

EFFECTO DEL OZONO EN LA DEGRADACION DE DISOLUCIONES ACUOSAS DE OXACILINA

Effect of Ozone on Ooxacillin degradation in aqueous solutions

Danela Silva^b, Mayra Bataller^b, Eliet Veliz^b, Irán Hernández^b, Anabel Villa^a,

^a Laboratorio de Genética Toxicológica, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba

^b Dirección de Investigación, Desarrollo e Innovación. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) mayra.bataller@cnic.cu. La Habana, Cuba.

Recibido: 18 de junio de 2020.

Aceptado: 30 de septiembre de 2020.

RESUMEN

La presencia de compuestos farmacéuticos en fuentes de abasto de agua y en ecosistemas constituye riesgos potenciales con efectos negativos al medioambiente, y son denominados contaminantes emergentes. Los antibióticos reciben una atención especial por la ocurrencia de la resistencia bacteriana. La efectividad de la ozonización para su degradación es reconocida. Sin embargo, se debate la toxicidad de los subproductos de reacción. El objetivo del estudio fue establecer las condiciones de ozonización de disoluciones modelo de oxacilina para evaluar el efecto en la degradación, la actividad genotóxica y antimicrobiana de las muestras ozonizadas y proponer una alternativa de tratamiento de las aguas residuales industriales. Se aplicó un diseño experimental 2^3 con pH (7 y 12), tiempos de contacto (30 y 60 min) y concentración de ozono en el gas a la entrada ($\text{CO}_{3(g)}$: 70 y 100 mg/L). La oxacilina alcanzó una degradación de más del 97% en los dos primeros minutos de reacción y se generaron subproductos, que no se degradaron totalmente. Las muestras ozonizadas no presentaron actividad antimicrobiana, ni genotoxicidad por el test de Ames, y los valores de DQO y $\text{Abs}_{\text{UV}254}$ disminuyeron. Esto indicó que los subproductos se degradaron parcialmente y se transformaron en compuestos más oxidados, biodegradables e inocuos. Se propone para el tratamiento de las aguas residuales industriales las condiciones de operación de $\text{CO}_{3(g)}$: 70 mg/L, pH: 7-8 y 15 min de tiempo de contacto.

Palabras clave: Contaminantes emergentes; antibióticos; antibióticos β -lactámicos oxacilina; ozonización.

ABSTRACT

The presence of pharmaceutical compounds in sources of water supply and ecosystems constitutes potential risks with negative effects on the environment, they are called emerging pollutants. Antibiotics receive special attention for the occurrence of bacterial resistance. The effectiveness of ozonation for their degradation is recognized. However, the toxicity of reaction byproducts is debated. The objective of the study was to establish ozonation conditions of amoxicillin and oxacillin model solutions to evaluate the degradation, genotoxic and antimicrobial activity of the ozonized samples to propose an alternative treatment of industrial wastewater. Experimental design 2^3 was applied with pH (7 and 12), contact times (30 and 60 min) and ozone concentration in the inlet gas ($\text{CO}_{3(g)}$: 70 and 100 mg/L). Oxacillin reached more than 97% of degradation in the first two minutes of reaction and byproducts were generated, which were not completely degraded. The ozonated samples did not show antimicrobial activity and genotoxicity by the Ames test, and the COD and $\text{Abs}_{\text{UV}254}$ values decreased. This indicated that the byproducts were partially degraded and transformed into compounds more oxidized, biodegradable and harmless. For the treatment of industrial wastewater are proposed the operational conditions of $\text{CO}_{3(g)}$: 70 mg/L, pH: 7-8 with 15 min of contact time.

Keywords: Emerging contaminants; antibiotics; β -lactamic antibiotics; oxacillin; ozonation.

INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes (CE) en la mayoría de los casos son sustancias no reguladas a nivel internacional que han sido detectadas en descargas de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), en aguas superficiales y subterráneas, así como en el agua potable (Deblonde *et al.*, 2011; Gogoi *et al.*, 2018). No obstante, estos CE están sujetos a futuras regulaciones debido a sus efectos potencialmente negativos a la salud humana y a los ecosistemas (Schriks *et al.*, 2010; Hernando *et al.*, 2011; Stuart *et al.*, 2012).

De todos los CE los que han suscitado mayor preocupación y estudios en los últimos años son los fármacos y en particular los antibióticos (Kümmerer, 2009; Fatta-Kassinos *et al.*, 2011; Rivera-Utrilla *et al.*, 2013; Vázquez *et al.*, 2014). La presencia de estos en fuentes de aguas y sedimentos ha incrementado el fenómeno de la resistencia bacteriana con consecuencias desfavorables en particular para la salud humana (Kristiansson *et al.*, 2011; Huerta, 2013; Gothwal & Shashidhar, 2015). La resistencia a antibióticos, en la mayoría de los patógenos bacterianos prevalentes en la clínica humana, se ha convertido en un problema epidemiológico y de salud pública internacional. Como consecuencia, los antibióticos pueden resultar ineficaces y el tratamiento de las infecciones se dificulta cada vez más (Varol Saraçoğlu *et al.*, 2014; Hogerzeil *et al.*, 2018; OMS, 2018).

Para el control de los CE, en general, es necesario aplicar tratamientos seguros y avanzados para la disposición de las aguas residuales de diferentes procedencias, dado que estas constituyen una de las fuentes de origen de su presencia en los ecosistemas y fuentes hídricas (García-Gómez *et al.*, 2011; Rivera-Utrilla *et al.*, 2013; Michael *et al.*, 2013; Gadipelly *et al.*, 2014; Gogoi *et al.*, 2018). Entre los tratamientos sugeridos está la ozonización y los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs) que permiten una oxidación fuerte de compuestos recalcitrantes presentes en las aguas residuales convirtiéndolos en más oxigenados y biodegradables (Homem & Santos, 2011; Benitez *et al.*, 2013; von Gunten, 2018).

En este sentido, la Empresa Farmacéutica que produce antibióticos del grupo β -lactámicos en Cuba lleva a cabo un proceso inversionista en su PTAR. Dentro de este grupo está la oxacilina, que es objeto de estudio del presente trabajo. Este antibiótico tiene una reconocida aplicación terapéutica. Su estructura se muestra en la Figura 1.

Consecuentemente para la eliminación de antibióticos, en matrices acuosas, tanto la ozonización como los POAs han sido reconocidos como tratamientos eficientes (Belghadr *et al.*, 2014; Marcelino *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2017; Giraldo *et al.*, 2018; Norte *et al.*, 2018). El ozono en disoluciones acuosas puede reaccionar directamente por la vía molecular (predomina en condiciones ácidas a $\text{pH} < 4$) con sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas. También, puede reaccionar indirectamente (predomina en medio alcalino a $\text{pH} > 10$) debido a su descomposición en radicales OH^\cdot , que reaccionan inmediatamente con los solutos. Esta segunda vía de reacción es la que se encuentra presente en los POAs.

Se reporta la efectividad de estos procesos para los antibióticos β -lactámicos, pero se debate la toxicidad de los productos, intermedios y subproductos de la reacción, que permanecen después del tratamiento. Esto puede ser una limitante para su aplicación si no se define adecuadamente las condiciones de operación para su implementación y la extensión de la degradación.

En este sentido, los resultados de la ozonización de amoxicilina, cefalexina y ceftriaxon en disoluciones modelos (Norte *et al.*, 2018) mostraron más del 95 % de degradación de los fármacos y un 20 % de mineralización a $\text{pH}=7$ y 30 min de reacción. Para un agua residual industrial se indicó la degradación de la amoxicilina entre un 80 y 90 % con una reducción de la toxicidad en un 86%. Por otra parte, Kidak y Doğan (2018) obtuvieron, en su estudio, un 32% de mineralización y una alta toxicidad de los subproductos de la ozonización de la amoxicilina. En combinación con ultrasonido alcanzaron un 45 % de mineralización y reducir la toxicidad.

Sin embargo, no se han identificado reportes de estudios de la aplicación de la ozonización para la degradación de oxacilina. Se reportan la aplicación de otros tratamientos de oxidación y APOs con resultados favorables, pero presentan dificultades para su implementación tecnológica. Giraldo *et al.* (2015a; 2015b; 2018) estudiaron la eliminación de la oxacilina en matrices acuosas, así como la extensión de la degradación y los subproductos, aplicando los procesos de oxidación electroquímica, fotocátalisis con TiO_2 y foto-Fenton.

