante los últimos años, distintas investigaciones han implementado el uso de lacasas libres e inmovilizadas, principalmente fúngicas, en la remediación de aguas contaminadas (Singh et al., 2018). Se reportan trabajos donde se utilizan lacasas de *T. versicolor*, *Myceliophthora thermophila*, *Trametes pubescens* para la biodegradación de estrógenos, diclofenaco, naproxeno y variados contaminantes hallados en los efluentes de PTAs, siendo capaces de biodegradar parte de ellos en presencia de mediadores químicos como HBT (Auriol et al., 2007; Lloret et al., 2010; Spina et al., 2015). La aplicación de lacasas

también se ha evaluado específicamente en el tratamiento de antibióticos, como en el trabajo de Suda y col. (2012), donde se indicó que la lacasa proveniente de *T. versicolor* es más eficiente en la degradación de TCs en comparación con las enzimas lignina y manganeso peroxidasas (Suda et al., 2012). Becker y col. (2016), utilizaron una lacasa fúngica inmovilizada para observar su efectividad al eliminar 38 antibióticos distintos, en presencia y ausencia del mediador SYR. Se observó que las penicilinas son menos estables que las tetraciclinas y fluoroquinolonas y que además el uso de SYR favoreció la remoción del 90% de 17 antibióticos (Becker et al., 2016). Por otro lado, Zhang y col. (2020) utilizaron una lacasa bacteriana inmovilizada de *Bacillus subtilis*, para la degradación de TC y AMP, presentando una eficiencia en la degradación cercana al 100%, en ausencia de mediador (Zhang et al., 2020). A pesar de las investigaciones realizadas con lacasas para la eliminación de antibióticos, aún no hay una enzima disponible en el mercado de esta clase que sea capaz de eliminar una gran cantidad de estos contaminantes.

La búsqueda de nuevas lacasas se ha expandido hacia las enzimas termófilas, ya que estas presentan mejores características de termoactividad y termoestabilidad en comparación a enzimas mesófilas. Estas características las convierten en excelentes candidatos a ser utilizados como biocatalizadores en procesos de biorremediación (Pérez-Llano et al., 2020). Es así como en la Fundación Biociencia, se aisló una nueva bacteria termoalcalófila desde un sitio geotermal. Este microorganismo se identificó como *Bacillus* sp. FNT, el cual presenta condiciones óptimas de crecimiento a pH 8,0 y 50°C. Desde las endosporas de este microorganismo se purificó la lacasa nativa y se generó su

versión recombinante, la que presenta una actividad máxima a 70°C y un pH óptimo de 6,0, al ser evaluada con SYR. Esta enzima es altamente termoestable y termoactiva, con una alta actividad catalítica hacia SYR, guayacol, ácido gálico y ABTS (Espina et al., 2021). Estas características convierten a la lacasa de *Bacillus* sp. FNT en una nueva enzima con alto potencial para ser aplicada en la eliminación de contaminantes del agua, en particular antibióticos.

## **2. HIPÓTESIS**

“La lacasa recombinante proveniente del *Bacillus* sp. FNT biodegrada tetraciclinas, penicilinas y quinolona en conjunto a mediadores redox, disminuyendo la ecotoxicidad de estos antibióticos”.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo General**

Determinar la capacidad de la lacasa recombinante de *Bacillus* sp. FNT para degradar antibióticos y disminuir la ecotoxicidad de estos en muestras de aguas en presencia y ausencia de mediadores redox.

### **3.2 Objetivo Específicos**

1. Determinar la actividad catalítica de la lacasa en la biodegradación de antibióticos.
2. Determinar el incremento de la biodegradación de antibióticos al utilizar mediadores redox.
3. Determinar la reducción en la ecotoxicidad producida por la biodegradación de los antibióticos.

## 4. MATERIALES Y METODOLOGÍAS

### 4.1 Reactivos

**Bio-Rad:** 30% Acrilamida/Bis Solución 37,5:1; Precision Plus Protein™ Standards, Reactivo de Bradford.

**Chemix:** Metanol.

**J.T Baker:** Acetonitrilo, H<sub>2</sub>O calidad HPLC.

**MERCK:** Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Ácido acético glacial, TEMED, Ácido oxálico.

**New England BioLabs:** células de *E. coli* BL21 competentes.

**Sigma-Aldrich:** Tetraciclina (TC), Oxitetraciclina (OTC), Clortetraciclina (CTC), Ampicilina (AMP), Amoxicilina (AMX), Ciprofloxacino (CIP), Kanamicina (Kan), Siringaldazina (SYR), 1-hidroxybenzotriazol (HBT), 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), Acetosiringona (AS), Persulfato de amonio, Protein standard (BSA), Fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

**TLC:** Sulfato de amonio y hierro (II) hexahidratado (Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O).

**VETEC:** Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

**Winkler:** NaCl, Agar-Agar, Bacto™ Triptona, Bacto™ Extracto de levadura, Lisozima, Dodecilsulfato de sodio (SDS), Tris-HCl, Urea, MES, HEPES, Acetato de sodio, Sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O), Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), D-(+) Glucosa anhidra, Lactosa, Cloruro de calcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O), Amortiguador TG-SDS 10x.

## 4.2 Obtención de la lacasa recombinante

Se realizó la transformación de células de *E. coli* BL21 competentes con el vector pJ444 regulado por el promotor T5 y el operador lactosa, regulado por represión catabólica (Bujard et al., 1987). Este vector contiene el gen que codifica la lacasa (*fntlac*) que proviene de *Bacillus* sp. FNT y un gen de resistencia a Kan como marcador de selección. La transformación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de transformación C2530 *New England BioLabs*®.

Se generó un preinóculo de la cepa *E. coli* BL21 pJ444-*fntlac* en medio LB (Tryptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) suplementado con Kan 50 µg/mL e incubado a 30°C durante 18 h con agitación a 160 rpm. Desde el preinóculo se tomó una alícuota para obtener un cultivo de 400 mL con una OD<sub>600</sub> inicial de 0,05. La cepa *E. coli* BL21 pJ444-*fntlac* se cultivó en medio de autoinducción TBA-Cu (Tryptona 12 g/L, extracto de levadura 24 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,3 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,8 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,1 g/L, glucosa 0,5 g/L, α-lactosa 2,0 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0,15 g/L, CuSO<sub>4</sub> 0,3 g/L), suplementado con Kan 50 µg/mL a 23°C por 30 h con agitación a 160 rpm. Una vez concluidas las 30 h, todo el cultivo se centrifugó durante 10 min a 7.690 g, en tubos de 50 mL para obtener la totalidad de la biomasa. El pellet de células se almacenó a -20°C.

El pellet se resuspendió en 40 mL de amortiguador Tris-HCl 50mM pH 8,0, luego se adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/mL y se incubó durante 45 min a 37°C con agitación. Posteriormente, se realizó la ruptura celular en hielo utilizando un sonicador de vástago (Branson) con los parámetros de *duty cycle* 40%, *output control* 2,5 y se aplicaron dos pulsos de ultrasonido de 5 min.

Luego de la ruptura celular, se almacenó una alícuota de la “fracción total” (FT). El resto se centrifugó a 17.310 g durante 30 min para lograr la separación del contenido citosólico del debris celular. Se recolectó todo el sobrenadante y se almacenó una alícuota llamada “fracción soluble” (FS). Al sobrenadante se le efectuó un *heat shock*, para realizar una purificación parcial de la enzima. Esto se realizó a 85°C durante 5 min en *thermoblock*. Una vez transcurrido el tiempo se dejó hielo durante 5 min para disminuir rápidamente su temperatura. Finalmente, se centrifugó a 17.310 g durante 30 min. El sobrenadante o “fracción heat shock” (HS) corresponde a una fracción enriquecida de la lacasa recombinante. El *pellet* obtenido en la primera centrifugación o “fracción insoluble” (FI) se solubilizó en urea 8M.

#### **4.3 Concentración de la fracción *heat shock***

La fracción HS, se filtró utilizando un concentrador Amicon con flujo de nitrógeno y con un filtro de 30 kDa. De esta forma se redujo el volumen que contenía las proteínas de tamaño mayor a 30 kDa, incluyendo la lacasa recombinante la cual tiene un tamaño de 60 kDa. Desde un volumen inicial aproximado de 30 mL se concentró la fracción HS hasta alcanzar un volumen de 3 a 5 mL.

#### **4.4 Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas presente en cada fracción se determinó mediante el uso del reactivo Bradford (Bio-Rad). Para esto se utilizó el equipo lector de microplacas EPOCH2 (BioTek®), en el cual se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de 2 mg/mL de BSA. Utilizando la curva de calibración se midió la concentración de proteínas presente en las fracciones: FT, FS, FI, HS y

lacasa concentrada. Cada una de las fracciones se diluyó 1:20 - 1:30, exceptuando la lacasa concentrada que se diluyó 1:50. Esto se realizó para que las concentraciones de proteínas de las diversas fracciones se encontraran dentro del rango lineal de la curva de calibración. En una placa de 96 pocillos se agregaron 200 µL de reactivo de Bradford 1x. Luego, se incorporaron 10 µL de cada una de las fracciones previamente diluidas en cada uno de los pocillos y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente donde cada muestra se preparó en triplicado. Posterior a ello, se realizó la lectura de absorbancia a 595 nm.

#### 4.5 Ensayo de actividad lacasa

La actividad enzimática de la lacasa se determinó en la fracción HS, ya que es la fracción correspondiente a la lacasa parcialmente purificada. La actividad de la enzima se midió llevando a cabo la reacción colorimétrica de oxidación de SYR a 70°C. Esta reacción se siguió en el tiempo, midiendo la absorbancia del producto de oxidación de SYR a 530 nm en un ensayo continuo, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700. El ensayo se realizó siguiendo los volúmenes indicados en la **Tabla 1**, para esto se incubó la cubeta con SYR y amortiguador a 70°C durante 2 min. Luego se incorporó la enzima a la cubeta y se realizó la medición de absorbancia durante 3 min.

Una unidad de actividad de lacasa (U) fue definida como el cambio de 0,001 unidades de absorbancia a 530 nm, siendo calculada de la siguiente manera:

$$U = \frac{((Abs530nm/minutos\ de\ ensayo) - (Abs530nm/minutos\ de\ blanco)) \times FD}{(0,001 \times 0,005)}$$

Donde U corresponde a las unidades volumétricas de actividad lacasa, FD es el factor de dilución de la enzima y  $Abs_{530nm}$  corresponde a las unidades de absorbancia de SYR oxidada medida a 530 nm.

**Tabla 1: Reactivos y volúmenes utilizados para la reacción enzimática**

	Blanco ( $\mu$ L)	Ensayo ( $\mu$ L)
SYR 0,216 mM	300	300
Amortiguador $KH_2PO_4$ pH 6,0	2700	2695
Lacasa FNT	0	5

SYR: siringaldazina

#### **4.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

La identificación de la lacasa se realizó mediante la determinación de su masa molecular mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se normalizó la concentración de proteínas de cada fracción a 1  $\mu$ g/ $\mu$ L en un volumen final de 15  $\mu$ L para luego incorporar 5  $\mu$ L de amortiguador de carga 4x. Una vez preparadas las muestras se desnaturalizan calentándolas a 90°C durante 5 min. Posteriormente, en un gel de poliacrilamida al 10% se cargaron las muestras y se utilizó el estándar de masa molecular “*Precision plus protein kaleidoscope*” (Bio-Rad). El gel se colocó en amortiguador TG-SDS 1x, se realizó la electroforesis aplicando 80 Volts durante 30 min, luego se aumentó a 100 Volts. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se incubó toda la noche en solución de tinción. Finalmente, se incubó dos veces con solución de destañir para observar el patrón de bandas de cada fracción analizada y así estimar la masa molecular de la enzima en estudio.

#### **4.7 Ensayos iniciales de biodegradación de antibióticos**

Se generaron soluciones stock de 5 mg/mL de TC, OTC, CTC, AMP, AMX y CIP. Los antibióticos TC, CTC y AMP se solubilizan en agua destilada mientras que la OTC, AMX y CIP en HCl 0,1N. Se utilizó como mediadores redox AS, HBT, ambos disueltos en metanol, y ABTS solubilizado en agua destilada. Se generó una solución stock a una concentración de 15 mM de cada mediador redox. En cada reacción los antibióticos se prepararon a una concentración final de 0,5 mg/mL y los mediadores redox a 0,5 mM. Las mezclas de mediadores redox y sustratos se incubaron con la fracción HS de la lacasa recombinante utilizando una concentración final de proteína de 0,1 mg/mL. Los ensayos se efectuaron en 200  $\mu$ L de volumen final, utilizando un amortiguador universal (HEPES, MES y Acetato de sodio) a pH 4, 5, 6 y 7 (Brooke et al., 2015); con una agitación de 180 rpm y una temperatura de 40°C, debido a que corresponde a la mitad de la temperatura óptima descrita para la lacasa FNT. Cada reacción se incubó durante 2 h, una vez transcurrido este tiempo las reacciones se detuvieron disminuyendo la temperatura a -20°C.

#### **4.8 Análisis de degradación de antibióticos mediante cromatografía de fase reversa**

Los ensayos se realizaron en 500  $\mu$ L de volumen final que contenían la mezcla de amortiguador, antibiótico, mediador redox y lacasa FNT. Estos ensayos se prepararon en las siguientes condiciones: pH 5, 6 y 7; a temperatura de 20, 30 y 40°C, durante 2 h a 180 rpm de agitación. Además, se realizaron ensayos a 24 h, pero solo en la condición de pH 6 en presencia de AS. Las concentraciones

utilizadas de lacasa FNT, antibióticos, AS y HBT son las mismas a las descritas en la sección 4.7. Las reacciones se detuvieron con acetonitrilo frío a -20°C en una proporción de 1:3 respecto al volumen de la reacción. Las reacciones se centrifugaron a 17.310 g durante 20 min para eliminar la lacasa de la reacción. Se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C hasta el momento del análisis mediante cromatografía de fase reversa.

Se utilizó el equipo HPLC Shimadzu LC-20AT con una columna de fase reversa C-18 Machery-Nagel (tamaño partícula 5,0 µm, longitud 250 mm, diámetro interno 4,6 mm) en condición isocrática a 45°C. Se utilizó una mezcla de 75% ácido oxálico 0,02M, 18% acetonitrilo y 7% metanol. La solución de ácido oxálico se preparó con agua grado HPLC filtrada a través de filtro 0,22 µm y desgasificada mediante ultrasonido. La cromatografía se realizó a 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 25 µL. Las muestras se descongelaron, se filtraron individualmente con filtros de 0,22 µm y se colocaron en viales ámbar para HPLC. Los cromatogramas de las muestras se obtuvieron mediante un detector de arreglo de diodos modelo SPD-M20A. Cada antibiótico se analizó a una longitud de onda distinta: 254 nm para TC y OTC, 273 nm para CIP y 235 nm para AMX. El análisis de las áreas se realizó con el software integrado del equipo. La obtención del porcentaje de degradación de antibióticos se calculó de la siguiente manera:

$$\%Biodegradación = \frac{\text{área control} - \text{área tratamiento}}{\text{área control}} \times 100$$

#### 4.9 Ensayos de ecotoxicidad

La evaluación de la ecotoxicidad se realizó observando la presencia o ausencia de los halos de inhibición del crecimiento, por lo que la ausencia de estos halos posterior al ensayo es un indicativo que los antibióticos perdieron efectividad (Zhang et al., 2020).

