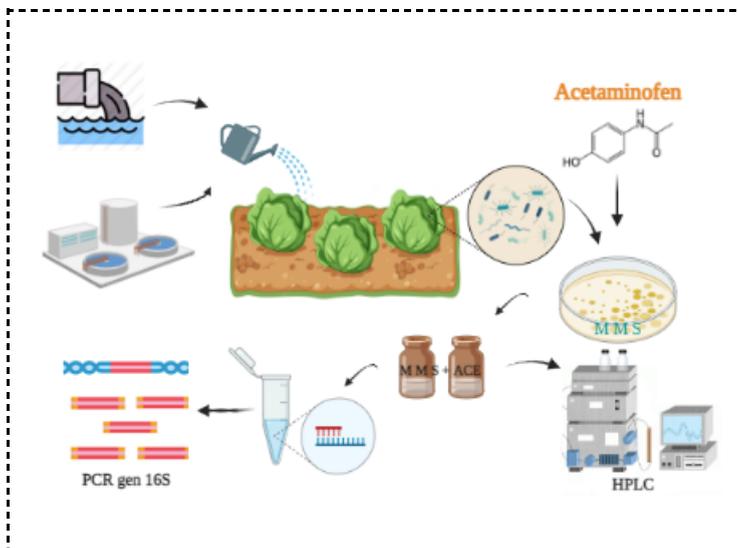


Degradación de acetaminofén en matrices acuosas por medio de bacterias endófitas provenientes de cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*)

*Degradation of acetaminophen in aqueous matrices by means of endophytic bacteria from the cultivation of lettuce (*Lactuca sativa*)*

Graphical Abstract (GA)



Degradación de acetaminofén por medio de bacterias endófitas provenientes de lechuga y su posterior identificación con la secuenciación 16S rRNA.

Degradación de acetaminofén en matrices acuosas por medio de bacterias endófitas provenientes de cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*)

*Degradation of acetaminophen in aqueous matrices by means of endophytic bacteria from the cultivation of lettuce (*Lactuca sativa*)*

*Valentina Paez Almanza*¹

¹ *Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

Dirigido por:

Dra., Diana Martínez Pachón.

Dr. Javier Vanegas Guerrero.

Resumen

La presencia y persistencia de productos farmacéuticos en la cadena alimentaria, especialmente en los cultivos alimentarios, puede tener efectos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente. El acetaminofén en particular es un contaminante ambiental importante debido a su uso generalizado. El objetivo de este trabajo fue determinar la degradación del acetaminofén (ACE) por bacterias endófitas provenientes de lechuga de 3 municipios de la Sabana de Bogotá (Cota, Mosquera y Funza). Para este propósito, los endófitos de lechuga se seleccionaron en medio mínimo de sal que contenía acetaminofén, la degradación del fármaco se realizó por HPLC y las bacterias se identificaron por secuenciación del gen 16s rRNA. Las bacterias *Klebsiella sp* L1cp y *Klebsiella pneumoniae* L2cp utilizan acetaminofén como fuente de carbono y energía para su crecimiento. Las cepas L1cp y L2cp degradaron el 20 % y el 70 % del acetaminofen a 50 mg/l en 60 h. La adición de glucosa afectó la degradación de la ACE, ya que la degradación de L1cp aumentó en un 33 % y la de L2cp disminuyó en un 53 %. Estos resultados sugieren el potencial de las bacterias endófitas de la lechuga para degradar el acetaminofén y un posible mecanismo de protección o detoxificación de sustancias exógenas en las plantas.

Degradación de acetaminofén en matrices acuosas por medio de bacterias endófitas provenientes de cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*)

*Degradation of acetaminophen in aqueous matrices by means of endophytic bacteria from the cultivation of lettuce (*Lactuca sativa*)*

Abstract

The presence and persistence of pharmaceuticals in the food chain, especially in food crops, can have negative effects on human health and the environment. Acetaminophen in particular is a significant environmental pollutant due to its widespread use. The objective of this work was to determine the degradation of acetaminophen (ACE) by endophytic bacteria from lettuce from 3 municipalities of the Sabana de Bogotá (Cota, Mosquera and Funza). For this purpose, lettuce endophytes were selected in minimal salt medium containing acetaminophen, drug degradation was performed by HPLC, and bacteria were identified by 16s rRNA gene sequencing. The bacteria *Klebsiella* sp L1cp and *Klebsiella pneumoniae* L2cp use acetaminophen as a carbon and energy source for their growth. Strains L1cp and L2cp degraded 20% and 70% of acetaminophen at 50 mg/l in 60 h. Glucose addition affected ACE degradation, with L1cp degradation increased by 33% and L2cp degradation decreased by 53%. These results suggest the potential of lettuce endophytic bacteria to degrade acetaminophen and a possible mechanism of protection or detoxification of exogenous substances in plants.

Keywords: Degradation, endophytic bacteria, acetaminophen, lettuce.

INTRODUCCIÓN

Los recursos naturales están cada vez más contaminados debido al crecimiento de la población y el desarrollo industrial. En la actualidad, la falta de agua afecta el 40% de la población mundial, lo que representa a unos 844 millones de personas sin agua, y este número aumenta cada año (Montes., et al 2017; Fagan., et al 2019). Además, existe una alta demanda de agua a nivel mundial, la cual se espera que aumente en un 50% para el 2030 debido a las necesidades de la población (UNESCO, 2020). Siendo, la agricultura de gran importancia al consumir un promedio del 70% del agua extraída del mundo, y se espera que la competencia por el agua se intensifique en el futuro, ejerciendo una presión particular sobre esta. (Banco Mundial, 2017).

Para cumplir la demanda de agua en la agricultura, las aguas residuales tratadas (aguas residuales recuperadas), se emplean para riego de cultivos y otros paisajes (Dickin et al., 2016; Ofori et al., 2019). En Israel, más del 85% de las aguas residuales se usan hoy en día para riego, esto representa más del 50% del volumen total para riego (Carter et al., 2019). No obstante, el uso de aguas residuales tratadas es una de las mayores rutas de contaminación de los alimentos, la cual contiene diversos contaminantes como los son compuestos orgánicos, los microorganismos patógenos y los metales pesados (Khalid et al., 2018; Adegoke et al., 2018). Se reporta que a nivel mundial, el 65% de todas las tierras de cultivo irrigadas dentro de los 40 km río abajo de las áreas urbanas dependen en gran medida de los flujos de aguas residuales tratadas, lo que podría exponer a unos 885 millones de residentes urbanos a posibles riesgos para la salud (Damania et al., 2019).

Los contaminantes detectados en los agroecosistemas, incluyen los contaminantes de preocupación emergente (CPE). Se trata de compuestos de distinta índole, presentes en concentraciones de $\mu\text{g/L}$ - ng/L y su presencia ha sido informada con frecuencia, por lo cual existe un fuerte interés por sus posibles efectos (Riemenschneider et al., 2016). Entre los CPE de mayor interés y estudiados se encuentran los compuestos farmacológicamente activos (CFAc) estos a menudo se identifican en la forma del compuesto original o como un producto de transformación, se ha

informado que muestra una fuerte tendencia a adsorberse, acumularse y persistir en las plantas (Christou et al., 2016). La adsorción de los CFAc en las plantas está relacionado con el genotipo de la planta y con las propiedades fisicoquímicas de los CFAc (Moreno et al., 2015). La acumulación potencial de los CFAc en diferentes organismos terrestres o acuáticos, junto con su consiguiente entrada en las cadenas alimentarias humanas, es visto como un tema prioritario que requiere investigación intensiva por su potencial peligro para la salud pública y para la calidad de los cultivos (Wu et al., 2014).

Se ha informado que las hortalizas de hoja tienen la mayor capacidad para absorber y bioacumular contaminantes emergentes en sus tejidos comestibles. Las hortalizas de hoja no tienen barreras para la translocación de CFA desde su absorción por las raíces hasta sus partes comestibles, es decir, las propias hojas, que muestran concentraciones y factores de bioacumulación más altos que otras partes de la planta.(Christou et al., 2019; Sungur et al., 2022). Siendo la lechuga la planta más común que absorbe productos farmacéuticos, estos pueden ser absorbidos por las raíces y posteriormente transportados y acumulados en las hojas. Por lo tanto, esto proporciona un camino para los productos farmacéuticos a través de la cadena alimentaria que, dependiendo de la concentración, podría representar un riesgo potencial para la salud humana cuando este frondoso cultivo se riega con agua regenerada.(Wu et al., 2012; Ponce et al., 2022). La lechuga puede bioacumular carbamacepina y triclosán en sus hojas hasta 0.60 µg/g, como también ibuprofeno hasta 0.073 µg/g y diclofenaco hasta 0.118 µg/g (Kovacs et al., 2020; Christou et al., 2019).

