

**I D Ó N E A
C O M U N I C A C I Ó N D E
R E S U L T A D O S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

Por:

I.R.H. Rita Carolina Cruz Rangel

**“BIODEGRADACIÓN DE CARBAMAZEPINA EN CONDICIONES
AEROBIAS POR *Schizophyllum commune*”**

Directora: Dra. Flor Yunuén García-Becerra

Co- directora: Dra. Adela Irmene Ortiz López

Asesor: Dr. Carlos David Silva Luna

Ciudad de México a 19 de mayo del 2023.



Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Maestría del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental fue realizado del 11 de septiembre del 2017 al 19 de mayo del 2023 en laboratorios del DPT de la DCNI.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 14 del mes septiembre del año 2023, la que suscribe Rita Carolina Cruz Rangel, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor (a) intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada; "BIODEGRADACIÓN DE CARBAMAZEPINA EN CONDICIONES AEROBIAS POR *Schizophyllum commune*" realizada bajo la dirección de la Dra. Flor Yunuén Garcia-Becerra y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del (la) director (a) del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: June.Garcia-Becerra@unbc.ca

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

"El que suscribe, Rita Carolina Cruz Rangel, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita."


Rita Carolina Cruz Rangel

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Rita Carolina Cruz Rangel, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Rita Carolina Cruz Rangel.


Rita Carolina Cruz Rangel
Nombre y firma del alumno

A MIS PADRES,

A MI COMPAÑERO DE VIDA,

AL ESFUERZO Y PERSEVERANCIA.

La ciencia está hecha de errores, pero de errores útiles de cometer,
pues poco a poco, conducen a la verdad.

Julio Verne

No importa lo lento que vayas,
siempre y cuando no te detengas.

Confucio

AGRADECIMIENTOS

La realización de este proyecto es producto del gran esfuerzo, desempeño y perseverancia que se obtuvo gracias a mi casa de estudios, la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa y sus instalaciones dónde se pudo realizar gran parte del trabajo realizado. Además, del apoyo y confianza por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al haberme otorgado la beca de estudios con No. CVU: 868558.

La parte medular de este proyecto fue en gran parte de la Dra. Flor Y. Garcia Becerra, la Dra. A. Irmene Ortiz López y el Dr. Carlos D. Silva Luna ya que, gracias a su ayuda, tiempo dedicado, amplios conocimientos y apoyo incondicional no se hubiera logrado la meta alcanzada. De igual manera, se agradecen las aportaciones científicas por parte de mis revisores de ICR: el Dr. Ricardo Beristain Cardoso, la Dra. Teresa de Jesús García Pérez y el Mtro. M. Sergio Hernández Jiménez, además del gusto de haber coincidido en este trayecto de forma personal y por sus aportaciones en mi formación profesional.

También gracias al Dr. Arturo Aburto Medina por su apoyo en la reclasificación de la cepa estudiada, gracias a las técnicas de biología molecular realizadas en la School of Science de la RMIT University de Australia. De la misma manera, se agradece al Instituto Politécnico Nacional (IPN) en especial al Dr. Jorge Alberto Mendoza Pérez, responsable del Laboratorio de Química Orgánica Ambiental de la ENCB-IPN por haber apoyado en algunos de los resultados experimentales obtenidos.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio y extra - laboratorio: Ingrid, Alejandro, Eduardo, Paty, Minerva, Jaqueline, Karina, A. Karem, Ezequiel, Verónica y Alexis que fueron testigos del esfuerzo puesto en cada paso dado. Sin su compañía y ayuda, esas largas horas de laboratorio no hubieran sido las mismas.

Finalmente, este extenso trayecto no lo hubiera logrado gracias al enorme e incomparable apoyo incondicional de mis padres y mi compañero de vida, Omar, que siempre confiaron en mi potencial para poder lograr esta meta. Además, de su compañía que siempre me abrigó en los buenos y malos momentos.

RESUMEN

Los cuerpos de aguas superficiales de todo el mundo, incluido México, llegan a tener presencia de microcontaminantes (MC), cuya característica principal es su baja concentración en la que se encuentran: mg/L (ppm), µg/L o ng/L (trazas). La carbamazepina (CBZ) se encuentra dentro de este grupo y a la vez en un subgrupo denominado como productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP, por sus siglas en inglés); cuya característica suele ser su persistencia a los tratamientos biológicos dentro de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR).

Los hongos de pudrición blanca (WRF, por sus siglas en inglés) son conocidos por poseer un sistema enzimático complejo, el cual le permite degradar MC con moléculas complejas. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue comprobar la capacidad degradativa de *Schizophyllum commune* en CBZ.

Los estudios de degradación se realizaron en cultivos en lote con agitación, a temperatura controlada con una concentración inicial de 5 mg/L del CBZ durante 33 días, incluyendo controles endógenos y abióticos. La degradación observada fue de 25.08% ± 0.42 y fue relacionada con la actividad microbiana evaluada mediante la producción de CO₂, mientras que el aumento de carbono orgánico (COT) indicó la posible producción de metabolitos que a su vez podrían haber interferido con el proceso degradativo. Por otro lado, el nulo consumo de nitrógeno total (NT) fue corroborado con el mínimo crecimiento microbiano. De igual manera, no se observaron efectos inhibitorios en la respiración de *S. commune* por la presencia de la CBZ.

Se demostró que *Schizophyllum commune* puede degradar CBZ, esta capacidad no había sido reportada previamente. Sin embargo, su potencial uso en tratamientos biológicos requerirá de estudios que puedan establecer las condiciones en que la limitada tasa de degradación observada en este estudio pueda ser mejorada y por consecuencia, convertirse en una opción viable para la remoción de este tipo de compuestos en comparación con un tratamiento fisicoquímico, el cual implica mayores gastos y en ocasiones sin que exista una biotransformación del MC.

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1 VENTAJAS Y DESVENTAJAS EN EL USO DE SISTEMAS FÚNGICOS DURANTE REMOCIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES	20
TABLA 2 REMOCIÓN DE CARBAMAZEPINA POR DISTINTOS TRATAMIENTOS EN PTAR.....	22
TABLA 3 REMOCIÓN DE CBZ CON TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS EN AGUAS RESIDUALES DE ORIGEN FARMACÉUTICO	23
TABLA 4 COMPARATIVA DEL DESEMPEÑO DE DIFERENTES TIPOS DE HONGOS EN LA DEGRADACIÓN DE CBZ	34
FIGURA 1 PORCENTAJE DE AGUAS TRATADAS EN MÉXICO POR PARTE DE LAS PTAR.	16
FIGURA 2 MOLÉCULA QUÍMICA DE CARBAMAZEPINA.....	18
FIGURA 3 DIAGRAMA METODOLÓGICO DEL EXPERIMENTO.....	26
FIGURA 4 <i>S. COMMUNE</i> EN PDA CON PRESENCIA DE CBZ A 5PPM.	27
FIGURA 5 <i>S. COMMUNE</i> EN MEDIO KIRK CON CBZ A 5PPM.....	28
FIGURA 6 ESQUEMA DE LOS CULTIVOS EN LOTE.....	28
FIGURA 7 PERFIL DE DEGRADACIÓN DE CBZ POR <i>S. COMMUNE</i>	32
FIGURA 8 COMPORTAMIENTO DEL CONTROL ABIÓTICO A LO LARGO DE LA CINÉTICA.....	33
FIGURA 9 PERFIL DE COT DURANTE LA ACTIVIDAD DE <i>S. COMMUNE</i>	36
FIGURA 10. PERFIL ESPECÍFICO DE NT DURANTE LA ACTIVIDAD DE <i>S. COMMUNE</i>	38
FIGURA 11 PERFIL DE CRECIMIENTO DE <i>S. COMMUNE</i>	39

Lista de Acrónimos

PTAR	Plantas de tratamiento de aguas residuales
WRF	Hongos de pudrición blanca (por sus siglas en inglés)
CE	Contaminantes emergentes
CBZ	Carbamazepina
SBN	Soluciones basadas en la naturaleza
MC	Microcontaminantes
COTr	Contaminantes orgánicos traza
DE	Disruptores endocrinos
PhAC	Compuestos farmacéuticamente activos (por sus siglas en inglés)
PPCP	Productos farmacéuticos y de cuidado personal (por sus siglas en inglés)
PT	Productos de transformación
MBR	Reactor biológico de membrana (por sus siglas en inglés)
SBR	Reactor biológico secuencial (por sus siglas en inglés)
COT	Carbón orgánico total
NT	Nitrógeno total
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés)
LC-MS/MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas (por sus siglas en inglés)

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	vii
RESUMEN	viii
ÍNDICE	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Situación de las plantas de tratamiento en México.....	16
2.2 Daños ambientales y a la salud por presencia de microcontaminantes.	17
2.3 Carbamazepina como microcontaminante en cuerpos acuáticos.	18
2.4 Sistemas fúngicos como tecnología factible en el tratamiento de aguas residuales y microcontaminantes.	19
2.5 Tratamientos para remoción de carbamazepina.....	21
2.6 Métodos biológicos para la biodegradación de carbamazepina.	23
3. OBJETIVOS, HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y RELEVANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	25
3.1 Objetivos.....	25
3.1.1 Objetivo general	25
3.1.2 Objetivos específicos	25
3.2 Hipótesis	25
3.3 Justificación	25
3.4 Relevancia de la investigación.....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 Crecimiento y conservación de <i>S. commune</i>	27
4.2 Estudios de biodegradación.....	28
4.3 Técnicas analíticas.....	29
4.3.1 Medición respirométrica a <i>S. commune</i>	29

4.3.2 Cuantificación de biomasa.....	30
4.3.3 Carbón orgánico total y nitrógeno total (COT/NT).	30
4.3.4 Extracción y cuantificación de carbamazepina.	31
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
5.1 Degradación de carbamazepina por <i>S. commune</i>	31
5.2 Evolución del carbono orgánico total (COT).....	36
5.3 Nitrógeno total (NT).....	37
5.4 Crecimiento microbiano.	38
5.5 Actividad microbiana por respirometría.	39
5.6 Balance de materia.....	40
6. CONCLUSIONES.....	42
7. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	42
8. REFERENCIAS.....	43
9. ANEXOS.....	51

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que el 70% de los cuerpos de agua superficiales en México presentan algún grado de contaminación (CNDH-UNAM, 2018). Esta contaminación se debe, en parte, a que aguas residuales no tratadas provenientes de descargas de efluentes industriales y municipales se vierten en estos cuerpos de agua. Además, se suman los efluentes provenientes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) que no tienen una calidad idónea después de su tratamiento debido al alto costo que estas involucran en operación y mantenimiento (Vidal-Álvarez, 2018). Este tipo de agua se considera *agua contaminada*, ya que las sustancias persistentes o recalcitrantes introducidas antes y que se mantienen durante el post tratamiento, ponen en riesgo la seguridad sanitaria para los seres humanos, así como para el uso agrícola o industrial (Hernández-Salazar *et al.*, 2017).

Durante el año 2021 se registró que la producción en México de agua residual sin tratar en el sector industrial estuvo alrededor de los 56.2 y 145.3 m³/s en el sector doméstico (SEMARNAT, 2022), lo que representa el 25.3% y el 67.5% de aguas tratadas respectivamente.

La composición de este tipo de aguas se basa principalmente en la gran variedad de contaminantes (Petrie *et al.*, 2015) denominados “contaminantes críticos” (Tjandraatmadja & Diaper, 2006) y "contaminantes emergentes" (Deblonde *et al.*, 2011), nombrados así, debido al peligro que representan a la salud pública y al medio ambiente.

Algunos de los compuestos que llegan a poseer este tipo de aguas residuales, son: metales pesados, hidrocarburos, compuestos inorgánicos nitrogenados, fósforo, materia orgánica, grasas y aceites, plaguicidas, fármacos (excreción o desechos) y productos de uso personal procedentes de distintos sectores productivos (industrial, hospitalarios o domésticos) (Akpor *et al.*, 2014; Garcia & Ortiz, 2018; Tejada *et al.*, 2014; Bendz *et al.*, 2005). Por tal motivo, es necesaria la implementación de tratamientos más eficaces y novedosos que mejoren los tratamientos convencionales en las PTAR del país.

Muchos de estos compuestos tienden a ser contaminantes persistentes en efluentes después del tratamiento en las PTAR y por consecuencia, llegan a ser encontrados en aguas superficiales. Los fármacos y compuestos químicos usados en la fabricación de

productos de cuidado personal pertenecen a este grupo de contaminantes, así como sus productos de degradación (Patiño *et al.*, 2014, Becerril *et al.*, 2009).

Un subgrupo de contaminantes emergentes, son los microcontaminantes (MC), cuya característica principal es la baja concentración en la que se encuentran: mg/L (ppm), µg/L o ng/L (trazas). Los contaminantes emergentes en agua, incluidos los MC, se consideran como aquellos productos químicos que en su mayoría terminan en aguas residuales y que hoy en día describe a menudo la contaminación del medio ambiente acuático (Kümmerer *et al.*, 2011). Se consideran de tipo emergente debido a que no existe una regulación estricta o bien, no son sometidos a algún proceso de regulación en el medioambiente. En el caso de México, aún no existe una normatividad que regule este tipo de contaminantes.

Los MC no son eliminados con eficacia en las PTAR convencionales, ya que no están diseñadas para su tratamiento. Se requiere de tratamientos específicos para garantizar un mayor nivel de tratamiento y, por ende, una mejor calidad del agua. Adicionalmente, la identificación y cuantificación de este tipo de contaminantes, a las concentraciones en las que se encuentran en las aguas residuales tratadas, suele ser con técnicas analíticas complejas debido a la sensibilidad que tienen respecto a las interferencias de otros compuestos químicos presentes en las aguas residuales (Akpor *et al.*, 2014).