Estos ensayos se realizaron en placas de petri con medio LB-agar y HVMOD-D1-agar. Para esto, se utilizó *E. coli* C41 cultivada de forma rutinaria en medio LB a 30°C y un aislado ambiental de *B. subtilis* disponible en la Fundación Biociencia, cultivado en medio HVMOD-D1 8% de sales totales (NaCl 48 g/L, glucosa 5 g/L, extracto levadura 4 g/L, peptona 4 g/L, casaminoácidos 3,5 g/L, citrato de sodio 2 g/L, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 4 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0,05 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4 g/L, Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 0,04 g/L), pH 6,5 a 30°C. Para el inóculo se utilizó como referencia el estándar de McFarland 0,5 el cual corresponde a una absorbancia de ~0,1 medida a 600 nm. Se inoculó con 100 µL de cada cultivo en forma de césped en sus respectivos medios sólidos. Sobre el agar ya inoculado se colocaron discos de papel filtro de 6 mm previamente esterilizados en luz UV. Sobre los discos esterilizados se incorporaron 5 µL de las mezclas de reacción incubadas a 2 y 24 h, siguiendo la metodología descrita en la sección 4.8. para los ensayos de 24 h. Además, como controles se incubaron los antibióticos en ausencia de lacasa en las mismas condiciones descritas en la sección 4.8. Las placas se incubaron a 30°C durante 18 h para observar la presencia o ausencia del halo de inhibición. Los halos de la zona de inhibición se midieron utilizando el programa ImageJ (Wayne Rasband, NIH). Para cada halo se realizaron 3 medidas distintas del diámetro.

Los ensayos se realizaron en triplicado informando el promedio y desviación estándar de cada halo de inhibición.

#### **4.10 Análisis estadístico**

Los ensayos de biodegradación de antibióticos realizados a 2 y 24 h y los ensayos de ecotoxicidad en placas con césped de *E. coli* C41 y de *B. subtilis*, se realizaron en triplicado. Los resultados de cada uno de estos ensayos se analizaron mediante ANOVA utilizando el programa GraphPad Prism 8.0.2. donde se consideró como una diferencia significativa un valor de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Obtención de la lacasa recombinante

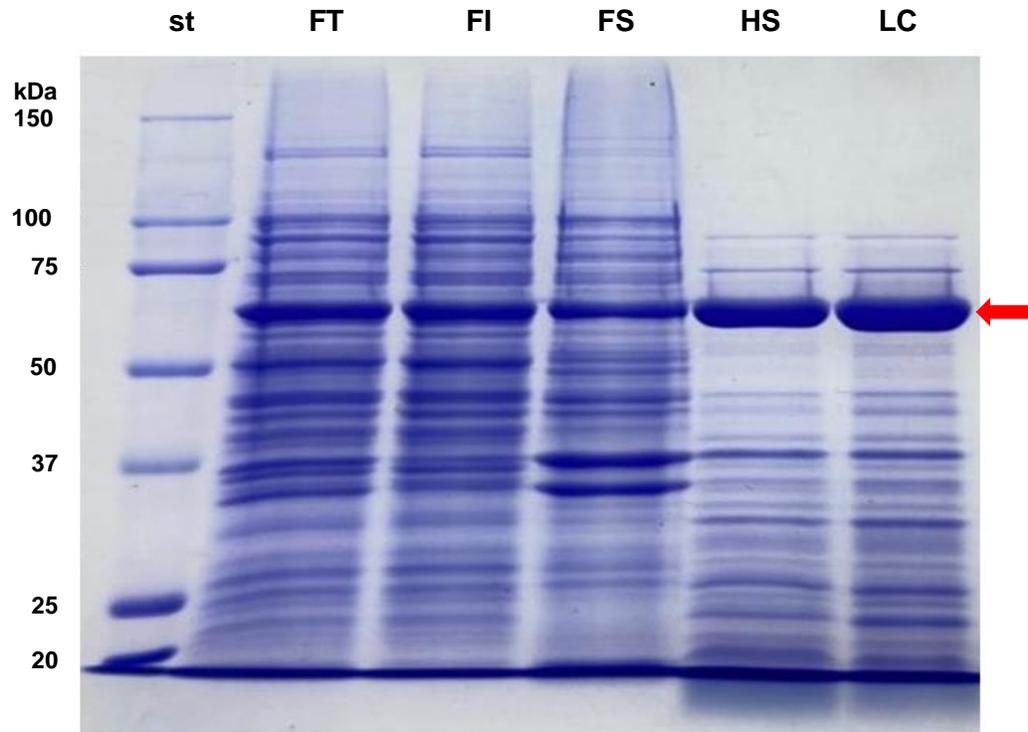
Las células transformadas con el vector que contiene la secuencia de la lacasa, cuya transcripción es regulada por el promotor T5, se crecieron en medio TBA de autoinducción suplementado con 0,3 g/L de Cu, debido a que la concentración de Cu afecta tanto al crecimiento de *E. coli* como a la expresión de la lacasa recombinante.

La sobreexpresión de la lacasa se observó mediante SDS-PAGE lo que permitió determinar la presencia y el grado de enriquecimiento de la enzima en las distintas fracciones obtenidas (**Figura 3**). En el carril HS del gel de SDS-PAGE, se observa una prominente banda de aproximadamente 60 kDa, la cual concuerda con la masa molecular reportada en literatura para esta lacasa (Espina et al., 2021). Además, se observa la eliminación de varias bandas de proteínas de *E. coli* C41 que estaban presentes inicialmente en la fracción soluble. Esto permitió confirmar que la lacasa aumento en la fracción HS.

La lacasa en la fracción HS, se concentró utilizando una celda de ultrafiltración Amicon hasta un volumen de 3 mL. Se realizó una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida nuevamente para confirmar la presencia de la lacasa.

En el gel de electroforesis de la Figura 3, en el carril LC, se observa que la banda concuerda con la masa molecular obtenida para la lacasa en la fracción HS (**Figura 3**). La concentración inicial de las proteínas totales en la fracción HS era

de 1 mg/mL aproximadamente y posterior al proceso de concentración (fracción LC) se alcanzó una concentración de 6 mg/mL.



**Figura 3: SDS-PAGE para fracciones celulares y lacasa parcialmente purificada.** st: estándar de masa molecular; FT: fracción total; FI: fracción insoluble; FS: fracción soluble; HS: fracción heat shock; LC: Lacasa concentrada. La flecha roja indica la ubicación de la banda correspondiente a la lacasa FNT, con un peso molecular de 60 kDa.

## 5.2 Determinación de la actividad específica de la lacasa

El ensayo de actividad se realizó según el protocolo descrito en la sección 4.5 de la metodología. La actividad enzimática se determinó en la fracción HS (30 mL de volumen total), la que corresponde a la fracción enriquecida con la lacasa. La actividad específica que presentó la fracción HS fue de 454.902 U/mg (**Tabla 2**). Esta actividad específica obtenida concuerda con lo descrito en literatura sobre esta enzima, donde se indica que la lacasa FNT posee una actividad específica

>450.000 U/mg (Espina et al., 2021). Al realizar la purificación parcial de la enzima se obtuvo un 28% de rendimiento (**Tabla 2**).

**Tabla 2: Purificación parcial y rendimiento de obtención de la lacasa FNT**

	Volumen (mL)	Proteínas totales (mg)	Actividad Total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)
<b>Fracción Total</b>	40	630 ± 12	58.000.005 ± 2.909.805	92.064 ± 4.619	100
<b>Fracción Soluble</b>	35	421,8 ± 106,8	20.880.002 ± 1.047.530	49.508 ± 2.484	36
<b>Heat shock 85°C 5'</b>	35	35,7 ± 0,7	16.240.001 ± 814.745	454.902 ± 22.822	28

### 5.3 Ensayos iniciales para definir condiciones de trabajo

#### 5.3.1 Ensayos iniciales de ecotoxicidad sin evaluación del pH

Para evaluar la capacidad degradativa de esta nueva lacasa, se utilizaron las concentraciones de antibióticos reportadas en trabajos de biodegradación de antibióticos y se seleccionó la concentración más alta reportada (Llorca et al., 2015). Inicialmente, se evaluó la sensibilidad de *E. coli* C41 frente a los distintos antibióticos. De esta forma se determinaron las concentraciones óptimas que permitían observar un halo de inhibición de crecimiento de *E. coli* C41 con un tamaño acorde al espacio disponible en la placa. Se seleccionó la concentración de 0,5 mg/mL de antibióticos (**Figura 4A**), exceptuando a CIP. Para este antibiótico se seleccionó una concentración de 0,0001 mg/mL, debido a que *E. coli* C41 era más sensible a CIP y a una concentración de 0,5 mg/mL presentaba un halo de inhibición de crecimiento muy amplio (**Figura 4B**). Además, se evaluó el efecto de la lacasa FNT y los diferentes mediadores redox sobre el crecimiento

de *E. coli* C41 (**Figura 4C**), observando que no tenían un efecto inhibitorio en el crecimiento de esta bacteria.

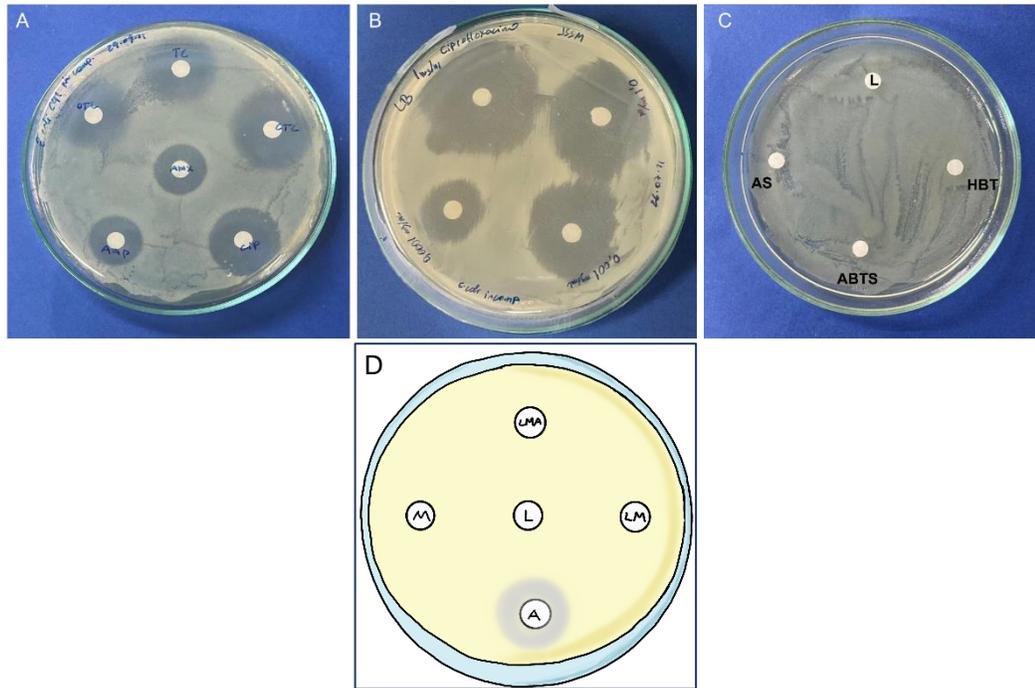
Los ensayos de degradación de antibióticos se realizaron en presencia de 3 mediadores redox, sin considerar el efecto del pH y se incubaron a 1 y 2 h. Para estos ensayos de degradación se utilizó el diseño de experimento descrito en la **Figura 4D**, donde se evalúa el halo de inhibición de crecimiento generado cuando se realiza el tratamiento con la lacasa, mediador redox y antibiótico (LMA), mediador redox (M), lacasa (L), lacasa más mediador redox (LM) y antibiótico (A). Para propósitos de esta investigación el halo de inhibición se interpretó como la presencia del antibiótico activo sobre la placa. Mientras que la disminución o desaparición del halo de inhibición indicó que el antibiótico evaluado fue degradado en parte o completamente por la lacasa.

En las placas inoculadas con *E. coli* C41 donde se incorporaron las reacciones de degradación se observó que, al utilizar AS como mediador redox, luego de 1 h de incubación, se observó la desaparición del halo de inhibición de crecimiento en el tratamiento de tetraciclina y clortetraciclina. Para esta misma condición, a las 2 h de tratamiento con la lacasa y AS como mediador redox, para las tres tetraciclinas evaluadas (**Figura 5 a, d, g**) los antibióticos pierden su actividad antimicrobiana. Los ensayos de degradación de las penicilinas y la quinolona con AS como mediador redox no presentaron disminución del halo de inhibición de crecimiento cuando se compararon con su respectivo control a los dos tiempos evaluados (**Figura 5 j, m, p**).

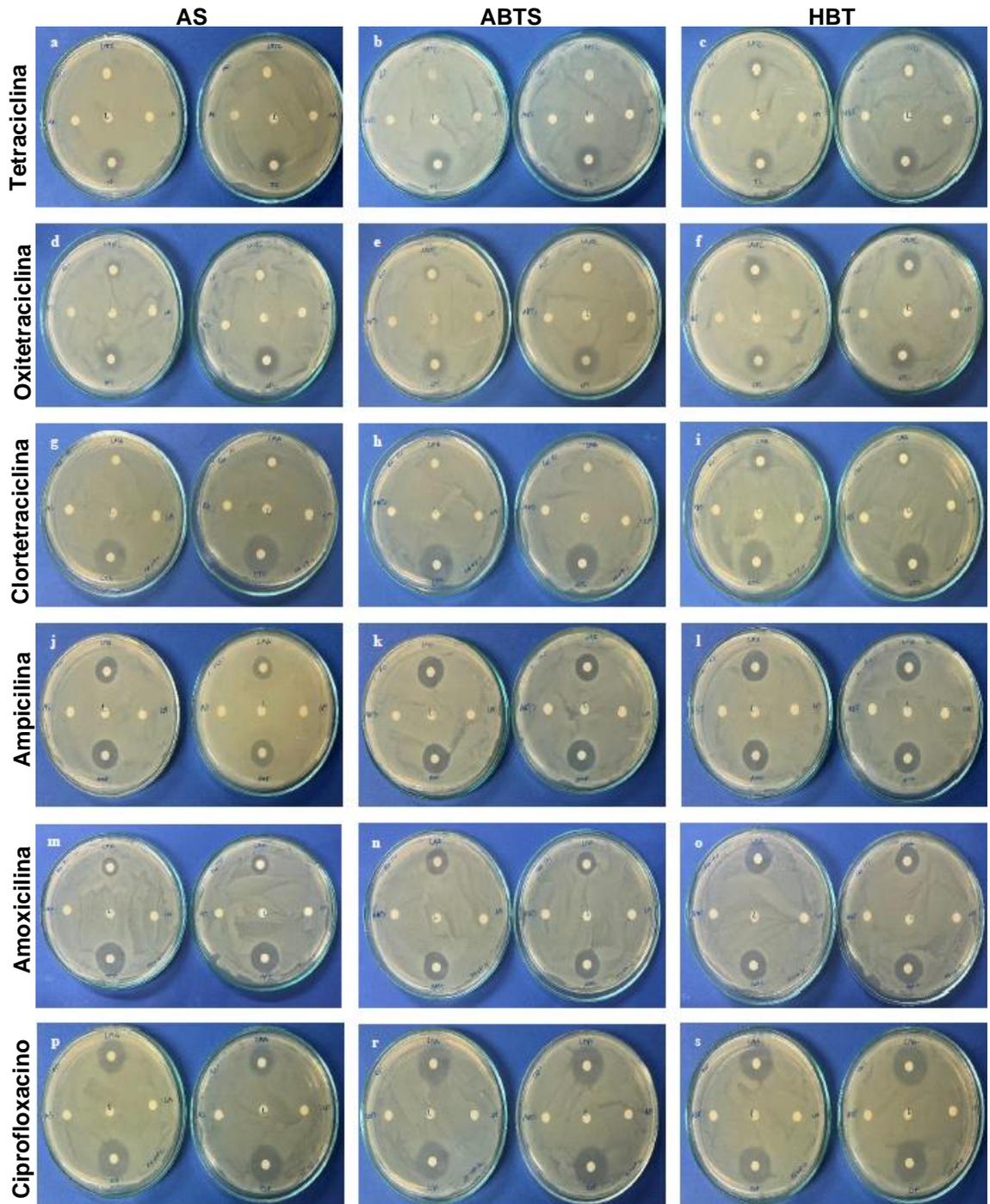
Las placas donde se incorporaron las reacciones de degradación realizadas con ABTS como mediador redox mostraron la ausencia de halo de inhibición de

crecimiento a 1 y 2 h de incubación en el tratamiento de tetraciclina y clortetraciclina, y solo a 2 h de incubación para oxitetraciclina (**Figura 5 b, e, h**). Para ampicilina y ciprofloxacino no se observó la disminución del halo de inhibición de crecimiento a ninguno de los tiempos evaluados (**Figura 5 k, r**). Mientras que para amoxicilina se observó la disminución en el halo de inhibición de crecimiento en comparación a su control solo a las 2 h de tratamiento (**Figura 5 n**).