Estos autores lograron la eliminación total del antibiótico y su actividad antimicrobiana en los tratamientos referidos después 4, 120, 50 min, respectivamente. Con el primer tratamiento no hubo ninguna mineralización después de 8 horas. La demanda química de oxígeno (DQO) se redujo y la biodegradabilidad de las disoluciones se incrementó de 0,03 a 0,84 (Giraldo *et al.* 2015a). En el segundo proceso (Giraldo *et al.* 2015b) se observó una alta mineralización a los 480 min. Los mejores resultados fueron a pH=6,0 aplicando $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de TiO_2 con 150 W de potencia. También, Giraldo-Aguirre *et al.* (2018) evidenciaron la eficiencia del tratamiento de la oxacilina con Foto-Fenton a pH neutro. Aunque solo se alcanzó el 5% de mineralización, a los 480 min, la biodegradabilidad se incrementó significativamente. Esto indicó la formación de subproductos más biodegradables pero resistentes.

Por otra parte, Yabalak *et al.* (2017), respecto a la degradación de oxacilina en disoluciones, reportó altos porcentajes de eliminación de carbono orgánico total (76 %) a 100°C , 35 mM de H_2O_2 y 45 min de tratamiento. Además, las muestras tratadas no mostraron genotoxicidad y la actividad antimicrobiana fue reducida.

Teniendo en cuenta estas premisas el presente trabajo tiene como objetivos establecer las condiciones de ozonización para el tratamiento de disoluciones de oxacilina, evaluar el efecto del ozono en la degradación, así como en la genotoxicidad y la actividad antimicrobiana de las mezclas de subproductos de la ozonización y proponer una alternativa del tratamiento para las aguas residuales procedentes de la industria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Instalación experimental de laboratorio

Las ozonizaciones de las disoluciones de oxacilina se realizaron en una instalación experimental del Laboratorio de Tecnologías en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Se empleó una columna de burbujeo de 100 mL, en operación semicontinua, equipada con un difusor de vidrio poroso, toma muestra, entrada y salida de gas. La columna se acopló a un baño termostatado (FrigomixU-2, Alemania) para el control de la temperatura durante las ozonizaciones a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

La mezcla oxígeno-ozono se obtuvo de un equipo generador de ozono (AQOZO, Cuba) alimentado con oxígeno comprimido. El ozono residual en el gas, que no reaccionó, fue destruido catalíticamente a la salida de la columna. Se empleó un flujo de gas de 5 L h^{-1} y una concentración de ozono en el gas a la entrada de la columna ($\text{C}_{\text{O}_3(\text{g})}$): 70 y 100 mg L^{-1} . La concentración de ozono en el gas fue determinada a 256 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Pharmacia LKB, Reino Unido). Para su evaluación las muestras ozonizadas se tomaron a diferentes tiempos de tratamiento y en los frascos se burbujeó un flujo de nitrógeno durante un minuto para purgar el ozono disuelto y detener la reacción.

Preparación de las disoluciones modelo de oxacilina

En la preparación de las disoluciones modelo se empleó oxacilina con un 99,99 % de pureza, proporcionada por la Empresa Farmacéutica y agua ultrapura, con una concentración inicial

de 30 mg L^{-1} ($7,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Para el ajuste a $\text{pH}=7$ y 12 se añadió hidróxido de sodio (2%). En los experimentos a $\text{pH}=7$ controlado se prepararon las disoluciones empleando una solución tampón de fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4) y dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4).

Evaluación de la degradación de la oxacilina en las disoluciones ozonizadas

Para evaluar el tiempo de degradación de la oxacilina, sin la posible interferencia de subproductos, se desarrolló un experimento durante 5 min a $\text{pH}=7$ controlado utilizando una disolución tampón y concentración de ozono en el gas a la entrada de la columna de 70 mg L^{-1} . El muestreo se realizó a cortos intervalos de tiempo de 0,5; 1; 2 y 5 min. Para evaluar bajo estas condiciones experimentales la vía del mecanismo de reacción, molecular o radicalico, se añadió t-butanol que actúa como captor de radicales OH^\cdot .

Evaluación de la degradación de los subproductos

Para evaluar la degradación de los subproductos generados en las disoluciones ozonizadas de oxacilina se realizó un diseño experimental 2^3 . Se analizó el efecto en la degradación debido a los factores (variables independientes): concentración de ozono en el gas a la entrada de la columna (70 y 100 mg L^{-1}), tiempo de contacto (15 y 30 min) y pH (7 y 12 inicial ajustado y no controlado).

Determinaciones para el seguimiento de la degradación de oxacilina y los subproductos

La determinación de las concentraciones de oxacilina y el seguimiento de la presencia de subproductos se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) según los diferentes tiempos de retención y las áreas de los picos registrados en los cromatogramas. El sistema CLAR marca Shimadzu empleado está compuesto por una bomba LC-20AD, un inyector automático Autosampler SIL-20A con *loop* de $100 \mu\text{L}$, un detector UV-Vis de longitud de onda variable SPD-20^a, una interfase CBM-20A con el programa LCsolution (ShimadzuCorp). En la Tabla 1 se presentan las condiciones cromatográficas.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de las muestras ozonizadas

Un aspecto importante en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con antibióticos es la eliminación de la actividad antimicrobiana residual, ya que contribuye a la proliferación de bacterias resistentes (Giraldo-Aguirre *et al.*, 2018). En este sentido, las muestras ozonizadas fueron evaluadas en el Laboratorio de Microbiología del CNIC.

Se determinó la actividad antimicrobiana a través de la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 hacia las disoluciones tratadas. Este microorganismo fue escogido debido a que presenta una respuesta adecuada a bajas concentraciones de antibióticos. Se

utilizó el método de difusión en agar (Palominos *et al.*, 2009). La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el halo de inhibición, que se genera, dada la difusión del antibiótico en el agar no permitiendo el crecimiento del microorganismo. La disminución del halo de inhibición indica una reducción de la actividad antimicrobiana.

Primeramente, se llenaron las placas Petri con el agar Mueller Hinton con unos 30 mL de medio de cultivo e incubadas a 37°C durante 24h para comprobar la efectividad de la esterilización y pureza del medio de cultivo. Pasado este tiempo se preparó el inóculo de 0,5 McFarland de un cultivo puro con 18 h de crecimiento utilizando el equipo DIRAMIC-10 (Cuba). Este inóculo se diluyó hasta una concentración de 5×10^5 UFC mL⁻¹ que fue la utilizada para la siembra en placa, según el procedimiento que se muestra en la Figura 2.

En las placas con agar una vez inoculadas se horadó un orificio de 3 mm de diámetro evitando llegar al fondo de la placa. En los orificios se inocularon 100 µL del inóculo y se incubaron a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se midió el diámetro del halo de inhibición generado.

Evaluación de la actividad genotóxica de las muestras ozonizadas

El estudio del potencial genotóxico de las muestras ozonizadas fue realizado mediante el Ensayo de Reversión Bacteriana en *Salmonella thyphimurium* (Salmonella / Microsoma) o Prueba de Ames en el Laboratorio de Genética Toxicológica del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Las cepas TA 98 y TA 100 de *Salmonella thyphimurium* fueron donadas por la Universidad Autónoma de México.

Como control negativo se empleó agua destilada estéril y como controles positivos se utilizaron los mutágenos directos e indirectos, reconocidos para este ensayo (Tabla 2). La fracción postmicrosomal S9 (sistema exógeno de activación metabólica) se preparó a partir de hígado de ratas Wistar machos de 200 g de peso tratadas con fenobarbital y benzonaftoflavona (Sigma, EE.UU.) (Gatehouse *et al.*, 1994; OECD Test No. 471, 1997; Mortelmans y Zeiger, 2000). La fracción S9 es uno de los componentes de la mezcla S9, que se explica más adelante.