Se ha identificado que el problema con este tipo de compuestos es su impacto sobre la salud y el medio ambiente. Mientras que en la fauna acuática tienden a bioacumularse en los tejidos, además de afectar el metabolismo de algunas especies de peces (García-Becerra & Ortiz, 2018). Su presencia en agua potable es consecuencia de la deficiente calidad en las descargas de aguas residuales puede llegar a ocasionar algunos problemas de salud como daños neurológicos, acumulación en tejidos, cáncer, disrupción endocrina, etcétera (Gil *et al.*, 2012).

Por lo tanto, abordar el tratamiento de estos contaminantes con presencia en las aguas residuales es un tema importante que conlleva a desarrollar nuevas técnicas de remoción que sean efectivas. Esta garantía requiere eficiencias tanto en términos de rendimiento como de costo, además de ser amigables con el medio ambiente y así garantizar una mejor calidad de aguas tratadas que por consecuencia, beneficiaría a una posible recuperación de lagunas, lagos, ríos y hasta acuíferos. Algunos ejemplos de estas tecnologías son el uso de las soluciones basadas en la naturaleza (SBN), sugeridas por la Organización de

la Naciones Unidas (ONU, 2018), cuyo propósito de usarlas es eliminar contaminantes en el agua a bajos costos y una alta eficiencia (UNESCO, 2018).

Los procesos biológicos en el tratamiento de aguas residuales son los más usados, debido al uso de microorganismos que incluyen bacterias y/o hongos que gracias a sus capacidades metabólicas pueden biotransformar contaminantes a productos inocuos para el ambiente. En el caso de sistemas fúngicos, específicamente los hongos de pudrición blanca (WRF por sus siglas en inglés) son una opción factible debido al potencial que poseen en comparación con los procesos bacterianos. Esto se debe a que tienen mecanismos de bioremediación oxidativa y una tolerancia a las sustancias tóxicas que se encuentran en el medio ambiente (Asgher *et al.*, 2008).

La biomasa fúngica cuenta con la capacidad de eliminar un amplio espectro de contaminantes orgánicos traça (COTr) (Asif *et al.*, 2017) presentes en aguas residuales. La maquinaria degradativa que tienen los WRF funciona gracias a enzimas no específicas. Se ha observado que este tipo de sustancias constituyen un grupo de biocatalizadores con la capacidad de catalizar la oxidación y remoción de MC presentes en suelos y aguas (Bilal *et al.*, 2019) tales como: hidrocarburos; compuestos fenólicos; plaguicidas, colorantes, fármacos, etc (Novotný *et al.*, 2000; Kumar & Min, 2011; Tortella *et al.*, 2013; Mir-Tutusaus *et al.*, 2019; Bulai *et al.*, 2017; Naghdi *et al.*, 2018).

Por lo que, el uso de WRF o basidiomicetos de podredumbre blanca son una herramienta a favor para la obtención de aguas tratadas de mejor calidad (Mandhatri & Gorawala, 2018) y por consecuencia, agilizar la recuperación de cuerpos de agua superficiales del país que sufren cierto tipo de contaminación derivado de los compuestos antropogénicos. Es por ello, que la utilización de estos microorganismos en conjunto con sistemas ambientalmente efectivos (tratamientos biológicos) pueden llegar a ser eficientes en la remoción de contaminantes emergentes. Un ejemplo de ello es el biorreactor híbrido de membrana en conjunto con *Trametes versicolor* cuya eliminación de carbamazepina (CBZ) fue del 68% (Nasir *et al.*, 2017).

Por tal motivo, el objetivo de este proyecto fue estudiar las capacidades de *Schizophyllum commune* para degradar CBZ, un MC persistente en aguas residuales.

2. ANTECEDENTES

2.1 Situación de las plantas de tratamiento en México.

En México, la contaminación hídrica es un problema ambiental serio y por consecuencia, de salud pública. Los datos proporcionados por la Comisión Nacional de Agua (CONAGUA) en el período que abarca del año 2017 al 2021 muestran esta problemática, ya que se reportaron porcentajes bajos en el tratamiento de aguas residuales tanto domésticas como industriales mediante plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) (Figura 1).



Figura 1 Porcentaje de aguas tratadas en México por parte de las PTAR.

Información tomada de Estadísticas del Agua de México versiones 2018, 2019 y 2022.

Tal y como se observa en la Figura 1, el tratamiento de estos efluentes no supera ni el 70% respecto a las aguas residuales municipales y en el caso de las aguas de tipo industrial están por debajo del 40% y el cual se redujo en el 2021 por debajo del 30% (SEMARNAT, 2018, 2019, 2022), una posible causa fue la pandemia COVID-19 que detuvo las actividades económicas del mundo, incluyendo las de tipo industrial.

Los problemas de baja eficiencia en más del 50% de las PTAR del país que usan lodos activados (SEMARNAT, 2019) pueden estar relacionados con el poco mantenimiento o diseño erróneo que existen en ellas, lo anterior ocasiona que la remoción de materia biodegradable en las aguas residuales municipales en forma de Demanda Biológica de

Oxígeno (DBO₅) solamente alcance el 19% aproximadamente (Inter-American Network of Academies of Sciences (IANAS y UNESCO, 2019).

La disponibilidad del servicio de tratamiento de aguas residuales en México de 2018 al 2020 aumentó de 41 a 58% (INEGI, 2023), mientras que los sistemas biológicos que emplean las PTAR en el país fueron los mismos y su eficacia sólo llega a funcionar para aguas residuales de tipo municipal dónde la presencia de MC es menor en comparación con un agua residual industrial. Por lo tanto, el 41.0% restante de la población que no cuenta con ningún servicio de este tipo, descarga sus aguas crudas sin ningún tratamiento. A nivel mundial, entre el 80 y 95% de las aguas residuales suelen ser descargadas en ríos, lagos y océanos, sin ningún tratamiento previo (SEMARNAT, 2018;). Por tal motivo, el gran reto que tiene el mundo y México es el de producir aguas tratadas de calidad que conlleven en un futuro a detener la contaminación de cuerpos de aguas superficiales y así garantizar la perseveración de flora y fauna acuática y el recurso hídrico mismo.

2.2 Daños ambientales y a la salud por presencia de microcontaminantes.

Los contaminantes emergentes (CE) tienden a ser considerados perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente, ya que pueden causar diversos efectos negativos en los organismos como puede ser la toxicidad crónica, disrupción endocrina y bioacumulación en la fauna acuática debido a las concentraciones en las que se encuentran (Patiño *et al.*, 2014; Becerril, 2009). Ejemplo de ello son los disruptores endocrinos (DE) que suelen estar presentes en aguas residuales sin tratar, aguas residuales tratadas, ríos receptores y aguas superficiales. Este tipo de MC interfieren con la función normal de los sistemas endocrinos de la vida silvestre y de los seres humanos. Esto ocurre a través de una exposición directa o indirecta mediante la cadena alimenticia. Tal es el ejemplo de la feminización de embriones de gaviotas asociados con la exposición al plaguicida diclorodifeniltricloroetano, conocido como DDT (Bendz *et al.* 2005).

La problemática central de estos compuestos es que no todos han sido identificados o regulados de modo que no sean perjudiciales a la salud. Únicamente el 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) y del diclofenaco han sido regulados por la Comisión Europea, cuyos límites máximos permisibles establecidos son de: 0.4, 0.035 y 100 ng/L,

respectivamente (Petrie *et al.*, 2015). Otro CE identificado es la CBZ, el cual se aborda a continuación.

2.3 Carbamazepina como microcontaminante en cuerpos acuáticos.

Los compuestos farmacéuticamente activos (PhAC) son parte de los MC persistentes en cuerpos de agua superficiales (Clara *et al.*, 2004). En los últimos años han sido reconocidos como un importante riesgo para la salud de los seres humanos y de los miembros en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Además de que se han convertido en una preocupación y a la vez en un tema que está llamando cada vez más la atención tanto en la comunidad científica como en la comunidad política, derivado de los casos de presencia de estos compuestos en el ciclo del agua (Meyer *et al.*, 2016). Este tipo de sustancias tienden a ser excretados a través de las heces y la orina de humanos, lo cual facilita su transporte a receptores acuáticos, como lagunas, lagos, ríos, mares y océanos. La CBZ es parte de los PhAC y CDE. Es un medicamento usado para el control de la epilepsia psicomotora y otros trastornos neurales. Está es considerada un contaminante emergente y persistente, el cual se caracteriza por su baja remoción en PTAR y degradación en cuerpos de agua superficiales (Clara *et al.*, 2004; Cunningham *et al.*, 2010). Este tipo de molécula es bipolar (un extremo se disuelve con el agua y otro no) y suele retenerse en sedimentos (Oetken *et al.*, 2005), provocando dificultad en el tratamiento del agua que lo contiene, con los procesos convencionales (Figura 2).

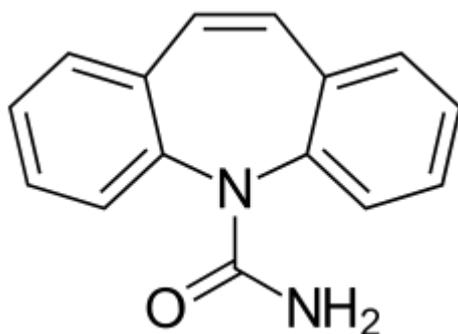


Figura 2 Molécula química de carbamazepina.

Otro dato importante de la CBZ es su resistencia a la atenuación natural, considerado un proceso esencial para eliminar la concentración de productos farmacéuticos en el medio ambiente. Este contaminante persistente es considerado un riesgo para la vida acuática y para los seres humanos (Li, 2014). Por ejemplo, en el caso del insecto *Chironomus*

Riparius midge se observó un aumento en la mortalidad de la especie en presencia de este compuesto (Nasir, 2017).

2.4 Sistemas fúngicos como tecnología factible en el tratamiento de aguas residuales y microcontaminantes.

La literatura propone tratamientos biológicos usando sistemas fúngicos como una herramienta poderosa y ya conocida para la biodegradación de varios tipos de contaminantes emergentes (Ahmed *et al.*, 2017). Debido a que poseen un sistema enzimático complejo y una gran capacidad de tolerar contaminantes tóxicos, además de poder transformarlos a compuestos más amigables con el medio ambiente, llamados productos de transformación (PT) (Olicón-Hernández *et al.*, 2017).

El grupo de hongos que han sido estudiados en el tratamiento secundario en PTAR son los WRF pertenecientes al grupo de basidiomicetos. Estos hongos han sido los primeros en analizarse debido a su potencial para la degradación de compuestos tóxicos y los cuales han dado resultados positivos. Su mecanismo de remediación biológica se centra en la sorción por biomasa fúngica y en sus capacidades biocatalíticas no específicas (Tomasini & León-Santesteban, 2019).

Algunas de las propiedades que hace hincapié Rodríguez-Rodríguez *et al.*, (2012) respecto a las capacidades biocatalíticas que tienen los WRF son: a) sistema enzimático altamente inespecífico capaz de oxidar una amplia gama de contaminantes; b) enzimas constitutivas; c) enzimas oxidativas extracelulares lo que da mayor facilidad de degradación de contaminantes con baja solubilidad en agua; d) distribución y crecimiento de hifas, que da mayor flexibilidad a la colonización y acceso a contaminantes secuestrados en los cuerpos fructíferos; y e) desechos lignocelulósicos como fuente de sustrato o co-sustrato. Por ejemplo, Espinosa-Ortiz *et al.*, (2016) y Cruz-Morató *et al.*, (2013) coinciden que los hongos de pudrición blanca tienen la capacidad de degradar un amplio espectro de estructuras químicas complejas y contaminantes farmacéuticos, tales como: estrógenos, bloqueadores beta, algunos medicamentos antiinflamatorios, antibióticos y otros agentes antimicrobianos que tienden a sufrir una degradación rápida que van de minutos a pocos días. Bajo este contexto se puede deducir que los tratamientos biológicos que emplean sistemas fúngicos podrían ser una opción factible para la

remoción de CE (Mir-Tutusaus *et al.*, 2018). En la Tabla 1 se mencionan las ventajas y desventajas en el uso de sistemas fúngicos para remoción de CE.

Tabla 1 Ventajas y desventajas en el uso de sistemas fúngicos durante remoción de contaminantes emergentes

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ol style="list-style-type: none"> 1. Bioremediación oxidativa aplicada a una amplia variedad de contaminantes químicos presentes en el medio ambiente (Asgher <i>et al.</i>, 2008). 2. Eliminación de MC y contaminantes químicos presentes en suelos y aguas mediante oxidoreductasas consideradas biocatalizadores verdes (Bilal <i>et al.</i>, 2019). 3. Tratamiento biológico a bajo costo, fácil operación y amigable con el medio ambiente para la remoción de contaminantes presentes en el agua sin formación de subproductos de degradación (Naghdi <i>et al.</i>, 2018; Silva <i>et al.</i>, 2019). 4. Contaminantes usados como sustratos y que no se pueden eliminar con microorganismos procariotas (Pointing, 2011). 5. Reproducción constitutiva de enzimas oxidativas que permiten la degradación de MC de baja solubilidad y que suelen conducir a la formación de productos de transformación, los cuales pueden ser tomados como un co-sustrato de asimilación durante la eliminación co-metabólica, reduciendo la necesidad de adaptación en matrices o sitios contaminados (Rodríguez-Rodríguez <i>et al.</i>, 2012; Cruz-Morató <i>et al.</i>, 2012). 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos en aguas residuales municipales e industriales, además, de la gran variabilidad de concentración de nutrientes que existe dentro de una PTAR, pueden afectar el crecimiento de WRF y su capacidad de producción de enzimas (Asif <i>et al.</i>, 2017; Stadlmair <i>et al.</i>, 2018). 2. Consorcios microbianos presentes en aguas crudas y residuales pueden afectar la actividad fúngica al competir por los sustratos disponibles (Naghdi <i>et al.</i>, 2018). 3. Complejo control de condiciones ambientales requeridas para el crecimiento de hongos, como es: la adición y actividad enzimática que depende de parámetros como el pH, la humedad y la temperatura, que no son posibles de controlar <i>in situ</i> (Tomasini & León-Santiesteban, 2019). 4. Los MC conjugados generalmente no se detectan mediante técnicas analíticas actuales, lo que subestima la concentración del contaminante estudiado y la capacidad de eliminación por parte del WRF (Mir-Tutusaus <i>et al.</i>, 2018).

