



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias de la Conducta

Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Capacidad de degradación de
antiinflamatorios no esteroideos por bacterias”**

TESIS

Para Obtener el Grado de:
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C.S. Lorna Catalina Can Ubando

Comité Tutorial:

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Tutor Académico

Dra. Keila Isaac Olivé

Tutor Interno

Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo

Tutor Externo



Toluca, Estado de México, noviembre de 2021

INDICE

	No. página
Resumen	
Introducción	
1. Antecedentes	
1.1 Contaminantes emergentes	8
1.1.1 Contaminantes emergentes en México	9
1.2 Antiinflamatorios no esteroideos	10
1.2.1 Diclofenaco	12
1.2.2 Ibuprofeno	13
1.2.4 Paracetamol	14
1.3 Métodos analíticos para la determinación de AINEs	15
1.3.1 Espectrofotometría UV/vis	15
1.3.2 Espectrometría de fluorescencia	16
1.3.3 Cromatografía de gases	16
1.3.4 HPLC	17
1.4 Estudios toxicológicos de AINEs	17
1.5 Ecofarmacovigilancia	18
1.6 Biorremediación	19
1.7 Bacterias	19
1.7.1 Identificación genética de bacterias	20
1.7.1.1 Amplificación de inserto 23S rRNA	20
1.7.1.2 Amplificación de gen 16S rRNA	21
1.8 Estudios antecedentes	21
2. Planteamiento del Problema	23
3. Justificación	24
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	26
6. Diseño metodológico	27
6.1 Diseño de estudio	27
6.2 Universo y Muestra	27
6.3 Criterios de inclusión y de exclusión	27
6.4 Variables	27
6.5 Procedimientos	29
6.5.1 Reactivación de cepas	29

6.5.2	Caracterización morfológica de las cepas	29
6.5.3	Caracterización fisiológica de las cepas	30
6.5.4	Comprobación de pureza de las cepas	31
6.5.5	Prueba cualitativa de biodegradación	33
6.5.6	Cinética de crecimiento en Medio Mínimo de Sales	35
6.5.7	Prueba semicuantitativa de biodegradación	36
6.5.8	Identificación genética	38
6.6	Análisis de datos	41
6.7	Aspectos éticos	42
7.	Resultados	
7.1	Capítulo de libro aceptado	43
7.2	Artículo enviado	45
8.	Resultados adicionales	48
9.	Conclusiones	50
10.	Referencias bibliográficas	52
	Anexos	60

Resumen.

Introducción: El consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) se ha visto incrementado con el paso de los años, provocando un desequilibrio ecológico que afecta a la salud de diversos organismos, incluyendo al ser humano. La búsqueda de microorganismos capaces de degradarlos es el primer paso para contrarrestar los efectos nocivos que pueden llegar a causar. La biorremediación es la mejor opción para afrontar el problema de contaminación por AINEs, así como para disminuir la incidencia de efectos tóxicos causados por estas moléculas. **Metodología:** Se reactivaron cepas de bacterias halotolerantes y se caracterizaron tanto morfológicamente (macroscópica y microscópica) como fisiológicamente (crecimiento a diferente concentración de NaCl y pH). Posteriormente, se procedió a realizar una prueba cualitativa utilizando a los indicadores de óxido-reducción 2,6-diclorofenolindofenol y cristal violeta como prueba preliminar de la degradación de los AINEs diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol. A las cepas que dieron resultado positivo en la prueba anterior, se les realizó una cinética de crecimiento con glucosa o el AINE que, potencialmente degradan, como única fuente de carbono. Lo siguiente fue realizar la prueba semicuantitativa, después de incubar las cepas con el AINE correspondiente durante 720 horas, que consistió en una separación en fase sólida seguida de la identificación de los AINEs por espectrofotometría UV. Se les realizó identificación genética a las cepas que disminuyeron la concentración de AINEs en el medio. **Resultados:** Se reactivaron 74 cepas que fueron bacilos Gram positivos halotolerantes y alcalotolerantes. Después de realizar la prueba cualitativa, 8 cepas dieron un resultado positivo: 4 para diclofenaco, 2 para ibuprofeno y 2 para paracetamol. La cinética de crecimiento se vio ligeramente disminuida cuando se utilizó el AINE como única fuente de carbono. Se observó un decremento en la concentración de diclofenaco con las cepas HA5-1 y TXO7B-1SG6, un decremento en la concentración de ibuprofeno con las cepas HS4-2 y TXO2-2SG2; sin embargo, ninguna de las cepas decremento la concentración de ibuprofeno. Las cepas fueron identificadas como *Bacillus paralicheniformis* y *Bacillus safensis*. **Conclusiones:** Las cepas halotolerantes reactivadas son potencialmente degradadoras de diclofenaco (HA5-1 y TXO7B-1SG6) e ibuprofeno (HS4-2 y TXO2-2SG2). No existen reportes previos de potencial degradador de estas cepas.

Introducción

Los contaminantes emergentes son un problema de salud tanto para animales y plantas como para el ser humano. Por lo general están presentes en bajas concentraciones, por lo que es difícil detectarlos en el ambiente; sin embargo, estos se bioacumulan en los organismos, llegando a causar toxicidad. Los productos farmacéuticos se han clasificado como contaminantes emergentes debido a que su consumo se ha visto incrementado con el paso de los años; sobre todo de los productos de venta libre, como son los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). La importancia de poner atención en este grupo de fármacos en específico es que son utilizados de manera indiscriminada y, en México, la ecofarmacovigilancia aún requiere un amplio esfuerzo para que el marco regulatorio se iguale al de otros países más desarrollados.

La biorremediación es una de las mejores opciones para afrontar el problema de contaminación por antiinflamatorios no esteroideos, así como para disminuir la incidencia de efectos tóxicos causados por estas moléculas. La búsqueda de microorganismos capaces de degradar este tipo de productos farmacéuticos es el primer paso para contrarrestar o prevenir los efectos nocivos que pueden llegar a causar en el ambiente y, posteriormente, en la salud del ser humano. Las actinobacterias son un grupo de microorganismos que han demostrado tener potencial biotecnológico gracias a que son capaces de producir metabolitos secundarios y enzimas extracelulares. En el presente trabajo se realiza la identificación de bacterias que pueden ser utilizadas potencialmente en la biorremediación de espacios contaminados con AINEs.