Se evaluaron muestras de disoluciones de oxacilina ozonizadas bajo una concentración de ozono en el gas aplicada de 70 mgL⁻¹ a pH=7 inicial ajustado y no controlado denominadas según los tiempos de contacto como T0: 5 min, T1: 60 min, T2: 30 min y T3: 15 min. El ensayo de Ames se realizó dos veces y cada muestra ozonizada por triplicado. Por ejemplo, con la cepa TA 98 se utilizaron tres réplicas por cada muestra con y sin la mezcla S9 y en otro momento se repitió el ensayo con estas mismas condiciones. De igual manera se procedió con la cepa TA 100.

Se empleó el método de incorporación en placa (Gatehouse *et al.*, 1994; OECD Test No. 471, 1997; Mortelmans y Zeiger, 2000). En cada placa de medio mínimo Vogel Bonner E (VBE) se vertieron 2 mL de agar suave a los que se le incorporó previamente 0,1 mL del cultivo bacteriano, 0,1 mL de la muestra ozonizada y según el caso 0,5 mL de la mezcla S9.

En el momento del ensayo se preparó la mezcla S9 que contenía KCl 33 mM, MgCl₂ 2,8 mM, NADP 4 mM, Glucosa 6-fosfato 5 mM, un 4% de fracción S9 y tampón-fosfato de sodio 200 mM a pH 7,4. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h y al cabo de ese tiempo

se contó el número de colonias revertantes por placa (Maron y Ames, 1983; Gatehouse *et al.*, 1994; OECD Test No. 471, 1997; Mortelmans y Zeiger).

Un resultado positivo se define como un aumento en el número de colonias revertantes que supere por más de dos veces al obtenido en el control negativo (solvente), así como que muestre un incremento en el número de colonias revertantes en función de las muestras ozonizadas bajo diferentes tratamientos (valores de pH y tiempos de contacto) (Maron y Ames, 1983; Gatehouse *et al.*, 1994; OECD Test No. 471, 1997; Mortelmans y Zeiger, 2000).

Se aplicó el programa estadístico SALANAL versión 1.0 diseñado para el análisis de los resultados en el Ensayo de Ames. Permite calcular la significación estadística de las diferencias observadas entre las frecuencias promedios del control negativo y los tratamientos con ozono. Asimismo, valorar si los efectos observados mantienen una relación proporcional a dichos tratamientos.

Evaluación de otros indicadores de la degradación en las disoluciones ozonizadas

Para valorar la extensión de la degradación se determinaron los valores de la demanda química de oxígeno (DQO) de las muestras tratadas y sin tratar con ozono, según los Métodos Estándar (APHA, AWWA, WPCF, 2005). Así como, la determinación de los valores de la absorbancia UV a 254 nm se realizó utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (CINTRA-101, Australia).

Procesamiento estadístico de la data experimental

Las determinaciones se hicieron por triplicado. Para el procesamiento estadístico de los resultados se empleó el programa de computación Microsoft® Excel 2010 y el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ozonización de oxacilina a pH=7 controlado.

El muestreo se realizó a cortos intervalos de tiempo de 0,5, 1, 2 y 5 min para evitar la posible interferencia de subproductos. En la Figura 3 se observa que a pH=7 controlado sin adición del captor de radicales OH[·] a los 0,5 min de reacción se obtiene un 97% de degradación del antibiótico, según el límite de cuantificación del equipo. Cuando se añade el captor de radicales OH[·] este valor se alcanza a los 2 min. La tendencia de una mayor degradación en la condición sin t-butanol sugiere la formación de radicales OH[·] bajo esta condición experimental. Esto favorece la oxidación por vía radicalica que permite una mayor velocidad de reacción y que el compuesto de partida se degrade más rápido.

Por otra parte, en las Figuras 4 y 5 se muestran los correspondientes cromatogramas, donde se aprecian los picos registrados, que indican la degradación de la oxacilina y la formación de subproductos. En la disolución sin t-butanol los subproductos se detectan a partir de los 0,5 min de iniciada la ozonización y en con t-butanol al minuto de reacción. En ambos sistemas reaccionantes se observa la presencia de subproductos durante los 5 min de reacción evaluados.

Evaluación de la degradación de subproductos en las disoluciones ozonizadas

Para evaluar el efecto de la ozonización en la degradación de los subproductos generados se realizó un diseño experimental 2³. Se analizó el efecto de los factores: concentración de ozono en el gas a la entrada de la columna (C_{O₃g}): (70 y 100 mg/L), tiempo de contacto (15 y 30 minutos) y pH (7 y 12 inicial ajustado y no controlado).

En la Figura 6a) y b) aparecen los cromatogramas de la oxacilina a pH= 7 y 12 (inicial ajustado y no controlado) con tiempos de retención de 9,754 min y 7,773 min, respectivamente. Se observa el registro de un pico simétrico, que corresponde a un solo compuesto que no presenta interacción con la columna.

A partir del análisis de los cromatogramas presentados en las Figuras 7 y 8, como era esperado, no se detectó oxacilina para ambos pH a los 15 y 30 min de reacción. Se observó a pH=7 la presencia de tres compuestos o grupos de compuestos (picos registrados) los cuales no tienen una variación apreciable en su intensidad con el incremento del tiempo de ozonización.

Por otra parte, se apreció a pH=12 la formación de cuatro compuestos o grupos donde el pico de menor intensidad registrado a los 30 min no es detectado a los 60 min (Figura 8 b). El área de los picos de menor tamaño se reduce con el incremento del tiempo de reacción, aunque no varía de forma apreciable la intensidad del pico de mayor tamaño.

De manera general se observan varios picos, de los cromatogramas registrados, de menor tamaño y la formación de compuestos más polares ya que son más solubles en la fase móvil (polar) y menos retenidos en la columna cromatográfica (apolar). Esto se puede inferir por los tiempos menores de retención obtenidos respecto a la oxacilina. Por la intensidad de los picos registrados se evidencia que estos corresponden con subproductos de la ozonización, además al no ser simétricos sugiere la existencia una mezcla de compuestos.

Este comportamiento puede atribuirse a que el ozono ataca preferentemente a los sitios con dobles enlaces, así como a los anillos aromáticos. En el caso de la presencia de compuestos con menor tiempo de retención, puede estar asociado al ataque a los heteroátomos (N y S) y a los tres grupos de nitrógeno, provocando la fragmentación de la oxacilina y la obtención de varios picos en el cromatograma, los cuales pueden coexistir. Para una concentración de ozono a la entrada de 100 mg/L, para iguales intervalos de pH y tiempos de contrato, se observó un comportamiento similar al descrito para 70 mg/L.

Análisis del Diseño Experimental

Bajo las condiciones experimentales evaluadas no fue posible la identificación y determinación de la concentración de los subproductos. Por lo tanto, se procesó el valor del área total de los picos registrados en los cromatogramas, para cada condición experimental, y se consideró como la variable dependiente para la comprobación estadística del efecto de las variables independientes seleccionadas. En este sentido, el valor del área total de los picos se corresponde con el alcance de la degradación y eliminación de los subproductos de la ozonización.

La Figura 9 indica que, dentro del intervalo experimental, no se obtuvo una diferencia significativa del efecto de las variables seleccionadas en el valor del área total de los picos de los cromatogramas. Los subproductos en su degradación deben transformarse por la oxidación durante el proceso de ozonización en compuestos que no se degradan totalmente y

persisten al tratamiento. Además, se infiere que bajo las condiciones experimentales aplicadas no se logra una alta mineralización después de la ozonización. Por lo que los subproductos que se generan y transforman durante el tratamiento tributan a que el valor del área total de los picos registrados no disminuya significativamente.

Este resultado se corresponde con lo reportado en varios estudios de tratamiento de la oxacilina con otros POAs. Giraldo-Aguirre *et al.* (2018) solo logran una mineralización del 5% a 480 min aplicando foto-Fenton a pH neutro, aunque lograron disminuir la actividad antimicrobiana e incrementar la biodegradabilidad de 0,08 a 0,98 de las matrices. Respecto a la oxidación electroquímica no hubo ninguna mineralización después de 8 horas, pero la DQO se redujo un 70% y la biodegradabilidad incrementó de 0,03 a 0,84 (Giraldo *et al.*, 2015a).

Por otra parte, Norte *et al.* (2018) en la ozonización de de antibióticos β -lactámicos, alcanza una reducción de los fármacos del 95%, pero solo una mineralización del 10 a 20% en disoluciones acuosas. Estos resultados reportados indican la presencia de subproductos del fármaco degradado después de los tratamientos aplicados dada la baja mineralización en general que se obtiene. Además, que se logran matrices con subproductos que son más biodegradables y la actividad antimicrobiana disminuye o se elimina.