Así, los sistemas fúngicos en el tratamiento de aguas residuales son una opción para remover contaminantes emergentes en especial de tipo farmacéutico, debido al mecanismo enzimático complejo que poseen y su facilidad de degradabilidad en tiempos cortos. Sin embargo, es importante considerar que dentro de las desventajas en este tipo

de sistemas es que están diseñados para efluentes específicos y no de varias matrices como suelen operarse en PTAR, lo cual puede abrir una posibilidad de implementar sistemas así dentro de plantas de tratamiento en hospitales y/o industrias farmacéuticas.

2.5 Tratamientos para remoción de carbamazepina.

En sistemas convencionales, las tasas de eliminación promedio para este MC recalcitrante es inferior al 10% en la mayoría de los casos. El uso de reactores biológicos de membrana (MBR, por sus siglas en inglés) y biológicos secuenciales (SBR, por sus siglas en inglés) tampoco ha sido eficaz para la eliminación de CBZ. De acuerdo con Hai *et al.*, (2011) el tratamiento en MBR llega a alcanzar una eficiencia de eliminación de CBZ aproximadamente del 20% en condiciones anóxicas y aerobias. Mientras que en el caso de los reactores SBR cuyo mecanismo se basa en la actividad nitrificante, no se ha observado biodegradación de la CBZ (Kruglova *et al.*, 2014). Por lo tanto, de acuerdo con la revisión de la literatura, los tratamientos convencionales, que se basan en bioremediación bacteriana de CBZ, no son efectivos.

Por otro lado, se han observado remociones altas (>80%) de CBZ en sistemas de tratamiento fisicoquímicos avanzado. La ozonización se ha utilizado para la reducción de la CBZ, incluso en las condiciones del proceso que generalmente son adoptadas en instalaciones de agua potable (Andreozzi *et al.*, 2002). También se ha estudiado el uso de carbón activado (Yu *et al.*, 2008). Otro método para remover la CBZ es mediante el uso de procesos electroquímicos, cuya eliminación fue superior al 90% (Horovitz *et al.*, 2016). Los tratamientos que emplean el uso de luz ultravioleta (UV) para la eliminación de CBZ han sido exitosos en conjunto con los tratamientos biológicos. De acuerdo con Kosjek *et al.*, (2009) este tren de tratamiento puede eliminar satisfactoriamente el compuesto original y sus subproductos de transformación. Si bien los procesos fisicoquímicos avanzados son efectivos, tienden a tener un mayor impacto ambiental con respecto a los biológicos. Esto por su alto uso de químicos y energía, que a su vez implican mayores costos. En otras ocasiones el tratamiento físico solo lleva al contaminante de un medio a otro.

En la Tabla 2 se presentan diferentes tratamientos con sus respectivos porcentajes de remoción en relación con la CBZ presentados en un estudio realizado por Alvarino *et al.*, (2018). La mayoría de los tratamientos son biológicos y en específico bacterianos, donde

se observan las eficiencias más bajas de degradación. Los mecanismos físicos suelen ser más eficaces en la remoción de la CBZ, como es el caso de la adsorción en carbón activado, con eficiencias de eliminación mayores al 80%.

Tabla 2 Remoción de carbamazepina por distintos tratamientos en PTAR
(Alvarino *et al.*, 2018).

TIPO DE TRATAMIENTO/ CONDICIONES REDOX	EFICIENCIA DE REMOCIÓN
Sorción /Biomasa	<10%
Sorción/Carbón activado	>80%
Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente (RAFA)	<20%
Lodos Activados (CAS)	<20%
MBR – Carbón activado	<20%
Anaerobio + aerobio	<20%
Anóxico + aerobio	20-50%
Anóxico con gránulos	<20%

Incluso, está información se confirma con la que menciona Lee *et al.*, (2022), donde reafirma que un proceso por adsorción que incluya solamente lodos activados tiene una baja eficiencia de eliminación de CBZ que va del 5 al 20%.

Este panorama suele ser desalentador para los tratamientos biológicos bacterianos, ya que el 52.9% de las PTAR que actualmente se encuentran activas en el país solamente operan con la tecnología anteriormente mencionada (SEMARNAT, 2019).

2.6 Métodos biológicos para la biodegradación de carbamazepina.

A continuación, se presenta la Tabla 3 donde se comparan algunos sistemas biológicos empleados en la degradación de este compuesto, así como su porcentaje de remoción.

Tabla 3 Remoción de CBZ con tratamientos biológicos en aguas residuales de origen farmacéutico

Porcentaje de remoción	Concentración inicial (mg/L)	Tiempo de eliminación (días)	Microorganismos y/o sistema empleado	Fuente
BACTERIAS				
30%	10	30	Bacterias (Cultivos en lote)	Bessa <i>et al.</i> , 2017
30%	2.46x10 ⁻⁴	0.7	Bacterias y hongos (Cultivo en lote)	Muter <i>et al.</i> , 2017
46.6%	100	6	<i>Pseudomonas sp.</i> (Cultivos en lote)	Li <i>et al.</i> , 2013
36.9%	710	57	Anóxico/aeróbico	Chtourou <i>et al.</i> , 2018
MICROALGAS				
35%	1	10	<i>C. mexicana</i> (Cultivos en lote)	Xiong <i>et al.</i> , 2016

HONGOS				
99%	1	14	<i>B. adusta</i> (Cultivos en lote)	Rodarte- Morales <i>et al.</i> , 2011
94%	9	6	<i>T. versicolor</i> (Cultivos en lote)	Jelic <i>et al.</i> , 2012
47%	10	7	<i>G. lucidum</i> (Cultivos en lote)	Marco-Urrea <i>et al.</i> , 2009

En resumen, la información anterior fleja que los tratamientos con bacterias no remueven ni el 50% de CBZ, y menos una biorremediación adecuada para la recuperación de cuerpos de agua superficiales contaminados a corto y largo plazo. En cambio, los sistemas fúngicos se notan prometedores para remover compuestos recalcitrantes de este tipo y pueden ser una herramienta importante que pudieran ayudar en la limpieza de aquellos lagunas, lagos, ríos o cuerpos de agua subterráneos que padecen la presencia de este tipo de MC.

Cabe mencionar, que los sistemas fúngicos en sistemas cerrados como son los reactores deben tener controles estrictos, ya que los nutrientes que llegan a ingresar en los efluentes de una PTAR suelen poseer cantidades de nutrientes variados, lo cual alteraría el funcionamiento fúngico debido a que requieren un sustrato homogéneo. Es por ello, que Bulai *et al.*, (2017) recomienda que las concentraciones de estos elementos sean bajas (ppm) y así poder establecer un tratamiento fúngico efectivo. Sin embargo, la remoción de MC depende en parte de la composición química de estos compuestos como es, poseer una mayor parte hidrofóbica en su molécula y tener grupos donadores de electrones, como grupos amino y/o hidroxilo en su estructura molecular (Naghdi *et al.*, 2018), como es el caso de CBZ. Con estas consideraciones el sistema enzimático de los WRF puede desarrollar mayores capacidades degradativas.

3. OBJETIVOS, HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y RELEVANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivo general

Demostrar que *Schizophyllum commune* tiene la capacidad de degradar CBZ.

3.1.2 Objetivos específicos

- I. Comprobar que la presencia de CBZ no influye en la actividad de *S. commune*.
- II. Mostrar la actividad metabólica de *S. commune* en presencia de CBZ utilizando la producción de CO₂ como indicador.
- III. Estimar la degradación de CBZ por *S. commune* en condiciones aerobias como única fuente de carbono.

3.2 Hipótesis

Schizophyllum commune degradará CBZ en condiciones aerobias, debido a su capacidad de utilizar compuestos lignocelulósicos como fuente de sustrato.

3.3 Justificación

En México, el 70% de cuerpos de agua superficiales presentan algún tipo de contaminación debido a las actividades antropogénicas. Tal es el caso de las aguas residuales hospitalarias, cuyos efluentes generan una gran cantidad de compuestos inorgánicos como son los MC, que pueden modificar la flora y fauna acuática debido a la bioacumulación, convirtiéndose en un problema de impacto ambiental.

Las PTAR y sus tratamientos comúnmente usados no son una solución ante este problema. Por tal motivo, encontrar procesos biológicos que favorezcan la biotransformación de MC, es el enfoque de este proyecto. La hipótesis incluye el uso del WRF, *Schizophyllum commune* para la remoción de carbamazepina, considerando que en la revisión bibliográfica reporta que esta cepa tiene capacidades de degradar moléculas complejas.

La comprobación de la hipótesis permitirá ampliar los conocimientos relacionados a los tratamientos biológicos con sistemas fúngicos para aguas residuales con presencia de MC, ya que pueden ser más eficaces que los tratamientos bacterianos y a un costo menor en comparación con los procesos fisicoquímicos. El conocimiento generado en este estudio puede ser una herramienta importante que coadyubaría al rescate de cuerpos de aguas superficiales contaminadas y/o mejorar los tratamientos secundarios dentro de las PTAR.

3.4 Relevancia de la investigación

El propósito de este proyecto es mostrar la capacidad metabólica de *S. commune* para la remoción y biodegradación de CBZ, un contaminante persistente que suele estar presente en cuerpos de agua superficiales o en aguas tratadas.

Shizophyllum commune es una cepa no estudiada en la biodegradación de compuestos de tipo farmacéuticos. Sin embargo, con la literatura revisada esta cepa tiene potencial para degradar compuestos de composición compleja como son ciertos tipos de xenobióticos. Por tal motivo, es importante su estudio y aportación como una posible opción en el tratamiento de aguas residuales hospitalarias con presencia de estos MC que garantizarían la bioremediación de efluentes naturales como son: lagunas, lagos, ríos, mares y océanos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

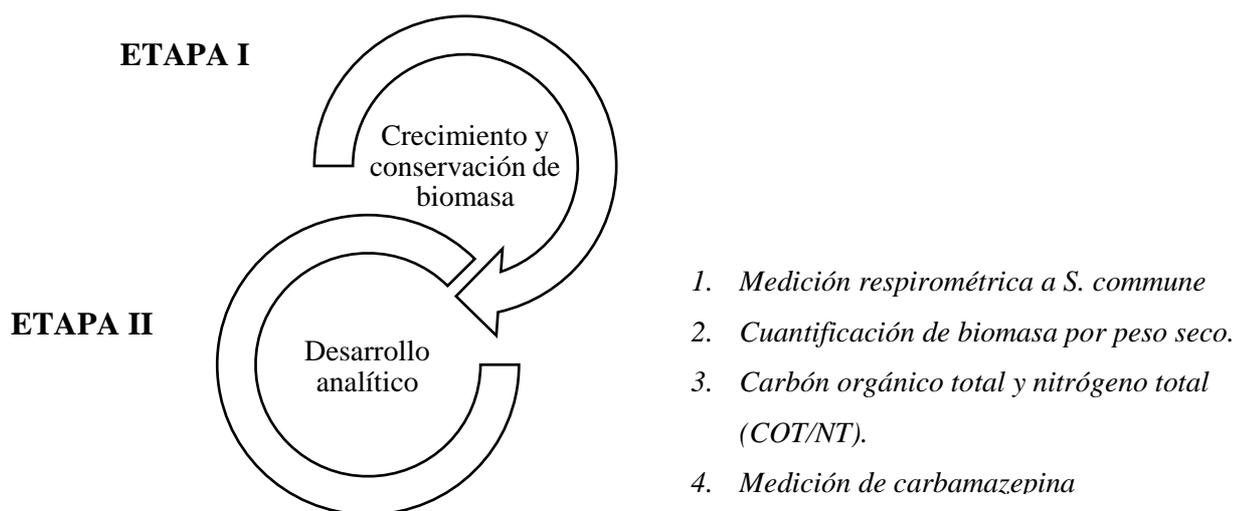


Figura 3 Diagrama metodológico del experimento.

4.1 Crecimiento y conservación de *S. commune*.

S. commune fue una cepa donada por el cepario de la UAM-Iztapalapa y nombrada con anterioridad como T. 33 que se consideraba como *Trametes sp.*, la cual fue archivada y posteriormente reclasificada. La secuenciación del WRF fue realizada en la School of Science de la RMIT University de Australia a cargo del Dr. Arturo Aburto Medina.

La reactivación de *Schizophyllum commune* se realizó a través del resembrado en placas de agar papa dextrosa (PDA) y CBZ a 5ppm (Figura 4) mediante la técnica de picadura (Soto, 2017) con ayuda de un picadientes previamente esterilizado. Las condiciones de incubación fueron 27.5°C durante un período de 7 a 10 días donde se podía observar un crecimiento importante de la cepa. Cada resembrado se desarrolló por triplicado en condiciones estériles.