1. Antecedentes:

1.1 Contaminantes emergentes

En las últimas décadas, las consecuencias del desarrollo de la actividad humana en múltiples actividades (industria, transporte, agricultura, urbanización) se han hecho evidentes alrededor del mundo. Estas actividades han dado origen a la contaminación de diferentes ecosistemas con microcontaminantes (1). El término “contaminantes emergentes” hace referencia a componentes que se encuentran en bajas concentraciones en el ambiente; muchos de estos compuestos son productos farmacéuticos o de cuidado personal, que ingresan al ambiente por excreción en orina y heces de humanos y animales, así como por una inadecuada disposición (2). La figura 1 muestra las vías de contaminación que siguen estos componentes y los lugares o zonas que pueden llegar a afectar. Las principales clases de contaminantes emergentes son: productos farmacéuticos, pesticidas, productos de desinfección y productos químicos industriales (3).



Figura 1. Rutas por las que se dispersan los principales contaminantes emergentes

La abundancia de los contaminantes emergentes en aguas residuales, superficiales y subterráneas, requiere atención; ya que pueden ser tóxicos para los humanos y exhiben ecotoxicidad a bajas concentraciones (4). Cuando se habla de productos farmacéuticos, se toma en cuenta que el consumo ha ido en aumento; por lo que ya se han identificado diferentes compuestos alrededor del mundo. Una gran cantidad de estos microcontaminantes proviene de hospitales y es el resultado de tratamientos medicamentosos, técnicas de laboratorio clínico y actividades de investigación; así como de la excreción de la sustancia activa no metabolizada (5).

La detección, identificación y cuantificación de contaminantes emergentes y sus productos de transformación en los diversos compartimentos ambientales es esencial para obtener conocimiento sobre su ocurrencia y destino (3).

La degradación y remoción efectiva de este tipo de contaminantes es un tema de preocupación, principalmente para biotecnólogos y científicos ambientales, quienes deben plantear estrategias viables y efectivas para su eliminación (6).

1.1.1 Contaminantes emergentes en México

Los reportes de contaminantes emergentes encontrados en aguas residuales en México son escasos, por lo que la investigación para el tratamiento y eliminación de los mismos no es adecuada. Estrada-Arriaga y col; realizaron un estudio en 2016 en los estados de México y Guanajuato. Se identificaron 51 compuestos clasificados como contaminantes emergentes en aguas residuales, incluyendo fármacos, productos de cuidado personal y hormonas naturales y sintéticas. Entre los compuestos que se encontraron en mayor concentración se encuentran el naproxeno, ibuprofeno, paracetamol, cafeína y metformina (7).

Un estudio realizado en 2017 en Sinaloa por Moeder y col; reveló la presencia de plaguicidas en aguas residuales, en concentraciones que excedieron los niveles de efectos tóxicos temporales; sin embargo, gracias a la planta de tratamiento de la zona, las concentraciones lograron disminuir después de un mes (8). En el mismo año,

Polanco y col; encontraron residuos de pesticidas organoclorados en muestras de leche materna de mujeres Mayas, en Yucatán; lo que refleja el uso indiscriminado de pesticidas en la agricultura. Estos residuos son un factor predisponente para el cáncer de mama en las madres y problemas en el neurodesarrollo de los niños (9).

En Cuernavaca, Morelos, se encontraron productos farmacéuticos, en aguas superficiales y residuales, principalmente analgésicos, antiinflamatorios, beta bloqueadores y antibióticos (10).

1.2 Antiinflamatorios no esteroideos

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son parte de un grupo heterogéneo de principios activos con diferentes estructuras químicas, como se puede apreciar en la tabla 1, pero efectos terapéuticos y adversos similares (11). Actúan como inhibidores no selectivos de la ciclooxigenasa en sus isoformas, COX-1 y COX-2, las cuales tienen un papel crucial en la síntesis de prostaglandinas (12). Diariamente, cerca de 30 millones de personas alrededor del mundo usan antiinflamatorios no esteroideos como tratamiento para la inflamación crónica. Existe variación en cuanto a la eliminación, vida media, rutas de administración y tolerancia de estos productos farmacéuticos (13).

De acuerdo con la NOM-073-ECOL-1994, en México, los límites máximos permisibles de sólidos suspendidos totales provenientes de las descargas de aguas residuales son 150 mg/L para la industria farmacéutica y de 250 mg/L para la industria farmoquímica al día (14). No se especifica la concentración de AINEs permitida bajo estas condiciones.

En 2017, entre los 10 AINEs más estudiados que fueron detectados en ambientes naturales se encuentran el ibuprofeno, diclofenaco y naproxeno. Las concentraciones máximas de estos productos farmacéuticos en aguas residuales fueron 20783 ng/L, 6167 ng/L y 13159 ng/L respectivamente (15).

Los canales de dispersión de los AINEs son variados, como se muestra en la figura 2, por lo que la exposición del ser humano a éstos puede ser de manera constante e inconsciente.