Dentro de los CFAc con más frecuencia detectados, se encuentra el acetaminofén (ACE), es actualmente uno de los fármacos antiflogísticos disponibles sin receta más utilizados en todo el mundo (Wu et al., 2012). Químicamente, el acetaminofen consta de un núcleo de anillo de benceno sustituido por un grupo hidroxilo y el átomo de nitrógeno de un grupo amida en la posición (1,4) (Wu et al. 2012). Se estima que el mercado mundial de acetaminofén se valore en \$126 millones en el 2022 debido a la pandemia de COVID-19 y se prevé a \$121 millones para el 2028 (Globenewswire, 2022). El ACE se considera uno de los contaminantes de mayor crecimiento en el planeta con

concentraciones de hasta 200 $\mu\text{g/L}$ en efluentes de aguas residuales y 28.70 $\mu\text{g/L}$ en aguas superficiales (Nieto-Juárez et al., 2021). El ACE se ha detectado en efluente de aguas residuales de la planta de tratamiento de aguas (PTAR) de Bogotá (Colombia) a concentración de 29.66 $\mu\text{g/L}$ (Botero et al., 2018). A pesar que el ACE está clasificado como un fármaco pseudo persistente, este se libera regularmente al medio ambiente, lo que significa un problema de relevancia para la salud humana y el ecosistema. En sujetos sanos, del 85 al 95% de una dosis terapéutica se elimina en la orina dentro de las 24 h (Natarajan et al., 2022; Gondi et al., 2022). Leitão y colaboradores (2021) detectaron ACE en raíces y hojas de lechuga con valores de 4.40 $\mu\text{g/g}$ y 3.46 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. También evidenciaron que el ACE en concentraciones de 1 mg/L y 5 mg/L afectaron significativamente los niveles de azúcares, porcentaje de humedad, clorofila e indujo estrés oxidativo en plantas de lechuga. Por lo tanto, la alta concentración del ACE en aguas tratadas y su capacidad de bioacumularse en la lechuga, ha conducido a diferentes métodos para remover efectivamente este fármaco en agua de riego.

Actualmente, los tratamientos convencional secundario (lodos activados) y terciario (filtración) de las PTAR son ineficientes para eliminar la mayoría de los CEC (Rizzo et al., 2015; Krzeminski et al., 2019) y, por lo tanto, las aguas residuales de las plantas son una de las principales fuentes de CEC que ingresan al ecosistema (Petrie et al., 2014). Existe una amplia gama de métodos de tratamiento avanzados para suprimir los CEC de las aguas residuales, como la adsorción con carbón activado, la ozonización y la filtración por membrana; así como nuevas técnicas que no han sido ampliamente implementadas, como los procesos de oxidación avanzada (Eggen et al., 2014). Sin embargo, estos métodos suelen ser difíciles de implementar a gran escala debido a las duras condiciones de reacción, la generación de contaminantes secundarios y los altos costos operativos (Chen et al., 2010; Ma et al., 2021). Por el contrario, la biodegradación de xenobióticos se considera una opción económica, respetuosa con el medio ambiente y con el potencial de eliminar productos finales (Chen et al., 2010; Hasan et al., 2011). La eficiencia de la biorremediación depende del contaminante y la concentración, el medio ambiente y disponibilidad para los microorganismos.

También requieren condiciones ambientales de crecimiento adecuadas como temperatura, pH, fuente adicional de carbono y concentraciones apropiadas de los contaminantes para inducir las enzimas deseadas (Kumar et al., 2011; Singh & Kumar et al., 2016). Sin embargo, la implementación de la biorremediación todavía es obstaculizada por una comprensión incompleta de las características genéticas, las vías metabólicas involucradas, la cinética del inoculante y la extensión en el tiempo de degradación por una adaptación a concentraciones crecientes de contaminaciones por los microorganismos (Madhavi et al., 2012; Singh & Kumar et al., 2016; Luka et al., 2018).

Existe un limitado número de géneros bacterianos capaces de degradar el acetaminofén. Entre los que se encuentra la cepa *Pseudomonas aeruginosa* la cual degradó ACE en concentraciones de hasta 2.2 g/l y por lo tanto, logró utilizarlo como una fuente de carbono (Zhang et al., 2013). También a sido reportado que una comunidad microbiana de suelo degradado el ACE a una concentración de 50 mg/L, en la cual se aisló *Rhodococcus erythropolis* con la capacidad de degradar las mayores concentraciones del fármaco (Akai et al., 2016). Asimismo, de lodos activados se aisló una *Pseudomonas moorei* KB4 que pudo degradar hasta 50 mg/L de ACE (Žur et al., 2018). De Gussemme y colaboradores (2011) informaron que *Delftia tsuruhatensis* y *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas de la biomasa de un biorreactor de membrana, degradaron ACE.

La degradación de contaminantes por microbios es un rasgo evolutivo por el cual los microbios sobreviven en presencia de contaminantes utilizándose como fuente de carbono, fósforo, azufre o nitrógeno (Tétard et al., 2016). Esta capacidad de los microbios se aprovecha ampliamente para la biorremediación de contaminantes. Las bacterias que colonizan los tejidos internos de las plantas sin causar infecciones sintomáticas o efectos negativos en su planta huésped se conocen como bacterias endófitas (Schulz & Boyle., 2006). Los endófitos bacterianos tienen la capacidad de desencadenar cambios fisiológicos que ayudan al crecimiento y desarrollo de la planta (Conrath et al., 2006). Son usadas en biorremediación para descomponer xenobióticos y conferir resistencia a la planta en suelos y aguas contaminadas (Ijaz et al., 2015; Feng et al., 2017), pueden degradar xenobióticos de forma individual o sinérgica con la planta (Newman et al., 2005) para disminuir la

concentración de contaminantes en los ecosistemas (Khan et al., 2013) e interior de la planta, lo que reduce los efectos tóxicos en la planta y la fauna herbívora (Ryan et al., 2008). Por ejemplo, la inoculación de la planta *Leptochloa fusca* con bacterias endófitas *Pantoea stewartii*, *Mycobacterium arborescens* y *Enterobacter* sp mejoró el crecimiento de *L. fusca* mientras ayudaba en la eliminación de contaminantes de las efluentes de agua (Ashraf et al., 2018). Sin embargo, la mayoría de estudios de biodegradación de CFA utilizando bacterias endófitas, se desarrollan en humedales artificiales a escala de laboratorio sin profundizar en el papel que podrían cumplir los microorganismos endófitos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue establecer la capacidad de degradación del acetaminofén por bacterias endófitas obtenidas de lechuga de la Sabana de Bogotá. Para esto se seleccionaron dos cepas de bacterias endófitas de lechuga con capacidad de utilizar el ACE como fuente de carbono, se determinó la degradación del acetaminofén por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y se identificaron las cepas por secuenciación parcial del gen 16S rRNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estándar de ACE grado HPLC se adquirió de la marca Sigma Aldrich. Para los ensayos de degradación se usó ACE comercial en pastilla de la marca AG FARMA S.A. Las soluciones se prepararon con agua ultrapura con una resistividad de 18 M Ω a 25 °C, obtenida con un equipo Stake Pure Milli-Q. El medio mínimo de sales (MMS) a pH 7 \pm 0.3 contenía (g/L): 1.0 NH₄NO₃; 0.5 NaCl; 0.2 MgSO₄ 7H₂O; 0.5 KH₂PO₄ y 1.5 K₂HPO₄ (Li et al., 2008) grado reactivo se obtuvieron de Merck, al igual que la glucosa. La solución se preparó en agua destilada y se esterilizó a 121 °C por 15 min.

Reactivación, conservación y selección de cepas bacterianas.

Se reactivaron nueve cepas del cepario del laboratorio de microbiología de la Universidad Antonio Nariño, las cuales fueron aisladas de hoja de lechugas de tres diferentes zonas de la sabana de Bogotá, en Cota (cp), Mosquera (lv) y Funza (fu). Los nueve aislamientos se sembraron en agar nutritivo a 30°C por 24 h. Estas cepas se crió-preservaron en caldo nutritivo y glicerol al 50%. Las nueve cepas fueron sembradas en agar MSM con 50 mg/L de ACE como única fuente de carbono por duplicado y en agar nutritivo más ACE a 50 mg/L, también por duplicado. Los medios se incubaron a

30 °C por 24 h. Se seleccionaron dos cepas que demostraron óptimo crecimiento y supervivencia, las cuales fueron asignadas como L1cp y L2cp. Con las cepas seleccionadas se prepararon pre-inóculos en MMS líquido con 1g/L de glucosa, para inocular los tratamientos de crecimiento y degradación. Los pre-inóculos se incubaron en un agitador rotativo a 150 rpm a 30 °C por 24 h (Chopra et al., 2020). Luego, las bacterias se centrifugaron a 8300 rpm durante 5 min (Verma et al., 2018), los sedimentos se resuspendieron en MMS y se ajustó a 0.5 absorbancias a 600 nm mediante un espectrofotómetro tipo UV/VIS (Shanghai Mapada Instruments Co). Medio no inoculado se utilizó como control.

Los tratamientos de crecimiento y degradación correspondieron a: 1) Glucosa a 1 g/L (GLU 1g/L), 2) Glucosa a 79 mg/L (GLU 79 mg/L), 3) Acetaminofén a 50 mg/L (ACE 50 mg/L) y 4) Acetaminofén a 50 mg/L con Glucosa a 1g/L (ACE 50 mg/L + GLU 1 g/L). Los tratamientos se realizaron en frascos ámbar de 250 ml que contenían 100 ml de MMS inoculado con cada cepa.

Curva de crecimiento bacteriano.