Figura 4 *S. commune* en PDA con presencia de CBZ a 5ppm.

Posteriormente, la biomasa obtenida fue transferida a un medio de cultivo líquido Kirk (Figura 5), el cual se usa para el crecimiento y desarrollo de cepas fúngicas (Kirk *et al.*, 1986), cuya composición fue: KH_2PO_4 (2.0 g/L), NH_4Cl (0.2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0.075 g/L), elementos traza (4mL/L) (Márquez, 2004) y CBZ con una concentración de 5 mg/L (ver ANEXO II), ajustado a un pH de 4.5, una agitación de 150 rpm a 30°C durante 14 días, aproximadamente (formación de pellets). Para disolver la CBZ, se utilizó un sonicador marca BENSON durante un período de 15 min. Este

procedimiento se realizó para favorecer la solubilidad de CBZ en el medio, además de aclimatar y desarrollar capacidades metabólicas del hongo en presencia del MC.

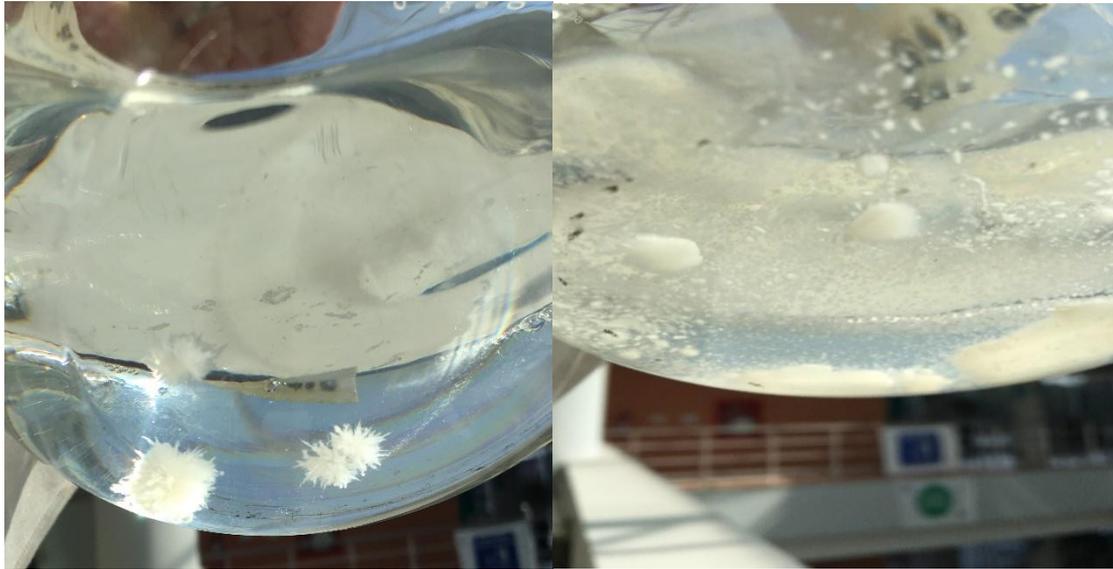


Figura 5 *S. commune* en medio Kirk con CBZ a 5ppm.

4.2 Estudios de biodegradación.

Las pruebas de degradación de CBZ por *S. commune* se realizaron en cultivos en lote (Figura 6), los cuales fueron divididos en tres:

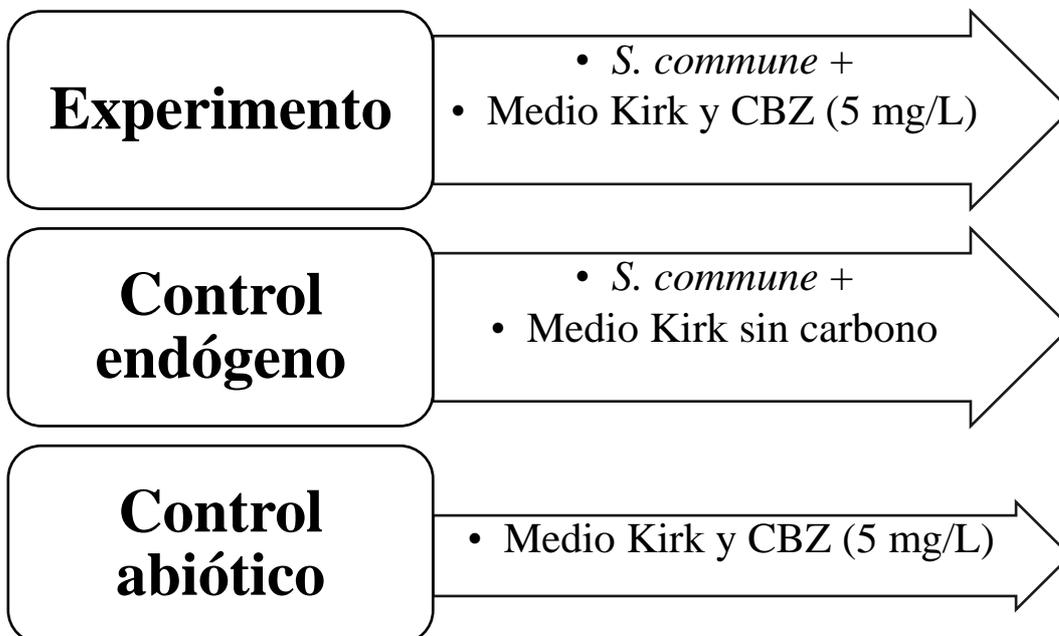


Figura 6 Esquema de los cultivos en lote.

Cada uno se realizó por triplicado, en matraces Erlenmeyer de tapa roscada de 125 mL con un volumen de operación de 30 mL. En el caso del control endógeno y el experimento, la relación p/v fue en promedio del 10% de biomasa inicial aclimatada (matraz madre incubado durante 14 días) y 90% del medio mineral con y sin presencia de CBZ respectivamente.

Finalmente, las condiciones a las que se desarrollaron las pruebas fueron a 150 rpm, 30°C (temperatura idónea para *S. commune* de acuerdo con Asgher *et al.*, 2008 y 2013) y condiciones de oscuridad, ya que la CBZ suele ser fotosensible. La duración total del proceso degradativo fue de 33 días con tres períodos de muestreo sacrificables: 0, 21 y 33 días (etapa inicial, intermedia y final de la incubación), los cuales se eligieron basándose en una prueba previa que se realizó a *S. commune* con una concentración de 10mg/L de CBZ y mayor a la del presente trabajo (ver ANEXO IV). Además, de las limitantes de acceso a la institución derivadas de la restricción pandémica del COVID-19.

4.3 Técnicas analíticas.

4.3.1 Medición respirométrica a *S. commune*.

La actividad de *S. commune* en presencia de CBZ se midió mediante respirometría. La respiración es un proceso donde las poblaciones utilizan sustratos orgánicos como fuente de carbono y energía, lo cual resulta en el consumo de oxígeno y producción de CO₂ para construir nuevo material celular (Maier *et al.*, 2009). La presencia de este gas es un indicador de la actividad biológica.

La respirometría se realizó en lote para cada cultivo, provistos de una válvula Mininert para extraer el CO₂ acumulado del *headspace* (espacio de cabeza). La medición de CO₂ se llevó a cabo con una ayuda de una jeringa cromatográfica, cuyo volumen de inyección fue de 100 µL, el cual se introdujo en un cromatógrafo de gases GOW-MAC con detector de conductividad térmica (TCD por sus siglas en inglés). Las condiciones de operación del equipo fueron: una columna CTR1 (Alltech), helio como gas portador, un inyector, detector y columna que estuvieron a temperaturas de 50°C, 115°C y 50°C, respectivamente.

4.3.2 Cuantificación de biomasa.

La concentración de biomasa se cuantificó mediante la técnica de peso seco. Este procedimiento consistió en concentrar el material celular que se encontraba en el medio líquido por filtración a vacío y a través del filtro de membrana (0.45 μm) previamente llevado a peso constante, el material retenido en el filtro fue secado en una estufa regulada a 50°C (24 a 48 hrs.) y pesado en una balanza analítica (Wang *et al.*, 2003). Esta técnica se usa para medir el crecimiento de hongos (Prescott *et al.*, 2002). La muestra líquida recolectada de la filtración fue utilizada para la medición de COT y NT.

4.3.3 Carbón orgánico total y nitrógeno total (COT/NT).

El COT se describe como aquellas moléculas orgánicas que deben romperse en unidades de carbono simples mediante un procedimiento oxidativo. Estos fragmentos deben ser convertidos en formas moleculares más sencillas como CO_2 de modo que pueda medirse en forma cuantitativa (APHA, 2005).

Para la realización de este experimento y la medición de este parámetro se usó el equipo TOC-L CSH/CSN de Shimadzu modelo Standalone, cuya característica que posee es la capacidad que tiene para oxidar un amplio espectro de moléculas orgánicas, tanto compuestos orgánicos de bajo peso molecular, como compuestos orgánicos insolubles y macromoleculares difíciles de degradar. Siguiendo el método de oxidación catalítica de combustión, el cual se realiza a una temperatura de 680 ° C (ver ANEXO I).

Las muestras se encontraban en estado líquido y previamente filtradas en membranas de un poro de 0.45 μm . Posteriormente, se acidificaron a pH 2 cuya finalidad es evitar interferencias de especies con carbono inorgánico (CI) provenientes de carbonatos, bicarbonatos y el CO_2 disuelto e inhibir el crecimiento de microorganismos.

En el caso del NT, el equipo Shimadzu TOC-L cuenta con un módulo que convierte los compuestos nitrogenados en N_2O (óxido nitroso) a 720 °C (ver ANEXO I). En ocasiones, cuando las muestras superan los 500 mg/L de N, el instrumento diluye automáticamente picos fuera de escala, lo que facilita su cuantificación. El tiempo total de análisis, por inyección, fue de 2 a 5 minutos. La concentración menor de detección fue de 0.05 mg/L de N. Para las muestras del proyecto, se tenía una concentración teórica de 53.52 mg/L de N.

4.3.4 Extracción y cuantificación de carbamazepina.

La medición y cuantificación de CBZ, fue realizada en el Laboratorio de Química Orgánica Ambiental de la ENCB perteneciente al Instituto Politécnico Nacional (IPN) mediante extracción en fase sólida y análisis con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés).

Para la disolución total y extracción de las muestras: experimento y control abiótico (triplicado) se realizó mediante, el uso de un cartucho Oasis HLB (Oasis HLB 6 cc Vac Cartridge, 200 mg Sorbent per Cartridge, 30 μ m, 30/pk) de fase reversa. El cartucho poseía un adsorbente universal de copolímero cuyo intervalo de pH abarcaba los valores que iban de 0 a 14 (Martínez - Garay, 2013; Mowafy *et al.*, 2012).

El método desarrollado a cargo del laboratorio anteriormente mencionado fue enfocado en la separación de la CBZ por HPLC a través de un sistema Bruker Daltonics Elute LC HPLC 1260 con columna cromatográfica Bruker Intensity Solo HPLC Column, C18, 3.2x100 (BRHSC18032100). Se utilizó un detector DAD-UV a una longitud de onda de 285 nm con una fase móvil compuesta por metanol : acetonitrilo (MET:ACN), ambos de pureza grado HPLC en proporción 70:30, un flujo de 1.0 mL/min y temperatura inicial y final de 25°C. El límite de detección fue de 1 μ g/L y el de cuantificación 2.5 μ g/L. Tal método analítico resultó lineal para el intervalo de concentraciones encontradas en el estudio.

La curva de calibración se realizó en un intervalo de concentraciones que iban de los 2.5 a 10 000 μ g/L con una $R^2 = 0.999$. Finalmente, el tiempo de retención obtenido para la detección de la CBZ tanto para el experimento como para el control abiótico, fue alrededor de los 3.79 ± 0.0 min.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los experimentos de *S. commune* en presencia de CBZ.

5.1 Degradación de carbamazepina por *S. commune*.

Los resultados mostraron que el hongo *S. commune* pudo degradar a la CBZ sin la necesidad de otra fuente de carbono, como se discute a continuación.

La Figura 7 muestra el consumo de CBZ por parte de *Schizophyllum commune* al día 0, 21 y 33, período de muestreo seleccionado por estudios previos realizados a una concentración de 10 ppm del mismo MC (ver ANEXO IV). El porcentaje de remoción total alcanzado fue de un $25.08 \pm 0.42\%$ en 33 días de cultivo y una tasa de degradación de 0.004 mg CBZ/d; lo que mostró una adaptabilidad al consumo de este contaminante por parte de la cepa.

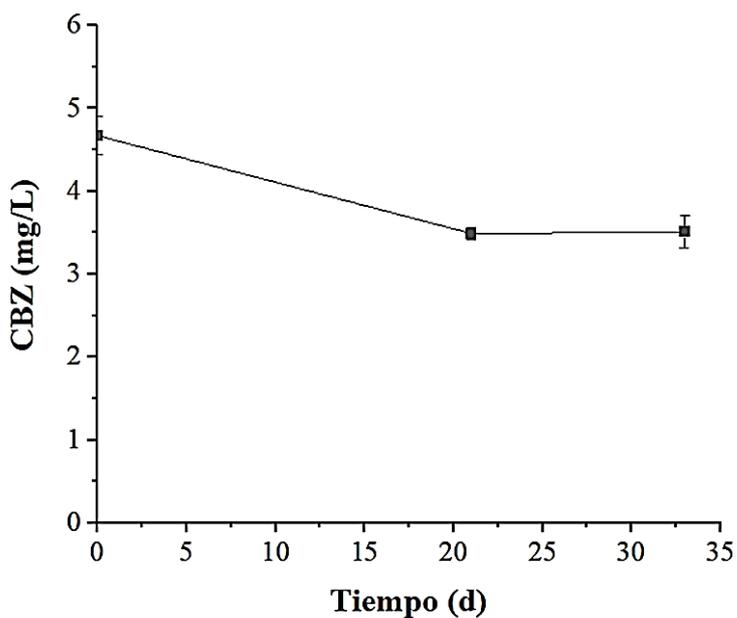


Figura 7 Perfil de degradación de CBZ por *S. commune*.