Dada la presencia de subproductos de ozonización, en el presente estudio, y para tener un criterio general de la extensión de la degradación se evaluó en las disoluciones ozonizadas de oxacilina: la actividad antimicrobiana y genotóxica, el seguimiento del pH, los valores de la absorbancia UV a 254 nm y de la DQO.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de las muestras ozonizadas

La actividad antimicrobiana de las disoluciones de oxacilina ozonizadas fue evaluada mediante el valor del diámetro del halo de inhibición generado. La Tabla 3 muestra los resultados de las muestras de las disoluciones sin tratar y tratadas aplicando una concentración de ozono en el gas de 70 mg L⁻¹, a diferentes tiempos de ozonización, bajo los pH=7 y 12 inicial ajustado y no controlado.

Se observó la no formación de halo de inhibición alrededor de la zona cargada con disoluciones de muestras ozonizadas de oxacilina. Esto demuestra la eliminación de la actividad antimicrobiana bajo las condiciones experimentales evaluadas. Se evidenció que en las matrices tratadas no hay presencia del antibiótico y que los subproductos generados de la oxidación no presentan actividad antimicrobiana.

La eliminación de la actividad antimicrobiana puede estar relacionada con las transformaciones estructurales de la oxacilina y los subproductos durante el proceso de ozonización. Por lo tanto, los resultados sugieren que el tratamiento propuesto transforma la oxacilina en productos que tienen modificaciones en el anillo β -lactámico, responsable de esta actividad (Giraldo *et al.*, 2015b). Esto indica que la ozonización, bajo las condiciones aplicadas, eliminó eficientemente la actividad farmacéutica de la oxacilina, y de aquellos subproductos de reacción que pudieran tenerla. En consecuencia, se elimina el riesgo asociado a la proliferación de bacterias resistentes debido a la entrada segura en ambientes acuáticos de matrices acuosas sin efectos antimicrobianos.

Evaluación de la absorbancia UV a 254 nm y la DQO

Se realizaron mediciones de la absorbancia UV a 254 nm (Abs_{254}) a los 30 min de ozonización. En la Tabla 4 se observa que para ambas concentraciones de ozono en el gas existe una disminución del valor de Abs_{254} en las muestras de disoluciones de oxacilina ozonizadas. Esto sugiere una disminución de la presencia de anillos aromáticos y compuestos insaturados durante el proceso de oxidación aplicando ozono (Norte *et al.*, 2018; Chávez *et al.*, 2019), lo cual se favorece a valores de pH=12 donde se alcanzan mayores porcentajes de reducción de este indicador.

Se alcanzó un 60,4% y un 80,5% de reducción de la DQO para el pH=7 y 12, respectivamente, en las muestras de disoluciones de oxacilina ozonizadas durante 30 min. Estos resultados indican la degradación y transformación del antibiótico y los subproductos generados en compuestos más oxidados y biodegradables, así como una degradación de compuestos orgánicos. Los valores de DQO se muestran en la Tabla 5.

Seguimiento del pH durante la ozonización

Los subproductos de la ozonización presentan mayores estados de oxidación en función de la dosis de ozono aplicada, comúnmente pueden ser oxidados hasta la obtención de ácidos carboxílicos. En la Tabla 6 se presenta la variación del pH durante la ozonización de disoluciones de oxacilina durante diferentes tiempos de contacto, concentración de ozono de 70 mg L⁻¹ a pH=7 y 12 inicial ajustado y no controlado.

En las disoluciones a pH=7 inicial el valor disminuyó hasta 4,45 a los 30 min de ozonización. Este comportamiento puede estar asociado a la formación de ácidos debido a la reacción de oxidación de la oxacilina, es decir, la formación de grupos carboxílicos en productos de transformación del fármaco. Estos resultados corroboran, como se ha planteado, que el sistema es capaz de transformar el antibiótico en compuestos orgánicos más oxidados, y que son recalcitrantes a la acción de la ozonización bajo las condiciones experimentales aplicadas. Este resultado se reporta por Giraldo-Aguirre *et al.* (2018) en el tratamiento de oxidación de oxacilina, bajo un POA aplicando foto-Fenton cerca del pH neutro.

Por otra parte, la disolución con pH inicial básico (pH=12) muestra un decrecimiento leve en su valor. La adición del hidróxido de sodio para ajustar la disolución al parecer provoca un efecto buffer en la disolución, lo que posibilita que el pH se mantenga relativamente estable ante las transformaciones ocurridas en la matriz acuosa.

Evaluación de la actividad genotóxica de las muestras ozonizadas

Para la evaluación de muestras ozonizadas bajo las condiciones experimentales referidas y denominadas T0: (5min), T1: (60min), T2: (30min) y T3: 15 (min) se emplearon las cepas TA 98 y TA 100. Estas cepas detectan mutaciones por adiciones o deleciones de bases y mutaciones por sustitución de pares bases respectivamente. Como se ha explicado el ensayo de Ames se realizó dos veces y cada muestra ozonizada por triplicado. Los resultados se muestran en las Figuras 10 y 11 indicando los valores promedio del número de colonias revertantes por placa con la desviación estándar para las muestras ozonizadas y los controles.

Se consideró como resultado de mutagenicidad positivo el aumento en el número de colonias revertantes que supere por más de dos veces la frecuencia de reversión del control negativo y que muestre un incremento en función de las muestras ozonizadas. Los resultados obtenidos

en este estudio evidenciaron que no hubo incrementos significativos de la frecuencia de revertantes para las cepas evaluadas (Figuras 10 y 11).

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedios del número de colonias revertantes por placa de las muestras ozonizadas y el control negativo. Tampoco, fue evidente una respuesta positiva dependiente de las muestras ozonizadas bajo diferentes valores de tiempos de contacto aplicados, que definen diferentes dosis de ozono. Por lo que se considera que las muestras evaluadas no tienen actividad genética en las cepas estudiadas según las normativas internacionales, que establecen estos parámetros como definitorios para los ensayos de reversión bacteriana.

Se puede concluir que las muestras ozonizadas de disoluciones de oxacilina no son mutagénicas en las condiciones evaluadas. Este resultado es muy favorable para la propuesta de la ozonización, como tratamiento. En el presente trabajo, bajo las condiciones experimentales aplicadas, se logró degradar la oxacilina en tiempos cortos, pero no se alcanzó la degradación de los subproductos en su totalidad. Por lo tanto, la evaluación de la actividad genotóxica realizada fue un complemento importante del estudio.

Yabalak *et al.* (2017) reportaron que las muestras de disoluciones de oxacilina tratadas por oxidación, con agua subcrítica usando H_2O_2 , no mostraron ningún efecto genotóxico. La alerta de la toxicidad de subproductos de la ozonización de la amoxicilina fue realizada por Kidad y Doğan (2018) bajo sus condiciones de estudio. Sin embargo, Norte *et al.* (2018) lograron una disminución del 86% de la toxicidad en muestras ozonizadas de aguas residuales industriales con presencia de antibióticos β -lactámicos, entre estos la amoxicilina.

No obstante, se recomienda como estrategia realizar una evaluación de la actividad genotóxica, en estudios previos, a las propuestas de tratamiento con ozono para aguas residuales industriales, así como a las aguas tratadas antes de su disposición final.

Propuesta de la alternativa de tratamiento con ozono y reactor para aguas residuales

Como se ha podido constatar la ozonización de disoluciones modelos de oxacilina indicó que en los primeros antes de los cinco minutos de reacción se logra una eliminación total del fármaco. Respecto a los subproductos se verificó la formación y permanencia en los tiempos evaluados de tratamiento. Sin embargo, al ser demostrada la no genotoxicidad, la eliminación de la actividad antimicrobiana, así como la disminución de los valores de DQO y Abs_{UV254} de las muestras de las disoluciones ozonizadas se propone emplear 15 min para el tratamiento con ozono de las aguas residuales reales.

Este tiempo resulta tres veces superior al valor en que se logra la degradación total de la oxacilina, por lo que debe garantizar que el efluente industrial no contenga concentraciones del antibiótico. Además, se tiene en cuenta el aumento de la demanda de ozono al tratar las aguas residuales reales, que poseen otros compuestos procedentes del proceso productivo.