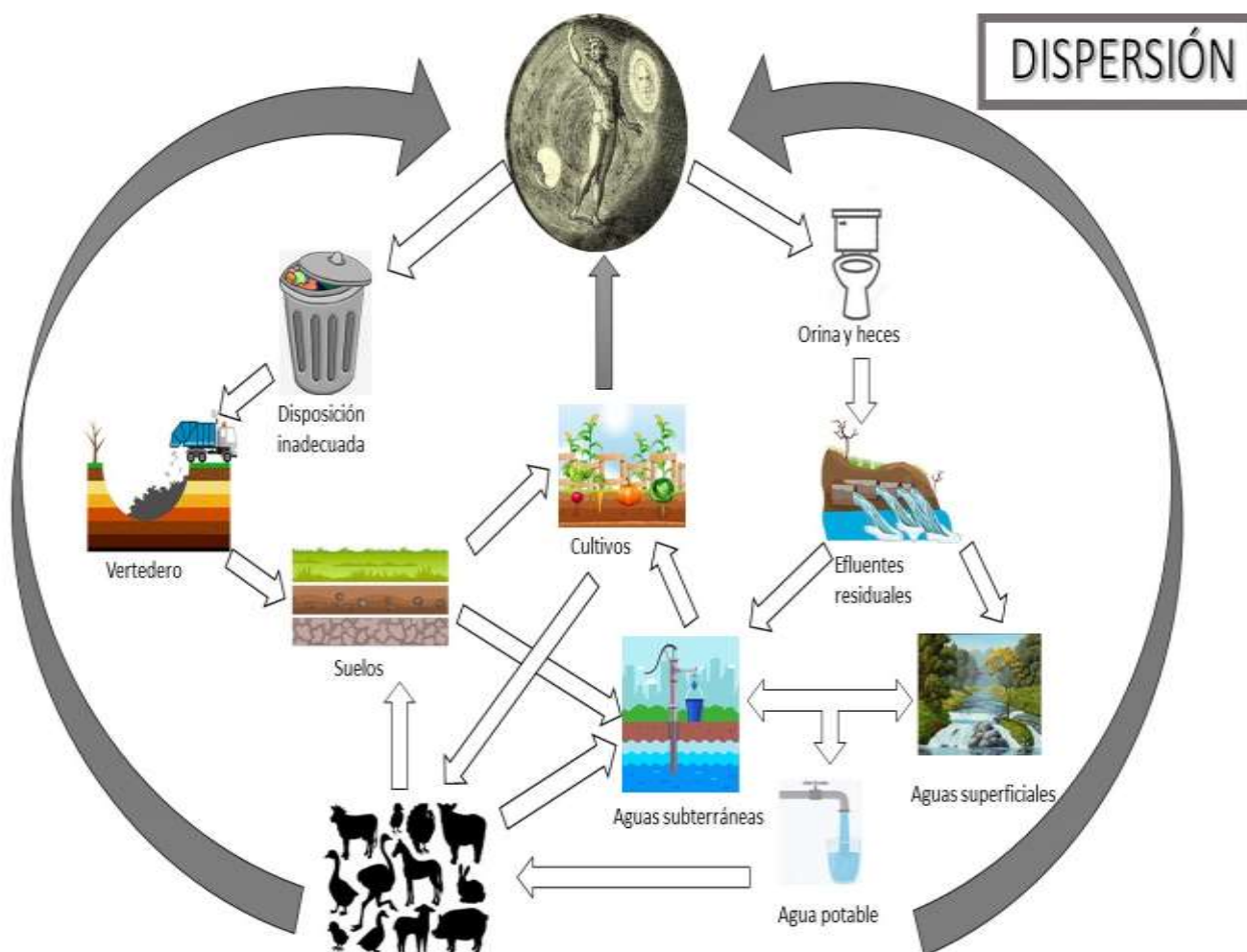
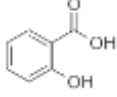
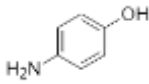
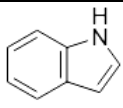
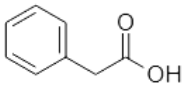
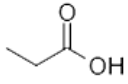
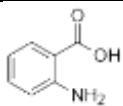
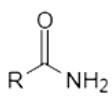
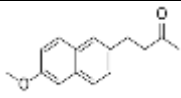
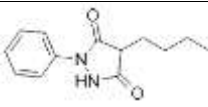
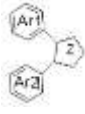


Figura 2. Dispersión y contaminación de los AINEs en el ambiente

La preocupación de encontrar AINEs en el ambiente es el hecho de que estos productos farmacéuticos están diseñados para tener actividad biológica a pequeñas dosis, por lo que podrían causar efectos no deseados en organismos expuestos (16).

Tabla 1. Clasificación de los AINEs con base a su estructura química (17)

Clasificación	Ejemplos	Estructura base
Derivados del ácido salicílico	Ácido acetilsalisílico, sulfasalazina	
Derivados de para-aminofenol	Paracetamol	
Derivados del indol	Indometacina, etodolac, sundilac	
Derivados del ácido fenilacético	Diclofenaco, ketorolaco	
Derivados del ácido propiónico	Ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno	
Fenamatos	Ácido mefenámico, ácido meclofenánico	
Derivados de la carboxamida	Piroxicam, meloxicam	
Alcanones	Nabumetona	
Pirazolidinediones	Fenilbutazona, oxifenilbutazona	
Diarilheterociclos	Celecoxib, rofecoxib	

1.2.1 Diclofenaco

Es el antiinflamatorio no esteroideo más consumido alrededor del mundo (18). Entre los efectos adversos más relevantes se encuentran los problemas gastrointestinales,

enfermedades cardiovasculares, daño renal, inhibición de la agregación plaquetaria y alteración de la función hepática (19, 20). La vida media de este fármaco es de 1.1 horas y puede ser administrado vía oral, oftálmica, tópica, rectal e intramuscular (21).

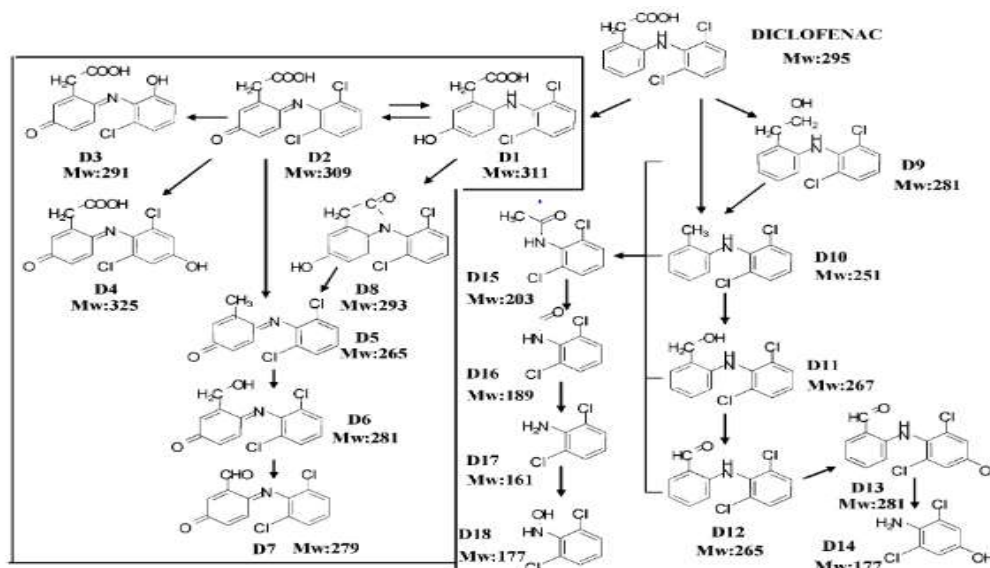


Figura 3. Ruta propuesta para la degradación de diclofenaco bajo tratamiento foto-Fenton (22)

1.2.2 Ibuprofeno

Es uno de los antiinflamatorios no esteroideos más utilizados; se caracteriza por ser un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, tiene alta biodisponibilidad y su metabolización se lleva a cabo en el hígado (23). Tiene una vida media de 2 horas y la prescripción usualmente es de 600 mg hasta por cuatro veces al día (21). Los efectos adversos en humanos incluyen reacciones anafilactoides, problemas gastrointestinales, trombocitopenia, erupciones cutáneas, cefalea y edema (20).