Se estableció la curva de crecimiento para las cepas L1cp y L2cp utilizando los cuatro tratamientos mencionados. Los medios con el 1% de inóculo se incubaron a 150 rpm durante 60 h a 30 °C. Cada 12, 24, 48 y 60 h se tomaron asépticamente alícuotas de 1 ml para el seguimiento del crecimiento bacteriano a 600 nm (Ouarts et al., 2019). Los controles fueron medios no inoculados con la misma concentración de glucosa y ACE, respectivamente. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

Degradación de acetaminofén por las cepas L1cp y L2cp.

Se realizaron ensayos por duplicado con los tratamientos tres (ACE 50 mg/L) y cuatro (ACE 50 mg/L + GLU 1 g/L) para establecer la capacidad de las cepas L1cp y L2cp para degradar el ACE como única fuente de carbono y determinar el efecto de una fuente externa de carbono como la glucosa. Los medios se incubaron a 150 rpm durante 60 h a 30 °C; cada 0, 12, 24, 48 y 60 h, se tomó asépticamente una alícuota de 1 ml para el seguimiento de ACE por HPLC. Los controles fueron medios no inoculados con la misma concentración de glucosa y ACE, respectivamente. Todos los

experimentos se llevaron a cabo por duplicado y en frascos ámbar para evitar la posible fotodegradación del ACE (Bai et al., 2018).

Se utilizó un sistema HPLC equipado con una columna C18 (150 mm x 3 mm, 5 µm) en un equipo Shimadzu LC-20AT con un detector de arreglo de diodos SPD-M20A ajustado a 243 nm para ACE. La fase móvil contenía acetonitrilo: buffer de fosfatos pH 3.6 (50:50) a 25 °C en condiciones isocráticas, con un flujo de 0.6 ml/min. Bajo estas condiciones, el acetaminofén se detecta a 1.3 min. La concentración de ACE se determinó con una curva de calibración para concentraciones entre 10 y 80 mg/L con soluciones estándar (ANEXO 1). Adicionalmente el tiempo de corrida fue de 10 min, pero al no observar ninguna otra señal o pico en el cromatograma, se disminuyó el tiempo de corrida a 3 min cada una, para evitar gastos del equipo. Para validar el método analítico, a partir de las curvas de calibración se determinó la linealidad, precisión, exactitud, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) para el ACE. Además se calculó el coeficiente de correlación, la desviación estándar, el coeficiente de varianza (Datos no mostrados).

Identificación taxonómica de cepas bacterianas (L1cp y L2cp) endófitas de lechuga empleando la técnica de secuenciación parcial del gen 16S rRNA.

Se extrajo el ADN genómico de dos cepas capaces de crecer en ACE como única fuente de carbono, mediante el kit de extracción QIAamp DNA Mini. El gen 16S rRNA de cada colonia se amplificó mediante PCR utilizando el kit GoTaq® Green Master Mix con los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (1 µM) y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (1 µM). Las condiciones de PCR incluyeron 35 ciclos a 94 °C (30 s), 55 °C (30 s) y 72 °C (1 min), con una extensión final a 72 °C durante 7 min. El ARNr 16S amplificado se visualizó en gel de agarosa al 1%, se tiñó con SYBR safe DNA gel stain, invitrogen. Los amplificados de ARNr 16S fueron purificados y secuenciados mediante electroforesis capilar utilizando la química BigDye terminator 3.1 de Applied Biosystems (Método Sanger). Las lecturas directa e inversa se recortaron y ensamblaron utilizando BioEdit versión 7.2.6.1 para producir una secuencia consenso de ARNr 16S.

Luego, se consultó la secuencia contra la base de datos NCBI utilizando BLAST y se determinó la secuencia vecina más cercana a la secuencia consultada (ANEXO 2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curva de crecimiento bacteriano.

La bacteria L1cp presentó mayor crecimiento en los tratamientos con glucosa (1 g/L) con absorbancias de hasta 0.7 Abs (Fig. 3). L1cp creció por debajo de 0.2 Abs a bajas concentraciones de glucosa (79 mg/L) y ACE como única fuente de carbono. Similar comportamiento presentó L2cp (Fig. 4), la cual mostró mayor crecimiento con los tratamientos de glucosa (1g/L) y creció por debajo de 0.2 Abs con bajas concentraciones de glucosa (79 mg/L) y ACE como única fuente de carbono.

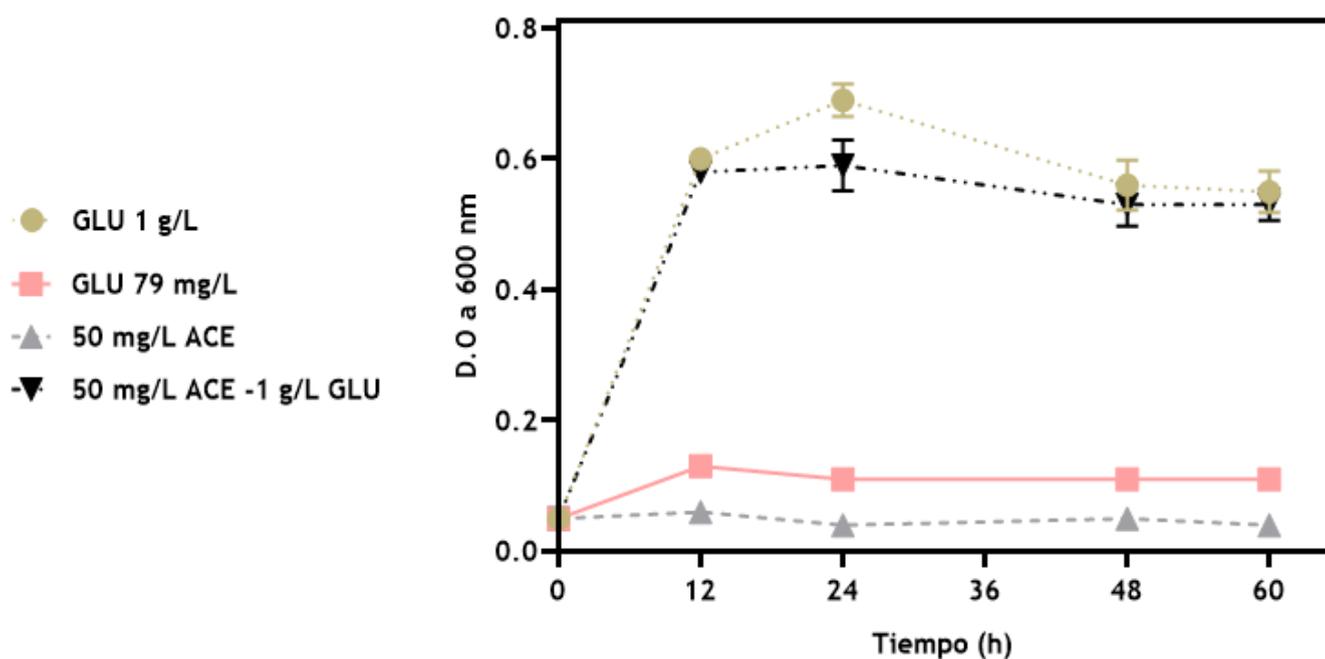


Figura 3. Crecimiento bacteriano de la cepa L1cp en medio mínimo con glucosa (1 g/L y 79 mg/L) y acetaminofén (50 mg/L y 50 mg/L de ACE + GLU 1 g/L).

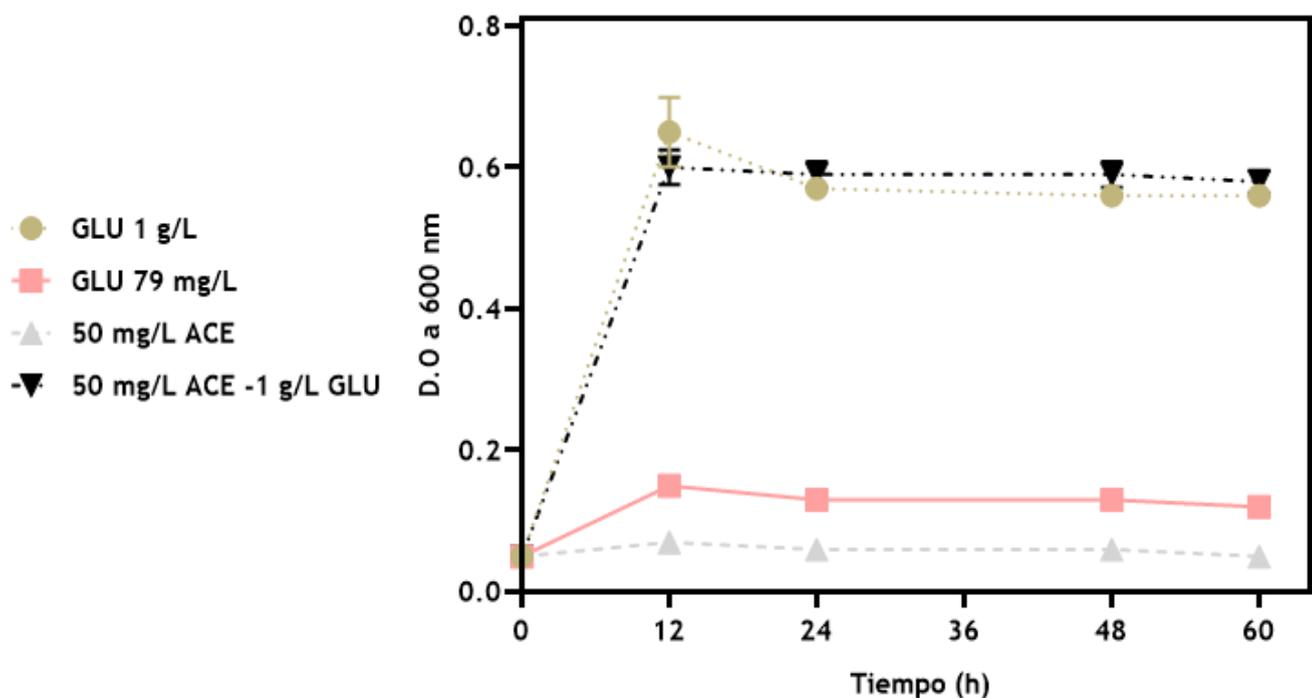


Figura 4. Crecimiento bacteriano de la cepa L2cp en medio mínimo con glucosa (1000 y 79 mg/L) y acetaminofén (50 mg/L y 50 mg/L de ACE - GLU 1000 mg/L).