Las placas donde se incorporaron las reacciones de degradación realizadas con HBT como mediador redox mostraron una disminución en el halo de inhibición de crecimiento en el tratamiento de tetraciclina y clortetraciclina luego de 2 h de incubación, cuando son comparados con su respectivo control (**Figura 5 c, i**). Para las reacciones de degradación de oxitetraciclina, ampicilina, amoxicilina y ciprofloxacino, en estas condiciones, no se observó disminución en el halo de inhibición de crecimiento (**Figura 5 f, l, o, s**).



**Figura 4: Controles para ensayos iniciales de ecotoxicidad en *E. coli* C41.** (A) Tamaño del halo de inhibición observado para TC, OTC, AMP y AMX a una concentración de 0,5 mg/mL. (B) Prueba de distintas concentraciones de CIP para la selección del tamaño de halo de inhibición. (C) Evaluación del efecto de la lacasa (L) y mediadores químicos (AS, HBT y ABTS) sobre el crecimiento de *E. coli* C41. (D) Esquema de ensayos iniciales de ecotoxicidad en placa, LMA: disco con lacasa, mediador redox y antibiótico; A: disco con antibiótico sin tratamiento; M: disco solo con mediador redox; L: disco solo con lacasa y LM: disco con lacasa y mediador redox.



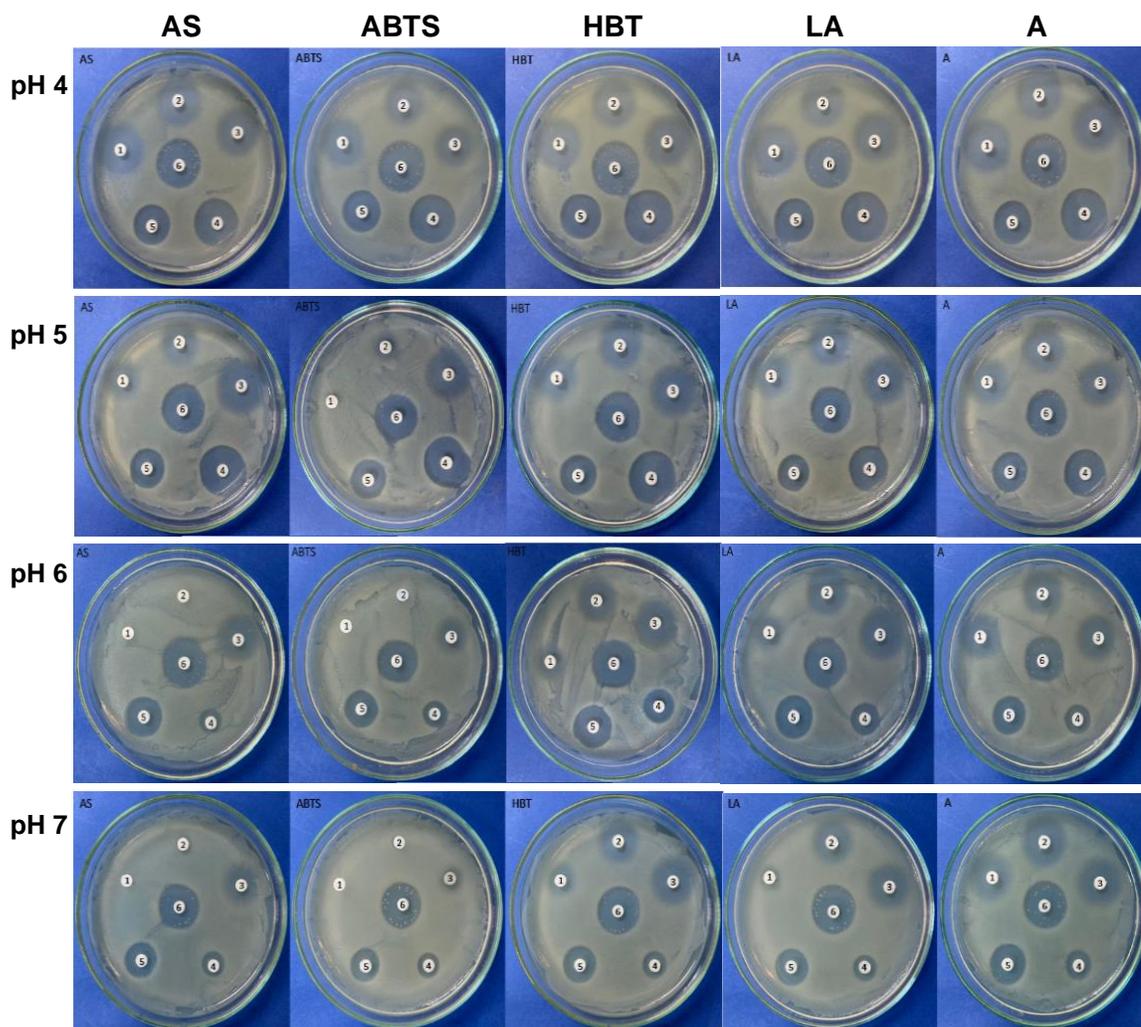
**Figura 5: Ensayos iniciales de ecotoxicidad en *E. coli* C41.** Para cada imagen: placa izquierda: ensayo de 1 h. Placa derecha: ensayo de 2 h. Disco superior: tratamiento con lacasa, Disco inferior: control del antibiótico. Disco izquierdo: control mediador; Disco central: control lacasa; Disco derecho: control lacasa + mediador. Las columnas indican el mediador redox utilizado mientras que las filas el antibiótico utilizado.

### 5.3.2 Efecto del pH en los ensayos de ecotoxicidad en *E. coli* C41

Para evaluar el efecto del pH sobre la capacidad degradativa de la lacasa FNT frente a los antibióticos evaluados anteriormente se utilizaron las condiciones ya descritas en la sección 4.7 de la metodología pero a diferentes pH. Transcurrido el tiempo de incubación de las reacciones de degradación, estas se incorporaron en los discos de papel dispuestos sobre las placas previamente inoculadas con *E. coli* C41 para observar los halos de inhibición de crecimiento (**Figura 6**). Los diámetros de los halos de inhibición se midieron utilizando el software ImageJ, para así evaluar la disminución del halo de inhibición en comparación al control (**Tabla 3**). El tamaño del halo de inhibición indica la sensibilidad del microorganismo respecto al antibiótico que se utilizó.

En los ensayos de degradación a pH 5 se observó la desaparición del halo de inhibición producido por TC y CTC cuando se incubaron con ABTS como mediador redox (**Figura 6 pH 5**), lo que correspondió a una disminución de 18,6 mm y 17,7 mm, respectivamente al comparar cada antibiótico con su control. Los ensayos de degradación de los otros antibióticos junto a AS y HBT como mediadores redox presentaron diferencias de 1 a 4 mm en los halos de inhibición de crecimiento (**Tabla 3 pH 5**).

Al evaluar los ensayos de degradación a pH 6 se observó una diferencia en el tamaño del halo de inhibición de crecimiento producido por el control de AMP, ya que este disminuyó en comparación al halo de inhibición generado por los controles de AMP a pH 4 y 5 (**Tabla 3**).



**Figura 6: Evaluación de ecotoxicidad en *E. coli* C41 a 4 pH distintos.** Cada fila corresponde a un pH distinto. En columnas los ensayos de biodegradación con los tres mediadores redox (AS, ABTS y HBT), ensayo en ausencia de mediador (LA) y antibióticos sin tratar (A). Los antibióticos evaluados fueron los siguientes: (1) CTC; (2) TC; (3) OTC; (4) AMP; (5) AMX y (6) CIP. Cada ensayo se realizó en triplicado.

**Tabla 3: Tamaño de halos de inhibición para cada pH**

pH 4	AS	ABTS	HBT	LA	A
CTC	21,2 ± 0,9	19,0 ± 0,5	19,6 ± 1,4	21,6 ± 1,6	22,2 ± 1,0
TC	21,3 ± 0,4	17,4 ± 0,9	18,7 ± 1,1	21,3 ± 0,8	22,0 ± 0,2
OTC	19,0 ± 0,8	19,5 ± 2,8	20,0 ± 3,1	21,3 ± 1,5	21,8 ± 1,5
AMP	24,6 ± 1,6	24,3 ± 0,8	25,8 ± 1,3	25,1 ± 0,3	25,9 ± 1,7
AMX	19,9 ± 1,5	20,0 ± 0,3	21,1 ± 1,0	20,5 ± 0,8	20,6 ± 0,1
CIP	24,5 ± 1,3	24,3 ± 0,6	25,3 ± 0,3	24,9 ± 0,6	24,8 ± 0,4

pH 5	AS	ABTS	HBT	LA	A
CTC	11,1 ± 1,8	0,0 ± 0,0	16,2 ± 1,4	16,1 ± 1,5	17,7 ± 1,2
TC	16,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0	17,5 ± 0,4	17,8 ± 1,0	18,6 ± 0,9
OTC	14,0 ± 12,2	19,1 ± 3,1	18,5 ± 1,9	18,6 ± 0,9	18,9 ± 1,3
AMP	23,5 ± 0,5	23,0 ± 0,7	24,3 ± 1,1	23,0 ± 2,0	23,0 ± 1,2
AMX	18,4 ± 0,7	18,8 ± 0,6	19,7 ± 0,8	17,9 ± 1,9	19,1 ± 1,3
CIP	22,6 ± 0,9	22,4 ± 0,7	23,4 ± 1,2	23,0 ± 2,0	21,5 ± 0,9

pH 6	AS	ABTS	HBT	LA	A
CTC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	11,4 ± 1,1	7,8 ± 0,2	17,9 ± 1,9
TC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	17,1 ± 1,8	16,5 ± 0,7	16,7 ± 1,3
OTC	18,5 ± 1,4	12,3 ± 0,6	21,0 ± 0,5	18,2 ± 1,3	19,4 ± 2,0
AMP	12,9 ± 2,2	13,6 ± 0,9	16,2 ± 0,8	14,8 ± 1,4	15,0 ± 1,9
AMX	19,9 ± 0,4	18,7 ± 1,2	21,2 ± 0,9	19,5 ± 0,9	18,9 ± 2,2
CIP	23,9 ± 1,5	22,1 ± 1,7	26,0 ± 4,9	22,7 ± 0,3	21,4 ± 0,7

pH 7	AS	ABTS	HBT	LA	A
CTC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	13,8 ± 5,3	8,7 ± 0,8	14,0 ± 0,9
TC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	14,5 ± 0,3	14,1 ± 0,5	16,2 ± 1,6
OTC	13,6 ± 1,4	10,6 ± 3,4	14,7 ± 1,6	13,7 ± 0,8	14,5 ± 0,4
AMP	10,3 ± 1,2	16,5 ± 0,8	13,8 ± 2,5	13,9 ± 1,9	13,2 ± 1,0
AMX	16,6 ± 0,8	12,6 ± 0,9	19,4 ± 1,6	19,8 ± 2,2	18,1 ± 1,3
CIP	18,8 ± 2,2	20,0 ± 1,4	22,9 ± 1,1	23,2 ± 1,4	22,0 ± 0,6

Cada tabla está agrupada dependiendo el pH de la reacción. (A) control de antibióticos; (AS, ABTS, HBT) mediadores químicos; (LA) ensayo en ausencia de mediador. Los valores corresponden a la medida del halo de inhibición en milímetros. Cada ensayo fue realizado en triplicado.

En estos ensayos de degradación se observó la disminución total del halo de inhibición de CTC en presencia de AS y ABTS (**Figura 6 pH 6**). Los ensayos de degradación de CTC en presencia de HBT presentaron una disminución de 6,5 mm. Incluso se observó una disminución de 10,1 mm en el halo de inhibición producido por CTC cuando se incubó con la lacasa FNT sin mediador redox (**Tabla 3 pH 6**).

Los ensayos de degradación de TC presentaron la disminución total del halo de inhibición en presencia de AS y ABTS, disminuyendo 16,2 mm al compararlo con el respectivo control (**Tabla 3 pH 6**). Los ensayos de degradación de TC, OTC, AMP, AMX y CIP que se realizaron junto a HBT no presentaron disminución en el halo de inhibición de crecimiento, indicando que no hay pérdida en la actividad antimicrobiana luego de este tratamiento.

Los ensayos de degradación de antibióticos realizados a pH 7 presentaron un comportamiento similar a lo observado a pH 6. En particular, los ensayos de degradación de CTC donde se observó la desaparición del halo de inhibición de este antibiótico cuando se utilizó AS y ABTS como mediadores redox. Mientras que, cuando se realizaron los ensayos de degradación de CTC sin mediadores redox, se observó una disminución de 5,3 mm al comparar el tamaño del halo de inhibición con su respectivo control (**Tabla 3 pH 7**). En cuanto a la degradación de TC, el halo de inhibición de crecimiento generado por este antibiótico desapareció cuando los ensayos se realizaron en presencia de AS y ABTS (**Tabla 3 pH 7**). Al utilizar ABTS como mediador redox para la degradación de OTC se observó una disminución de 3,9 mm en el halo de inhibición de crecimiento. En los ensayos de degradación de todos los antibióticos evaluados donde se utilizó HBT como mediador redox, no se observó disminución en el halo de inhibición (**Tabla 3 pH 7**).

En los ensayos de degradación realizados a pH 4, los halos de inhibición de crecimiento no presentaron variación en su tamaño con respecto a sus controles en ninguna de las condiciones evaluadas (**Tabla 3 pH 4**). La disminución de los diámetros de los halos indicó que la capacidad para degradar antibióticos de la

lacasa FNT depende del tipo de sustrato y de la naturaleza del mediador redox presente en la reacción.