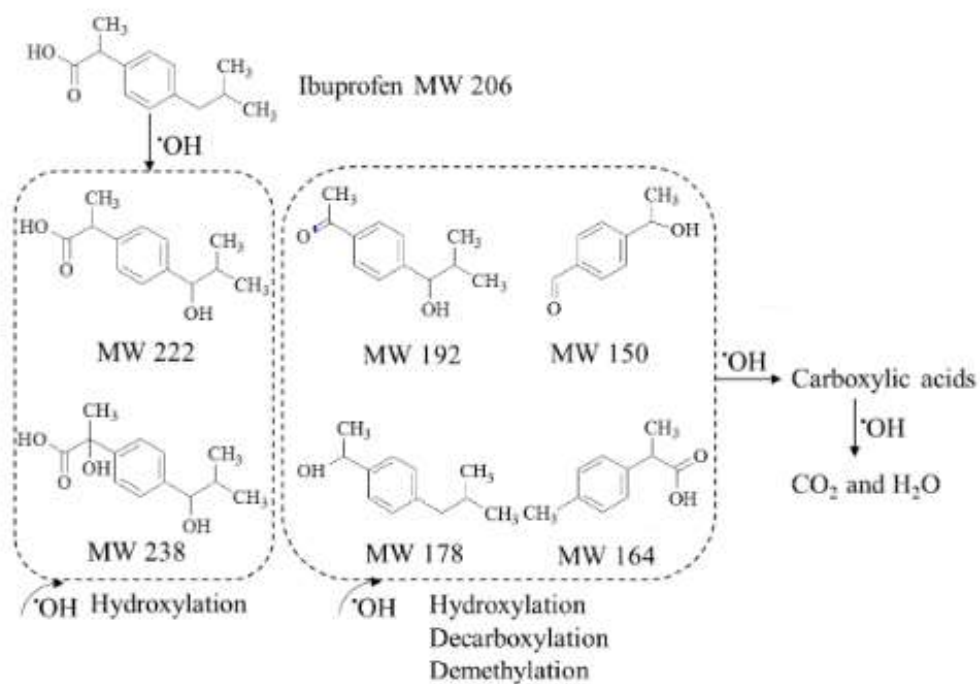


Figura 4. Ruta propuesta para la degradación de ibuprofeno bajo tratamiento electro-Fenton (24)

1.2.4. Paracetamol

Es un analgésico y antipirético con una débil actividad antiinflamatoria; actúa como inhibidor de la ciclooxigenasa (25). El paracetamol se distribuye en todo el organismo, concentrándose principalmente en el hígado, el tracto gastrointestinal y los riñones (26). Una dosis elevada de paracetamol puede producir severo daño hepatocelular, así como necrosis tubular renal (27).

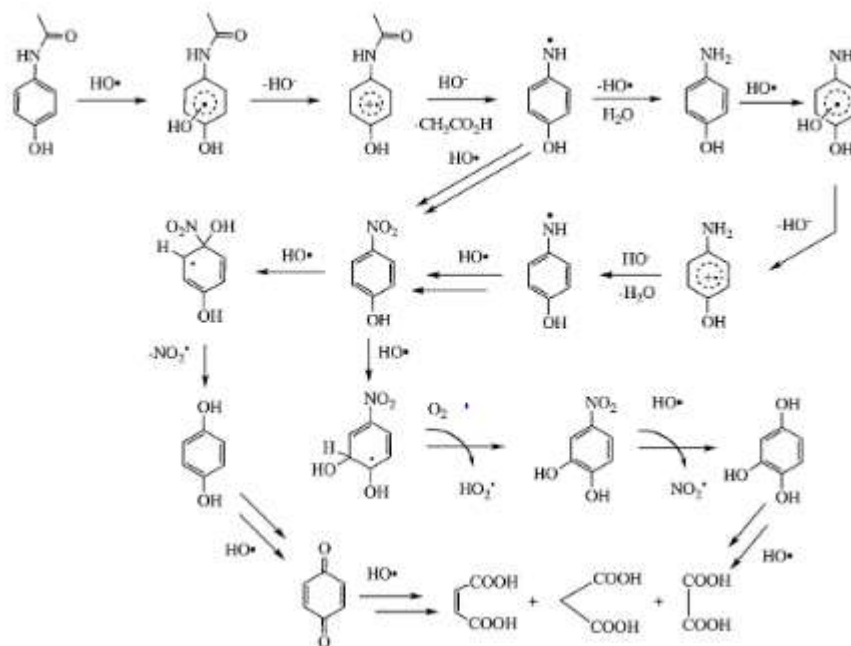


Figura 5. Ruta propuesta para la degradación de paracetamol bajo tratamiento fotocatalítico (28)

1.3 Métodos analíticos para la determinación de AINEs

Dada la necesidad de conocer la presencia y concentración del principio activo de diversos productos farmacéuticos, existen diferentes métodos analíticos, reportados en la literatura, que han resultado eficaces en la determinación de antiinflamatorios no esteroideos. Entre ellos se encuentran la espectrofotometría UV (29, 30), espectrofotometría de fluorescencia (31, 32), cromatografía líquida de alta resolución (33), así como la cromatografía de gases (34).

1.3.1 Espectrofotometría UV/vis

La espectrofotometría se basa en el proceso por el cual la radiación electromagnética interactúa con moléculas de forma que se producen perfiles de absorción o emisión característicos de enlaces o grupos funcionales (35). Una de las variaciones en este método es la espectrofotometría derivativa, la cual es de gran utilidad para obtener información tanto cualitativa como cuantitativa de los espectros de las muestras; ofrece mayor sensibilidad y especificidad en el análisis de mezclas (36). Esta es una técnica fácil de usar, ya que puede resultar ser más rápida que otras; por esto es que se sigue

utilizando para la determinación de diferentes moléculas utilizadas en la industria farmacéutica como la nistatina (37), el ibuprofeno (38, 39) y el naproxeno (29).

1.3.2 Espectrofotometría de fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno en el que las moléculas son sometidas a un proceso de excitación del electrón en el último nivel de energía del último orbital molecular ocupado a uno superior; al regresar el electrón a su estado basal, emite una longitud de onda mayor a la de absorción (40). Entre los AINEs que han sido identificados con más frecuencia utilizando el método analítico de fluorescencia emisión-excitación son el naproxeno (31), ibuprofeno (32), y el diclofenaco (41). Existe una modalidad en este método analítico, llamado fluorescencia sincrónica; este método se ha utilizado para la determinación de moléculas que se encuentran en una mezcla (42).

1.3.3 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es un método de separación que se basa en las diferencias de volatilidades de los componentes de la muestra a analizar y en su capacidad de adsorción (cromatografía gas- sólido) o su solubilidad (cromatografía gas- líquido) (43). En este método, la muestra debe ser volátil y termoestable (44); el analito se hace pasar en estado gaseoso y es arrastrado por el gas portador o el líquido (fase móvil) a través de una columna fija (45). No existe interacción entre la fase móvil y el analito; por lo tanto, la migración del analito es independiente de la naturaleza química de la fase móvil (46).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una técnica ampliamente utilizada en la determinación de compuestos orgánicos de interés, como lo son los contaminantes emergentes. Esta técnica se ha aplicado para la determinación de AINEs (47) como ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno y diclofenaco (48); así como la determinación de metil salicilato en piel y cabello (34).