También, dado los resultados alcanzados se propone ozonizar al pH de las aguas residuales de la Empresa Farmacéutica con valores entre 7 y 8. Esto garantizará un menor costo de operación al no emplear reactivos químicos y sistemas de dosificación. En cuanto a la concentración de ozono en el gas se recomienda aplicar 70 mg L^{-1} . No obstante, las condiciones de ozonización deben ser ajustadas en la práctica durante la implementación tecnológica del proceso de tratamiento. Se recomienda que las aguas residuales industriales

sean debidamente segregadas para una mejor caracterización y control del tratamiento propuesto.

Se propone para el tratamiento de las aguas residuales industriales, diseñar y emplear, como reactor una columna de burbujeo dentro de un sistema de ozonización compacto y automatizado. Estas son muy utilizadas para sistemas gas-líquido. Además, pueden lograr valores eficientes de transferencia de masa, flexibilidad en los tiempos de contacto, bajo costo de mantenimiento y operación.

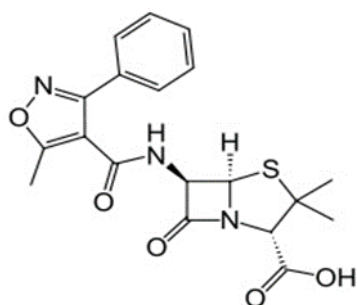


Fig 1. Estructura de la oxacilina.

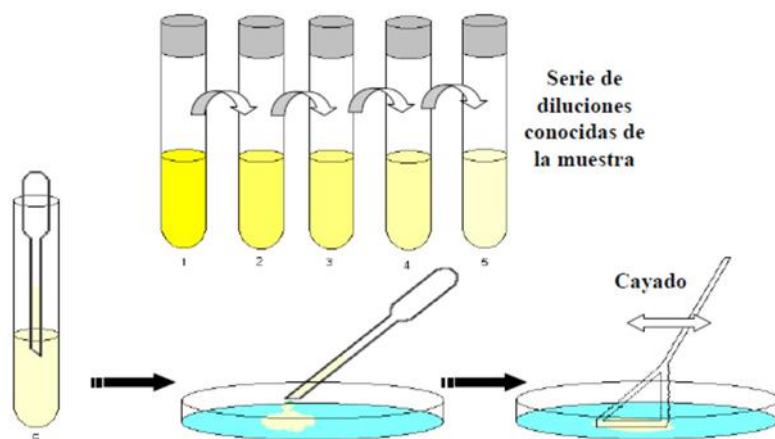


Fig. 2. Procedimiento para la siembra del microorganismo y extensión en superficie con espátula Drigalski.

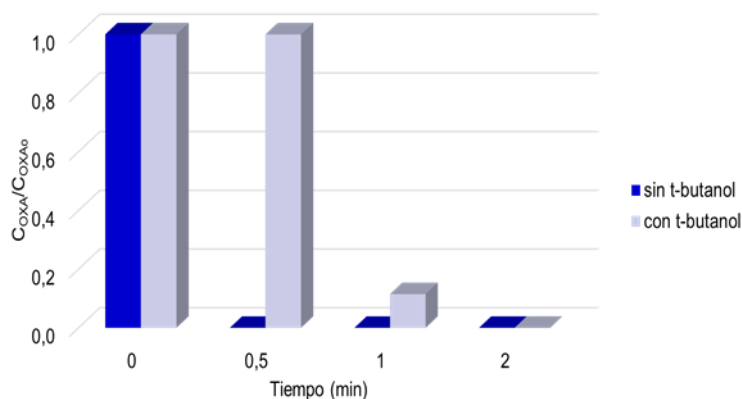


Fig. 3. Variación de la concentración de oxacilina. ($\text{CO}_3(\text{g})$: 70 mg L⁻¹, pH=7 controlado, sin y con t-butanol)

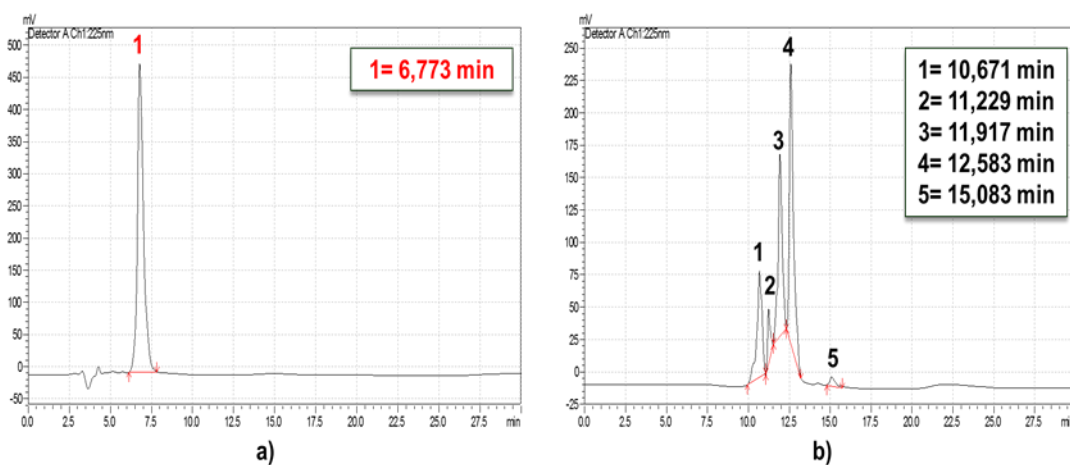


Fig. 4. Cromatogramas de ozonización de la disolución de oxacilina sin t-butanol. ($\text{CO}_3(\text{g})$: 70 mg L⁻¹, pH=7 controlado, tiempo de contacto; a) 0 min, b) 0,5 min)

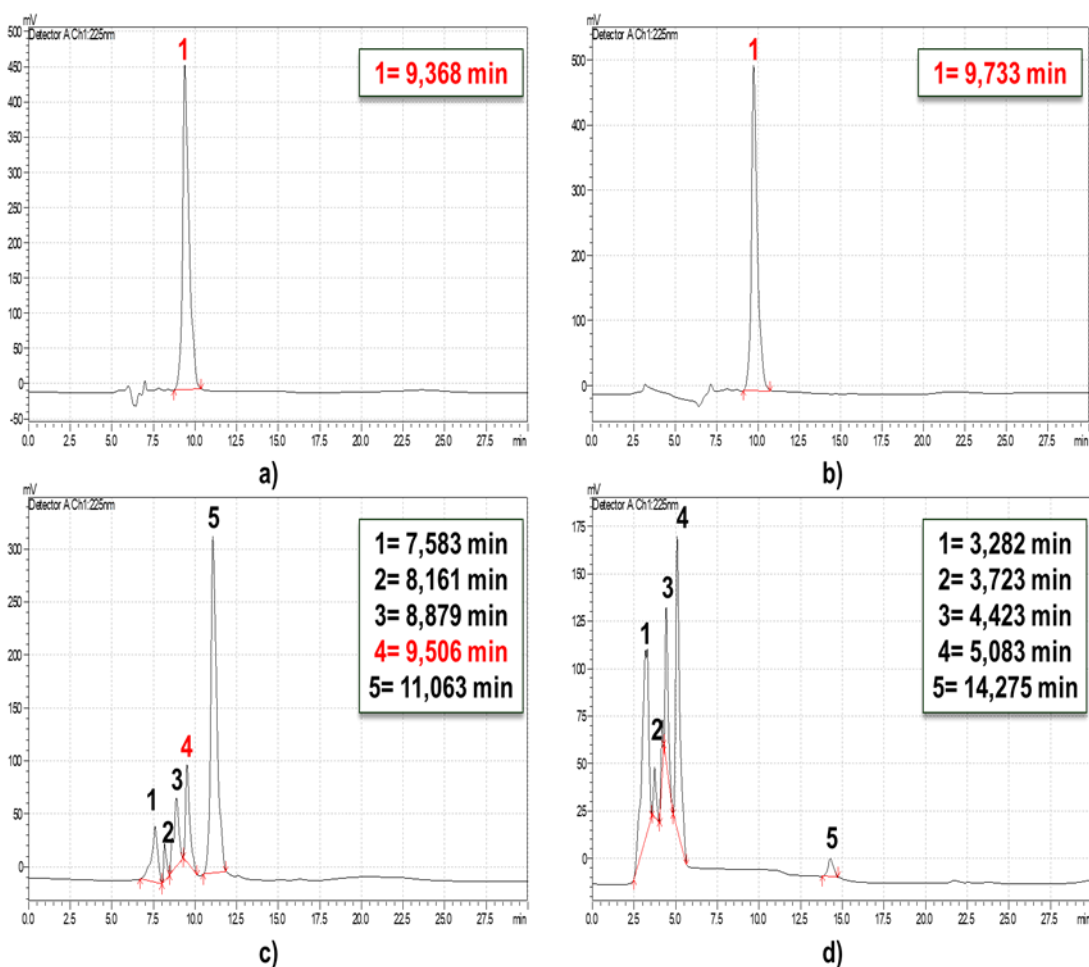


Fig. 5. Cromatogramas de ozonización de la disolución de oxacilina con t-butanol ($\text{CO}_3(\text{g})$: 70 mg L⁻¹, pH=7 controlado, tiempo de contacto: a) 0 min, b) 0,5 min, c) 1 min, d) 2 min)