El crecimiento bacteriano en el tratamiento 1 (GLU 1 g/L) tuvo un comportamiento exponencial hasta los tiempos de 24 h y 12 h, para las cepas L1cp y L2cp, respectivamente. La glucosa suele ser la principal fuente de azúcar para el metabolismo bacteriano y un factor limitante en los cultivos bacterianos que debe ser optimizado para el crecimiento celular saludable (Maier et al., 2015). La concentración de 1 g/L (5.5 mM), es la concentración mínima que se utiliza en los medios de cultivo, ya que se aproxima a los niveles normales de azúcar en sangre, por lo tanto es la concentración mínima que se necesitan las bacterias para un buen crecimiento, por lo tanto podemos observar un crecimiento óptimo de las dos cepas (Koobotse et al., 2020). Para el tratamiento 4 (50 mg/L ACE + 1 g/L GLU), hubo un crecimiento similar al del tratamiento 1, con una ligera disminución, posiblemente por los excipientes de la solución madre del acetaminofén, lo que puede afectar el crecimiento de las bacterias (Akin et al., 2020; Zengin et al., 2014). Para el tratamiento 2 (79

mg/L) el cual proporcionó la misma concentración de carbono (31.6 mg/L) que los 50 mg/L de ACE del tratamiento 3, este permitió una comparación entre los tratamientos. Se logró determinar que el crecimiento de las dos cepas, en los tratamientos 2 y 3, nos indica que la fuente de carbono no era suficiente para un buen crecimiento bacteriano. Rouibah y colaboradores (2021) reportaron que a una mayor concentración de acetaminofén (400 mg/L) sin ninguna fuente de carbono adicional permito que *Pseudomona putida* crezca a una densidad óptica mayor a 1.0. Lo que nos indica que posiblemente a una mayor concentración de ACE, podría aumentar el crecimiento de la cepas, aumentando el número de bacterias y así mismo, posiblemente pueda eliminar más rápidamente el acetaminofén y con mejor eficiencia.

Degradación de acetaminofén por las cepas L1cp y L2cp.

Los tratamientos 3 (50 mg/L de ACE) y 4 (50 mg/L de ACE + 1 g/L GLU) se evaluaron sobre la degradación de acetaminofén. La cepa L1cp disminuyó un 20% de ACE después de 60 h, mientras, la cepa L2cp degrado el 75% de ACE después de las 60 h para el tratamiento 3. En presencia de glucosa (tratamiento 4) aumentó la degradación a 33% de ACE , sin embargo para L2cp disminuyó la degradación a 53% después de 60 h (Fig. 5 y 6). Esto demuestra que la degradación del ACE es influenciado por una fuente de carbono extra como la glucosa y la importancia de exponer previamente a las cepas al acetaminofén para activar el metabolismo y aumentar la degradación.

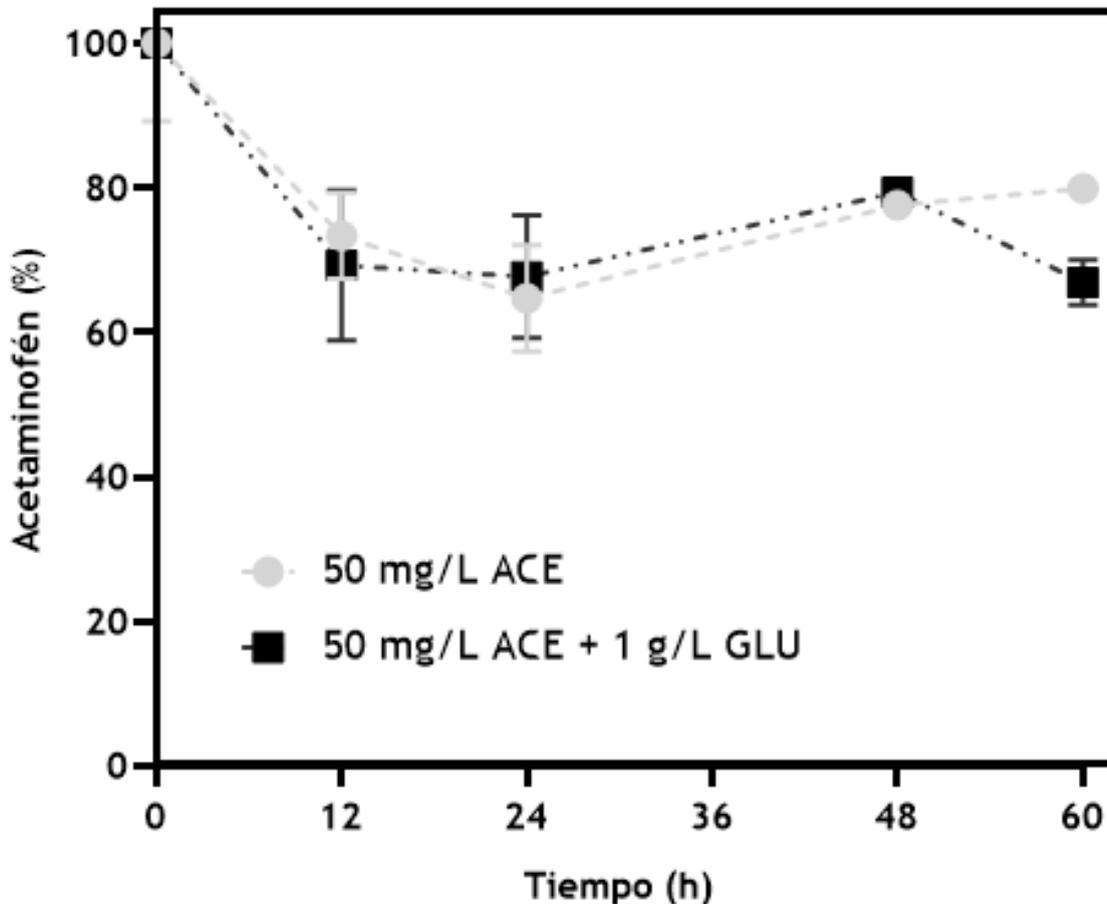


Figura 5. Porcentaje de degradación de ACE por la cepa L1cp. Tratamientos 3 (50 mg/L de ACE) y preinóculo 4 (50 mg/L de ACE - GLU 1g/L).

La disminución del 20% del acetaminofén en MMS sin glucosa demuestra que L1cp utiliza como única fuente de carbono el acetaminofén. Pero en presencia de glucosa puede aumentar la degradación a un 33% hasta el tiempo 60h, algo que es muy común en algunas bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pantoea* sp y *Pseudomonas* sp (Khan et al., 2009; Wadhah et al., 2018). Es posible que el acetaminofén se consuma de forma simultánea con la glucosa, por tanto, un aumento de la concentración de glucosa puede incrementar la tasa de degradación del fármaco (Wadhah et al., 2018). Incluso, aumentar la población bacteriana y por lo tanto, disminuir el tiempo de degradación (Horemans et al., 2013).

El acetaminofén puede ser transformado en alguna vía del metabolismo de la bacteria. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotroohomonas* sp degradan acetaminofén, el cual fue informado por dos vías : 1) el acetaminofén es catalizado inicialmente por una amidohidrolasa con la

liberación de acetato para producir 4-aminofenol, en el que el grupo amino se reemplaza por un grupo hidroxilo para formar hidroquinona, luego de la fisión del anillo, 2) en el segundo caso, la hidroxilación inicial del paracetamol podría potencialmente ser catalizada por una enzima hidrolítica para producir hidroquinona con una liberación de acetamida, que luego podría convertirse en ácido oxámico. De igual manera la ausencia de glucosa no provoca la detención del proceso de biodegradación (Zhang et al, 2013; Chopra et al, 2020).