1.3.4 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida se caracteriza por el proceso de separación que se produce dentro de una columna empaquetada; existen 5 modos de separación: adsorción, partición, intercambio iónico, exclusión de tamaño y la afinidad (49). Las principales características de este método son la alta resolución, eficacia, presión y velocidad (43). Ésta técnica de separación se utiliza ampliamente en combinación con diferentes métodos de detección como UV, fluorescencia e infrarrojo (50). Las muestras deben ser extraídas previamente para que su identificación sea precisa. Se han realizado diversos estudios en los que esta técnica ha resultado efectiva para la determinación de diversos productos farmacéuticos (51) como AINEs (16) en aguas residuales (52, 53) y fluidos como suero (54, 55) y orina (56); destacando la identificación del diclofenaco en estos estudios (57, 58).

1.4. Estudios toxicológicos de AINEs

Se han realizado diversos estudios en donde se demuestra la toxicidad de los antiinflamatorios no esteroideos en diferentes especies animales expuestas a estos. El mecanismo de acción de estos fármacos puede explicar las alteraciones en los organismos; las prostaglandinas, que se ven inhibidas, no solo participan en el proceso inflamatorio, sino también en la neurotransmisión y transporte iónico para la regulación del sistema circulatorio y permeabilidad vascular (59). Así mismo, existe una reducción de leucotrienos que se relaciona con la señalización de supervivencia celular (60).

El diclofenaco es teratogénico para *Xenopus laevis* (DL₅₀ 9.56 mg/L, D₅₀ para malformaciones 2.74 mg/L) y *Lithobates catesbeianus* (DL₅₀ 12.10 mg/L, D₅₀ para malformaciones 2.88 mg/L) (61). Los efectos adversos de este fármaco también fueron estudiados en *Cyprinus carpio* (DL₅₀ 70.98 mg/L en 96 horas) en donde se comprobó que induce estrés oxidativo, principalmente en hígado y branquias (62). Este efecto también fue encontrado en *Hyalella azteca* (DL₅₀ 0.467 mg/kg en 72 horas) (63).

En *Cyprinus carpio* también se estudió el estrés oxidativo que causa el ibuprofeno en este organismo (DL₅₀ 175.6 mg/L en 96 horas); los principales órganos afectados son el hígado, las branquias y la sangre (64).

El estrés oxidativo que produce el ácido acetyl salicílico en *Daphnia magna* (DL₅₀ 88.33 mg/L en 48 horas) induce a su vez daño oxidativo en el ADN; el cual es un indicador de lesión premutagénica en células de mamíferos (65).

1.5. Ecofarmacovigilancia

Los productos farmacéuticos han traído consigo múltiples beneficios para la salud, como la mejora en la calidad de vida. Sin embargo, los residuos de estos encontrados en el ambiente han sido ligados a efectos negativos en los ecosistemas, así como en la salud de humanos y animales (66). La ecofarmacovigilancia puede ser definida como las actividades enfocadas en la identificación, evaluación, entendimiento y prevención de efectos adversos u otros problemas relacionados a la presencia de productos farmacéuticos en el ambiente, que afecta la salud humana y de otras especies animales (67).

Los AINEs son usados frecuentemente de manera inapropiada debido a que son productos farmacéuticos de venta libre y suelen automedicarse en síntomas de dolor, inflamación y fiebre (68). Desde la perspectiva de la ecofarmacovigilancia, prevenir el consumo innecesario sería un medio eficaz para disminuir los residuos en el ambiente. Por lo tanto, la estrategia va enfocada a mejorar la prescripción e impulsar el consumo adecuado y responsable de los AINEs en los tratamientos médicos, tanto en humanos como en uso veterinario (11).

Para que la ecofarmacovigilancia se lleve a cabo de manera efectiva es necesario desarrollar estándares, crear protocolos, establecer bases de datos y procedimientos de monitoreo, así como ampliar la investigación en esta área. También se requiere el desarrollo y fortalecimiento de plataformas y redes regionales, nacionales e internacionales de soporte técnico; además de proporcionar apoyo financiero para garantizar la calidad del programa (16). Existen pocos estudios al respecto en México,

por lo que el marco regulatorio requiere de un amplio esfuerzo para igualar los avances que se tienen en otros países de referencia (69).

1.6. Biorremediación

La degradación es la descomposición de una sustancia química en compuestos o moléculas más simples. Si este fin se consigue por la acción de agentes biológicos como plantas, animales y microorganismos, que utilizan estos compuestos en los procesos metabólicos requeridos en sus actividades vitales, se denomina biorremediación (70). Los tratamientos biológicos de áreas afectadas por contaminantes emergentes ofrecen una alternativa menos costosa y amigable con el ambiente. La mayoría de los microorganismos utilizados en esta práctica son capaces de producir enzimas oxidoreductasas que pueden degradar varios tipos de contaminantes (71). Los modelos de biodegradación de contaminantes emergentes son necesarios para evaluar, entender y predecir los principales factores que influyen en la biodegradación de este tipo de compuestos en aguas residuales (72).

1.7. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que son capaces de moverse independientemente en la naturaleza (73). Los requerimientos mínimos para el crecimiento bacteriano incluyen agua, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas (74). La distribución de las especies bacterianas depende de la ubicación geográfica (latitud, longitud, altitud) (75, 76) y, por ende, de las condiciones ambientales (oxígeno, pH, temperatura, salinidad) (77), de la estación del año (78) y de la cantidad de nutrientes como nitrógeno, carbono y fósforo que alteran los factores biogeoquímicos (79).

Se han detectado diversas características de las bacterias a las que se les ha dado uso en diferentes campos de la ciencia. Sirven como bioindicadores del equilibrio o la ausencia de factores perturbadores de un ecosistema (80); se ha caracterizado su efecto al limpiar agua gracias a su capacidad degradadora de sulfametoxazol (81) y su

capacidad de degradación de compuestos pesticidas (metil haluros) ha sido comprobada (82). Por otro lado, las bacterias han demostrado ser efectivas en la biorremediación de aceite de baja viscosidad (83), hidrocarburos monoaromáticos (84) y policíclicos aromáticos (85).

También se han estudiado sus efectos en simbiosis con otros organismos. Se han estudiado bacterias endófitas que ayudan al crecimiento de las plantas y, a su vez, ayudan en la remediación de hidrocarburos (86-88), mercurio (89), arsénico (90) y níquel (91, 92).