Se realizó un control abiótico, con la finalidad de descartar una posible degradación no asociada a la actividad biológica. En la Figura 8 se puede observar que para el día 33 del experimento abiótico no hubo una diferencia significativa con respecto a la concentración inicial. Por lo que estos resultados confirman que la degradación de la CBZ presentada en la Figura 7 está asociada principalmente al proceso biológico.

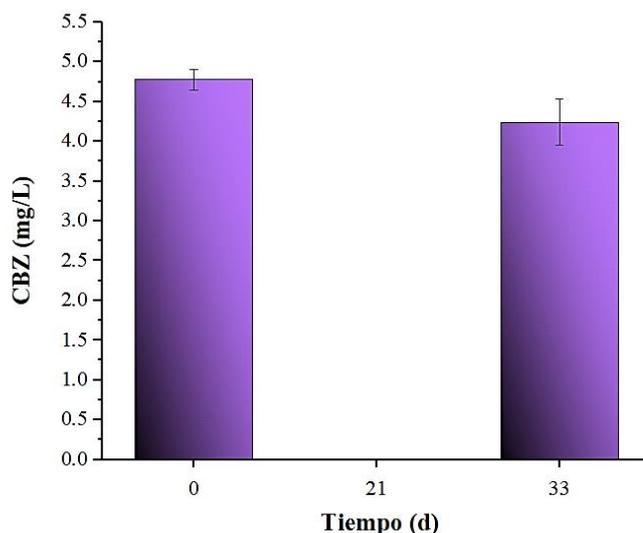


Figura 8 Comportamiento del control abiótico a lo largo de la cinética.

Considerando la complejidad de la biodegradación del MC, se realizó un compendio que muestra un comparativo de estudios con otras especies de WRF en la degradación de CBZ (Tabla 5). Estos estudios fueron seleccionados por algunas de las similitudes operativas que tuvieron relación con la presente investigación.

Los resultados obtenidos indicaron que la optimización de un proceso de degradación dependerá de qué tan rápido un MC se eliminará de un sistema, es decir, tener tasas de degradación altas. Por ejemplo, *Trametes versicolor* tuvo una tasa de 0.075 mgCBZ/d para remover 9 mgCBZ/L en un período de 6 días. En cambio, *P. chrysosporium* o *B. adusta* tuvieron tasas de 0.001 mgCBZ/d que son inferiores en comparación a las obtenidas en el presente trabajo o, *U. ramanniana* que fue de 0.004 mgCBZ/d, es decir, para degradar 1mg/L de CBZ el proceso llega a tardar 14 días para *P. chrysosporium* o *B. adusta*, por consecuencia, la eliminación del MC será más lenta.

Tener una tasa de remoción semejante a la de *Trametes versicolor* puede relacionarse al grupo de enzimas selectivas producidas para degradar algún MC. En especial, aquellas enzimas no asociadas a la degradación de la lignina. Por otra parte, tener tasas de remoción parecidas a *P. chrysosporium* o *B. adusta*, indican que las enzimas de degradación de lignina presentes en los hongos de pudrición blanca no suelen ser efectivas en ocasiones para degradar CBZ (Zhang *et al.*, 2012). Esto resultados indicaron que los tiempos de duración de la cinética y el porcentaje de remoción de la CBZ varían con respecto al tipo de hongo y las condiciones de cultivo.

Tabla 5 Comparativa del desempeño de diferentes tipos de hongos en la degradación de CBZ

Microorganismo	Concentración inicial (mg/L)	Condiciones del experimento	Tiempo de cultivo (d)	Porcentaje de remoción	Tasa de degradación (mgCBZ/d)	Fuente
<i>P. chrysosporium</i>	1	30°C Sin agitación Medio Kirk Cultivo en lote	14	23 – 57%	0.001	Rodarte-Morales <i>et al.</i> , 2011
<i>T. versicolor</i>	9	25°C, 135 rpm pH 4.5 Medio Kirk Cultivo en lote	6	94%	0.075	Jelic <i>et al.</i> , 2012
<i>G. lucidum</i>	10	25°C, 135 rpm pH 4.50 Medio Kirk (8 _{glucosa} /L) Cultivo en lote	7	47%	0.0143	Marco-Urrea <i>et al.</i> , 2009
<i>P. chrysosporium</i>	5	30°C pH 7.5 Agua residual municipal Cultivo continuo (Biorreactor de placas)	100	60-80%	0.1	Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>U. ramanniana</i>	≈ 1	28°C, 200 rpm Caldo papa dextrosa Cultivo en lote	25	25%	0.004	Kang <i>et al.</i> , 2008
<i>B. adusta</i>	1	30°C Sin agitación Medio Kirk Tratamiento en lote	14	99%	0.001	Rodarte-Morales <i>et al.</i> , 2011
<i>S. commune</i>	5	30°C, 130 rpm pH 4.5 Medio Kirk Cultivo en lote	33	25%	0.004	Presente estudio

En el presente trabajo, la degradación limitada de CBZ puede relacionarse a que las enzimas internas o extracelulares pudieron haberse inhibido o bien, que no eran efectivas

para este tipo de contaminante (Maier *et al.*, 2009). Por ejemplo, Nasir *et al.*, (2017) menciona un listado de enzimas que son participes en la degradación de CBZ, las cuales son: citocromo P450, peroxidasa de manganeso, peroxidasa versátil, lacasa y lignina peroxidasa que pueden llegar a inhabilitarse en presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos que interfieren en el crecimiento y capacidad de secreción enzimática en WRF (Asif *et al.*, 2017).

Otro posible escenario, es que el hongo no tiene la capacidad enzimática para degradar los subproductos o intermediarios que se producen durante la degradación de la CBZ, como son: CBZE, 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina (CBZD), acridina y acridona (Jelic *et al.*, 2012) que pueden ser más tóxicos que la molécula original, o la existencia de un desbalanceo de nutrientes en el medio de cultivo para la degradación de un contaminante complejo. Por tal motivo, se sugiere la realización de un análisis mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS por sus siglas en inglés) (Daniele *et al.*, 2017) que identifique los subproductos de CBZ durante el proceso degradativo. Además, de un estudio metabolómico microbiano (Li *et al.*, 2020) que permita profundizar el mecanismo degradativo del hongo sobre el contaminante problema.

En otros trabajos se ha estudiado a *S. commune* por sus potenciales capacidades metabólicas en la degradación de contaminantes complejos, como es el caso de los colorantes. Algunos de los estudios realizados con esta misma cepa aplicados a la eliminación de colorantes textiles como el amarillo R-dorado y el rojo brillante 80, tuvieron tiempos de degradación relativamente cortos. Por ejemplo, la remoción del primer colorante fue de 73% en 6 días (eliminación total con adición de glucosa) y 84.8% de decoloración en 7 días, para el segundo colorante (Asgher *et al.*, 2008; *et al.*, 2013). Sin embargo, estos porcentajes solo reportan la desaparición del color y no la degradación completa de la molécula. Este tipo de compuestos llamados colorantes azo, se caracterizan por la presencia de uno o más grupos azo o cromóforos -N=N- en su molécula (Allen, 1971). La eliminación de un tinte se obtiene cuando se rompen los enlaces azoicos del colorante respectivo y producen productos decolorados (Pereira, 2001). Por tal motivo, es posible que los subproductos del colorante siguen presentes en este procedimiento, sin someterlo a una biodegradación total.

5.2 Evolución del carbono orgánico total (COT).

El consumo de COT soluble por parte de *S. commune* en presencia de CBZ se muestra en la Figura 9, dónde se presenta el perfil del COT en los experimentos y en el control endógeno evaluados durante 33 días de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron que *S. commune* presentó un comportamiento inverso a lo esperado, ya que el perfil que se deseaba era una disminución del COT. En ambos estudios se puede observar que hubo un incremento del COT para el día 21, aunque hubo una reducción neta para el final del experimento.

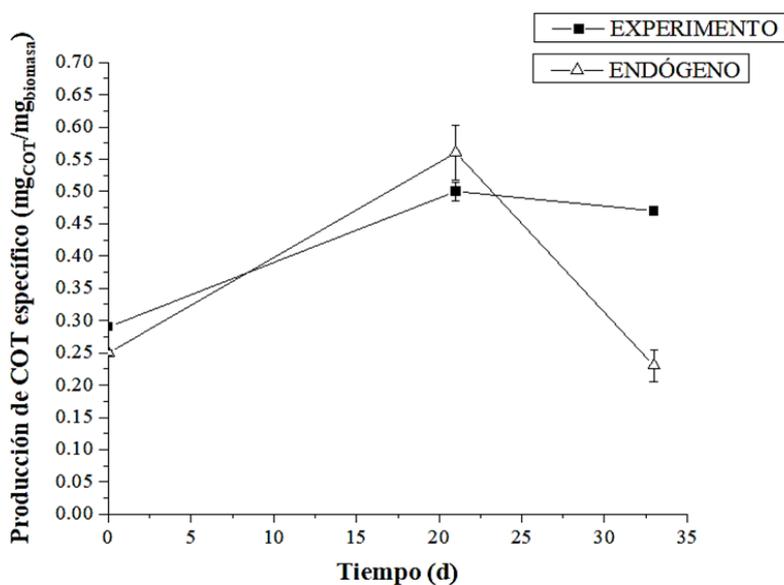


Figura 9 Perfil de COT durante la actividad de *S. commune*.

Durante el día 21 de la cinética, se observó una degradación importante de la CBZ (Figura 7), el cual se relaciona a la vez con el incremento del COT específico, aproximadamente del 42% para el caso del cultivo alimentado con CBZ, mientras, que, una tendencia similar se observó también en el perfil para el estudio endógeno. Cabe mencionar, que no se observó un crecimiento significativo del hongo en ambos estudios, por lo que la liberación de materia orgánica podría estar asociado al proceso netamente catabólico. En este caso se podría plantear el siguiente escenario, que, a pesar de presentar la misma tendencia, podría haber un proceso adaptativo diferente en ambos estudios, uno debido a la presencia de la CBZ, y el otro debido a la falta de una fuente de carbono y energía externa. Por ejemplo, el hongo *S. commune* presenta la característica metabólica de liberar material enzimático para desdoblar compuestos orgánicos complejos, como es el caso de

la lignina. Este material enzimático podría estar asociado con la medición e incremento del COT.

Un ejemplo cuando ocurre pérdida extensa de carbohidratos por acción de WRF, lo explica Peralta *et al.*, (2017) con el compuesto de la lignina, ya que la presencia de polisacáridos estructurales se da después de la escisión oxidativa del compuesto, producto de la acción enzimática con el uso de este tipo de hongos. Tal comportamiento, puede estar relacionado con este proyecto, ya que la CBZ es una molécula con compuestos de carbono cuya degradación es en presencia de este tipo de microorganismos.

Los carbohidratos producidos suelen ser producto de fenoles relacionados con ácidos grasos presentes en las hifas del micelio (Jelic *et al.*, 2012). En algunas ocasiones, la producción prominente de metabolitos también puede ser factor en la producción de compuestos de carbono disueltos, tal y como ocurrió en el estudio realizado por Kang *et al.* (2008). Este fenómeno pudo haberse presentado en el momento en que *S. commune* desdobló la molécula de la CBZ (Figura 7) y por consecuencia, produjo moléculas más pequeñas, es decir, intermediarios.

Después del día 21, el cultivo endógeno disminuyó el COT, debido a que este material orgánico es posiblemente biodegradable (lisis celular). Para el caso del experimento, este mostró una mínima degradación del 5.93% en forma de COT a partir del mismo día, y esto podría atribuirse a que la presencia de la CBZ o sus intermediarios inhibieron el metabolismo catabólico. Finalmente, la medición de COT en este proyecto no mostró una respuesta directa sobre la biodegradación de la CBZ, pero si puede sugerir la complejidad del metabolismo del hongo en la degradación de contaminantes con moléculas complejas.

5.3 Nitrógeno total (NT).

Los perfiles obtenidos para la medición de NT se muestran en la Figura 10, los cuales provenían de los sustratos nitrogenados que componían el medio mineral en el que se estudió a *Schizophyllum commune*. Los resultados ilustran lo anteriormente mencionado, que no existió consumo significativo de nitrógeno por parte de la cepa en presencia de CBZ. En cambio, para el control endógeno la concentración inicial fue mayor, pero sin cambios en su consumo.