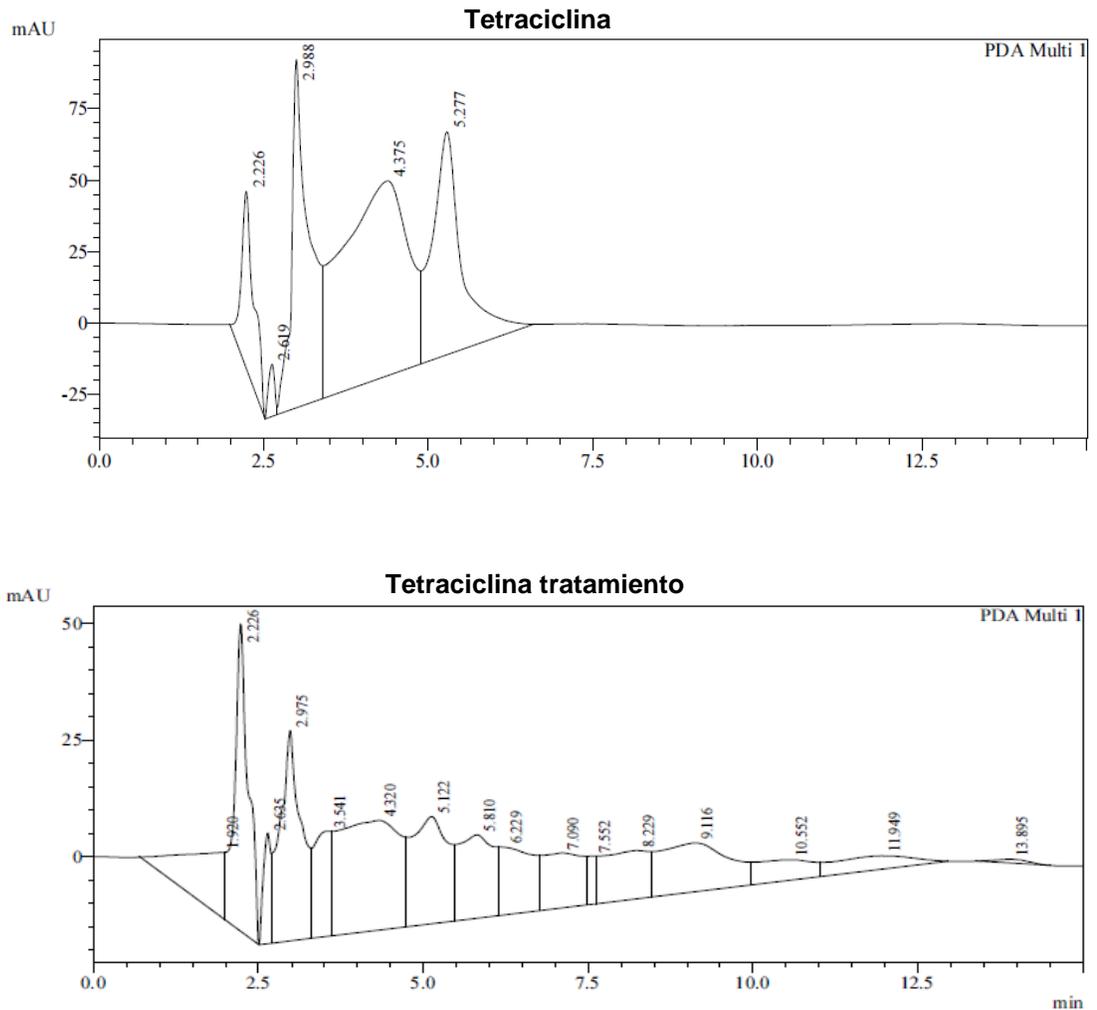
En consideración de los resultados obtenidos en este trabajo y de los disponibles en la literatura, se decidió no continuar evaluando la degradación de CTC, a pesar de la gran capacidad degradativa que presentó la lacasa FNT sobre este antibiótico ya que CTC no es un antibiótico con gran presencia en el ambiente y no es ampliamente utilizado (Qiao et al., 2018; Ministerio de Salud, 2019). Además, no se continuó evaluando a pH 4, ya que no se observó disminución de los halos de inhibición. Se descartó el uso de ABTS como mediador redox porque es de origen sintético y se ha descrito como un compuesto tóxico (Hilgers et al., 2018). Se continuó utilizando HBT porque es ampliamente usado en trabajos de aplicación de lacasas en biodegradación.

## **5.4 Evaluación de porcentaje de biodegradación mediante cromatografía de fase reversa**

### **5.4.1 Porcentaje de biodegradación a 2 h de reacción**

La biodegradación de antibióticos por acción de la lacasa FNT también fue evaluada utilizando una columna de fase reversa en un equipo HPLC, según lo indicado en la sección 4.8 de la metodología. Para cada antibiótico analizado se obtuvo un cromatograma y el área correspondiente a su pico de elución para la condición sin enzima y se comparó con el área que se obtuvo luego de la reacción con la lacasa. En la **Figura 7** se muestran dos cromatogramas obtenidos en este trabajo: un cromatograma control de TC y un cromatograma obtenido luego del tratamiento de TC con la lacasa FNT. Los tiempos de retención para cada uno

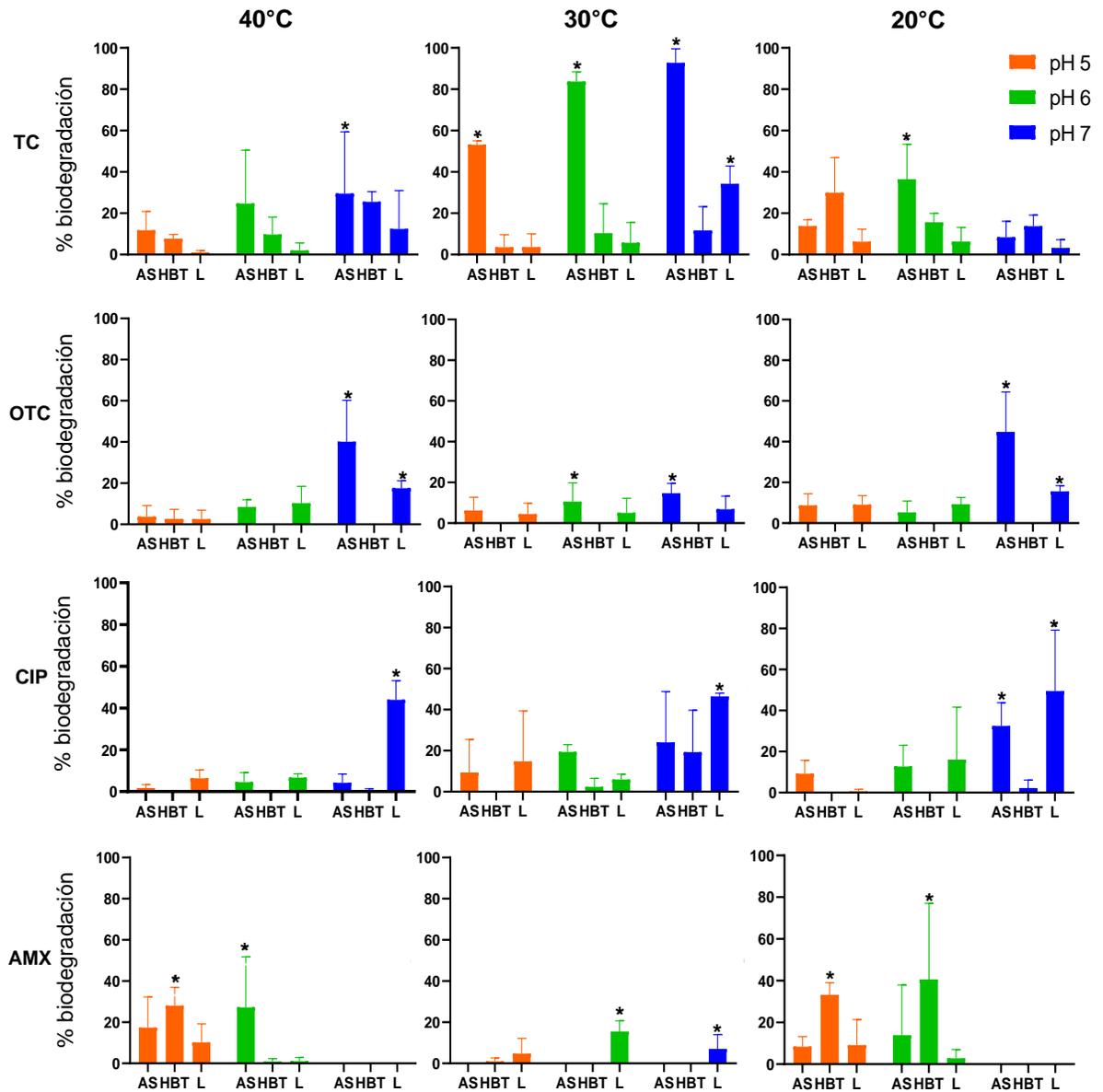
de los antibióticos fueron los siguientes: TC 5,2 min.; OTC 4,4 min.; CIP 4,5 min y AMX 2,7 min.



**Figura 7: Cromatogramas de la separación de tetraciclina mediante cromatografía de fase reversa.** Cromatograma superior obtenido de tetraciclina control incubada a pH 6, 20°C durante 24 h. Cromatograma inferior obtenido de tetraciclina incubada junto a lacasa FNT con AS como mediador redox a pH 6, 20°C durante 24 h.

Cuando se observó la degradación de TC en presencia de AS a 40°C y pH 7, se obtuvo el porcentaje de biodegradación más alto con un promedio de 29,5%, mientras que a pH 6 se observó una degradación de 24,7%. A 30°C y con AS se observó una degradación superior al 50% para todos los pH evaluados: pH 5: 53,1%; pH 6: 83,7%; pH 7: 92,8%, siendo pH 7 donde se presentó la mayor biodegradación, la cual fue significativa respecto a su control. Cuando se evaluó la degradación por la lacasa FNT a 30°C y pH 7 sin mediadores redox, se observó una degradación de 34,3%. A 20°C se observó en presencia de AS una degradación de 13,7% y 36,5% a pH 5 y 6, respectivamente y también se observó una degradación de 29,9% en presencia de HBT a pH 5 (**Figura 8 TC**).

Cuando se evaluó la biodegradación de OTC a 40°C y pH 7, se obtuvo una degradación del 40,1%, el mayor porcentaje de biodegradación obtenido para esta condición, seguido de un 17,6% logrado en ausencia de mediadores redox. A 30°C con AS se observó la biodegradación de 10,5% y 14,7% a pH 6 y 7, respectivamente. La biodegradación a 30°C que se observó en ausencia de mediadores redox fue de 4,5%, 5,0% y 6,8%, a pH 5, 6 y 7, respectivamente. A 20°C y pH 7 se observó un 44,8% de biodegradación con AS y un 15,6% en ausencia de mediador redox. En los ensayos con HBT solo a 40°C y pH 5 se observó un 2,7% de biodegradación. En los ensayos de degradación realizado a 30°C y 20°C, no se notó una disminución significativa respecto al control en ninguno de los pH evaluados (**Figura 8 OTC**).



**Figura 8: Porcentaje de biodegradación luego de 2 horas de incubación en presencia y ausencia de mediadores redox.** En cada columna se indican las reacciones realizadas a 40, 30 y 20°C. En las filas se indican las reacciones realizadas con cada uno de los antibióticos evaluados: TC, OTC, CIP y AMX. Cada ensayo se llevó a cabo en triplicado, se realizó análisis estadístico ANOVA donde (\*)  $p < 0,05$  corresponde a valor significativo respecto al control y post test Dunnett.

Los ensayos de degradación realizados con CIP indicaron que a 40°C y pH 7 se logró un 44% de biodegradación, cuando el ensayo se realizó en ausencia de mediadores redox. En las otras condiciones evaluadas, a 40°C se logró una degradación inferior al 7%. En los ensayos de biodegradación a 30°C y pH 7 se observó la mayor degradación de CIP, la que fue de 19,3% en presencia de HBT, 24% con AS y 46,4% con la lacasa en ausencia de mediadores redox, siendo esta degradación significativa respecto a su control. En los pH 5 y 6 donde se evaluó la degradación de CIP a 30°C, se observó una degradación entre 2% y 20%. A 20°C la biodegradación presentó una tendencia similar a lo informado con anterioridad, donde la mayor degradación fue a pH 7: 32,5% con AS y 50% con la lacasa FNT en ausencia de mediadores redox. La biodegradación en las otras condiciones a 20°C fue de 1% y 16% y no presentaron diferencias significativas respecto al control (**Figura 8 CIP**).

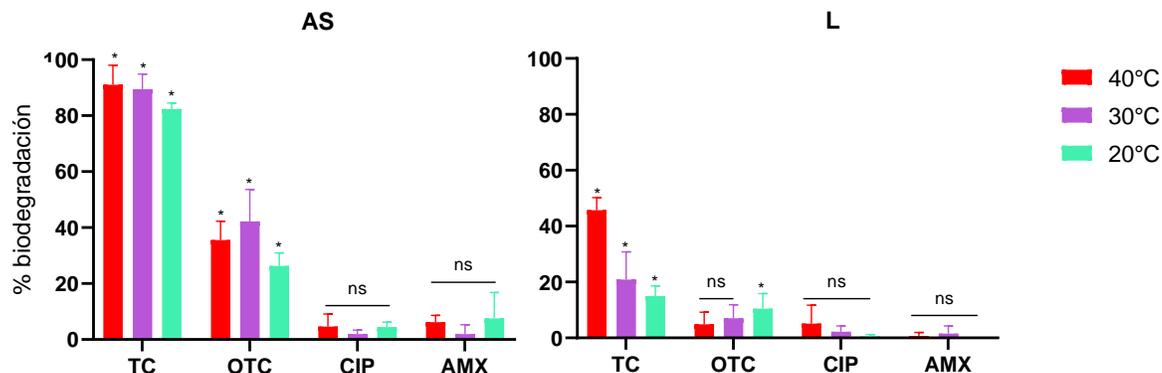
Por último se realizaron los ensayos de biodegradación de AMX donde se observó que a 40°C y pH 6 se logró una biodegradación de 27,2% con AS. Mientras que a pH 5 se observó un 28% de degradación con HBT, 17,4% con AS y 10,2% con la lacasa sin mediador redox. La degradación de AMX a pH 5 presentó un comportamiento distinto a lo observado con anterioridad, ya que se observó una degradación significativa respecto al control cuando se utilizó HBT como mediador redox. A 30°C se obtuvo una biodegradación de 16% a pH 6 y de 7% a pH 7, en ambos casos en ausencia de mediador redox. A 30°C y pH 5 se observó un 4,7% de biodegradación. Los datos obtenidos a 20°C indicaron que la degradación más significativa respecto al control fue en presencia de HBT a pH 6 con 41% y a pH 5 con 33% de degradación. Con AS a pH 6 y pH 5 la

degradación fue de 14% y 8,3%, respectivamente. A 20°C y pH 7 no se observó biodegradación significativa respecto al control. Cuando se utilizó AS y HBT a pH 7 no se observó degradación en ninguna de las 3 temperaturas evaluadas (**Figura 8 AMX**).

#### **5.4.2 Porcentaje de biodegradación a 24 h de reacción**

Se continuó usando AS como mediador redox porque al emplearlo en los ensayos de degradación se obtuvieron porcentajes de biodegradación más elevados y con significancia estadística en comparación a los ensayos de degradación con HBT. También se continuó trabajando a pH 6, ya que es el pH óptimo cuando se utiliza SYR como sustrato (Espina et al., 2021). Se realizaron los ensayos de biodegradación de estos 4 antibióticos, incubados durante 24 h a temperaturas de 40, 30 y 20°C y se evaluaron las diferencias en la biodegradación en comparación a las 2 h de incubación.

En los ensayos con AS para TC se obtuvo una degradación de 91% a 40°C, 90% a 30°C y 82% a 20°C, en donde todos los resultados presentaron una diferencia significativa respecto al control. Para OTC a 40, 30 y 20°C se obtuvo una biodegradación de 36%, 42% y 26%, respectivamente, presentando una diferencia significativa respecto al control. En los ensayos de degradación de CIP con AS se obtuvo un porcentaje de degradación menor, donde a 40°C se alcanzó 4,7% seguido de 4,4% a 20°C y finalmente 2% a 30°C. En el caso de AMX con AS el mayor porcentaje de biodegradación se obtuvo a 20°C con 8%, seguido de 6,2% a 40°C y finalmente 2% a 30°C. Para CIP y AMX no se observaron diferencias significativas respecto a su control (**Figura 9 AS**).



**Figura 9: Porcentaje de biodegradación luego de 24 horas de incubación en presencia y ausencia de acetosiringona.** Ensayos realizados con los cuatro antibióticos TC, OTC, CIP y AMX. A la izquierda (AS) ensayos realizados con lacasa y acetosiringona como mediador redox. A la derecha (L) ensayos realizados con lacasa en ausencia de mediador redox. Todos los ensayos se incubaron a tres temperaturas 40°C (rojo), 30°C (morado) y 20°C (celeste). Cada ensayo se llevó a cabo en triplicado, se realizó análisis estadístico ANOVA y post test Tukey donde (\*)  $p < 0,05$  corresponde a valor significativo y (ns) valor no significativo, respecto al control.