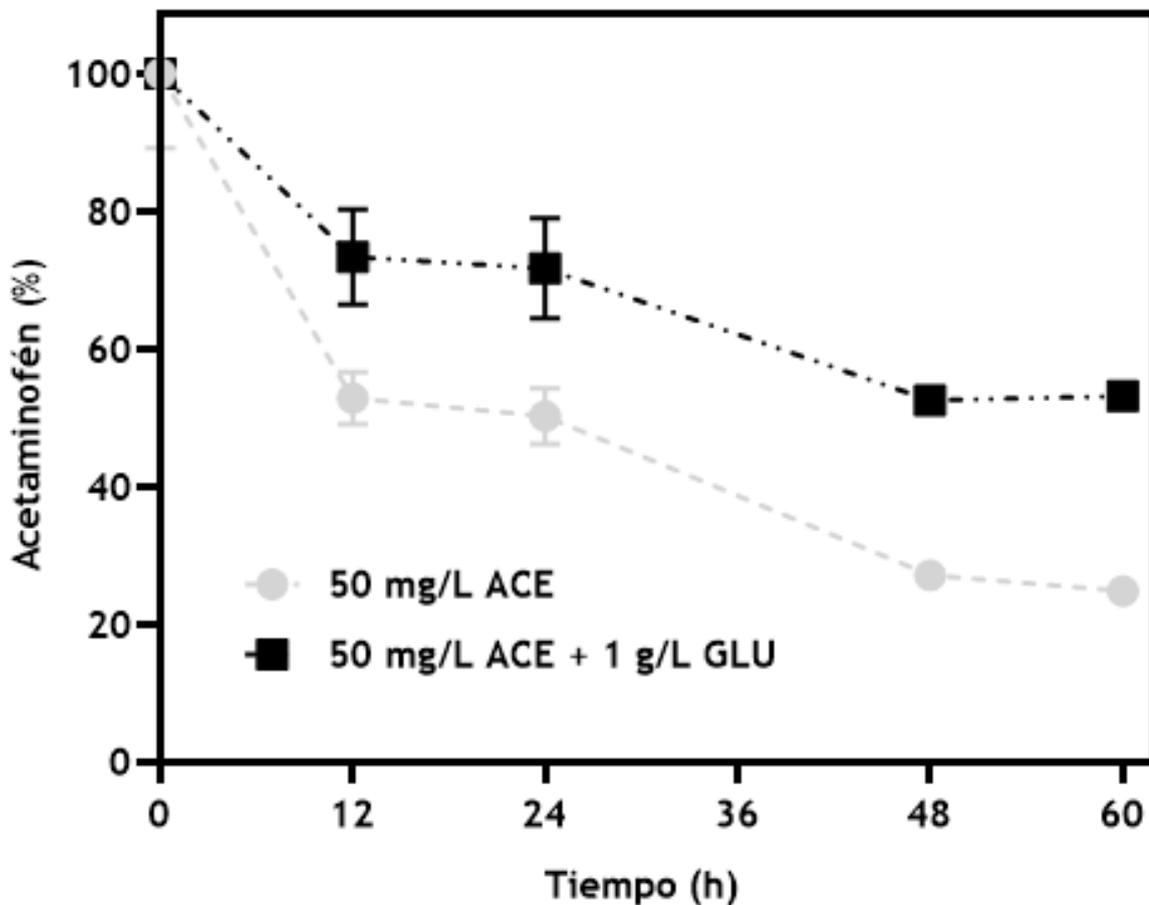


Figura 6. Porcentaje de degradación de acetaminofén por la cepa L2cp. Tratamientos 3 (50 mg/L de ACE) y tratamiento 4 (50 mg/L de ACE - GLU 1g/L).

Al contrario, L2cp con glucosa disminuyó la degradación del ACE de 75% a 53%. Esto podría deberse a que la glucosa puede afectar el metabolismo bacteriano de L2cp para degradar el acetaminofén. La mayoría de las bacterias utilizan varios sustratos como fuente de carbono de forma jerárquica. La presencia de una fuente de carbono preferida como la glucosa impide la expresión de

genes relacionados con el sistema catabólico que permiten a las bacterias utilizar un sustrato secundario en este caso el ACE. Este tipo de regulación se conoce como represión de catabolitos de carbono (RCC). Por lo cual reduce la actividad de la degradación del ACE, inhibiendo la expresión y la activación de diferentes rutas metabólicas para el uso de una fuente de carbono secundaria ante una fuente de carbono primaria como la glucosa, la cual es la principal fuente de carbono para los seres vivos, por lo tanto las bacterias preferirán metabolizar la glucosa, ya que requiere menor energía y es más sencillo consumirla (Szököl et al., 2014). Bacterias como *Cupriavidus* sp y *Comamonas testosteroni* pueden degradar diferentes contaminantes, las cuales se ven afectadas por la presencia de otra fuente de carbono, en donde el mecanismo principal es que afecta la degradación fue la RCC (Horemans et al., 2017; Tiwari et al., 2020).

Identificación taxonómica de las bacterias L1 cp y L2cp.

Las dos cepas son Gram-negativa y los productos de PCR mostraron una sola banda con un peso molecular de aproximadamente de 1500 pb (Fig. 7). El BLAST sugirió que la cepa L1cp presentó un 99 % similar a la cepa *Klebsiella* sp (LR025092.1) con un valor E de $4e^{-57}$. La cepa L2cp fue un 99 % similar a *Klebsiella pneumoniae* (OP536123.1) con un valor E $7e^{-61}$.

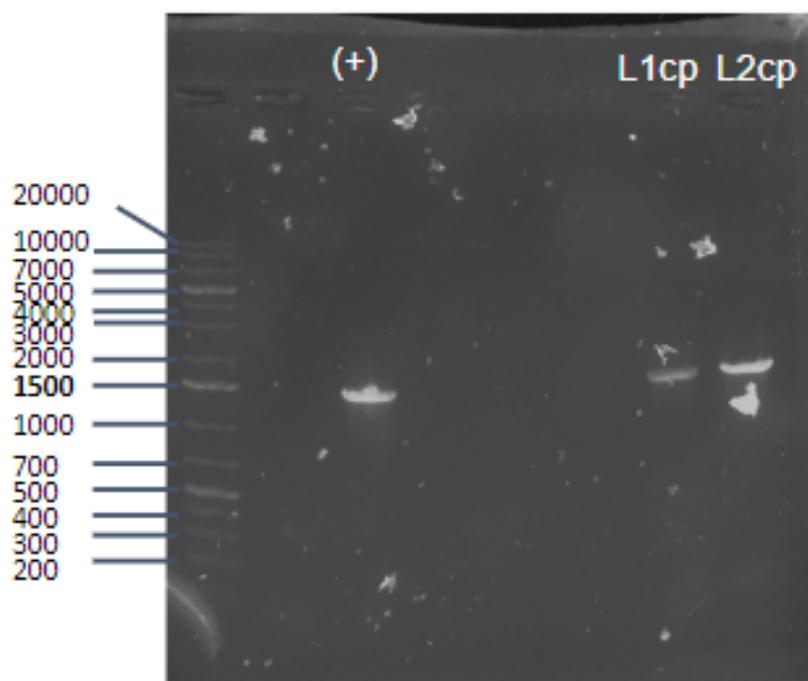


Figura 7. Gel de agarosa al 1% con los productos de PCR del 16 rRNA de las bacterias L1cp y L2cp.

Las *Klebsiellas* son habitantes del sistema digestivo de animales y humanos, las cuales pueden ser bacterias endófitas de varios microbiomas vegetales (Brandl et al., 2006; Teplitski et al., 2011). La *Klebsiella* puede estar en la microbiota de las lechugas, ya que puede proporcionar hábitats para diferentes microorganismos en donde puede formar relaciones beneficiosas con ella (Rastogi et al. 2012; Lopes et al., 2017). En la literatura no hay reportes *Klebsiellas* degradadoras de ACE. Sin embargo, se ha reportado que son degradadoras de otros compuestos farmacológicamente activos. Aissaoui y colaboradores (2017) demostraron que *Enterobacter hormaechei* aislada de lodos activados, metaboliza diclofenaco (DCF) a una tasa de eliminación del 52.8%. En presencia de una fuente externa de carbono (glucosa), la tasa de eliminación aumentó a aproximadamente el 82% a una concentración inicial de 10 mg/L de DFC después de 48 h. De igual manera, *Klebsiella* sp mineraliza 70 mg/l de DFC después de 72 h, también reportaron que tiene dos propiedades promotoras crecimiento vegetal, como la solubilización de fosfato y actividad de ACC desaminasa. La inoculación con *Klebsiella* sp mejoró significativamente el rendimiento del crecimiento, la producción de biomasa, la tasa de germinación de semillas, entre otras en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) (Li et al., 2020). Aunque se ha reportado que las plantas pueden metabolizar los contaminantes orgánicos, gracias a sus enzimas oxidativas y reductivas, son organismos autótrofos, por lo cual, no dependen de los contaminantes orgánicos como fuente de energía y carbono (Bittsánszky et al., 2011). Por lo tanto, las plantas se benefician de sus bacterias endófitas asociadas para la degradación de los contaminantes orgánicos absorbidos por estas para evitar los efectos deletéreos del contaminante en las plantas (Calderón-Preciado et al., 2012; Leitño et al., 2021). Por ejemplo, Badar y colaboradores (2022) mostraron una disminución del 60.03% de ACE en plantas de espinacas tratadas con 200 mg/L de ACE después de ocho días. Ellos identificaron las cepas *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* y *Kocuria* con potencial de degradar el ACE. Esto demuestra la capacidad que tienen las bacterias endófitas de degradar los contaminantes emergentes que están presentes en las plantas, para así evitar problemas para la planta (Afzal et al., 2014).