Además se han identificado genes de importancia biotecnológica (93), como *pahE*, el cual funciona como biomarcador para distinguir bacterias degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos (94).

1.7.1 Identificación genética de bacterias

En el reino procariota, los ribosomas están compuestos por 2 subunidades: la 50S, que contiene la región 23S rRNA, la 5S rRNA y 30 proteínas más; y la subunidad 30S, que contiene al 16S rRNA y otras 20 proteínas más (95). Para identificar bacterias, se requiere amplificar el gen 16S rRNA

1.7.1.1. Amplificación de inserto 23S rRNA

Un inserto de 100 pares de bases del gen 23S rRNA fue caracterizado como marcador filogenético para bacterias Gram positivo con alto contenido de G+C (96). Este marcador se ha utilizado como criterio de purificación para las actinobacterias (97); así como para la identificación del género *Mycobacterium* (98). Las mutaciones en el gen 23S, por otro lado, pueden ser la causa de diferentes características de las bacterias, como la resistencia a fármacos (99).

1.7.1.2. Amplificación de gen 16S rRNA

La amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA es utilizado para determinar la composición e identificación de las comunidades bacteriana y arquea (100). El gen 16S rRNA está formado por 9 regiones variables, alternadas con regiones conservadas (101). La amplificación de este gen permite entender de mejor manera la filogenia de las procariotas; la comparación de la secuencia obtenida se compara con bases de datos como BLAST y EzBiocloud (102).

1.8. Estudios antecedentes

Langenhoff y col; probaron la biodegradación aeróbica de ibuprofeno y diclofenaco provenientes de agua residuales. Después de 4 días, el consorcio bacteriano logró degradar 250 mg/mL de ibuprofeno y no se identificaron moléculas intermediarias. Por otro lado, se detectaron 8 moléculas intermediarias en el metabolismo del diclofenaco; lo que indica una degradación total del ibuprofeno y parcial del diclofenaco (103).

Stenotrophomonas maltophilia demostró su capacidad de degradación de naproxeno en un estudio realizado por Wojcieszynska y col; en 2014. La cepa se expuso a 6 mg/L del producto farmacéutico como única fuente de carbono y se obtuvo un 28% de degradación. Así mismo, bajo condiciones cometabólicas, usando glucosa como fuente externa de carbono, la degradación aumentó a 78% (104).

Se identificó una cepa bacteriana del género *Variovorax* por Murdoch y Hay en 2015. Los resultados de esta investigación muestran que la bacteria es capaz de utilizar ibuprofeno como única fuente de carbono; después de siete días de incubación con el principio activo, *Variovorax* Ibu-1 fue capaz de degradar el 50% de una concentración inicial de 500 mg/L de ibuprofeno (105).

En 2017, Aissaoui y col; describieron la transformación metabólica y co-metabólica del diclofenaco, por acción de *Enterobacter hormaechei*. El porcentaje de degradación de diclofenaco como única fuente de carbono fue de 52.8%; mientras que, usando glucosa como fuente externa de carbono, se alcanzó una degradación del 82% (106).

Bacillus thuringiensis es capaz de degradar hasta 6 ppm de naproxeno en cometabolismo, esto de acuerdo con la investigación publicada por Gorny y col. en 2018 (107). En el mismo año, Ivshina y col. sugirieron una ruta de degradación de diclofenaco por *Rhodococcus ruber*, el cual fue capaz de degradar 50 µg/L del AINE en 6 días (108).

Moreira y col., sometieron a la cepa bacteriana *Labrys portucalensis* a pruebas de degradación del diclofenaco, utilizando una fuente alterna de carbono. La degradación fue exitosa en un rango de concentración de 1.7 – 34 µM. Así mismo, realizaron la identificación de las moléculas obtenidas en diferentes etapas, logrando así proponer un mecanismo de degradación (109).

El cometabolismo también resultó efectivo para Nguyen y col., quienes, en 2019, consiguieron la degradación de diclofenaco utilizando lodos activados. Consiguieron remover el 45% de una concentración de 50 ppm de diclofenaco, 22% de 500 ppm y 12% de 5000 ppm; todo en un periodo de tiempo de 13 a 70 días (110).

2. Planteamiento del Problema:

Debido al crecimiento de la población mundial, la prevalencia de enfermedades y el mejoramiento en el cuidado de la salud, la producción y consumo de productos farmacéuticos ha tenido un incremento significativo (16). Los antiinflamatorios no esteroideos son los productos farmacéuticos que se presentan con mayor frecuencia en matrices ambientales, como drenaje, sedimento, superficie del agua y acuíferos (11). Debido al uso indiscriminado de estos, así como su inadecuada disposición, se ha hecho necesaria la ecofarmacovigilancia para la detección, evaluación, comprensión y prevención de problemas relacionados con la presencia de estos productos farmacéuticos en el ambiente, que afectan el ecosistema y la salud del ser humano (69).

Los métodos de tratamiento más utilizados en las áreas contaminadas por productos farmacéuticos suelen ser costosos y su efectividad es variable, ya que la remoción no siempre es completa (111), teniendo que recurrir al uso de varias técnicas para obtener mejores resultados. Por los motivos anteriores, la biorremediación es una alternativa potencialmente viable para hacer frente a este problema. Las bacterias tienen un alto potencial biotecnológico debido a su capacidad para producir enzimas extracelulares (112). Por lo tanto, son una opción para la biorremediación de ecosistemas contaminados con este tipo de contaminantes emergentes.

Pregunta investigación:

¿Las bacterias son capaces de degradar a los antiinflamatorios no esteroideos diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol?

3. Justificación:

El término contaminantes emergentes se refiere principalmente a aquellos para los cuales actualmente no se cuenta con regulaciones que monitoreen o denuncien públicamente su presencia en el suministro de agua o en las descargas de aguas residuales (2). Muchos fármacos son liberados continuamente al ambiente por medio de diferentes fuentes y siguen diversas vías de contaminación: desechos y subproductos industriales, excreciones humanas y animales, basura doméstica, entre otros (113). Cuando los productos farmacéuticos o, inclusive, algunos de sus metabolitos llegan al ambiente se filtran a varios efluentes acuíferos, alcanzando las fuentes de agua potable (12).

Los patrones de uso de los fármacos definen el riesgo ecológico que representan; también se considera importante su volumen de consumo. La cantidad de un producto farmacéutico que entre en el ambiente depende no sólo del volumen total utilizado por la población, también deben contemplarse factores como la relación entre el consumo y las ventas totales, la farmacocinética y los flujos totales en aguas residuales (69).