Los ensayos en ausencia de mediador redox mostraron que la biodegradación de TC alcanzó un máximo de 46% a 40°C, seguido de 21% a 30°C y 15% a 20°C, presentando una diferencia significativa respecto al control en todas las temperaturas evaluadas. Para OTC la máxima biodegradación fue de 11% a 20°C, seguido de 7% a 30°C y 5% a 40°C, donde solo la biodegradación a 20°C presentó una diferencia significativa respecto al control. CIP presentó una biodegradación de 5% a 40°C, 2% a 30°C y de 0,5% a 20°C. Por último, para AMX la biodegradación fue incluso menor con 1% a 40°C, 2% a 30°C y 0% a 20°C. Para CIP y AMX no se observaron diferencias significativas respecto a su control (**Figura 9 L**).

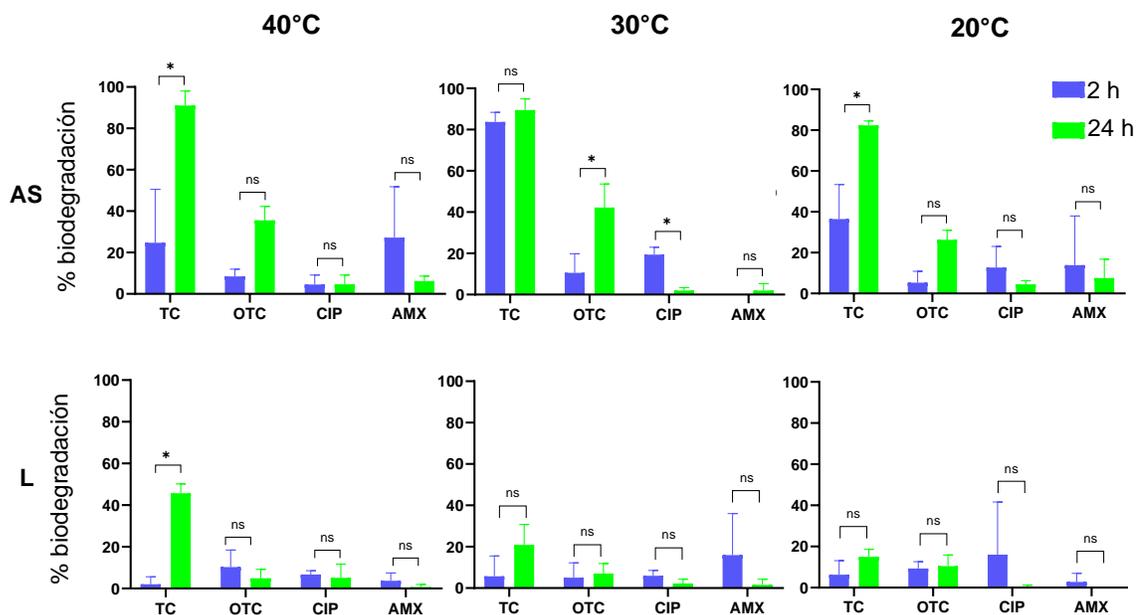
Se analizó la cinética de degradación de los ensayos realizados a 2 h y 24 h de incubación con AS y sin mediador redox a pH 6 y a las 3 temperaturas evaluadas. Cuando se utilizó AS en las reacciones a 40°C se observaron diferencias

significativas únicamente en el caso de la TC. Se observó un incremento en la biodegradación cuando la reacción se incubó durante 24 h. Esta tendencia también se observó en OTC, pero para este antibiótico la diferencia no fue significativa. Cuando se analizó CIP y AMX, ambos antibióticos no presentaron diferencias significativas entre las reacciones realizadas a 2 h y 24 h a 40°C.

A 30°C, no se observó diferencia significativa en la biodegradación lograda en TC y AMX. Mientras que para los ensayos de biodegradación de OTC la biodegradación que se alcanzó a las 24 h fue significativamente mayor a la que se logró a las 2h de incubación. En el caso de CIP el comportamiento fue inverso, se logró una mayor biodegradación a las 2 h de incubación en comparación a las 24 h. A 20°C se observó un comportamiento similar a lo observado a 40°C, donde en la degradación de TC se notó un aumento significativo en la biodegradación luego de 24 h incubación en comparación a los ensayos de 2 h de incubación. Los ensayos de degradación de OTC ilustraron la misma tendencia, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Mientras que los ensayos de degradación de CIP y AMX no mostraron diferencias en la biodegradación al compararlos a 2 y 24 h (**Figura 10 AS**).

A 40°C las reacciones de degradación en ausencia de mediador redox mostraron una tendencia similar a la observada en las reacciones con AS, donde para TC se logró un aumento significativo en la biodegradación a 24 h pero para OTC, CIP y AMX no se observó una diferencia significativa en la biodegradación. A 30°C se observó un aumento en la biodegradación de TC a las 24 h, pero esta no fue significativa, igual a lo observado para OTC, CIP y AMX. Finalmente, a 20°C el comportamiento fue similar al observado a 30°C en donde para ninguno

de los antibióticos evaluados se notó una diferencia significativa al comparar la biodegradación de las 2 h con la de 24 h (**Figura 10 L**).



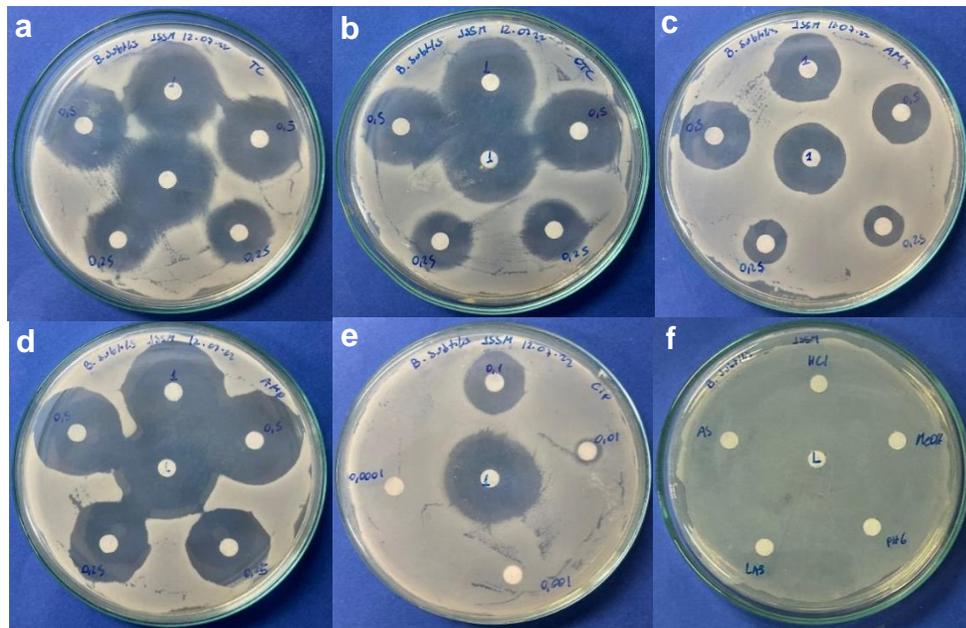
**Figura 10: Cinética de biodegradación de antibióticos en el tiempo.** Ensayos realizados con los cuatro antibióticos TC, OTC, CIP y AMX. En columnas se indican las temperaturas evaluadas 40, 30 y 20°C. En la fila superior (AS) se indican los ensayos realizados con lacasa y acetosiringona como mediador redox. En la fila inferior se muestran los ensayos realizados con lacasa sin mediador redox. En azul los ensayos de 2 h de incubación; en verde ensayos de 24 h de incubación. Cada ensayo se llevó a cabo en triplicado, se realizó análisis estadístico ANOVA y post test Sidak donde (\*) es un valor significativo  $p < 0,05$  y (ns) valor no significativo, respecto a la comparación de las mismas condiciones a las distintas horas evaluadas.

## 5.5 Disminución en la ecotoxicidad de antibióticos producto de la biodegradación producida por la lacasa.

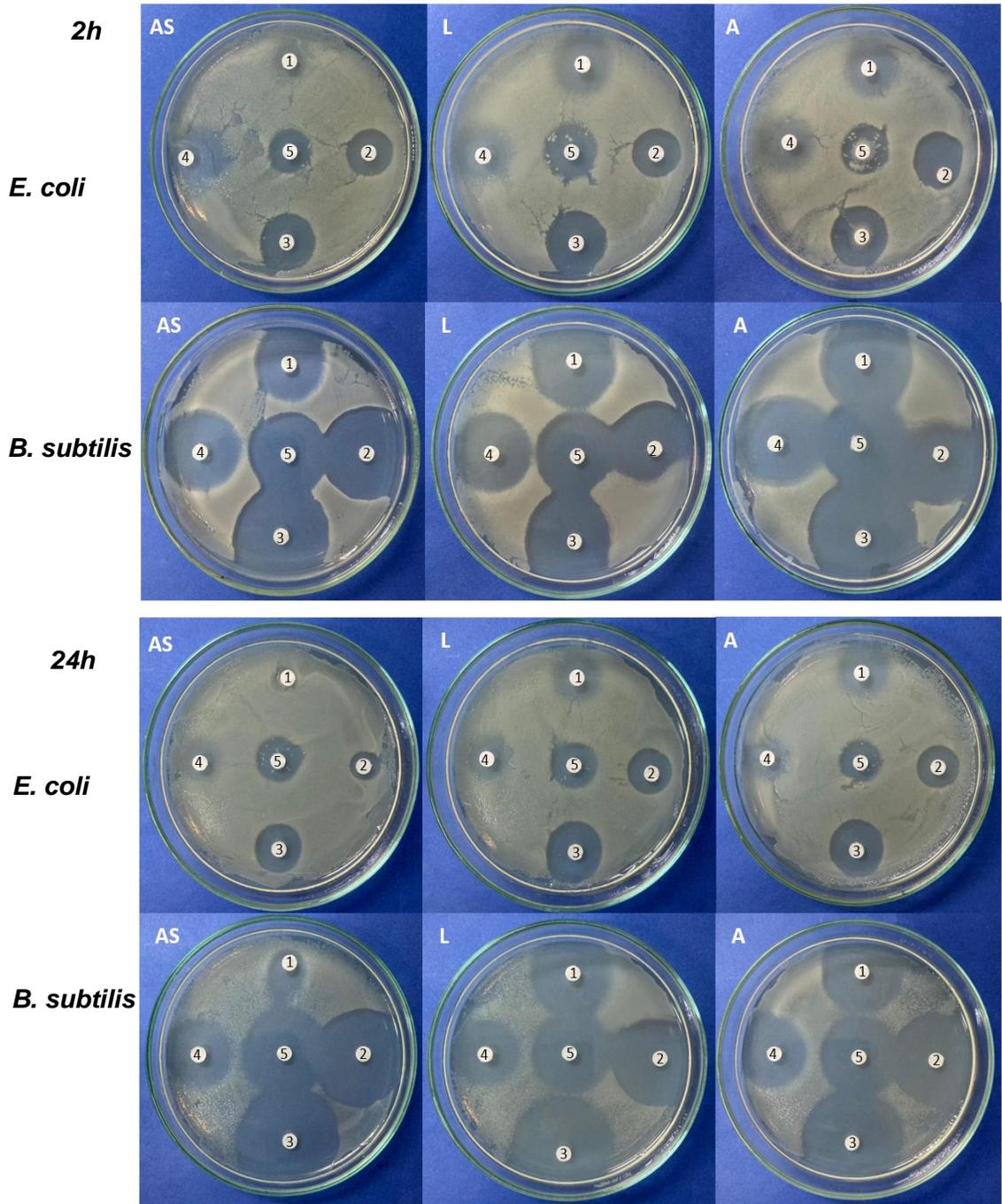
Se evaluó si la biodegradación de antibióticos por acción de la lacasa FNT era capaz de eliminar la ecotoxicidad producida por los antibióticos. La disminución de ecotoxicidad se evaluó utilizando dos microorganismos aislados: *E. coli* C41 y *B. subtilis*, siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.9 de la metodología. En primer lugar, se evaluó la sensibilidad de *B. subtilis* a los cinco antibióticos para determinar el tamaño del halo de inhibición de crecimiento más adecuado para la experimentación (**Figura 11 a, b, c, d, e**). Además, se evaluó el efecto sobre el halo de inhibición de crecimiento del mediador redox y los solventes en los cuales los antibióticos y mediador redox se prepararon (**Figura 11 f**). La concentración que se seleccionó para los ensayos fue de 0,5 mg/mL incluyendo a CIP, a diferencia de *E. coli* C41 que la concentración utilizada de CIP fue de 0,0001 mg/mL.

Los ensayos de biodegradación se realizaron a 2 y 24 h, a las tres temperaturas evaluadas con anterioridad. Luego de la degradación con la lacasa FNT y AS como mediador redox a 40°C durante 2 h, se observó una disminución del halo de inhibición producido por TC al evaluarlo en *E. coli* C41, el cual desapareció al usar el antibiótico tratado durante 24 h (**Figura 12**). En el caso de *B. subtilis* se observó una disminución en el halo de inhibición luego del tratamiento de TC a 2 h de incubación, respecto a su control. Luego del tratamiento de TC durante 24 h de incubación se observó una disminución mayor del halo de inhibición de crecimiento de *B. subtilis* respecto al control con TC incubada durante 24 h y en comparación a la reacción de biodegradación de TC incubada durante 2 h