CONCLUSIONES

Las cepas bacterianas endófitas de lechuga pueden degradar y asimilar ACE como única fuente de carbono. Endófitos como *Klebsiella* sp L1cp y *Klebsiella pneumoniae* L2cp degradaron el 75% y 20% del acetaminofén después de 60 h respectivamente. La adición de glucosa influyó en la degradación del ACE con un aumento del 33% para L1cp y una disminución en L2cp del 53%, las cepas tuvieron diferentes comportamientos al estar en presencia de la glucosa, donde estos comportamientos ya han sido reportados en la degradación de contaminantes con bacterias. Por lo tanto, estos endófitos de lechuga pueden ayudar a la planta a superar la fitotoxicidad y reducir el estrés inducido por el ACE. Sin embargo no se podría afirmar si hay una mineralización completa del fármaco o se transforme en productos intermediarios.

RECOMENDACIONES

- Establecer si las cepas requieren de una adaptación gradual al acetaminofén para aumentar su potencial de degradación y llegar hasta 100% de degradación.
- Secuenciar el genoma bacteriano de ambas bacterias para poder establecer una vía de degradación del acetaminofén.
- Determinar los mecanismos de represión de catabolitos de carbono, para la cepa L2cp.
- Evaluar las lechugas con los endófitos degradadores en la remoción de contaminantes en agua y suelo.
- Confirmar si hay mineralización del ACE y si se transforma en otros metabolitos.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por MINCIENCIAS (contrato de proyecto 818-2019) y la Universidad Antonio Nariño. Agradezco al Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Químicas en las líneas de investigación de Biotecnología ambiental y agrícola y Remediación Ambiental y Procesos Avanzados de Oxidación. Agradezco enormemente a mis directores, al profesor Javier Vanegas Guerrero y a la profesora Diana Martínez Pachón por brindarme la oportunidad de hacer parte de su equipo de investigación, por la paciencia, la guía y la compañía que

me brindaron en cada uno y los procesos necesarios para el desarrollo y culminación de este proyecto. A mi familia, las personas más importantes de mi vida, por la confianza, el apoyo, la fuerza y la motivación para ser mejor cada día y tener el valor de superar cada uno de los obstáculos que se me presento y poder cumplir con esta meta. A mis amigos y compañeros en especial a Marcela Gomez por ser cómplices y apoyo de este proyecto.

REFERENCIAS

- Adegoke, A. A., Amoah, I. D., Stenström, T. A., Verbyla, M. E., & Mihelcic, J. R. (2018). Epidemiological evidence and health risks associated with agricultural reuse of partially treated and untreated wastewater: a review. *Frontiers in public health*, 6, 337. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00337>
- Aissaoui, S., Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Harrouche, K., & Sghaier, H. (2017). Metabolic and co-metabolic transformation of diclofenac by *Enterobacter hormaechei* D15 isolated from activated sludge. *Current microbiology*, 74(3), 381-388. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1190-x>
- Akay, C., & Tezel, U. (2020). Biotransformation of Acetaminophen by intact cells and crude enzymes of bacteria: A comparative study and modelling. *Science of the total environment*, 703, 134990. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134990>
- Akin-Ajani, O. D., Odeku, O. A., & Olumakinde-Oni, O. (2020). Evaluation of the mechanical and release properties of lactose and microcrystalline cellulose and their binary mixtures as directly compressible excipients in paracetamol tablets. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 11(2), 42-52.
- Ashraf, S., Afzal, M., Naveed, M., Shahid, M., & Ahmad Zahir, Z. (2018). Endophytic bacteria enhance remediation of tannery effluent in constructed wetlands vegetated with *Leptochloa fusca*. *International Journal of Phytoremediation*, 20(2), 121-128. DOI: 10.1080/15226514.2017.1337072.

- Badar, Z., Shanableh, A., El-Keblawy, A., Mosa, K. A., Semerjian, L., Mutery, A. A., ... & Semreen, M. H. (2022). Assessment of Uptake, Accumulation and Degradation of Paracetamol in Spinach (*Spinacia oleracea* L.) under Controlled Laboratory Conditions. *Plants*, 11(13), 1626. <https://doi.org/10.3390/plants11131626>
- Bai, Y., Cui, Z., Su, R., & Qu, K. (2018). Influence of DOM components, salinity, pH, nitrate, and bicarbonate on the indirect photodegradation of acetaminophen in simulated coastal waters. *Chemosphere*, 205, 108-117. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.087>
- Banco mundial (2017). Agua en la agricultura. <https://www.bancomundial.org/es/topic/water-in-agriculture>
- Bittsánszky, A., Gullner, G., Gyulai, G., & Komives, T. (2011). A case study: uptake and accumulation of persistent organic pollutants in Cucurbitaceae species. In *Organic xenobiotics and plants* (pp. 77-85). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9852-8_4
- Botero-Coy, A. M., Martínez-Pachón, D., Boix, C., Rincón, R. J., Castillo, N., Arias-Marín, L. P., ... & Hernandez, F. (2018). An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater. *Science of the Total Environment*, 642, 842-853. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.088>
- Brandl M. T. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual review of phytopathology*, 44, 367-392. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143359>
- Calderón-Preciado, D., Renault, Q., Matamoros, V., Cañameras, N., & Bayona, J. M. (2012). Uptake of organic emergent contaminants in spath and lettuce: an in vitro experiment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(8), 2000-2007. <https://doi.org/10.1021/jf2046224>
- Caragea, G., Avram, O., Pauna, A., Costea, A. C., & Tudosie, M. (2022). Acetaminophen, a therapeutic or an extremely toxic remedy—a review. *Journal of Mind and Medical Sciences*, 9(1), 102-110. <https://doi.org/10.22543/7674.91.P102110>

- Carter, L. J., Chefetz, B., Abdeen, Z., & Boxall, A. B. (2019). Emerging investigator series: towards a framework for establishing the impacts of pharmaceuticals in wastewater irrigation systems on agro-ecosystems and human health. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 21(4), 605-622. DOI: 10.1039/C9EM00020H
- Chen CY, Chen SC, Fingas M, Kao CM (2010) Biodegradation of propionitrile by *Klebsiella oxytoca* immobilized in alginate and cellulose triacetate gel. *J Hazard Mat* 177:856–863
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.112>
- Chopra, S., & Kumar, D. (2020). Characterization, optimization and kinetics study of acetaminophen degradation by *Bacillus drentensis* strain S1 and wastewater degradation analysis. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-0297-x>
- Christou, A., Antoniou, C., Christodoulou, C., Hapeshi, E., Stavrou, I., Michael, C., Fatta-Kassinou, D., & Fotopoulos, V. (2016). Stress-related phenomena and detoxification mechanisms induced by common pharmaceuticals in alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. *The Science of the Total Environment*, 557–558, 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.054>
- Christou, A., Papadavid, G., Dalias, P., Fotopoulos, V., Michael, C., Bayona, J. M., ... & Fatta-Kassinou, D. (2019). Ranking of crop plants according to their potential to uptake and accumulate contaminants of emerging concern. *Environmental research*, 170, 422-432. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.048>
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., & Mauch, F. (2006). Priming: getting ready for battle. *Mol Plant-Microbe Interact* 19: 1062–1071. doi: 10.1094/MPMI-19-1062. Doi: 10.1094
- Damania, R., Desbureaux, S., Rodella, A. S., Russ, J., & Zaveri, E. (2019). Quality unknown: the invisible water crisis. World Bank Publications.
- De Gussemé, B., Vanhaecke, L., Verstraete, W., & Boon, N. (2011). Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor. *Water research*, 45(4), 1829-1837. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.040>

- Dickin, S. K., Schuster-Wallace, C. J., Qadir, M., & Pizzacalla, K. (2016). A review of health risks and pathways for exposure to wastewater use in agriculture. *Environmental health perspectives*, 124(7), 900-909. <https://doi.org/10.1289/ehp.1509995>
- Eggen, R. I., Hollender, J., Joss, A., Schärer, M., & Stamm, C. (2014). Reducing the discharge of micropollutants in the aquatic environment: the benefits of upgrading wastewater treatment plants. <https://doi.org/10.1021/es500907n>
- Fagan, G. (2019). El acceso de los hogares rurales a los recursos hídricos bajo impactos climáticos basado en evidencia de campo en la región de Tigray, Etiopía. *Revista africana de ciencia y tecnología ambiental*, 1 (6), 228-240. <https://doi.org/10.5897/AJEST2019.2675>
- Fatta-Kassinos, D., Kalavrouziotis, I. K., Koukoulakis, P. H., & Vasquez, M. I. (2011). The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. *The Science of the Total Environment*, 409(19), 3555–3563. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.036>
- Feng, N. X., Yu, J., Zhao, H. M., Cheng, Y. T., Mo, C. H., Cai, Q. Y., ... & Wong, M. H. (2017). Efficient phytoremediation of organic contaminants in soils using plant–endophyte partnerships. *Science of the Total Environment*, 583, 352-368. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.075
- García, M. G., Fernández-López, C., Polesel, F., & Trapp, S. (2019). Predicting the uptake of emerging organic contaminants in vegetables irrigated with treated wastewater—implications for food safety assessment. *Environmental research*, 172, 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.011>
- Gondi, R., Kavitha, S., Kannah, R. Y., Karthikeyan, O. P., Kumar, G., Tyagi, V. K., & Banu, J. R. (2022). Algal-based system for removal of emerging pollutants from wastewater: A review. *Bioresource Technology*, 344, 126245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126245>