En México, los antiinflamatorios no esteroideos son utilizados de manera indiscriminada debido a su venta libre. Por otro lado, los criterios para una ecofarmacovigilancia efectiva aún no se encuentran oficialmente establecidos. La presencia de estos productos farmacéuticos en el ambiente ha traído desequilibrio, principalmente, en la fauna acuática, debido a que la bioacumulación de los principios activos ha provocado ecotoxicidad en las diferentes especies (114).

4. Hipótesis

Hipótesis alterna: Las bacterias aisladas son capaces de degradar al menos uno de los antiinflamatorios no esteroideos a los que se van a exponer (diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol).

Hipótesis nula: Las bacterias aisladas no son capaces de degradar los antiinflamatorios no esteroideos a los que se van a exponer (diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol).

5. Objetivos:

5.1. Objetivo General:

Determinar la capacidad de bacterias para la degradación de los antiinflamatorios no esteroideos diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol.

5.2. Objetivos específicos:

Reactivar cepas de bacterias de una colección previamente aislada.

Evaluar la capacidad de degradación de antiinflamatorios no esteroideos (diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol) por acción de bacterias.

Realizar la identificación genética de las bacterias con capacidad para degradar antiinflamatorios no esteroideos.

6. Diseño metodológico

6.1 Diseño de Estudio

Tipo de estudio: Experimental, cuantitativo

6.2 Universo y Muestra

Universo: Microorganismos aislados de diferentes ecosistemas de México

Población: Bacterias halotolerantes

Método de muestreo: Por conveniencia

Muestra: Bacterias halotolerantes degradadoras de antiinflamatorios no esteroideos

6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios inclusión

- Bacterias que degraden antiinflamatorios no esteroideos

Criterios exclusión

- Microorganismos que no sean bacterias.

Criterios eliminación

- Bacterias que no degraden antiinflamatorios no esteroideos

6.4 Variables

Independiente: Bacterias

Dependiente: Degradación de AINEs

Tabla 2. Operacionalización de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis estadístico.
Bacterias	Microorganismos unicelulares capaces de moverse independientemente en la naturaleza.	Identificación genética a través de la secuenciación del gen 16S rRNA	Independiente	Nominal	N/A
Degradación de AINEs.	Descomposición o reducción de la molécula base del fármaco.	Medición de reacciones redox a través de indicadores colorimétricos	Dependiente Cuantitativa	Absorbancia	t- student
		Medición de la concentración por espectrofotometría UV	Dependiente Cuantitativa	Concentración	t- student ANOVA

6.5 Procedimientos

6.5.1 Reactivación de cepas.

Para la reactivación de las cepas se prepararon 4 medios de cultivo de diferente composición:

- Medio para halófilos moderados (MH) (115): contiene 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de proteosa peptona, 1 g/L de dextrosa y 18 g/L de agar. Complementado con solución de NaCl al 5%, cantidad suficiente para un litro.
- Medio Sauton-UAM (116): contiene 4 g/L de asparagina, 2 g/L de ácido cítrico, 0.5 g/L de K_2HPO_4 , 0.5 g/L de $MgSO_4$, 0.05 g/L de citrato férrico amoniacal, 0.1 g/L de $ZnSO_4$, 0.5 g/L de $CaCl_2$, 0.1 g/L de $CuSO_4$, 10 g/L de hojuelas de papa, 60 g/L de glicerol, 5 g/L de carbón activado, 0.1 g/L de cicloheximida, 0.05 g/L de estreptomina, 0.05 g/L de eritromicina, 0.05 g/L de kanamicina y 18 g/L de agar. Complementado con solución de NaCl al 5%, cantidad suficiente para un litro.
- Medio Czapek (Becton Dickinson, No. de catálogo: 211776): se resuspenden 50 g del medio deshidratado por cada litro de solución de NaCl al 5%
- Medio BHI (Becton Dickinson, No. de catálogo: 211200): se resuspenden 37 g del medio deshidratado por cada litro de solución de NaCl al 5%

Se realizó la esterilización de los medios de cultivo en autoclave a 121°C durante 15 minutos; consecutivamente, se vertieron en cajas Petri estériles una vez que alcanzaron una temperatura de 45° C. Se utilizaron las cepas de bacterias de la colección perteneciente al Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México. Las cepas fueron sembradas en los medios de cultivo, tanto sólidos como líquidos.

6.5.2 Caracterización morfológica de cepas puras.

Morfología macroscópica.

Las características que se tomaron en cuenta para realizar la descripción de la morfología macroscópica fueron: color, tamaño, textura, forma, apariencia,

prominencia de la colonia, existencia de micelio vegetativo o aéreo y matiz irradiado en el medio de cultivo.

Morfología microscópica.

Tras la realización de un frotis de las cepas puras, se procedió a realizar una tinción de Gram. Una vez teñidos, se observaron en un microscopio óptico de la marca y modelo OLYMPUS U-5RE-2.

6.5.3 Caracterización fisiológica.

Determinación de la concentración de Cloruro de Sodio (NaCl) para el crecimiento óptimo de las cepas aisladas.

Para obtener la concentración de Cloruro de Sodio (NaCl) óptima, así como el rango para el desarrollo de las cepas se utilizaron distintas concentraciones de NaCl (0, 0.5, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30%) a pH de 7; cada cepa se sembró por estría cruzada en los medios preparados y se incubaron a 37°C. La observación del crecimiento se realizó diariamente durante 10 días y se interpretó como (-) cuando fue nulo, (+) cuando fue muy escaso, (++) cuando fue escaso, (+++) cuando fue moderado y (++++) cuando fue óptimo.

Determinación del valor de potencial de Hidrógeno (pH) para el crecimiento óptimo de las cepas aisladas.

Para determinar tanto el rango como el pH óptimo para el desarrollo de las cepas se utilizaron diferentes valores de pH, adaptando la concentración de NaCl de acuerdo con el desarrollo óptimo; dichos valores de pH fueron 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. Cada cepa se inoculó por estría cruzada y se incubaron a 37°C. La observación del desarrollo se realizó diariamente durante 10 días y se interpretó como (-) cuando fue nulo, (+) cuando fue muy escaso, (++) cuando fue escaso, (+++) cuando fue moderado y (++++) cuando fue óptimo.

6.5.4. Comprobación de la pureza de las cepas

Obtención de biomasa.

La biomasa fue obtenida a partir de las cepas bacterianas aisladas que se inocularon en el medio líquido MH, y se utilizó la metodología siguiente:

1. En un matraz de 125 mL con 30 mL de medio de cultivo líquido estéril MH, se inoculan las cepas aisladas.
2. Una vez que se observe un crecimiento suficiente, se transfiere todo el contenido del matraz a tubos Falcón de 15 mL previamente esterilizados y se centrifugan durante 15 minutos a 3000 rpm, se decanta el sobrenadante y el material sedimentado que queda al fondo del tubo se transfiere a tubos eppendorf de 1.5 mL, los cuales, a su vez, se centrifugan a 14000 rpm por 5 minutos; nuevamente se descarta el líquido sobrenadante y se procede a iniciar el protocolo de extracción de ADN con el sedimento bacteriano.