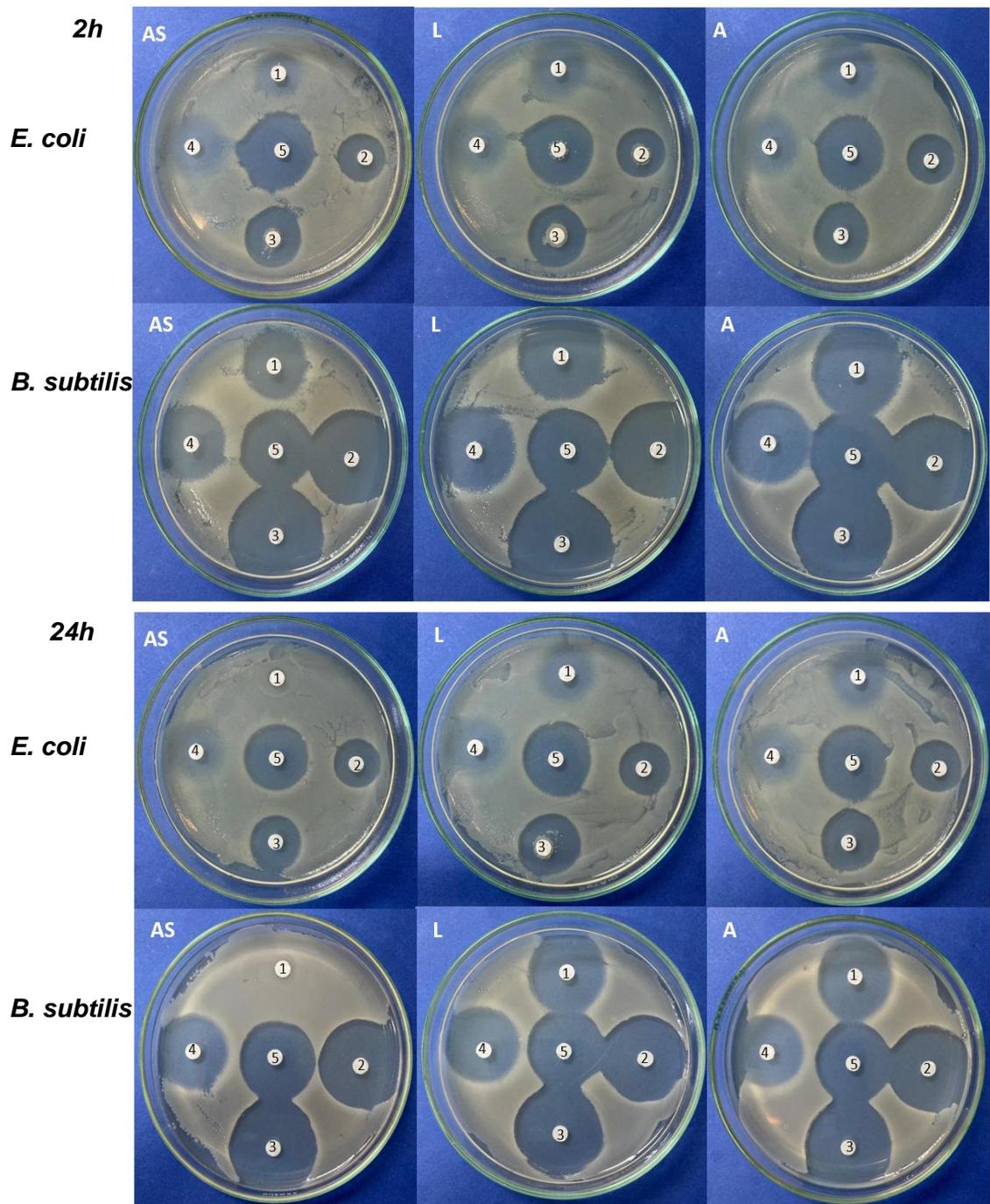
(Figura 12). Las reacciones de biodegradación incubadas a 30°C presentaron un comportamiento similar, se observó la disminución del halo de inhibición de crecimiento producido por TC a las 2 h de incubación. Luego de 24 h de incubación de este antibiótico con la lacasa FNT y AS, el halo de inhibición de crecimiento de *E. coli* C41 desapareció completamente (Figura 13). Al analizar la reacción de biodegradación de TC incubada durante 24 h en las condiciones mencionadas anteriormente, el halo de inhibición de crecimiento de *B. subtilis* producido por TC desapareció completamente (Figura 13). Finalmente, en los ensayos de biodegradación de antibióticos incubados a 20°C se observó la desaparición del halo de inhibición producido por TC tanto para *E. coli* C41 como para *B. subtilis* luego de 24 h de incubación (Figura 14).



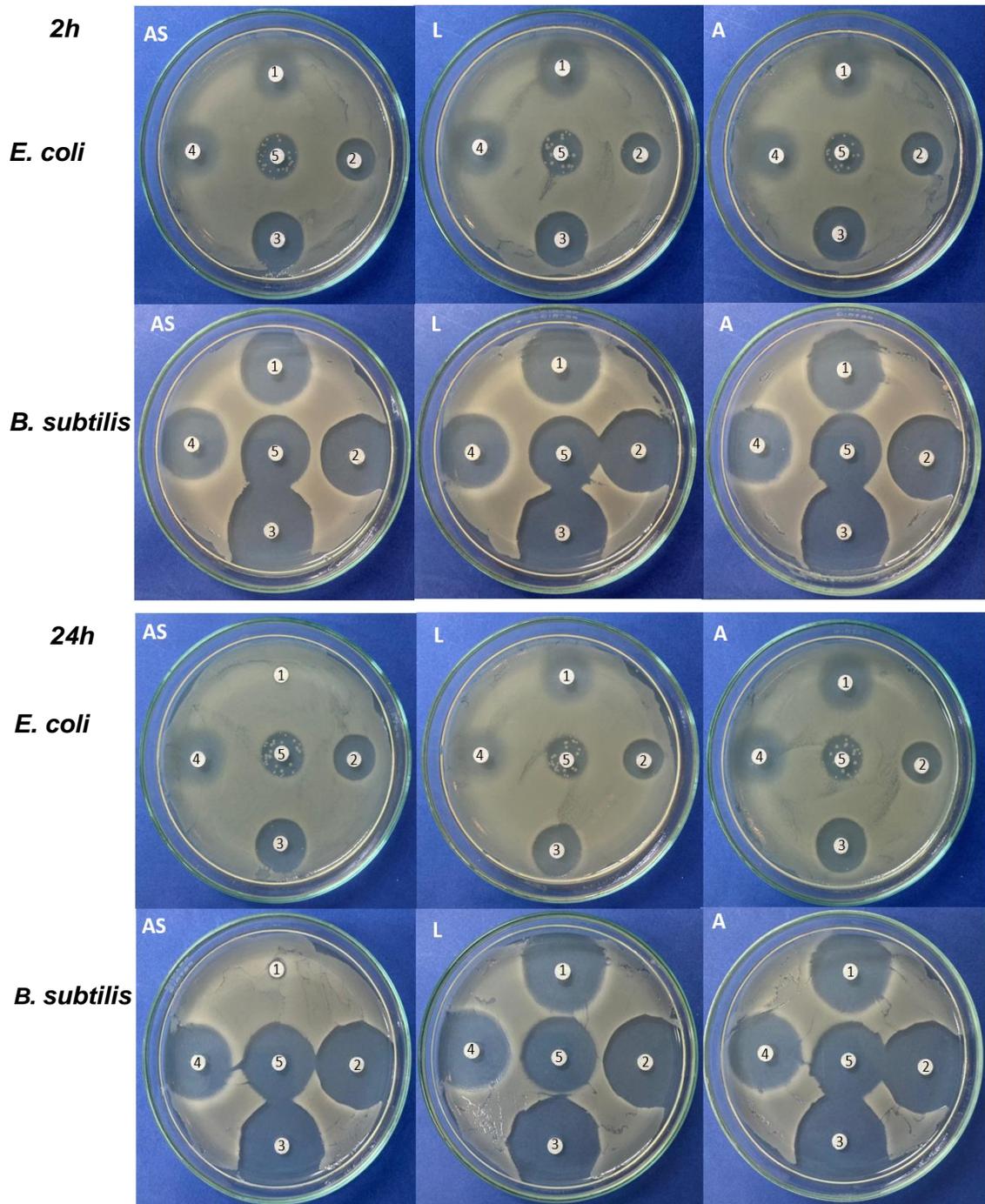
**Figura 11: Controles para ensayos de ecotoxicidad en *Bacillus subtilis*.** Se evaluaron tres concentraciones 1; 0,5 y 0,25 mg/mL para (a) TC, (b) OTC, (c) AMX y (d) AMP. Para (e) CIP se evaluó 1; 0,1; 0,01; 0,001 y 0,0001 mg/mL. En (f) se evaluó el efecto de HCl, metanol, amortiguador pH 6, Lacasa+AS, AS y lacasa sola, sobre el crecimiento de *B. subtilis*.



**Figura 12: Ensayos de ecotoxicidad a 40°C.** Los distintos ensayos se realizaron a pH 6 en presencia y ausencia de mediador químico. (AS) ensayos realizados con acetosiringona, (L) ensayos in mediador químico, (A) control de cada antibiótico. (1) TC; (2) AMX; (3) AMP; (4) OTC; (5) CIP. Cada ensayo se realizó en triplicado.



**Figura 13: Ensayos de ecotoxicidad a 30°C.** Los distintos ensayos se realizaron a pH 6 en presencia y ausencia de mediador químico. (AS) ensayos realizados con acetosiringona, (L) ensayos in mediador químico, (A) control de cada antibiótico. (1) TC; (2) AMX; (3) AMP; (4) OTC; (5) CIP. Cada ensayo se realizó en triplicado.



**Figura 14: Ensayos de ecotoxicidad a 20°C.** Los distintos ensayos se realizaron a pH 6 en presencia y ausencia de mediador químico. (AS) ensayos realizados con acetosiringona, (L) ensayos in mediador químico, (A) control de cada antibiótico. (1) TC; (2) AMX; (3) AMP; (4) OTC; (5) CIP. Cada ensayo se realizó en triplicado.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Efecto del pH sobre la biodegradación de antibióticos evaluado con ensayos de ecotoxicidad en *E. coli* C41

Para los ensayos de degradación realizados en este trabajo se consideraron las concentraciones reportadas por otros grupos de trabajo, 0,00001 mg/mL y 0,1 mg/mL (Suda et al., 2012; Becker et al., 2016; Ding et al., 2016; Llorca et al., 2015) para ensayos de biodegradación de penicilinas, tetraciclinas y quinolonas. Se decidió utilizar la concentración más alta reportada en literatura para evaluar la actividad de la lacasa FNT frente a los antibióticos estudiados. La enzima inicialmente fue capaz de degradar antibióticos a una concentración de 0,1 mg/mL, por lo que se aumentó cinco veces la concentración de estos, trabajando finalmente a una concentración de 0,5 mg/mL.

Lo observado en los resultados obtenidos de los ensayos de degradación donde no se consideró el pH como variable, indicaron que cuando la lacasa FNT se incubaba con un mediador redox, ya sea AS o ABTS, se observa la degradación de TC, OTC y CTC mostrado como la ausencia del halo de inhibición de crecimiento en *E. coli* C41. Cuando se realizaron los ensayos de degradación de antibióticos evaluando el efecto del pH, se observaron diferencias en los tamaños de los halos de inhibición de crecimiento para cada antibiótico. En el caso de las penicilinas como son AMX y AMP, estas moléculas presentan un comportamiento anfótero siendo susceptibles a cambios en el pH. Su actividad antimicrobiana se ve disminuida a pH cercanos a la neutralidad (Mitchell et al., 2014) como se observó en los ensayos de degradación realizados en este trabajo (**Figura 6**). Se ha

descrito que una misma concentración de antibiótico  $\beta$ -lactámico puede actuar de distinta manera sobre un mismo microorganismo dependiendo del pH en el cual se encuentra. Esto debido a la hidrólisis de estas moléculas inducida por el pH (Mitchell et al., 2014). Además, la velocidad de hidrólisis es directamente proporcional al aumento de pH y la temperatura cumple un rol preponderante en la hidrólisis del antibiótico (Mitchell et al., 2014). Por lo tanto, la disminución en el tamaño de los halos de inhibición producidos por AMP y AMX, se puede atribuir a la hidrólisis que sufren estos antibióticos a 40°C de incubación a pH 6 y 7.

Al evaluar los ensayos de degradación de tetraciclinas a distintos pH se observó una mayor afinidad de CTC por la lacasa FNT, ya que esta degradó a CTC en ausencia de mediador redox, observando una disminución del halo de inhibición de crecimiento de *E. coli* C41 (**Figura 6 pH 7 y Tabla 3 pH 6, pH 7**). Al analizar la degradación de TC y CTC, se observó una disminución en el halo de inhibición de crecimiento cuando las reacciones de degradación se incubaron con AS o ABTS como mediador redox. La ausencia del halo de inhibición se mostró a pH 6 y 7, lo que se relaciona con la susceptibilidad de las tetraciclinas a los cambios de pH. A pH cercanos a la neutralidad las tetraciclinas se comportan como anfóteros (Liu et al., 2013), cambiando su estado de protonación, lo cual puede determinar la manera de ataque del mediador redox en forma de radical a la estructura de las tetraciclinas, teniendo como efecto la pérdida de la actividad antimicrobiana.

## 6.2 Análisis del porcentaje de biodegradación de antibióticos mediante cromatografía de fase reversa

Se ha reportado que las tetraciclinas actúan como complejos quelantes al unirse a iones metálicos, lo que favorece la adsorción de estas moléculas en los grupos silanol de las columnas de fase reversa. Debido a esto, en los cromatogramas de tetraciclinas suelen aparecer los denominados “picos de cola” (*tailing peaks*). Para evitar estas interacciones se acidificó la fase móvil con ácido oxálico hasta alcanzar pH 2 y así no observar los *tailing peaks* en las tetraciclinas (Yang et al., 2013; Oka et al., 2000). Al analizar la AMP no se logró la identificación del pico característico por lo que se evaluaron otras fases móviles (Elmolla et al., 2010; Zhang et al., 2020). La AMP no presentó el comportamiento descrito en literatura, por esto no se continuó con el análisis mediante cromatografía de fase reversa para este antibiótico.

Al analizar los ensayos de biodegradación de 2 h de incubación en ausencia de mediadores redox, se observó una degradación significativa frente al control para todos los antibióticos evaluados a pH 7 en al menos una condición (**Figura 8**). CIP fue el antibiótico que la lacasa FNT degradó en mayor porcentaje en comparación al resto de antibióticos evaluados, logrando una biodegradación superior al 40% en las tres temperaturas evaluadas a pH 7. La degradación lograda por la lacasa FNT puede estar relacionada al efecto del pH sobre su actividad, ya que el pH puede determinar cómo los antibióticos interactúan con el sitio activo de la enzima. El pH óptimo de las lacasas descritas en literatura se encuentran en un amplio rango, donde la de *T. versicolor* presenta un pH óptimo de 4,0 (Han et al., 2005) y la de *B. subtilis* tiene un pH óptimo de 5,5 ambas

evaluadas con ABTS (Zhang et al., 2020), mientras que la lacasa FNT presenta un pH óptimo de 6,0 evaluado con SYR (Espina et al., 2021). Los óptimos de pH varían dependiendo del sustrato que se evalúa. En el caso de la lacasa FNT presenta un pH óptimo de 7 para degradar CIP. Se ha descrito que se logra una mayor biodegradación de CIP cuando la reacción se lleva a cabo en pH alcalino (Yadav et al., 2021). Al analizar estudios de acoplamiento molecular (*molecular docking*) realizados en la lacasa CotA proveniente de *B. subtilis*, la cual presenta un 65,75% de identidad con la lacasa FNT, estos análisis indicaron que debido a la estructura molecular del CIP este se puede unir con mayor afinidad al sitio T1 de CotA, favoreciendo su degradación (Zhou et al., 2022). El sitio T1 es relevante para la catálisis de las lacasas porque es ahí donde el sustrato se une, sustrae un electrón y este es empleado en la reducción de O<sub>2</sub> para la formación de agua en el centro trinuclear (Morozova et al., 2007). La estructura y composición del sitio activo de las lacasas es altamente conservado (Morozova et al., 2007) por lo que las interacciones de CIP con la lacasa CotA pueden ser utilizadas para explicar la degradación de este antibiótico por acción de la lacasa FNT. La estructura molecular de CIP y el pH 7, descrito como pH óptimo para la degradación de CIP en este trabajo, cumplen un rol importante en la interacción de este antibiótico con el sitio T1, ya que al estar presentes ambos factores permiten la degradación de CIP por acción de la lacasa FNT.

Los ensayos de degradación de antibióticos a 2 h de incubación donde se utilizó AS como mediador redox mostraron una degradación significativa, respecto a los controles de TC, OTC y CIP. La AMX fue el único antibiótico que presentó una degradación significativa respecto a su control cuando se utilizó HBT como

mediador redox. Estas diferencias en la degradación de antibióticos pueden estar dadas por las características estructurales y de potencial redox que presenta cada uno de los mediadores empleados.

El mediador redox HBT presenta en su estructura un grupo >N-OH, el cual es oxidado por la lacasa formando un grupo altamente reactivo denominado “radical nitroxil” (>N-O\*), el cual ataca a la molécula blanco removiendo un átomo de hidrógeno (Morozova et al., 2007). El mediador natural derivado de la lignina AS presenta un mecanismo donde una vez oxidado, se forma el radical fenoxi, actuando como una especie radicalaria, sustrayendo un protón y un electrón del sustrato blanco (Camarero et al., 2007). Se ha descrito que AS es capaz de formar radicales más estables, debido a la presencia de sustituyentes metoxi (-O-CH<sub>3</sub>) que estabilizan la formación del radical en la estructura fenólica, convirtiéndolo así en uno de los mediadores naturales óptimos para el trabajo con lacasas (Mani et al., 2018). Por otra parte, el mediador HBT presenta un potencial redox de 1,08 V vs el electrodo de hidrógeno estándar (EHE) (Hilgers et al., 2018), mientras que AS presenta un potencial redox de 0,58 V vs EHE (Mani et al., 2018). La AS es oxidada de forma más rápida que HBT debido a que posee un potencial redox menor, favoreciendo la oxidación catalizada por la lacasa. Además, HBT es un mediador redox sintético derivado de benzotriazol mientras que, AS es un derivado de la lignina que presenta una estructura fenólica, la cual ha sido ampliamente descrita como uno de los sustratos naturales de las lacasas (Morozova et al., 2007).