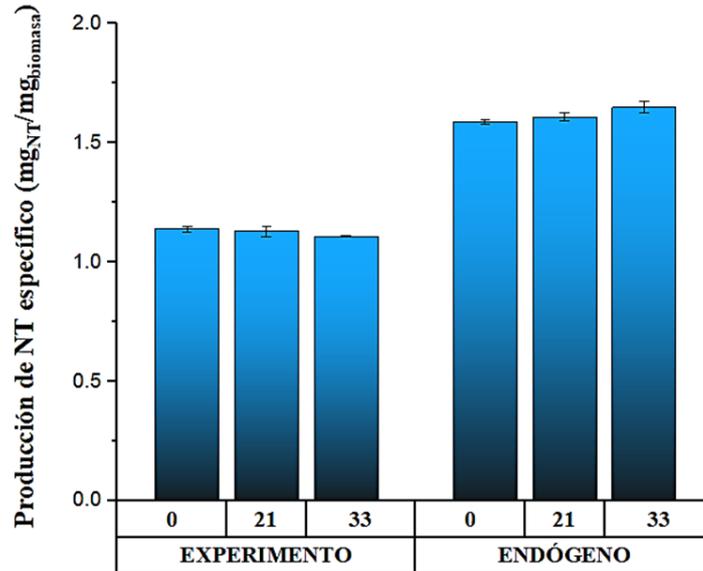


Figura 10. Perfil específico de NT durante la actividad de *S. commune*.

El perfil de nitrógeno del experimento no mostró un cambio significativo, tanto en el experimento como en el control endógeno. Una posibilidad de que las fuentes nitrogenadas no fueron consumidas por parte de *S. commune*, se debió a que la relación 1:14 (C:N) en este estudio fue excedida en comparación con otros estudios que indican que la óptima para WRF es 10:1 (Gao *et al.*, 2007), la cual le permite a la cepa un aumento en la actividad y eficiencia del crecimiento celular (Di Lonardo *et al.*, 2020). La relación desbalanceada en este proyecto se consideró así, simulando la variabilidad de nutrientes que llegan a tener las aguas residuales. Por otra parte, tener un excedente de nitrógeno es causa de inhibición en la inducción de producción enzimática (Asgher *et al.*, 2008). Sin embargo, por la carente investigación que se tiene de *Schizophyllum commune* con la degradación de compuestos farmacéuticos, no hay suficiente información para identificar las enzimas específicas que permitan seguir la degradación completa del compuesto.

5.4 Crecimiento microbiano.

La Figura 11 muestra el perfil de crecimiento que tuvo *Schizophyllum commune* durante la cinética tanto para el experimento como para el control endógeno, en los cuales no se observan efectos inhibitorios durante el crecimiento debido a la presencia de CBZ.

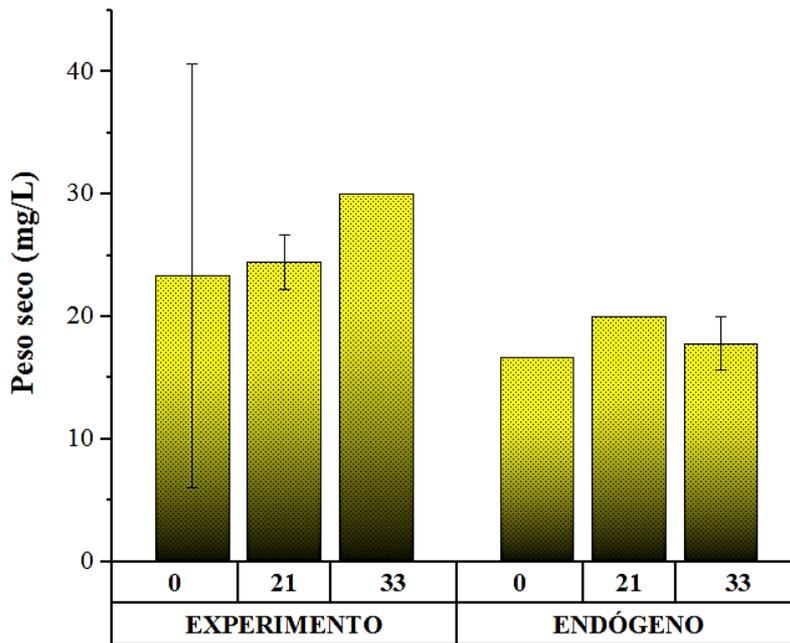


Figura 11 Perfil de crecimiento de *S. commune*.

La concentración final de *S. commune* fue de 30 ± 0.0 mg/L para el experimento y 17.78 ± 2.18 mg/L para el control endógeno, lo que indica un crecimiento por parte de la cepa en presencia de CBZ como única fuente de carbono y la cual aportó energía necesaria al microorganismo (Schlegel & Zaborosch, 1993). Sin embargo, el crecimiento nulo de *S. commune* presente entre el día 0 y 33 en el experimento, se puede relacionar a que no hubo un consumo de nitrógeno (Figura 10), el cual se considera un nutriente indispensable para las rutas anabólicas comúnmente llevadas a cabo en los microorganismos. Además, del desbalance C:N (1:14), donde la baja concentración de carbono se debió a que la CBZ fue la única fuente de carbono para el WRF y a una concentración parecida a la que se llegan a encontrar los MC en el medio ambiente.

La variación o error estándar del inóculo microbiano que se observa al inicio de la cinética se relaciona con la heterogeneidad de la biomasa que tiende a formar gránulos y por consecuencia, su manejo y cuantificación es compleja.

5.5 Actividad microbiana por respirometría.

La actividad de *S. commune* por respirometría se detectó al inicio de las pruebas en el experimento con una cantidad de CO₂ en el espacio de cabeza, esto se debió a que no se realizó ningún cambio de atmósferas. Posteriormente, el incremento en la producción de

CO₂ el cual estaría asociado al consumo de CBZ (Figura 7) comprendió del día 0 al día 7, lo que estaría indicando la mineralización del contaminante objetivo (Mancera – López *et al.*, 2008). La degradación continuó del día 7 hasta el día 20, sin embargo, después del séptimo día la producción de CO₂ presentó un decremento del 41%, manteniéndose el perfil sin cambios hasta el final de la cinética (ver ANEXO III). Cabe mencionar, que el consumo de la CBZ puede seguir dos vías principalmente, el catabolismo y el anabolismo, no obstante, en el presente trabajo no se observó crecimiento del hongo, lo que indica que el consumo de la CBZ se mineralizó a CO₂. Sin embargo, el decremento de CO₂ después del día 7, sugiere que el CO₂ se pudo ir perdiendo debido a una fuga de gas en los cultivos en lote.

Por parte del control endógeno al día 0 se contaba con una concentración inicial de CO₂, que no varió significativamente en el transcurso del cultivo, lo que indicó que no hubo una producción de CO₂, pero tampoco un decaimiento que hubiera indicado una posible muerte de la cepa, lo cual también indica que *Schizophyllum commune* tiene la capacidad de sobrevivencia a ambientes hostiles como es la limitación de nutrientes (Sheridan *et al.*, 2015). Este control mostró claramente que la producción de CO₂ en el experimento se asoció a la degradación de la CBZ.

Para el control abiótico, no se observó producción de CO₂ debido a que este cultivo en lote estuvo en presencia solamente de CBZ sin ningún factor biótico que pudiese oxidar el compuesto objetivo.

En conclusión, las mediciones del dióxido de carbono sugieren que el hongo *S. commune* tiene la capacidad metabólica para mineralizar la CBZ, así como la correlación que existe con la degradación total obtenida del fármaco. Por tal motivo, esta investigación aporta un hallazgo novedoso con el uso de esta cepa y su relación con la degradación del fármaco como MC.

5.6 Balance de materia.

El siguiente balance de masa resume la biotransformación de la CBZ en forma de carbono, el cual se expresa en la siguiente ecuación:

Ecuación 1

$$C_{CBZ \text{ en matriz de agua}} = C_{CBZresid} + C_{CO_2} + C_{biomadic}$$

dónde:

C_{CBZ} = Carbono de CBZ inicial en el tratamiento en lote (Entrada).

y a la salida del sistema es:

$C_{CBZresid}$ = Carbono de CBZ no degradada al final del experimento.

C_{CO_2} = Carbono de CBZ degradada y mineralizada como CO_2 .

$C_{biomadic}$ = Carbono de CBZ que se asimiló y produjo biomasa adicional de *S. commune*.

El objetivo del siguiente balance fue comparar la concentración de carbono obtenida a la entrada y a la salida del sistema (día 0 y día 33). El desglosé de la Ecuación 1 se reporta con base a los resultados reportados en las secciones anteriores y relaciones estequiométricas correspondientes.

Solo como mg C:

$$0.11mgC_{CBZ} = 0.08 mgC_{CBZresid} + 0 mgC_{CO_2} + 0.095 mgC_{biomasa}$$

Por lo tanto:

$$0.11mgC_{CBZ} = 0.175 mgC$$

Por tal motivo, se observa que existe un desbalance de carbono en ambos días. El carbono de dióxido de carbono (C- CO_2) disminuyó (-0.02 mg C- CO_2) de tal manera que se desprecia en la Ecuación 1, esto posiblemente se deba a la baja sensibilidad en la técnica de respirometría llevada a cabo en este estudio. Sin embargo, la ecuación resulta estar ligeramente desbalanceada a la salida del sistema por el excedente de carbono proviene ligeramente de la biomasa. Este C-biomasa superior puede deberse al limitado manejo homogéneo que se tuvo en el inóculo al inicio de la cinética. La problemática de la homogenización de inóculos provenientes de pellets, gránulos u otro tipo de aglomeraciones de células, al momento de realizar un estudio degradativo en un medio

líquido como es el caso de este trabajo, es observado en diversos trabajos y diversas especies (Swamy & Ramsay, 1999; Asgher *et al.*, 2013).

El carbono de CBZ residual representa el 72.72% de carbono inicial, lo cual indica que pudo provenir de otras fuentes como pudieron haber sido metabolitos producidos por el mismo MC.

6. CONCLUSIONES

El WRF, *Schizophyllum commune* logró una remoción de CBZ del $25.08 \pm 0.42\%$. Por tal motivo, se comprobó la hipótesis planteada y se demostró que esta cepa sin reportes previos sobre la degradación de algún compuesto farmacéutico tiene capacidades degradativas de CBZ. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para mejorar la remoción.

De esta manera, el uso de sistemas fúngicos para un sistema biológico de una PTAR sigue considerándose una buena opción para la eliminación de MC tanto en aguas residuales como tratadas, de los cuales se obtendrían mayor calidad en este tipo de aguas y por consecuencia, que no dañen el medio ambiente y al ser humano.

7. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Para mejorar la limitada degradación que se obtuvo en el presente trabajo, se requieren estudios que permitan entender los mecanismos y condiciones bajo las cuales *Schizophyllum commune* lleva a cabo este proceso. Por ejemplo, análisis que permitan identificar las enzimas involucradas o la adición de cosustratos que pudieran potenciar la actividad microbiana. De igual manera, el identificar y cuantificar los tipos de metabolitos producidos de las rupturas de enlaces del MC problema por acción de la enzima selectiva que actúe sobre ellos, permitiría saber si esos subproductos pueden seguir siendo degradables o tóxicos para la cepa de estudio. Desde el punto de vista experimental, se podrían implementar experimentos más largos que permitan tener un mayor número de muestreos, así como repeticiones de estos.

8. REFERENCIAS

- Ahmed, I., Iqbal, H. M., & Dhama, K. (2017). Enzyme-based biodegradation of hazardous pollutants: An overview. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 402-411.
- Akpor, O. B., Otohinoyi, D. A., Olaolu, T. D., & Aderiye, B. I. (2014). Pollutants in wastewater effluents: impacts and remediation processes. *International Journal of Environmental Research and Earth Science*, 050-059.
- Allen, R. L. (1971). The chemistry of azo dyes. En R. L. Allen, *Colour Chemistry* (págs. 21–36). Boston: Springer.
- Alvarino T., S. S. (2018). Understanding the sorption and biotransformation of organic micropollutants in innovative biological wastewater treatment technologies. *Science of the Total Environment*, 297-306.
- Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G., & Pollio, A. (2002). Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research*, 2869–2877.
- APHA. (2005). 5310 Total Organic Carbon. En A. P. Federation, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition*. (págs. 1-9). Washington, DC.
- Asgher, M., Bhatti, H. N., Ashraf, M., Legge, & L., R. (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, 771–783.
- Asgher, M., Kausar, S., Batthi, H., Shah, S., & Ali, M. (2008). Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 189-193.
- Asgher, M., Yasmeen, Q., & Iqbal, H. (2013). Enhanced decolorization of Solar brilliant red 80 textile dye by an indigenous white rot fungus *Schizophyllum commune* IBL-06. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 347–352.
- Asgher, M., Yasmeen, Q., Muhammad, H., & Iqbal, N. (2013). Enhanced decolorization of Solar brilliant red 80 textile dye by an indigenous white rot fungus *Schizophyllum commune* IBL-06. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 347-352.

-
- Asif, M. B., Hai, F. I., Hou, J., Price, W. E., & Nghiem, L. D. (2017). Impact of wastewater derived dissolved interfering compounds on growth, enzymatic activity and trace organic contaminant removal of white rot fungi: A critical review. *Journal of Environmental Management*, 89-109.
- Becerril Bravo, J. E. (2009). Contaminantes emergentes en el agua. *Revista Digital Universitaria*, 1-7.
- Bendz, D., Paxéus, N. A., Ginn, T. R., & Loge, F. J. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: H`oje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*, 195–204.
- Bessa, V., Moreira, I., Tiritan, M., & Castro, P. (2017). Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 135-142.
- Bilal, M., Adeel, M., Rasheed, T., Zhao, Y., & Iqbal, H. M. (2019). Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. *Environment International*, 336-353.
- Bulai, I. M., Spina, F., Varese, G. C., & Venturino, E. (2017). Wastewater bioremediation using white rot fungi: Validation of a dynamical system with real data obtained in laboratory. *Mathematical Methods in the Applied Sciences*, 4195–4207.
- Chtourou, M., Mallek, M., Dalmau, M., Mamo, J., Santos-Clotas, E., Ben Salah, A., . . . Monclús, H. (2018). Triclosan, carbamazepine and caffeine removal by activated sludge system focusing on membrane bioreactor. *Process Safety and Environment Protection*.
- Clara, M., Strenn, B., & Kreuzinger, N. (2004). Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Research*, 947–954.
- Cruz-Morató, C., Rodríguez-Rodríguez, C., Marco-Urrea, E., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T., . . . Barceló, D. (2013). Biodegradation of Pharmaceuticals by Fungi and Metabolites Identification. *Emerging Organic Contaminants in Sludges*, 165-213.