- Hasan SA, Ferreira MIM, Koetsier MJ, Arif MI, Janssen DB (2011) Complete biodegradation of 4-fluorocinnamic acid by a consortium comprising *Arithrobacter* sp. strain G1 and *Ralstonia* sp. strain H1. *Appl Environ Microbiol* 77(2):572–579. <https://doi.org/10.1128/AEM.00393-10>
- Horemans, B., Breugelmans, P., Hofkens, J., & Springael, D. (2017). Carbon catabolite repression and cell dispersal affect degradation of the xenobiotic compound 3, 4-dichloroaniline in *Comamonas testosteroni* WDL7 biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(3). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix004>
- Horemans, B., Smolders, E., & Springael, D. (2013). Carbon source utilization profiles suggest additional metabolic interactions in a synergistic linuron-degrading bacterial consortium. *FEMS microbiology ecology*, 84(1), 24-34. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.088>
- Hunter PJ, Hand P, Pink D, Whipps JM, Bending GD (2010) Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca* species) phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 76: 8117–8125. <https://doi.org/10.1128/AEM.01321-10>
- Ijaz, A., Imran, A., Anwar ul Haq, M., Khan, Q. M., & Afzal, M. (2016). Phytoremediation: recent advances in plant-endophytic synergistic interactions. *Plant and Soil*, 405(1), 179-195. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2606-2>
- Khalid, S., Shahid, M., Bibi, I., Sarwar, T., Shah, A. H., & Niazi, N. K. (2018). A review of environmental contamination and health risk assessment of wastewater use for crop irrigation with a focus on low and high-income countries. *International journal of environmental research and public health*, 15(5), 895. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050895>
- Khan, S., Afzal, M., Iqbal, S., Mirza, M. S., & Khan, Q. M. (2013). Inoculum pretreatment affects bacterial survival, activity and catabolic gene expression during phytoremediation of diesel contaminated soil. *Chemosphere*, 91(5), 663-668. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.025
- Khan, S., Hamayun, M., Khan, A., Ahmad, B., Ahmed, S., & Lee, I. (2009). Influence of pH, temperature and glucose on biodegradation of 4-aminophenol by a novel bacterial strain,

Pseudomonas sp. ST-4. African Journal of Biotechnology, 8(16). DOI: 10.4314/ajb.v8i16.62067

Koobotse, M. O., Schmidt, D., Holly, J., & Perks, C. M. (2020). Glucose Concentration in Cell Culture Medium Influences the BRCA1-Mediated Regulation of the Lipogenic Action of IGF-I in Breast Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8674. <https://doi.org/10.3390/ijms21228674>

Kovacs, E. D., Silaghi-Dumitrescu, L., Kovacs, M. H., & Roman, C. (2021). Determination of the Uptake of Ibuprofen, Ketoprofen, and Diclofenac by Tomatoes, Radishes, and Lettuce by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS). *Analytical Letters*, 54(1-2), 314-330. DOI: 10.1080/00032719.2020.1779278

Krzeminski, P., Tomei, MC, Karaolia, P., Langenhoff, A., Almeida, CMR, Felis, E., ... & Fatta-Kassinos, D. (2019). Desempeño de los métodos de tratamiento secundario de aguas residuales para la eliminación de contaminantes de preocupación emergente implicados en la absorción de cultivos y la propagación de la resistencia a los antibióticos: una revisión. *Ciencia del Medio Ambiente Total*, 648, 1052-1081. <https://doi-org.ezproxy.uan.edu.co/10.1016/j.scitotenv.2018.08.130>

Kumar, A., Bisht, B. S., Joshi, V. D., & Dhewa, T. (2011). Review on bioremediation of polluted environment:: A management tool. *International journal of environmental sciences*, 1(6), 1079.

Leitão, I., Martins, L. L., Carvalho, L., Oliveira, M. C., Marques, M. M., & Mourato, M. P. (2021). Acetaminophen Induces an Antioxidative Response in Lettuce Plants. *Plants*, 10(6), 1152. <https://doi.org/10.3390/plants10061152>

Li, X., Jiang, J., Gu, L., Ali, S. W., He, J., & Li, S. (2008). Diversity of chlorpyrifos-degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated samples. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62(4), 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.03.001>

Li, X., Peng, D., Zhang, Y., Ju, D., & Guan, C. (2020). *Klebsiella* sp. PD3, a phenanthrene (PHE)-degrading strain with plant growth promoting properties enhances the PHE degradation

and stress tolerance in rice plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110804.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110804>

Lopes, R., Cerdeira, L. T., Fernandes, M. R., Pérez-Chaparro, P. J., McCulloch, J. A., & Lincopan, N.

(2017). Draft genome sequence of a CTX-M-15-producing endophytic *Klebsiella pneumoniae*

ST198 isolate from commercial lettuce. *Journal of global antimicrobial resistance*, 10,

19-20 <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.03.005>

Luka, Y., Highina, B. K., & Zubairu, A. (2018). Bioremediation: A solution to environmental

pollution-a review. *Am J Eng Res*, 7(2), 101-109.

Ma, D., Yi, H., Lai, C., Liu, X., Huo, X., An, Z., ... y Yang, L. (2021). Revisión crítica de los procesos

de oxidación avanzada en el tratamiento de aguas residuales orgánicas. *Quimiosfera*, 275,

130104. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130104>

Maier, RM y Pepper, IL (2015). Crecimiento bacterial. En *Microbiología ambiental* (págs. 37-56).

Prensa Académica. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>

Montes-Grajales, D., Fennix-Agudelo, M., & Miranda-Castro, W. (2017). Occurrence of personal care

products as emerging chemicals of concern in water resources: A review. *Science of the Total*

Environment, 595, 601-614. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.286>

Moreno-González, R., Rodriguez-Mozaz, S., Gros, M., Barceló, D., & León, V. M. (2015). Seasonal

distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal

lagoon (SE Spain). *Environmental research*, 138, 326-344. DOI: 10.1016/j.envres.2015.02.016.

Natarajan, R., Saikia, K., Ponnusamy, S. K., Rathankumar, A. K., Rajendran, D. S., Venkataraman, S.,

... & Vaidyanathan, V. K. (2022). Understanding the factors affecting adsorption of

pharmaceuticals on different adsorbents—A critical literature update. *Chemosphere*, 287,

131958. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131958>

Newman, L. A., & Reynolds, C. M. (2005). Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic

bacteria in plants. *Trends in Biotechnology*, 23(1), 6-8. DOI: 10.1016 / j. tibtech.2004.11.010

- Nieto-Juárez, J. I., Torres-Palma, R. A., Botero-Coy, A. M., & Hernández, F. (2021). Pharmaceuticals and environmental risk assessment in municipal wastewater treatment plants and rivers from Peru. *Environment International*, 155, 106674. DOI: 10.1016/j.envint.2021.106674.
- Ofori, S., Puškáčová, A., Růžičková, I., & Wanner, J. (2021). Treated wastewater reuse for irrigation: Pros and cons. *Science of The Total Environment*, 760, 144026. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144026>
- Ouarts, N., Djeribi, R., Boukachabia, A., Mena, F., Gasmi, K., Akacem, D., & Rouabhia, M. (2019). In vitro Biodegradation of Gliclazide by *Aeromonas hydrophila* and *Serratia odorifera* Bacteria. *Environmental Engineering Science*, 36(6), 643-649. <https://doi.org/10.1089/ees.2018.0224>
- Paracetamol Market Research Report [2022–2028] | Industry. Available online: <https://www.globenewswire.com/en/newsrelease/2022/02/15/2384836/0/en/Paracetamol-Market-Research-Report-2022-2028-Industry-Size-Share-Growth-RateBusiness-Strategies-Industry-Revenue-Opportunities-Future-Trends-Leading-Players-Update-Analysis-and-Fo.html>
- 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*, 72, 3-27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- Ponce-Robles, L., Benelhadj, L., García-García, A. J., Pedrero-Salcedo, F., Nortes-Tortosa, P. A., Albacete, J., & Alarcón, J. J. (2022). Risk assessment for uptake and accumulation of pharmaceuticals by baby leaf lettuce irrigated with reclaimed water under commercial agricultural activities. *Journal of Environmental Management*, 324, 116321. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116321>
- Rastogi G, Sbdio A, Tech JJ, Suslow TV, Coaker GL, et al. (2012) Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *ISME J* 6: 1812–1822. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.32>