La degradación de antibióticos lograda por la lacasa FNT cuando se utiliza AS como mediador redox puede estar relacionada a la diferencia de potencial redox

entre este mediador y los otros analizados, porque el mecanismo de acción de AS es más rápido en comparación al de HBT. Además, las características estructurales que presenta AS para interactuar con el sitio activo de la lacasa FNT junto a la velocidad de acción de este generan un efecto sinérgico, incrementando el porcentaje de biodegradación de los antibióticos cuando se incuban con AS como mediador redox.

Al analizar los ensayos de degradación de antibióticos con 24 h de incubación, se observó que en los ensayos sin mediador redox se logró una degradación significativa respecto al control de TC en las tres temperaturas evaluadas y para OTC solo a 20°C de incubación (**Figura 9 L**). El porcentaje de biodegradación obtenido para estos antibióticos está dado por el aumento de tiempo de incubación con la lacasa FNT y puede estar relacionado con las características estructurales que presentan las tetraciclinas. Estudios de acoplamiento molecular realizados en CotA con TC, describen que la TC se une al sitio de T1 de la enzima interactuando con 13 aminoácidos mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones  $\pi$ -alquil (Zhou et al., 2022; Zhang et al., 2020). Además, las tetraciclinas se caracterizan por tener un núcleo de cuatro anillos fusionados que presentan distintos grupos funcionales en su estructura, particularmente alcoholes (Vicente & Pérez-Trallero, 2010). La presencia de los grupos -OH permite observar una similitud con estructuras fenólicas en las tetraciclinas. En consecuencia, el aumento en el tiempo de incubación junto a las características estructurales que poseen las tetraciclinas permite la interacción de estos antibióticos con el sitio T1 de la lacasa FNT, generando una biodegradación significativa respecto al control de estos antibióticos.

Al observar los ensayos de degradación de antibióticos incubados a 24 h con AS como mediador redox se observó una biodegradación superior al 80% de TC y mayor a 30% para OTC, en las tres temperaturas evaluadas (**Figura 9 AS**). El alto porcentaje de biodegradación de estos antibióticos se debe al aumento en el tiempo de incubación con la lacasa FNT y a las características que presenta AS, tanto en su mecanismo de acción como en su estructura.

Al analizar la cinética de degradación de antibióticos en el tiempo y con temperatura se observa un aumento en la velocidad de degradación para TC a 40 y 20°C, mientras que a 30°C no se observó una diferencia entre los ensayos de degradación realizados a 2 y 24 h de incubación (**Figura 10**). La temperatura cumple un rol importante en la catálisis enzimática, más aun considerando la naturaleza termófila de la lacasa FNT. Por esto, las diferencias observadas en la biodegradación de TC a 2 y 24 h se pueden atribuir a las diferentes temperaturas empleadas. A 30°C la catálisis realizada por la lacasa FNT usando a AS como mediador redox alcanza una velocidad mayor en tan solo 2 h de incubación, en comparación a los ensayos a 40 y 20°C realizados en 2 h de incubación. La degradación de OTC mostró que la degradación solo aumentó significativamente a 30°C, similar a lo observado en los ensayos de degradación de TC a 40 y 20°C. La cinética de degradación de CIP mostró una mayor velocidad de degradación a las 2 h de incubación en comparación a las 24 h de incubación. Esta diferencia en la degradación de CIP también puede atribuirse a la complejidad de la muestra analizada, donde los productos de degradación de este antibiótico pudieran no haber sido separados en su totalidad en la columna de fase reversa, alterando el área de la señal correspondiente a CIP.

La lacasa FNT presentó un alto porcentaje de biodegradación de antibióticos, al ser comparada con otras lacasas descritas en literatura, demostrando el potencial en biorremediación que posee. Se ha descrito que la lacasa de *T. versicolor* al ser incubada en ausencia de mediador redox y con una concentración de 0,04 mg/mL de antibióticos durante 4 h, alcanzó solo un 16% de degradación de TC y un 14% de OTC (Suda et al., 2012). Pero la misma enzima puede degradar un 78% de TC a 0,1 mg/mL luego de 18 h de incubación en ausencia de mediadores redox (Llorca et al., 2015). Por otro lado, la lacasa proveniente de *Pycnoporus* sp. en ausencia de mediador redox, no fue capaz de degradar TC ni OTC a 0,05 mg/mL (Tian et al., 2020, Ding et al., 2016; Becker et al., 2016), mientras la lacasa de *Bacillus amyloliquefaciens* no fue capaz de degradar TC a 0,2 mg/mL luego de 1 h de incubación, y solo alcanzó un 37,5% de degradación luego de 12 h de incubación (Han et al., 2023). La lacasa FNT es capaz de degradar el 34,3% de TC a 0,5 mg/mL luego de tan solo 2 h de incubación a 30°C a pH 7 alcanzando el 46% de biodegradación luego de 24 h de incubación a 40°C a pH 6. En el caso de OTC, la lacasa FNT luego de 2 h de incubación alcanzó una biodegradación en ausencia de mediador redox de 15,6% a 20°C y pH 7, siendo la más alta degradación reportada y con similares resultados a los descritos en Suda et al., 2012.

La lacasa FNT en ausencia de mediador redox es capaz de degradar tetraciclinas a concentraciones hasta 11 veces superiores a las reportadas en literatura, siendo una de las lacasas con mayor capacidad degradativa de tetraciclinas.

La degradación de CIP se ha analizado utilizando la lacasa de *Streptomyces coelicolor*, la que degradó un 16% de CIP 0,005 mg/mL en ausencia de mediador

redox a 37°C (Yadav et al., 2021), mientras que la lacasa de *T. versicolor* no logró degradar 0,001 mg/mL de CIP a 25°C y pH 6,5 en ausencia de mediador (Cuprys et al., 2022), resultado similar a lo reportado con la lacasa de *Streptomyces ipomoeae* donde no se observó degradación de CIP 0,05 mg/mL a 35°C (Blánquez et al., 2016). Sin embargo, la lacasa FNT a pH 7 y en ausencia de mediador redox degradó sobre un 40% de CIP en 2 h de incubación a las tres temperaturas evaluadas, utilizando una concentración de CIP en un rango de 10 a 500 veces superior a lo reportado en la literatura (Ding et al., 2016; Becker et al., 2016). La lacasa FNT fue efectiva para la degradación de CIP, cuando se encuentra a pH 7, a pesar de que en su conformación no presenta estructuras fenólicas. El comportamiento de la lacasa FNT a pH 7 podría tener importantes implicancias biotecnológicas, debido a que el agua que llega a las plantas de tratamiento se encuentra en un rango cercano al alcalino (Cruz-Morató et al., 2013; Boczkaj et al., 2017), resultando interesante expandir este estudio hacia esos rangos de pH.

Los estudios para la degradación de AMX se han realizado con la lacasa de *Pycnoporus sanguineus* CS43, esta degradó un 72% AMX 0,02 mg/mL luego de 72 h de incubación en ausencia de mediador redox, mientras que la lacasa de *T. versicolor* y *Mycelophthora thermophila* lograron un 58% de degradación de AMX en las mismas condiciones (Guardado et al., 2019). Otros trabajos han descrito que al utilizar las lacasas de *T. versicolor*, *Xylaria polymorpha* y *Aspergillus* sp., se alcanzó una degradación de AMX en un rango de 20 a 30% a 30°C y pH 5 después de 24 h de incubación, en ausencia de mediador redox (Bankole et al., 2022). En el presente trabajo se obtuvo un 16% de degradación de AMX a 30°C

y pH 6, siendo el máximo observado, mientras que a pH 5 se alcanzó un 10,2% de degradación luego de una incubación de 2 h a 30°C con la lacasa FNT (**Figura 8**). Esta nueva lacasa en ausencia de mediador redox presentó una baja capacidad degradativa de AMX al ser comparada con otras lacasas descritas en la literatura. Esto puede estar relacionado a los efectos del pH sobre los grupos alcoholes (-OH) presentes en la estructura de AMX (Guardado et al., 2019). Este tipo de antibiótico al estar en soluciones acuosas puede ser fácilmente hidrolizado por el medio y formar rápidamente productos de degradación (Gozlan et al., 2013). En consecuencia, para la degradación de AMX el efecto del pH tuvo un rol importante tanto en la degradación catalizada por la lacasa FNT como también en la estructura de AMX, ya que pudo haber alterado el estado de protonación de sus sustituyentes alterando así la interacción del antibiótico con el sitio T1 de la lacasa FNT.

El uso de mediadores redox en conjunto a lacasas permite ampliar el rango de sustratos oxidables por estas enzimas a partir de una catálisis indirecta, permitiendo la degradación de compuestos recalcitrantes (Morozova et al., 2007). Varios trabajos han descrito el comportamiento de distintas lacasas frente a mediadores redox naturales y sintéticos en la degradación de antibióticos. Como es el trabajo de Suda et al., donde se muestra que al utilizar HBT como mediador redox junto a la lacasa de *T. versicolor*, se degradó TC y OTC a una concentración de 0,04 mg/mL en 1 h de incubación, mostrando una mejora en la biodegradación en comparación al mismo ensayo en ausencia de mediador (Suda et al., 2012). Actualmente, el uso de lacasas junto a mediadores redox naturales ha ido en incremento. Así, la lacasa de *S. coelicolor* logró una degradación superior al 80%

de CIP 0,005 mg/mL a 37°C y pH 8 luego de 10 h de incubación junto a AS. Al evaluar concentraciones crecientes de CIP, la biodegradación disminuyó llegando a un 60% cuando se utilizó 0,01 mg/mL de CIP, indicando que la capacidad degradativa depende de la concentración del sustrato (Yadav et al., 2021). Incluso, se observó una degradación del 80% de TC 0,01 mg/mL en 2 h de incubación con AS 200 mg/mL a pH 8 (Yadav et al., 2021).

En este trabajo, al utilizar la lacasa FNT junto a AS como mediador redox se observó un aumento en la biodegradación en comparación a los ensayos que se realizaron en ausencia de mediador redox. Este comportamiento se observó particularmente en los ensayos de biodegradación de TC y OTC incubados durante 24 h, donde se alcanzó porcentajes muy elevados de biodegradación (91% para TC y 42% para OTC) en comparación a trabajos descritos en la literatura. Además, cuando se compararon los porcentajes de biodegradación alcanzados por la lacasa FNT en presencia de AS y de HBT, se observó una mayor biodegradación de TC, OTC y CIP cuando se incubaron con AS como mediador redox. Esto se debe a las características estructurales que posee AS que permiten lograr una mayor biodegradación en comparación al uso de HBT.

La alta biodegradación lograda junto a AS le brinda un mayor potencial de aplicación en biorremediación a la lacasa FNT, ya que AS al ser un mediador redox de origen natural permitiría lograr una aplicación sostenible y con una menor generación de contaminación asociada al proceso.

### 6.3 Efecto de la biodegradación sobre la ecotoxicidad de antibióticos

En esta investigación se implementaron discos de difusión en placas para evaluar la inhibición de crecimiento de dos microorganismos: uno Gram negativo (*E. coli* C41) y uno Gram positivo (*B. subtilis*), con el fin de tener un espectro más amplio al de evaluar si se pierde o no el efecto antimicrobiano. *E. coli* es una bacteria ampliamente estudiada y generalmente patógena, por lo que un aumento de su presencia en el ambiente o la adquisición de genes de resistencia a antibióticos es potencialmente nocivo para el ser humano (Van Elsas et al., 2011). Mientras que *B. subtilis* también ha sido muy caracterizada, no es patógena y está ampliamente distribuida en el ambiente (Kovács, Á. T., 2019).

La principal diferencia que se observó entre estos dos microorganismos es la sensibilidad a las concentraciones evaluadas de los antibióticos, principalmente a CIP. *E. coli* C41 es más sensible que *B. subtilis*, donde al utilizar la concentración de 0,5 mg/mL presentó un halo de inhibición muy grande por lo que no era factible utilizarlo para el desarrollo de los experimentos (**Figura 4**). Frente a esto, se utilizó una concentración de 0,0001 mg/mL de CIP solo para los ensayos con *E. coli* C41. Este comportamiento se relaciona con que CIP es más potente frente a bacterias Gram negativas (Alos, 2009). Por esto se observó esta diferencia en los tamaños de halo de inhibición de crecimiento en *B. subtilis* y *E. coli* C41.

La evaluación de la pérdida de ecotoxicidad asociada a los ensayos de biodegradación de antibióticos utilizando la lacasa FNT, mostró una reducción en la ecotoxicidad de TC con un gran potencial en biorremediación. Se observó que cuando se realizan los ensayos de biodegradación de TC junto a AS como

mediador redox, incubados durante 24 h a 30 y 20°C, el halo de inhibición de crecimiento de ambos microorganismos evaluados desaparece completamente (**Figura 13** y **Figura 14**). Esto indica que la degradación producida por la lacasa FNT eliminó el efecto antimicrobiano de TC en su totalidad, eliminando la ecotoxicidad asociada a este antibiótico.

Respecto a la degradación de OTC, la lacasa FNT logró una biodegradación de 40% a 30°C cuando se analizó mediante cromatografía de fase reversa. Pero para este antibiótico, luego de la incubación con la lacasa FNT utilizando los discos sobre placas no se observó una disminución en el tamaño del halo de inhibición de crecimiento en ninguno de los dos microorganismos evaluados. Un comportamiento similar se observó en los ensayos de biodegradación de los otros antibióticos evaluados. Ante estos resultados obtenidos, es necesario realizar la determinación de la concentración inhibitoria mínima para estos microorganismos frente a todos los antibióticos evaluados. De esta forma, se podría tener más información respecto a la concentración estimada en la cual se podrán ver cambios en el halo de inhibición. También es necesario considerar que con la catálisis realizada por la lacasa FNT se generan productos de degradación de los antibióticos. La eliminación del halo de inhibición indicó que el antibiótico perdió su efecto antimicrobiano y que los productos de degradación no tienen efecto antimicrobiano debido a la ausencia del halo de inhibición. Por esto, en las reacciones de degradación donde no se observó la disminución del halo de inhibición no se puede descartar la presencia de productos que sean tóxicos para ambos microorganismos evaluados. El estudio de los productos de degradación es relevante, ya que se ha mostrado que estos pueden mantener su

toxicidad y que además el uso de ciertos mediadores químicos como SYR pueden incrementar la toxicidad (Becker et al., 2016). En consecuencia, es necesario realizar un análisis de los productos de degradación de los antibióticos para determinar si estos presentan un efecto antimicrobiano remanente a la catálisis de la lacasa FNT sobre ellos.