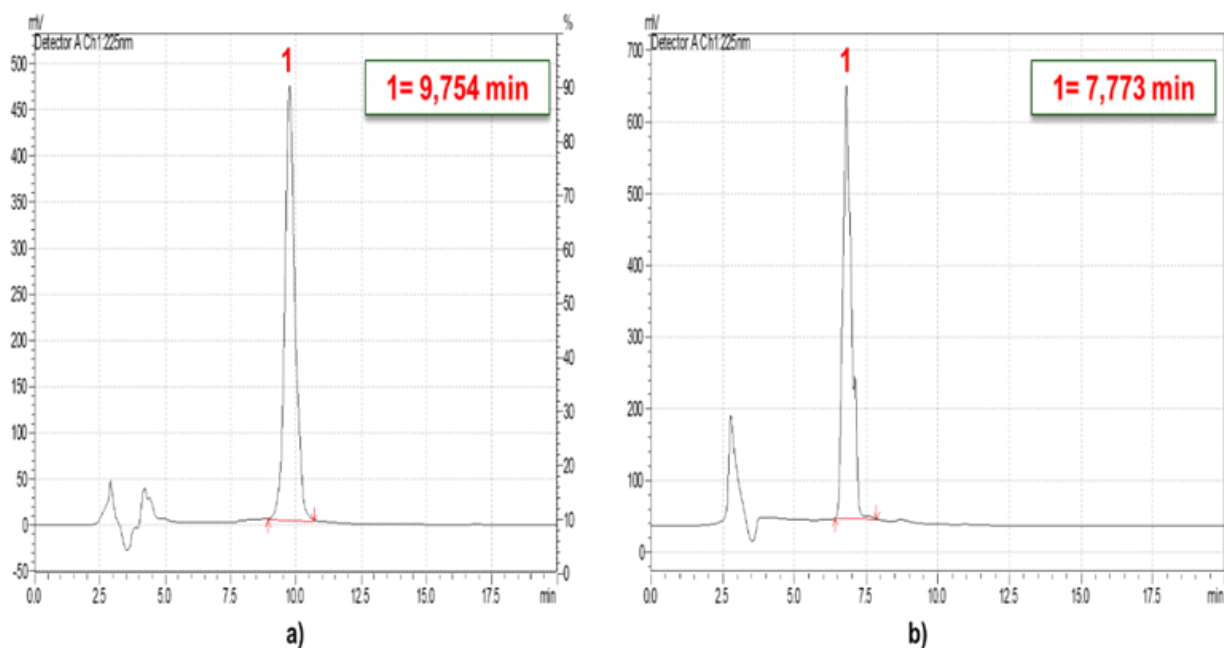


Fig. 6. Cromatogramas de ozonización de la disolución de oxacilina a) pH=7, b) pH=12. (CO₃g: 70 mg L⁻¹, tiempo de contacto: 0 min).

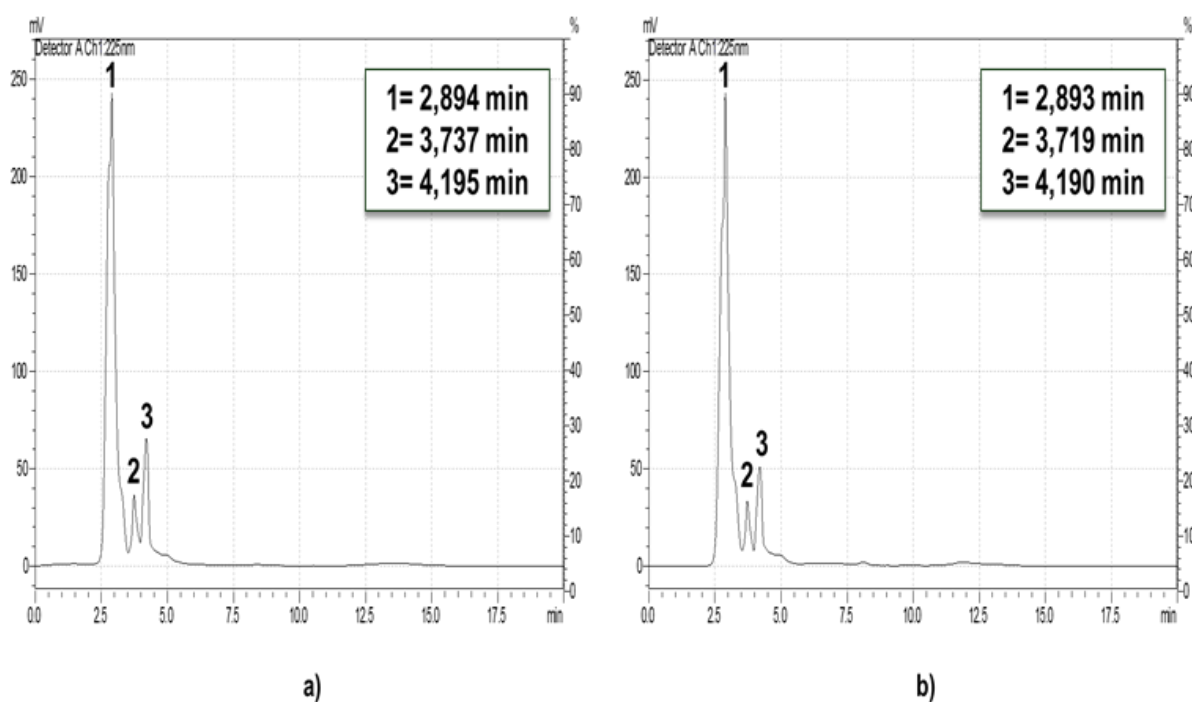


Fig. 7. Cromatogramas de ozonización a pH=7 inicial ajustado y no contralado. (CO₃g 70 mg L⁻¹: a) 15 min, b) 30 min).

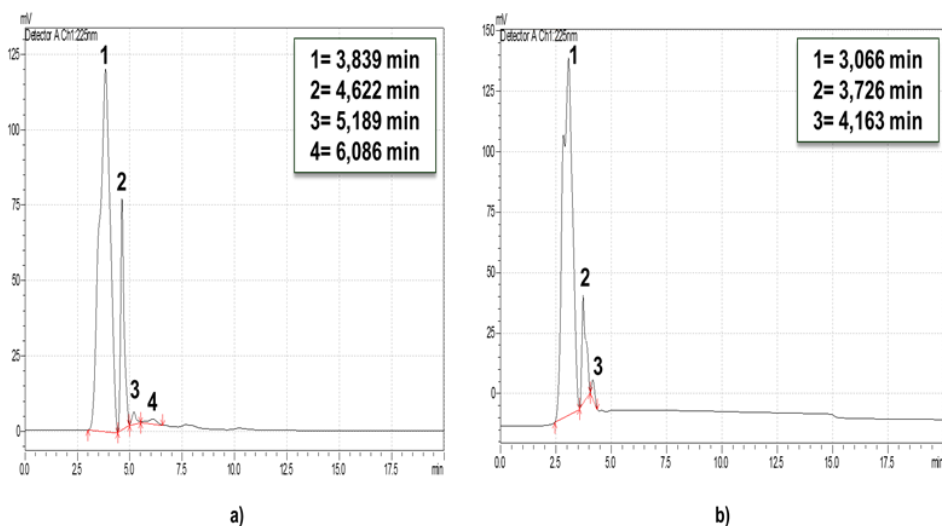


Fig. 8. Cromatogramas de ozonización para pH 12 inicial ajustado y no contralado.
(CO₃g 70 mg L⁻¹: a) 15 min, b) 30 min).