-
- Cunningham, V. L., Perino, C., D'Aco, V. J., Hartmann, A., & Bechter, R. (2010). Human health risk assessment of carbamazepine in surface waters of North America and Europe. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 343–351.
- Daniele, G., Fieu, M., Joachim, S., Bado-Nilles, A., Beaudouin, R., Baudoin, P., . . . Vulliet, E. (2017). Determination of carbamazepine and 12 degradation products in various compartments of an outdoor aquatic mesocosm by reliable analytical methods based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, 16893–16904.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., & Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 442– 448.
- Di Lonardo, D. P. (2020). Effect of nitrogen on fungal growth efficiency. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 433-437.
- Espinosa-Ortiz, E. J., Rene, E. R., Pakshirajan, K., van Hullebusch, E. D., & Lens, P. N. (2016). Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: applications and perspectives. *Chemical Engineering Journal*, 553–571.
- Gao, L., Sun, M. H., Liu, X. Z., & Che, Y. S. (2007). Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological research III*, 87-92.
- Garcia-Becerra, F. Y. (2018). Biodegradation of Emerging Organic Micropollutants in Nonconventional Biological Wastewater Treatment: A Critical Review. *Environmental engineering science*, 1-25.
- Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., & Gutiérrez, O. D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*, 52-73.
- Hai, F. I., Li, X., Price, W. E., & Nghiem, L. D. (2011). Removal of carbamazepine and sulfamethoxazole by MBR under anoxic and aerobic conditions. *Bioresource Technology*, 10386–10390.
- Hernández-Salazar, A. M.-S.-H. (2017). Tratamiento de aguas residuales industriales en México: Una aproximación a su situación actual y retos por atender. *Revista Internacional de Desarrollo Regional Sustentable*, 75 - 78.

-
- Horovitz, I., Avisar, D., Baker, M. A., Grilli, R., Lozzi, L., Di Camillo, D., & Mamane, H. (2016). Carbamazepine degradation using a N-doped TiO₂ coated photocatalytic membrane reactor: Influence of physical parameters. *Journal of Hazardous Materials*, 98–107.
- IANAS. (2019). *Calidad del Agua en las Américas: Riesgos y Oportunidades*. México: UNESCO Open Access.
- INEGI. (2023). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DEL AGUA*. Ciudad de México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía, (INEGI).
- Jelic, A., Cruz-Morato, C., Marco-Urrea, E., Sarra, M., Perez, S., Vicent, T., . . . Barcelo, D. (2012). Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *water r e s e a r c h*, 955 - 964.
- Kang, S.-I., Kang, S.-Y., & Hur, H.-G. (2008). Identification of fungal metabolites of anticonvulsant drug carbamazepine. *Environmental biotechnology*, 663–669.
- Kirk, T. K. (1986). Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. Mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol β -aryl ether substructure of lignin. *Biochemical Journal*, 279-287.
- Kosjek, T., Andersen, H. R., Kompare, B., Ledin, A., & Heath, E. (2009). Fate of Carbamazepine during Water Treatment. *Environmental science & technology*, 6256–6261.
- Kruglova, A., Ahlgren, P., Korhonen, N., Rantanen, P., Mikola, A., & Vahala, R. (2014). Biodegradation of ibuprofen, diclofenac and carbamazepine in nitrifying activated sludge under 12 °C temperature conditions. *Science of the Total Environment*, 394–401.
- Kumar, N. S., & Min, K. (2011). Phenolic compounds biosorption onto *Schizophyllum commune* fungus: FTIR analysis, kinetics and adsorption isotherms modeling. *Chemical Engineering Journal*, 562-571.
- Kümmerer, K. (2011). Emerging Contaminants. En K. Kümmerer, *Treatise on Water Science* (págs. 69-87). Oxford: Elsevier.

-
- Lee, Y.-Y., Fan, C., Haque, & Fatima. (2022). Hybrid combination of advanced oxidation and biological processes for the micropollutant removal of carbamazepine. *Clean water*, 1-13.
- Li, A., Rui, C., Cui, D., Qiu, T., & Pang, C. (2013). Characterization and biodegradation kinetics of a new cold-adapted. *Journal of environmental sciences*, 2281–2290.
- Li, Q., Liu, J., & Gadd, G. M. (2020). Fungal bioremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and toxic metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 8999–9008.
- Li, W. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution*, 193-201.
- Maier, R. M., Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (2009). *Environmental Microbiology Second Edition*. Oxford: Academic Press.
- Mancera-López, M., Esparza-García, F., Rodríguez-Vázquez, R., Saucedo-Castañeda, G., & Barrera-Cortés, J. (2008). Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 151–160.
- Mandhatri, S., & Gorawala, P. (2018). Ecological Adaptations of White-Rot Fungi: A Solution to Human Caused Problems? En P. Gorawala, & S. & Mandhatri, *Agricultural research updates* (págs. 1- 269). New York: Nova Science Publishers.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., & Caminal, G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 765–772.
- Márquez-Ortega, A. (2004). *Determinación de patrones de inducción de lacasas en el hongo Trametes sp. EUMI*. México: UAM.
- Martinez-Garay, A. Y. (2013). *Cuantificación de carbamazepina en efluentes hospitalarios por CLAR y determinación de la cinética de degradación*. Toluca: UAEM.
- Meyer, W. R. (2016). Measured and predicted environmental concentrations of carbamazepine, diclofenac, and metoprolol in small and medium rivers in northern Germany. *Environ Monit Assess*, 188-487.

-
- Mir-Tutusaus, J. A., Bacchar, R., Caminal, G., & Sarrà, M. (2018). Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. *Water Research*, 137-151.
- Mir-Tutusaus, J. A., Parladé, E., Villagrasa, M., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., Martínez-Alonso, M., . . . Caminal, G. (2019). Long-term continuous treatment of non-sterile real hospital wastewater by *Trametes versicolor*. *Journal of Biological Engineering*, 1-13.
- Mowafy, H. A., Alanazi, F., & El Maghraby, G. (2012). Development and validation of an HPLC–UV method for the quantification of carbamazepine in rabbit plasma. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29-34.
- Muter, O., Perkons, I., Selga, T., Berzins, A., Gudra, D., Radovica-Spalvina, I., . . . Bartkevics, V. (2017). Removal of pharmaceuticals from municipal wastewaters at laboratory scale by treatment with activated sludge and biostimulation. *Science of the Total Environment*.
- Naghdi, M., Taheran, M., Brar, S. K., Kermanshahi-pour, A., Verma, M., & Surampalli, R. (2018). Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. *Environmental Pollution*, 190-213.
- Nasir, N. M., Talib, S. A., Hashim, S. N., & Tay, C. C. (2017). Biodegradation of carbamazepine using fungi and bacteria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 124-146.
- Novotný, C., Erbanová, P., Cajthml, T., Rothschild, N., Dosoretz, C., & Sasek, V. (2000). *Irpelex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 850-853.
- Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T., & Oehlmann, J. (2005). Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates. Part I. The Antiepileptic Drug Carbamazepine. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, 353–361.
- Olicón-Hernández, D. R., González-López, J., & Aranda, E. (2017). Overview on the Biochemical Potential of Filamentous Fungi to Degrade Pharmaceutical Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 1-17.

-
- ONU. (2018). *Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2018: Soluciones basadas en*. París: UNESCO.
- Patiño, Y., Díaz, E., & Ordóñez, S. (2014). Microcontaminantes emergentes en aguas: tipos y sistemas de tratamiento. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 1-20.
- Peralta, R. M., Polacchine da Silva, B., Gomes-Côrrea, R. C., Kato, C. G., Vicente Seixas, F. A., & Bracht, A. (2017). Enzymes from Basidiomycetes-Peculiar and Efficient Tools for. *Enzymes from Basidiomycetes*, 119-149.
- Pereira-Chagas, E., & Durrant, L. R. (2001). Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme and Microbial Technology*, 473–477.
- Petrie, B., Barden, R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water research*, 3-27.
- Pointing, S. B. (2011). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20-33.
- Prescott, L. H., & Klein, D. (2002). Microbiology: Food and Industrial Microbiology. 5th Edition. En L. H. Prescott, & D. Klein, *Microbiology: Food and Industrial Microbiology* (págs. 978-981). Boston: McGraw-Hill.
- Rodarte-Morales, A. I., Feijoo, G., Moreira, M. T., & Lema, J. M. (2011). Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1839–1846.
- Rodríguez-Rodríguez, C., Caminal, G., Vicent, T., Díaz-Cruz, M., Eljarrat, E., Farré, M., . . . Barceló, D. (2012). Fungal-Mediated Degradation of Emerging Pollutants in Sewage Sludge. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 137-164.
- Schlegel, H. G., & Zaborosch, C. (1993). *General Microbiology*. Barcelona: Cambridge University Press.
- SEMARNAT. (2018). Tratamiento y reúso del agua. En CONAGUA, *Estadísticas del Agua en México 2018* (págs. 126, 128). México: Comisión Nacional del Agua.

-
- SEMARNAT. (2019). *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México, edición 2018*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- SEMARNAT. (2019). Tratamiento y reúso del agua. En CONAGUA, *Estadísticas del Agua en México 2019* (págs. 104, 106). México: Comisión Nacional del Agua.
- SEMARNAT. (2022). Tratamiento de aguas residuales. En CONAGUA, *Numeragua 2022* (pág. 61). México: Comisión Nacional del Agua.
- Sheridan, K. J., Dolan, S., & Doyle, S. (2015). Endogenous cross-talk of fungal metabolites. *Frontiers in MICROBIOLOGY*, 1-11.
- Silva, A. D.-M. (2019). The Use of Algae and Fungi for Removal of Pharmaceuticals by Bioremediation and Biosorption Processes: A Review. *Water*, 1 - 36.
- Soto-Gúzman, M. (2017). *Diseño de gránulos fúngico/bacterianos para la degradación de materia orgánica y carbamazepina en agua residual municipal (TESIS)*. México: Universidad Autónoma Metropolitana - Cuajimalpa.
- Stadlmair, L. F., Letzel, T., Drewes, J. E., & Grassmann, J. (2018). Enzymes in removal of pharmaceuticals from wastewater: A critical review of challenges, applications and screening methods for their selection. *Chemosphere*, 649-661.
- Swamy, J., & Ramsay, J. (1999). The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 130-137.
- Tejada, C., Quiñonez, E., & Peña, M. (2014). Contaminantes emergentes en aguas: metabolitos de fármacos. Una revisión. *Universidad Militar Nueva Granada*, 80-101.
- Tjandraatmadja, G. &. (2006). Sources of critical contaminants in domestic wastewater: review. *Water for a Healthy Country*, 1-80.
- Tomasini, A., & Leon-Santiesteban, H. H. (2019). *Fungal bioremediation : fundamentals and applications*. México: Taylor & Francis Group, LLC.
- Tortella, G., Durán, N., Rubilar, O., Parada, M., & Diez, M. C. (2013). Are white-rot fungi a real biotechnological option for the improvement of environmental health? *Critical Reviews in Biotechnology*, 165-172.

-
- UNAM-CNDH. (2018). *Estudio sobre la protección de ríos, lagos y acuíferos desde la perspectiva de los derechos humanos, 2018*. Ciudad de México.: Universidad Autónoma de México, coordinación de humanidades.
- UNESCO. (2018). *The United Nations World Water Development Report 2018: Nature-Based Solutions for Water*. París: Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura.
- Vidal-Álvarez, M. (2018). Tratamiento de aguas residuales en México: problemáticas de salud pública y oportunidad de uso de ecotecnologías sustentables. *Revista Internacional de Desarrollo Regional Sustentable*, 41-58.
- Wang, C., Chang, C., Chu, C., Lee, D., Chang, B.-V., & Liao, C. (2003). Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *Biotechnology*, 83-92.
- Xiong, J.-Q., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A., Ji, M.-K., & Choi, J. (2016). Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 183–190.
- Yu, Z., Peldszus, S., & Huck, P. M. (2008). Adsorption characteristics of selected pharmaceuticals and an endocrine disrupting compound—Naproxen, carbamazepine and nonylphenol—on activated carbon. *Water research*, 2873 – 2882.
- Zhang, Y., & Geißen, S.-U. (2012). Elimination of carbamazepine in a non-sterile fungal bioreactor. *Bioresource Technology*, 221-227.

9. ANEXOS

ANEXO I: Curvas de calibración COT / NT

La curva de calibración para la medición del carbono total (CT) se realizó con una solución madre de biftalato de potasio a una concentración de 1000 mg/L y la cual se le realizaron diluciones con apoyo de la ecuación $C_1V_1 = C_2V_2$.