## 7. CONCLUSIONES

- I. El pH y la temperatura tienen un rol relevante en la biodegradación de antibióticos realizada por la lacasa de *Bacillus* sp. FNT.
- II. La lacasa de *Bacillus* sp. FNT es capaz de biodegradar TC, OTC y CIP a concentraciones superiores a las ambientales tanto a 30 como a 20°C.
- III. La utilización de AS como mediador redox junto a la lacasa de *Bacillus* sp. FNT incrementa notablemente la biodegradación de TC y OTC a temperatura ambiente después de 2 h de incubación.
- IV. Ensayos de ecotoxicidad mostraron que la lacasa de *Bacillus* sp. FNT junto a AS es capaz de eliminar la toxicidad de TC evaluada en *E. coli* C41 y *B. subtilis* a 30 y 20°C luego de 24 h de tratamiento.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abello-Passteni, V. (2020). Eco-efficiency assessment of domestic wastewater treatment technologies used in Chile Evaluación de eco-eficiencia de tecnologías de tratamiento de aguas residuales domésticas en Chile (Doctoral dissertation, *Faculty of Life Sciences*, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile).
- Alos, J. I. (2009). Quinolonas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27, 290-297.
- Arismendi, D., Becerra-Herrera, M., Cerrato, I., & Richter, P. (2019). Simultaneous determination of multiresidue and multiclass emerging contaminants in waters by rotating-disk sorptive extraction–derivatization-gas chromatography/mass spectrometry. *Talanta*, 201, 480-489.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., de los Santos, M. H., ... & Trujillo-Roldán, M. A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial cell factories*, 18, 1-33.
- Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., & Blamey, J. M. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology*, 280, 478–488.
- Atalah, J., Zhou, Y., Espina, G., Blamey, J. M., & Ramasamy, R. P. (2018). Improved stability of multicopper oxidase–carbon nanotube conjugates using a thermophilic laccase. *Catalysis Science & Technology*, 8, 1272-1276.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R. D., & Adams, C. D. (2007). Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. *Water Research*, 41, 3281-3288.
- Azubuiké, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-18.
- Bankole, P. O., Omoni, V. T., Tennison-Omrovoh, C. A., Adebajo, S. O., Mulla, S. I., Adekunle, A. A., & Semple, K. T. (2022). Novel laccase from *Xylaria polymorpha* and its efficiency in the biotransformation of pharmaceuticals: Optimization of operational conditions, comparative effect of redox-mediators and toxicity studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 217, 112675-112687.
- Becker, D., Varela Della Giustina, S., Rodríguez-Mozaz, S., Schoevaart, R., Barceló, D., Cazes, M. de, Belleville, M.-P., Sanchez-Marcano, J., de Gunzburg, J., Couillerot, O., Völker, J., Oehlmann, J., & Wagner, M. (2016). Removal of antibiotics in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccase – Degradation of compounds does not always eliminate toxicity. *Bioresource Technology*, 219, 500–509.
- Blánquez, A., Guillén, F., Rodríguez, J., Arias, M. E., & Hernández, M. (2016). The degradation of two fluoroquinolone based antimicrobials by SilA, an

- alkaline laccase from *Streptomyces ipomoeae*. *World Journal of microbiology and Biotechnology*, 32, 1-8.
- Boczkaj, G., & Fernandes, A. (2017). Wastewater treatment by means of advanced oxidation processes at basic pH conditions: a review. *Chemical Engineering Journal*, 320, 608-633.
  - Brooke, D., Movahed, N., & Bothner, B. (2015). Universal buffers for use in biochemistry and biophysical experiments. *AIMS biophysics*, 2, 336-342.
  - Bueno, I., Verdugo, C., Jimenez-Lopez, O., Alvarez, P. P., Gonzalez-Rocha, G., Lima, C. A., Travis, D. A., Wass, B., Zhang, Q., Ishii, S., & Singer, R. S. (2020). Role of wastewater treatment plants on environmental abundance of Antimicrobial Resistance Genes in Chilean rivers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 223, 56–64.
  - Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., ... & Dobberstein, B. (1987). A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods in enzymology*. 155 416-433.
  - Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, A. T., Romero, J., Gutiérrez, A., & José, C. (2007). Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1264-1271.
  - Campos, S., Lorca, J., Vidal, J., Calzadilla, W., Toledo-Neira, C., Aranda, M., ... & Salazar, R. (2023). Removal of contaminants of emerging concern by solar photo electro-Fenton process in a solar electrochemical raceway pond reactor. *Process Safety and Environmental Protection*, 169, 660-670.
  - Charuau, L., Jardé, E., Jaffrézic, A., Thomas, M. F., & Le Bot, B. (2019). Veterinary pharmaceutical residues from natural water to tap water: sales, occurrence and fate. *Journal of hazardous materials*, 361, 169-186.
  - Chauhan, P. S., Goradia, B., & Saxena, A. (2017). Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech*, 7, 323-343.
  - Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T., & Sarrà, M. (2013). Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water research*, 47, 5200-5210.
  - Cuprys, A., Thomson, P., Suresh, G., Roussi, T., Brar, S. K., & Drogui, P. (2022). Potential of agro-industrial produced laccase to remove ciprofloxacin. *Environmental science and pollution research international*, 29, 10112–10121.
  - Deng, Y., & Zhao, R. (2015). Advanced oxidation processes (AOPs) in wastewater treatment. *Current Pollution Reports*, 1, 167-176.
  - Ding, H., Wu, Y., Zou, B., Lou, Q., Zhang, W., Zhong, J., ... & Dai, G. (2016). Simultaneous removal and degradation characteristics of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics by laccase-mediated oxidation coupled with soil adsorption. *Journal of hazardous materials*, 307, 350-358.
  - Elmolla, E. S., & Chaudhuri, M. (2010). Degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution by the UV/ZnO photocatalytic process. *Journal of hazardous materials*, 173, 445-449.

- Espina, G., Cáceres-Moreno, P., Mejías-Navarrete, G., Ji, M., Sun, J., & Blamey, J. M. (2021). A novel and highly active recombinant spore-coat bacterial laccase, able to rapidly biodecolorize azo, triarylmethane and anthraquinonic dyestuffs. *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 298–306.
- 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, 2522-2527.
- Gozlan, I., Rotstein, A., & Avisar, D. (2013). Amoxicillin-degradation products formed under controlled environmental conditions: identification and determination in the aquatic environment. *Chemosphere*, 91, 985-992.
- Grenni, P., Ancona, V., & Barra Caracciolo, A. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136, 25-39.
- Guan, Z.-B., Luo, Q., Wang, H.-R., Chen, Y., & Liao, X.-R. (2018). Bacterial laccases: Promising biological green tools for industrial applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 3569–3592.
- Guardado, A. L. P., Belleville, M. P., Alanis, M. D. J. R., Saldivar, R. P., & Sanchez-Marcano, J. (2019). Effect of redox mediators in pharmaceuticals degradation by laccase: a comparative study. *Process Biochemistry*, 78, 123-131.
- Han, M. J., Choi, H. T., & Song, H. G. (2005). Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Microbiology*, 43, 555-560.
- Han, Z., Wang, H., Zheng, J., Wang, S., Yu, S., & Lu, L. (2023). Ultrafast synthesis of laccase-copper phosphate hybrid nanoflowers for efficient degradation of tetracycline antibiotics. *Environmental research*, 216, 114690-114701.
- Hernández, F., Calisto-Ulloa, N., Gómez-Fuentes, C., Gómez, M., Ferrer, J., González-Rocha, G., ... & Montory, M. (2019). Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic. *Journal of hazardous materials*, 363, 447-456.
- Hilgers, R., Vincken, J. P., Gruppen, H., & Kabel, M. A. (2018). Laccase/mediator systems: their reactivity toward phenolic lignin structures. *ACS sustainable chemistry & engineering*, 6, 2037-2046.
- Homem, V., & Santos, L. (2011). Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices—a review. *Journal of environmental management*, 92, 2304-2347.
- Hou, J., Long, X., Wang, X., Li, L., Mao, D., Luo, Y., & Ren, H. (2023). Global trend of antimicrobial resistance in common bacterial pathogens in response to antibiotic consumption. *Journal of Hazardous Materials*, 442, 130042-130055.
- Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., ... & Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 3463-3470.
- Kovács, Á. T. (2019). *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology*, 27, 724-725.

- Kovalakova, P., Cizmas, L., McDonald, T. J., Marsalek, B., Feng, M., & Sharma, V. K. (2020). Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. *Chemosphere*, 251, 126351-126366.
- Liu, M., Hou, L. A., Yu, S., Xi, B., Zhao, Y., & Xia, X. (2013). MCM-41 impregnated with A zeolite precursor: Synthesis, characterization and tetracycline antibiotics removal from aqueous solution. *Chemical engineering journal*, 223, 678-687.
- Llorca, M., Rodríguez-Mozaz, S., Couillerot, O., Panigoni, K., de Gunzburg, J., Bayer, S., ... & Barceló, D. (2015). Identification of new transformation products during enzymatic treatment of tetracycline and erythromycin antibiotics at laboratory scale by an on-line turbulent flow liquid-chromatography coupled to a high-resolution mass spectrometer LTQ-Orbitrap. *Chemosphere*, 119, 90-98.
- Lloret, L., Eibes, G., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Feijoo, G., & Lema, J. M. (2010). Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochemical Engineering Journal*, 51, 124-131.
- Mani, P., Fidal Kumar, V. T., Keshavarz, T., Chandra, T. S., & Kyazze, G. (2018). The role of natural laccase redox mediators in simultaneous dye decolorization and power production in microbial fuel cells. *Energies*, 11(12), 3455-3467.
- Manzo, V., Goya-Pacheco, J., Arismendi, D., Becerra-Herrera, M., Castillo-Aguirre, A., Castillo-Felices, R., ... & Richter, P. (2019). Cork sheet as a sorptive phase to extract hormones from water by rotating-disk sorptive extraction (RDSE). *Analytica chimica acta*, 1087, 1-10.
- Manzo, V., Ulisse, K., Rodríguez, I., Pereira, E., & Richter, P. (2015). A molecularly imprinted polymer as the sorptive phase immobilized in a rotating disk extraction device for the determination of diclofenac and mefenamic acid in wastewater. *Analytica chimica acta*, 889, 130-137.
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*, 24, 718-733.
- Mate, D. M., & Alcalde, M. (2016). Laccase: A multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 10, 1457-1467.
- Ministerio de Salud. (2019). Instituto de Salud Pública de Chile. Instituto de salud pública. Recuperado 6 de enero de 2023, de <https://www.ispch.gob.cl/noticia/isp-informa-sobre-la-resistencia-a-los-antimicrobianos-y-los-antibioticos-mas-vendidos-en-chile/>
- Mitchell, S. M., Ullman, J. L., Teel, A. L., & Watts, R. J. (2014). pH and temperature effects on the hydrolysis of three  $\beta$ -lactam antibiotics: Ampicillin, cefalotin and cefoxitin. *Science of the total environment*, 466, 547-555.
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V., & Yaropolov, Y. I. (2007). Laccase-mediator systems and their applications: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43, 523-535.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 54675776, Tetracycline. Recuperado 12 de abril de 2023, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetracycline>.
- Oka, H., Ito, Y., & Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882, 109-133.

- Owa, F. D. (2013). Water Pollution: Sources, Effects, Control and Management. *Mediterranean Journal of Social Sciences*, 4, 65-65.
- Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman Jr, C. U., & Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chemical reviews*, 119, 3510-3673.
- Pérez-Llano, Y., Soler, H. P., Olivano, A. R., Folch-Mallol, J. L., Cabana, H., & Batista-García, R. A. (2020). Laccases from extremophiles. *Laccases in Bioremediation and Waste Valorisation*, 33, 213-238.
- Qamar, M. U., Chughtai, M. I., Ejaz, H., Mazhari, B. B. Z., Maqbool, U., Alanazi, A., ... & Junaid, K. (2023). Antibiotic-Resistant Bacteria, Antimicrobial Resistance Genes, and Antibiotic Residue in Food from Animal Sources: One Health Food Safety Concern. *Microorganisms*, 11, 161-177.
- Qiao, M., Ying, G. G., Singer, A. C., & Zhu, Y. G. (2018). Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment international*, 110, 160-172.
- Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., & Kumar, A. (2011). Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme research*, 2011, 217861-217873.
- Singh, J., Saharan, V., Kumar, S., Gulati, P., & Kapoor, R. K. (2018). Laccase grafted membranes for advanced water filtration systems: a green approach to water purification technology. *Critical reviews in biotechnology*, 38, 883-901.
- Spina, F., Cordero, C., Schilirò, T., Sgorbini, B., Pignata, C., Gilli, G., ... & Varese, G. C. (2015). Removal of micropollutants by fungal laccases in model solution and municipal wastewater: evaluation of estrogenic activity and ecotoxicity. *Journal of Cleaner Production*, 100, 185-194.
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27, 116-129.
- Suda, T., Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., & Nishida, T. (2012). Treatment of tetracycline antibiotics by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Bioresource technology*, 103, 498-501.
- Tian, Q., Dou, X., Huang, L., Wang, L., Meng, D., Zhai, L., ... & Liao, X. (2020). Characterization of a robust cold-adapted and thermostable laccase from *Pycnoporus* sp. SYBC-L10 with a strong ability for the degradation of tetracycline and oxytetracycline by laccase-mediated oxidation. *Journal of hazardous materials*, 382, 121084-121098.
- Van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., & Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal*, 5, 173-183.
- Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 28, 122-130.
- Wang, J., & Chen, H. (2020). Catalytic ozonation for water and wastewater treatment: recent advances and perspective. *Science of the Total Environment*, 704, 135249.
- Wang, Q., & Yang, Z. (2016). Industrial water pollution, water environment treatment, and health risks in China. *Environmental Pollution*, 218, 358–365.

- Wang, W., Lin, C., Wang, L., Jiang, R., Huang, H., Liu, Y., & Lin, H. (2023). Contamination, sources and health risks of potentially toxic elements in the coastal multimedia environment of South China. *Science of The Total Environment*, 862, 160735-160748.
- Wen, X., Zeng, Z., Du, C., Huang, D., Zeng, G., Xiao, R., ... & Deng, R. (2019). Immobilized laccase on bentonite-derived mesoporous materials for removal of tetracycline. *Chemosphere*, 222, 865-871.
- Wilkinson, J. L., Boxall, A. B., Kolpin, D. W., Leung, K. M., Lai, R. W., Galbán-Malagón, C., ... & Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119, e2113947119.
- Xu, S., Jiang, Y., Liu, Y., & Zhang, J. (2021). Antibiotic-accelerated cyanobacterial growth and aquatic community succession towards the formation of cyanobacterial bloom in eutrophic lake water. *Environmental Pollution*, 290, 118057-118068.
- Yadav, D., Ranjan, B., Mchunu, N., Roes-Hill, L., & Kudanga, T. (2021). Enhancing the expression of recombinant small laccase in *Pichia pastoris* by a double promoter system and application in antibiotics degradation. *Folia Microbiologica*, 66, 917-930.
- Yang, J., Li, W., Ng, T. B., Deng, X., Lin, J., & Ye, X. (2017). Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 832-856.
- Yang, X. Q., Yang, C. X., & Yan, X. P. (2013). Zeolite imidazolate framework-8 as sorbent for on-line solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of tetracyclines in water and milk samples. *Journal of Chromatography A*, 1304, 28-33.
- Yoshida, H. (1883). Chemistry of laquer (urushi). *J. Chem. Soc.*, 43, 472-486.
- Zhang, C., You, S., Zhang, J., Qi, W., Su, R., & He, Z. (2020). An effective in-situ method for laccase immobilization: Excellent activity, effective antibiotic removal rate and low potential ecological risk for degradation products. *Bioresource Technology*, 308, 123271-123281.
- Zhong, R., Li, H., Wang, Y., Zhang, Y., Zhou, J., & Wang, T. (2023). Removal of antibiotic resistance genes and pathogenicity in effluent from municipal wastewater treatment plant by plasma oxidation. *Chemical Engineering Journal*, 454, 140274-140286.
- Zhou, Y., You, S., Zhang, J., Wu, M., Yan, X., Zhang, C., ... & He, Z. (2022). Copper ions binding regulation for the high-efficiency biodegradation of ciprofloxacin and tetracycline-HCl by low-cost permeabilized-cells. *Bioresource Technology*, 344, 126297-126303.