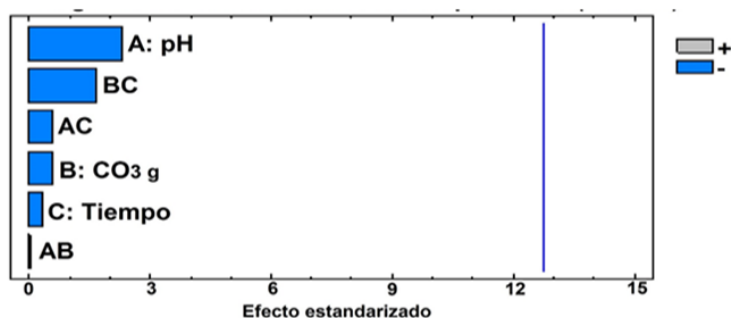


Fig. 9. Diagrama de Pareto. Evaluación del efecto en la reducción del área total de los subproductos debido a las variables pH (A): 7 y 12 ajustado y no controlado; Concentración de ozono en el gas (B): 70 y 100 mg/L; Tiempo de contacto (C): 15 y 30 minutos y las interacciones (AB) (BC) (AC).

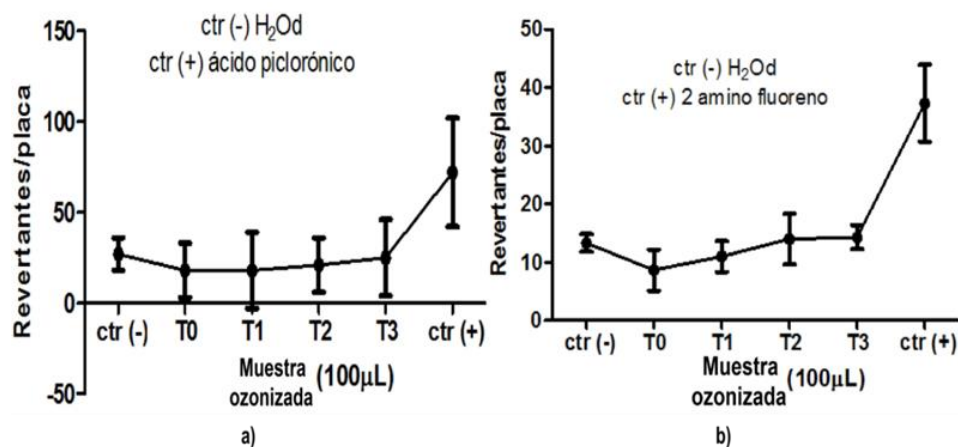
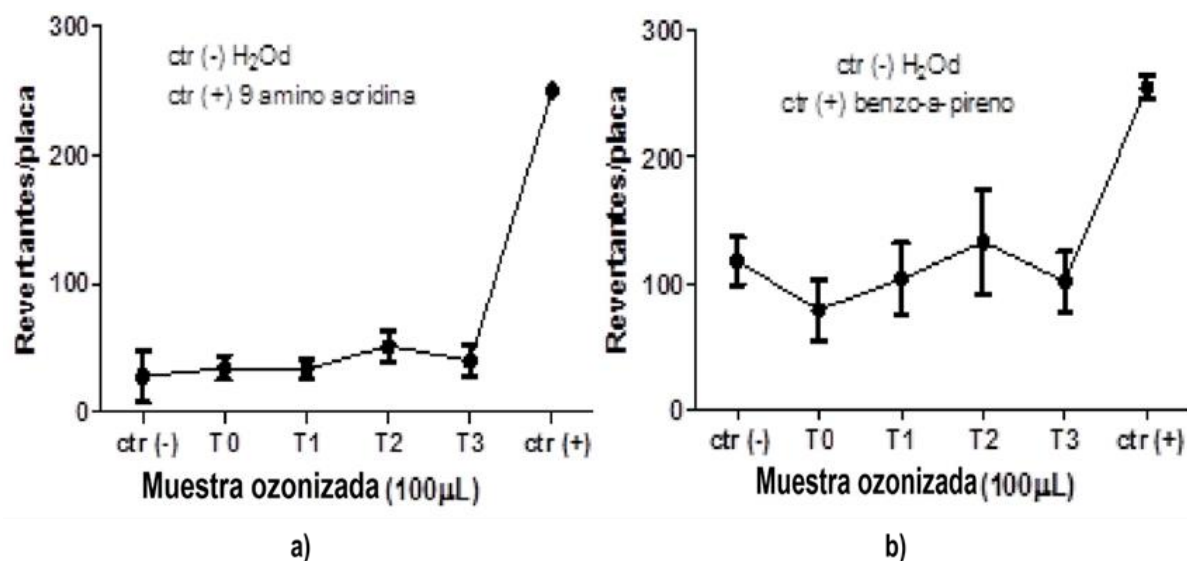


Fig. 10. Resultado de la exposición las muestras ozonizadas (T0-T3 100µL) frente a la cepa TA 98: a) con S9, b) sin S9**Fig. 11.** Resultado de la exposición las muestras ozonizadas (T0-T3 100µL) frente a la cepa TA 100: a) con S9, b) sin S9.**Tabla 1.** Condiciones cromatográficas empleadas por CLAR.

| Fase Móvil | Columna | Límite de cuantificación | Longitud de onda | Flujo |
|--|---------------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| KH ₂ PO ₄ (0,02 mol L ⁻¹) / acetonitrilo/metanol (64:27:9) (v/v) | RP C18 de 150 x 4,6 mm | 0,75 mg L ⁻¹ | 225 nm | 0,8 mL min ⁻¹ |

CLAR: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIBG)

Tabla 2. Cepas de *Salmonella typhimurium* y controles positivos empleados en el Test de Ames.

| Cepas | Controles positivos | |
|--------|--------------------------------|----------------------------------|
| | +S9 | -S9 |
| TA 98 | 2-amino-fluoreno (10 µg/placa) | Ácido picrolónico (100 µg/placa) |
| TA 100 | Benzo (a) pireno (2 µg/placa) | 9-amino-acridina (10 µg/ placa) |

+S9: con mezcla S9 (con activación metabólica); -S9: sin mezcla S9 (sin activación metabólica).

Tabla 3. Actividad Antimicrobiana a través de la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 hacia las disoluciones de oxacilina tratadas.

| Tiempo (min) | Diámetro del halo de inhibición (mm) | |
|---------------|--------------------------------------|------------|
| | pH 7 | pH 12 |
| 0 | 43,0 ± 5,3 | 15,0 ± 2,0 |
| 5, 15, 30, 60 | Sin halo | Sin halo |

Tabla 4. Efecto de la ozonización en los valores de la absorbancia UV a 254 nm.

| Tiempo (min) | CO _{3ge} (mg/L) | Reducción del valor de Abs _{254nm} (%) | |
|--------------|--------------------------|---|--------------|
| | | pH=7 | pH=12 |
| 30 | 70 | 50,27 ± 1,51 | 93,35 ± 2,30 |
| | 100 | 56,70 ± 1,82 | 94,87 ± 2,00 |

Tabla 5. Efecto de la ozonización en los valores de la DQO.

| Tiempo (min) | DQO (mg/L) | |
|--------------|------------|----------|
| | pH=7 | pH=12 |
| 0 | 207 ± 10 | 272 ± 14 |
| 30 | 82 ± 2 | 53 ± 1 |

Tabla 6. Variación del pH durante la ozonización de las disoluciones de oxacilina.

| Tiempo (min) | pH=7 | pH=12 |
|--------------|-------------|--------------|
| 0 | 7,00 ± 0,02 | 12,00 ± 0,05 |
| 5 | 5,30 ± 0,00 | 11,90 ± 0,00 |
| 15 | 4,60 ± 0,00 | 11,87 ± 0,00 |
| 30 | 4,45 ± 0,05 | 11,85 ± 0,06 |