- Riemenschneider, C., Al-Raggad, M., Moeder, M., Seiwert, B., Salameh, E., & Reemtsma, T. (2016). Pharmaceuticals, Their Metabolites, and Other Polar Pollutants in Field-Grown Vegetables Irrigated with Treated Municipal Wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(29), 5784–5792. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01696>
- Rizzo, L., Fiorentino, A., Grassi, M., Attanasio, D., & Guida, M. (2015). Advanced treatment of urban wastewater by sand filtration and graphene adsorption for wastewater reuse: Effect on a mixture of pharmaceuticals and toxicity. *Journal of environmental chemical engineering*, 3(1), 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.11.011>
- Rodriguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., & Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323, 361–380. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.106>
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 1-9. DOI: 10.1111 / j.1574-6968.2007. 00918.x
- Schulz, B. (2006). What are endophytes? In ‘Microbial root endophytes’.(Eds BJE Schulz, CIC Boyle, TN Sieber) pp. 1–13.
- Singh S, Kumar GV (2016) Biodegradation and bioremediation of pollutants: perspectives, strategies and applications. *Int J Pharmacol Bio Sci* 10(1):53–65
- Szőköl, J., Rucká, L., Šimčíková, M., Halada, P., Nešvera, J., & Pátek, M. (2014). Induction and carbon catabolite repression of phenol degradation genes in *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus jostii*. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(19), 8267-8279. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5881-6>
- Sungur, Ş. (2022). Pharmaceutical and personal care products in the environment: occurrence and impact on the functioning of the ecosystem. In *Emerging Contaminants in the Environment* (pp. 137-157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85160-2.00009-3>

- Teplitski M, Warriner K, Bartz J, Schneider KR (2011) Untangling metabolic and communication networks: interactions of enterics with phytobacteria and their implications in produce safety. *Trends Microbiol* 19: 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.11.007>
- Tétard-Jones, C., & Edwards, R. (2016). Potential roles for microbial endophytes in herbicide tolerance in plants. *Pest Management Science*, 72(2), 203-209. <https://doi.org/10.1002/ps.4147>
- Tiwari, B., Sindhu, V., Mishra, A. K., & Singh, S. S. (2020). Carbon Catabolite Repression of Methyl Parathion Degradation in a Bacterial Isolate Characterized as a *Cupriavidus* sp. LMGR1. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231(7), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04715-7>
- UNESCO. (2020). The United Nations World Water Development Report 2020: Water and Climate Change. <https://www.unwater.org/publications/world-water-development-report-2020/>
- Wadhah, H. (2018). Edrees., et al. “Biodegradation of Paracetamol by Native Bacterial Strains Isolated from Yemeni Pharmaceutical Wastewater Plant in Sana’a”. *Chronicles of Pharmaceutical Science*, 2, 512-522.
- Wu, X., Conkle, J. L., & Gan, J. (2012). Multi-residue determination of pharmaceutical and personal care products in vegetables. *Journal of chromatography. A*, 1254, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.041>
- Wu, X., Conkle, J. L., Ernst, F., & Gan, J. (2014). Treated wastewater irrigation: uptake of pharmaceutical and personal care products by common vegetables under field conditions. *Environmental Science & Technology*, 48(19), 11286–11293. <https://doi.org/10.1021/es502868k>
- Zengin, G., Uysal, A., Gunes, E., & Aktumsek, A. (2014). Survey of phytochemical composition and biological effects of three extracts from a wild plant (*Cotoneaster nummularia* Fisch. et Mey.): A potential source for functional food ingredients and drug formulations. *PloS one*, 9(11), e113527. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113527>

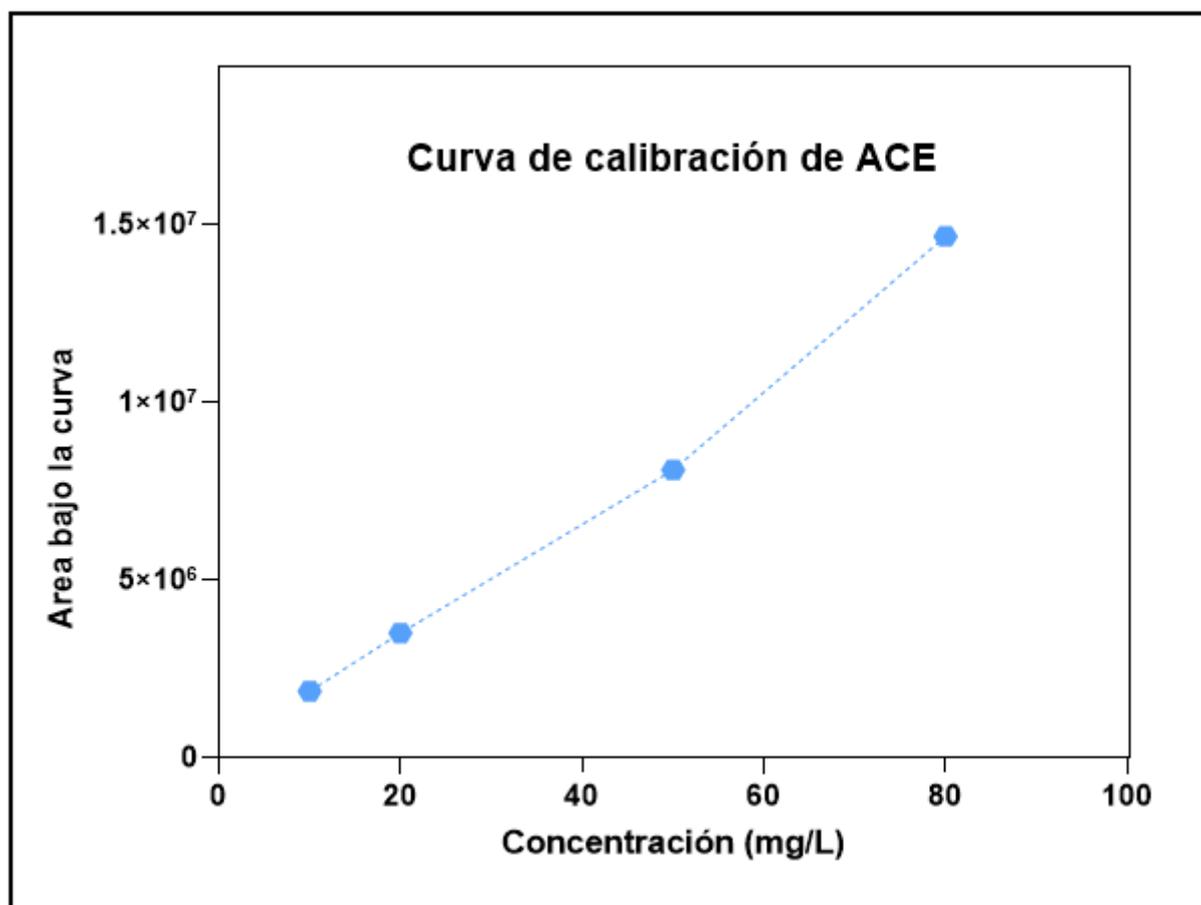
Zhang, L., Hu, J., Zhu, R. et al. (2013). Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 3687–3698 DOI: 10.1007/s00253-012-4170-5

Żur, J., Wojcieszynska, D., Hupert-Kocurek, K., Marchlewicz, A., & Guzik, U. (2018). Paracetamol–toxicity and microbial utilization. *Pseudomonas moorei* KB4 as a case study for exploring degradation pathway. *Chemosphere*, 206, 192-202. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.179>.

ANEXOS

ANEXO 1. Curva de calibración de ACE para el seguimiento de su concentración por HPLC.

Rango de cuantificación de 10 mg/L a 80 mg/L.



ANEXO 2. Secuencias de consenso para la identificación de las cepas L1cp y L2cp.

Secuencia consenso L1cp - *Klebsiella* sp

TCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCRGTCSRGCCGGKARCWCARAGGAG
MYTGCTCTCRGGTGAYRARCTGGMGGAMGGGTGRGKAATGWCTGGKMAASTGCMTSAT
GGCCCTTASGRGKAKRRCTACTGGAMACGGTAGCTAMWAYS GCATATACRWMGMRAGAS
CRAMSTSGSGAGASCWWGCGGRCTCATRMMRTMWGWYGTAGYCCRGATKGGAKTAG
CTAGYARSTSGGGTAMTGGCTCAYSWAGKCGRMGATCSCTAGCTRRTCKKAGAKSATGAM
YAGCYACRSTGRATACTGWKMCACGGKCCCTGTASACWCKMCSGKMRCASCAGTGG
GGARTRGGTTGCAMAAKMRGYAGSWAGCCTGATG

Secuencia consenso L2cp - *Klebsiella pneumoniae*

GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTT
GACATCCAGAGAACTTAGCASAGAKAGCTTTGGTGCYYTCGGGWGACKAGCKGMGGAC
RGGTGMKKMATGKCTGTCGKMARCTGCSTGWTGTGAAATGKTGGGWTAASTMCYGSAA
ACGGTAGCKMATAACCGCWTAWCSTYKSWWGACCAAAGTGS GGKMC SKYCGGGMATC
AWGCCAKSAGAYGTGCCAGATGGGATWARCTGGAGKAAGGTGGGGTAATGRCGTCACC
TAGKCRWCGATGGCCCTWRCKRGTCTGAGAGGMTGACACACGTGCYACAMTGGMACTG
AKACAMRGWSMAGMSWCCTACGSGAGGCAGCARTGSGGAMCTMWTRMASWATGKGC
GYARKCCKGATKSGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAG
ATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG
GAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGC

Y etard-Jones, C., Edwards, R., 2016. Potential roles for microbial endophytes in herbicide tolerance in plants. *Pest Manag. Sci.* 72 (2), 203–209.