Concentración (mg/L)	Área
100	11.62
250	24.94
500	37.77
750	54.35
1000	70.42

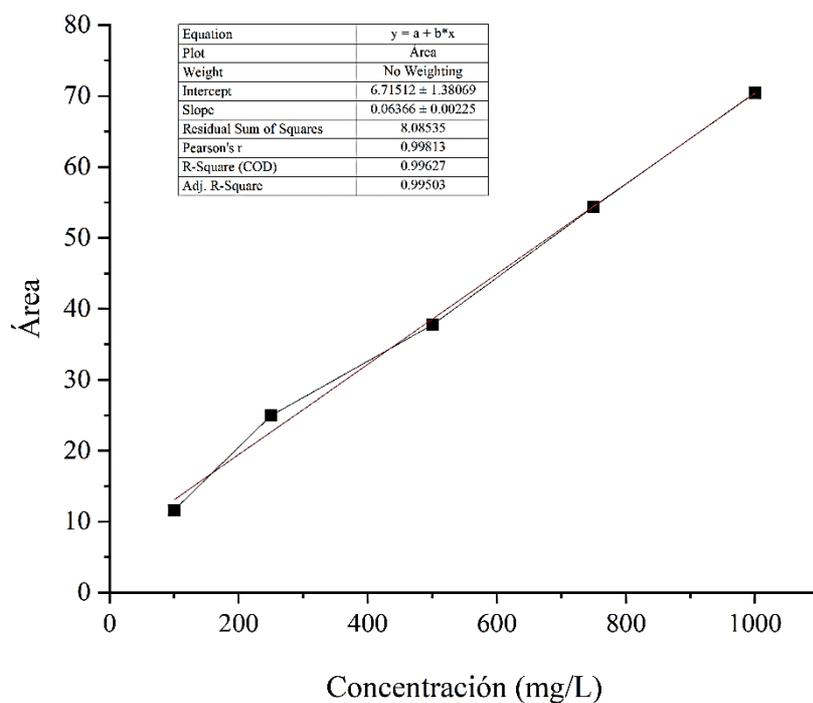


Figura A1. Curva de calibración para carbono total (CT)

La curva de calibración para la medición de nitrógeno total se realizó con una solución madre de cloruro de amonio a una concentración de 100 mg/L y la cual se le realizaron diluciones con apoyo de la ecuación $C_1V_1 = C_2V_2$.

Concentración (mg/L)	Área
10	207.4
20	378.8
50	913.7
70	1109
100	1552

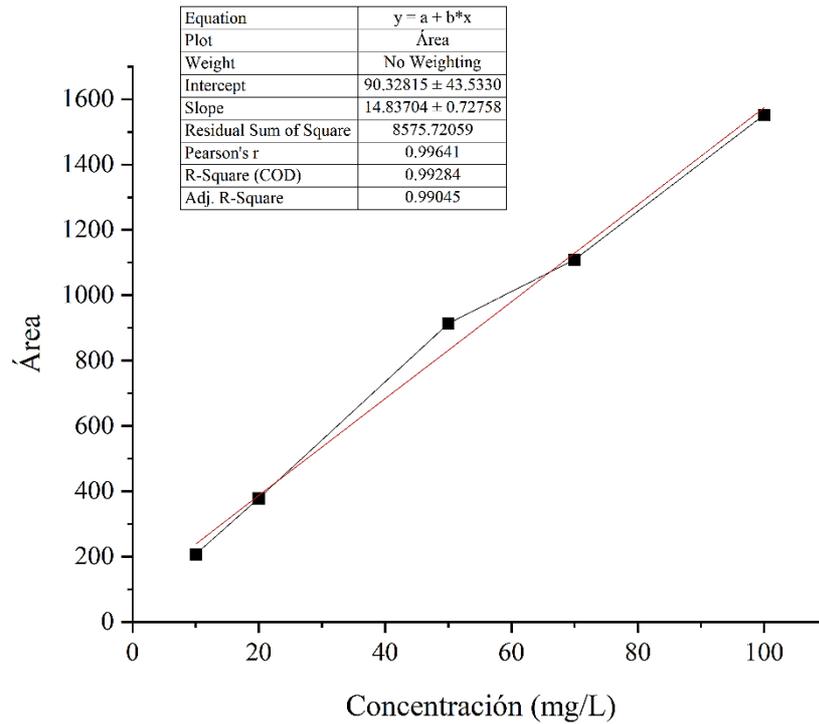


Figura A1.2 Curva de calibración para nitrógeno total (NT)

ANEXO II: Solución estándar de CBZ (5 mg/L)

La solución estándar de CBZ se realizó a una concentración de 1000 mg/L y para obtener la concentración de 5 mg/L se recurrió al uso de la ecuación $C_1V_1 = C_2V_2$. El volumen obtenido fue el agregado a cada matraz de los experimentos realizados.

$$\left(1000 \frac{mg}{L}\right) V_1 = (27 mL) \left(5 \frac{mg}{L}\right)$$

$$V_1 = \frac{(27 mL) \left(5 \frac{mg}{L}\right)}{\left(1000 \frac{mg}{L}\right)}$$

$$V_1 = 0.135 mL / \text{cultivo en lote}$$

ANEXO III: *S. commune* y CBZ (5 mg/L)

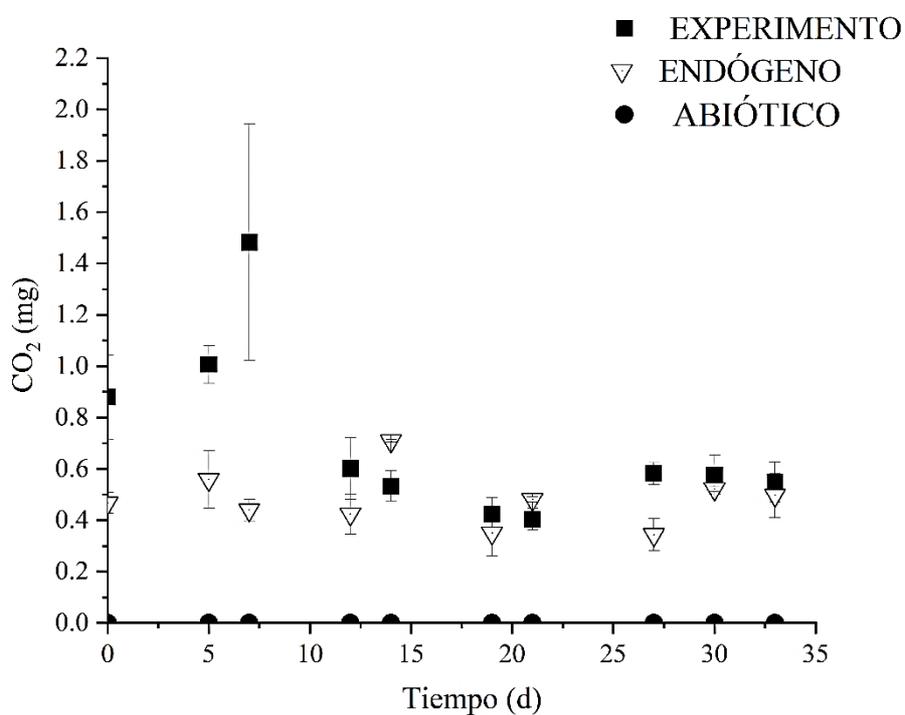


Figura A3. Perfil de producción de CO₂ durante el proceso

ANEXO IV: Pruebas de *S. commune* y CBZ (10 mg/L)

Los resultados que se muestran a continuación son la representación de un experimento prueba con *S. commune* en presencia de CBZ a una concentración de 10 ppm. Sin embargo, como se puede observar los resultados no son concluyentes, ya que la contaminación de los controles (endógeno y abiótico) se hicieron presentes en las mediciones de COT y TN, así como las posibles fugas de CO₂ en los cultivos en lote.

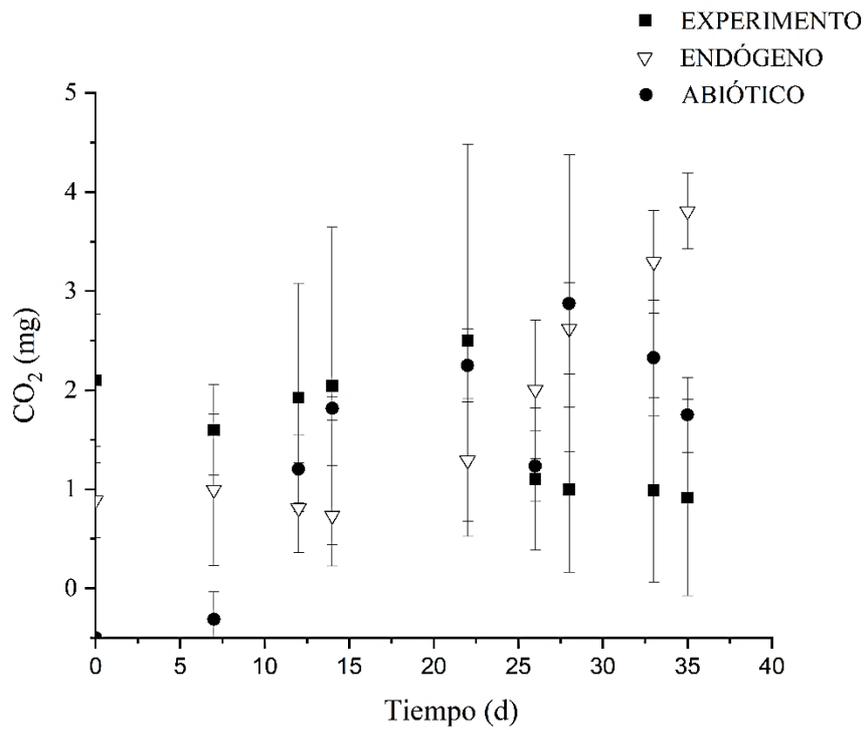


Figura A4. Perfil de producción de CO₂ durante el proceso

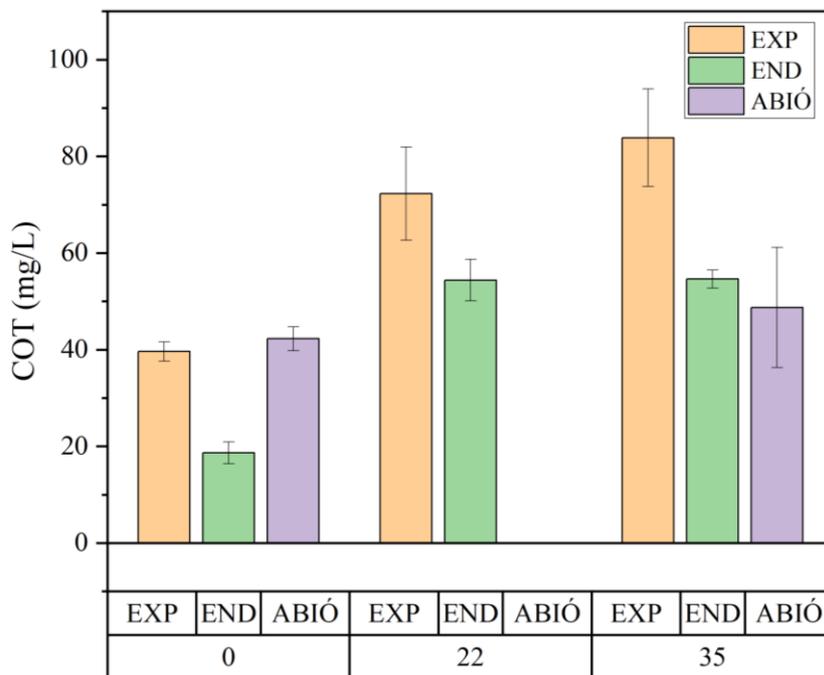


Figura A4.1 Perfil de COT durante el proceso

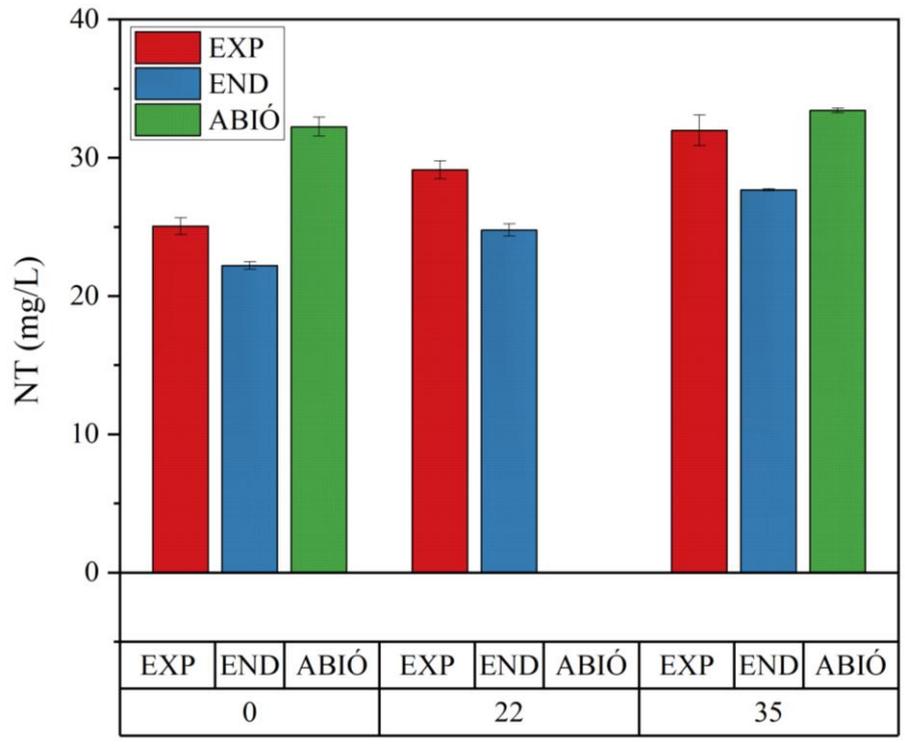


Figura A4.2 Perfil de NT durante el proceso