CONCLUSIONES

Con la ozonización se obtuvo más del 97% de reducción de oxacilina a los dos minutos de reacción aplicando una concentración de ozono en el gas de 70 mg L⁻¹ de y pH=7 controlado. Las muestras ozonizadas no presentaron actividad antimicrobiana, ni genotoxicidad, así como los valores de DQO y Abs_{UV254} disminuyeron. Esto indicó que los subproductos que se generaron de la degradación de la oxacilina se transformaron en compuestos más oxidados e inocuos, aspecto favorable para la propuesta de tratamiento de oxidación con ozono. Se propone como alternativa de tratamiento para las aguas residuales industriales el empleo de una concentración de ozono en el gas a la entrada de 70 mg L⁻¹, pH entre 7 y 8 con 15 minutos de tiempo de contacto.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a la Empresa Farmacéutica por su colaboración en proporcionar la oxacilina y al CIGB por el empleo del CLAR.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- APHA, AWWA, WPCF. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, 21th Edition.
- Benitez, F.J., Acero, J.L., Real, F.J., & Roldán, G. (2013). The Effectiveness of Single Oxidants and AOPs in the Degradation of Emerging Contaminants in Waters: A Comparison Study. *Ozone: Science & Engineering*, 35(4), 263-272.
- Belghadr, I., Khorramabadi, G.S., Godini, H., & Almasian, M. (2014). The removal of the cefixime antibiotic from aqueous solution using an advanced oxidation process (UV/H₂O₂). *Desalination and Water Treatment*, 55(4), 1-8.
- Chávez, A.M., Gimeno, O., Rey, A., Pliego, G., Oropesa, A.L., & Álvarez, P.M. (2019). Treatment of highly polluted industrial wastewater by means of sequential aerobic biological oxidation-ozone based AOPs. *Chemical Engineering Journal*, 361, 89-98.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C. & Hartemann, P. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. (2011). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214:442-8.
- Fatta-Kassinos, D., Meric, S., & Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: Current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(2), 251-270.
- Gadipelly, C., Pérez-González, A., Yadav, G.D., Ortiz, I., Ibáñez, R., Rathod, V.K., & Marathe, K.V. (2014). Pharmaceutical Industry Wastewater: Review of the Technologies for Water Treatment and Reuse. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(29), 11571-11592.

- García-Gómez, C., Gortáres-Moroyoqui, P., & Drogui, P. (2011). Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción. *Química Viva*, 10(2), 96-105.
- Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., & *et al.* (1994). Report from the working group on bacterial mutation assays: International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Research*, 312(3), 217-233.
- Giraldo A.L., Erazo-Erazo E.D., Flórez-Acosta O.A., Serna-Galvis E.A., & Torres-Palma R.A. (2015a). Degradation of the antibiotic oxacillin in water by anodic oxidation with Ti/IrO₂ anodes: evaluation of degradation routes, organic byproducts and effects of water matrix components. *Chemical Engineering Journal* 279, (1), 103-114.
- Giraldo A.L., Erazo-Erazo E.D., Flórez-Acosta O.A., Serna-Galvis E.A., & Torres-Palma R.A. (2015b). TiO₂ photocatalysis applied to the degradation and antimicrobial activity removal of oxacillin: evaluation of matrix components, experimental parameters, degradation pathways and identification of organics by-products. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 31, 95–100.
- Giraldo-Aguirre, A.L., Serna-Galvis, E.A., Erazo-Erazo, E.D., Silva-Agreto, J., Giraldo-Ospina, H., Flórez-Acosta, O.A., & Torres-Palma, R.A. (2018). Removal of β -lactam antibiotics from pharmaceutical wastewaters using photo-Fenton process at near-neutral pH. *Environmental Science Pollution Research*, 25(21), 20293–20303.
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V.K., Chaminda, G.G., An, A.K., & Kumar, M. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, 6, 169-180.
- Gothwal, R. & Shashidhar, T. (2015). Antibiotic pollution in the environment: a review. *Clean – Soil, Air, Water*, 43(4), 479-489.
- Hernando, M. D., Rodríguez, A., Vaquero, J. J., Fernández-Alba, A. R., & García, E. (2011). Environmental risk assessment of emerging pollutants in water: Approaches under horizontal and vertical EU legislation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(7), 699-731.
- Homem, V. & Santos, L. (2011). Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. *Journal of Environmental Management*, 92 (10), 2304-2347.
- Hogerzeil, H., Frank, G., Grundmann, N., Kettis, M., Knox, J., & Larsson, J. (2018). *Antimicrobial Resistance Benchmark Methodology Report 2018*. The Netherlands.
- Huerta, B. M. (2013). Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. *Science of the Total Environment*, 456, 161
- Jung, Y.J., Kim, W.G., Yoon, Y., Hwang, T.M., & Kang, J.W. pH effect on ozonation of ampicillin: kinetic study and toxicity assessment. (2012). *Ozone: Science & Engineering*, 34(3), 156-162.
- Kıdak, R. & Doğan S. (2018). Medium-high frequency ultrasound and ozone based advanced oxidation for amoxicillin removal in water. *Ultrasonics sonochemistry*, 40, 131-139.

- Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., & Weijdegard, B. (2011). Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS One*, 6(2), 1-7.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment - A review. Part I. *Chemosphere*, 75(4), 417-434.
- Marcelino, R.B., Leao, M.M., Lago, R.M., & Amorim, C.C. (2017). Multistage ozone and biological treatment system for real wastewater containing antibiotics. *Journal of Environmental Management*, 195, 110-116.
- Maron, D.M., & Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research / Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3-4), 173-215.
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C.S. Manaia, C., Merlin, Schwartz, T., Dagot, C., & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research*, 47(3), 957-995.
- Mortelmans, K. & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research / Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 455(1-2), 29-60.
- Norte T.H.O., Marcelino, R.B., Medeiros, F.H, Moreira, R.P., Amorim, C.C., & Lagom, R.M. (2018). Ozone oxidation of β -lactam antibiotic molecules and toxicity decrease in aqueous solution and industrial wastewaters heavily contaminated. *Ozone: Science & Engineering*, 40(5),1-7.
- OECD. (1997). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects.
- OMS (2018). Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>. Abril 2018.
- Palominos, R.A., Mondaca, M.A., Giraldo, A, Peñuela, G., Pérez-Moya, M., & Mansilla, H.D. (2009). Photocatalytic oxidation of the antibiotic tetracycline on TiO₂ and ZnO suspensions. *Catalysis Today*, 144, 100-105.
- Rivera-Utrilla, J, Sánchez-Polo, M, Ferro-García, M.Á, Prados-Joya, G., & Ocampo-Pérez, R. (2013). Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*, 93(7), 1268-1287.
- Schriks, M., Heringa, M. B., van der Kooi, M. M., de Voogt, P., & van Wezel, A. P. (2010). Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. *Water Research*, 44(2), 461-476.
- Souza, F.S., da Silva, V.V., & Rosin, C.K., Hainzenreder, L., Arenzon, A., & Féris, L.A. (2017). Comparison of different advanced oxidation processes for the removal of amoxicillin in aqueous solution. *Environmental Technology*, 39(5), 549-557.
- Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., & Hart, A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 416, 1-21.

- Varol Saraçoğlu G. Varol Saraçoğlu, S., Gőçmez, C.B., Özkal, F., Ekmekyapar, P., & Meric, S. (2014). Occurrence of antibiotics in urban wastewater: A risk assessment study in Tekirdag city related to antibiotic resistant bacteria and infection disease control, *Global Journal of Advance in Pure & Applied Science*, 4, 235–244.
- Vasquez, M.I., Lambrianides, A., Schneider, M., Kümmerer, K., & Fatta-Kassinos, D. (2014). Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: What we know and what we should know. *Journal of Hazardous Materials*, 279, 169-89.
- von Gunten, U. (2018). Oxidation Processes in Water Treatment: Are We on Track? *Environmental Science & Technology*, 52(9), 5062–5.
- Yabalak, E., Könen, S., Osman, A., Serap, R., Tunçe M., & Murat, A. (2017). Application of response surface methodology for the optimization of oxacillin degradation by subcritical water oxidation using H₂O₂: genotoxicity and antimicrobial activity analysis of treated samples. *Desalination and Water Treatment*, 81, 186–198.