Extracción de ADN

Se realizó de acuerdo con la metodología el kit Promega Wizard® Genomic:

1. El sedimento bacteriano es resuspendido con 480 μ L de EDTA 0.5 M.
2. 120 μ L de lisozima son agregados al tubo y, con una pipeta, se homogeniza cuidadosamente.
3. Después de incubar la mezcla a 37°C por 60 minutos, se centrifuga a 14000 rpm durante 2 minutos y se procede a retirar el líquido sobrenadante.
4. Posteriormente, 600 μ L de solución de lisis nuclear, del kit de ADN "Promega Wizard® Genomic" para purificación, se agregan y se mezclan cuidadosamente.
5. La mezcla es incubada a 80°C durante 5 minutos, posteriormente, se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente.
6. 3 μ L del reactivo de RNAsa del kit de ADN "Promega Wizard® Genomic" para purificación, son agregados al tubo y se mezcla por inversión de 2 a 3 veces.
7. El tubo es incubado a 37°C por 60 minutos y se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente.

8. 200 μ L del reactivo de solución de precipitación de proteínas, del kit de ADN “Promega Wizard® Genomic” para purificación, se agregaron al lisado previamente tratado con RNAsa, se procede a agitar enérgicamente en un vortex durante 20 segundos para homogenizar completamente.
9. La mezcla se incuba durante 5 minutos en hielo.
10. Se procede a centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos y el sobrenadante se traslada a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL que tenga un volumen de 600 μ L de isopropanol.
11. El tubo se homogeniza, por inversión, suavemente hasta que la creación de hebras de ADN se hace visible.
12. Se centrifuga durante 2 minutos a 14000 rpm.
13. Cuidadosamente, se descarta el líquido sobrenadante y el tubo se sacude suavemente sobre un papel absorbente. Después de adicionar 600 μ L de etanol al 70% y se invierte el tubo de 2 a 3 veces con el pellet de ADN.
14. Se centrifuga durante 2 minutos a 14000 rpm, se decanta el etanol cuidadosamente y se deja secar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
15. Como último paso, 100 μ L del reactivo de solución de rehidratación, del kit de ADN “Promega Wizard® Genomic” para purificación, se agregan y se incuban a 4°C por 12 horas en refrigeración.
16. Debe permanecer almacenado en congelación hasta que se vaya a usar.

La visualización del ADN se realizó a través de una electroforesis en gel de agarosa a concentración del 1% con los productos de extracción para observar la manifestación y la calidad del ADN; la metodología que se utilizó fue la siguiente:

1. Se agregan 0.25 g de agarosa y 25 mL de solución TAE 1X en un matraz de 200 mL.
2. La mezcla se mueve suavemente y se calienta por 40 segundos en un horno de microondas, y durante 20 segundos más en otras 2 ocasiones.
3. Previamente, la cámara para electroforesis se arma y la agarosa se vierte en el molde. La agarosa se deja reposar hasta su solidificación durante 15 minutos y se retira el peine.
4. Se agrega solución TAE 1X sobre el gel hasta cubrirlo.
5. 7 μ L de muestra se mezclan con buffer de carga y se colocan en los pozos del gel. Así mismo, se deposita un volumen de 7 μ L de marcador de peso molecular.

6. Se cierra la cámara de electroforesis y se programa por un tiempo de 45 minutos a 120 Volts y 300 microAmperes.
7. Después de este tiempo, el gel se retira y utiliza una solución de bromuro de etidio para revelar.
8. La imagen se captura en un fotodocumentador.

Amplificación del marcador filogenético

Se amplificó el marcador filogenético, a las cepas aisladas, que contiene 350 pares de bases (pb) y se localiza en el gen rRNA 23S, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron las siguientes secuencias como iniciadores:

23R insF: 5'-(AC)AGCGTAG(AGCT)CGA(AT)GG-3'

23S insR: 5'-GTG(AT)CGGTTT(AGCT)(GCT)GGTA-3'

Se utilizó la Taq AND polimerasa comercial para ejecutar la reacción. Las condiciones establecidas para el ciclo térmico fueron: un ciclo de predesnaturalización a 94°C (durante 5 minutos), desnaturalización a 94°C (por 30 segundos), acoplamiento a 50°C (por 20 segundos), elongación a 72°C (durante 90 segundos), se repiten 29 ciclos y un ciclo post-elongación a 72°C (durante 7 minutos). Se observaron los fragmentos amplificados por medio de una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 2% y realizando un revelado en bromuro de etidio por 7 segundos.

6.5.5. Prueba cualitativa de biodegradación

Preparación de las muestras

Las bacterias halotolerantes reactivadas fueron inoculadas en medio MH líquido ajustado al pH y complementado con la concentración de NaCl de óptimo crecimiento de cada cepa. Se incubaron a 37°C durante 2 días. Por otro lado, se prepararon soluciones de AINEs (diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol), 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) y cristal violeta (CV) a una concentración de 1000 ppm. Posteriormente, un inóculo de 200 µL del cultivo de bacterias, lo cual equivalía a 6×10^7 células (tubo 3 de la escala McFarland), se transfirió a un tubo con tapa de

rosca que contenía 25µL de la solución de AINEs y 100 µL de la solución de DCPIP o 25 µL de la solución de CV y se añadió Medio Mínimo de Sales (MSM) (117) ((NH₄)₂SO₄, 1000mg/L; Na₂HPO₄, 800mg/L; K₂HPO₄, 200mg/L; MgSO₄ ·7H₂O, 200mg/L; CaCl₂·2H₂O, 100mg/L; FeCl₃·H₂O, 5mg/L; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·H₂O, 1mg/L) suplementado con NaCl y ajustado al pH óptimo para el crecimiento de cada cepa para un volumen final de 5 mL.

Para determinar la sensibilidad de los indicadores de óxido reducción evaluados, se construyó una curva de calibración para cada uno.

Preparación de controles

Control 1. Contenía 100 µL de la solución de DCPIP o 25 µL de CV; se llevó a volumen de 5 mL con MSM.

Control 2. Se preparó con 25 µL de la solución de AINEs y 100 µL de la solución de DCPIP o 25 µL de CV; se llevó a volumen de 5 mL con MSM.

Control 3. Contenía 200 µL del cultivo bacteriano (6×10^7 células) y 100 µL de la solución de DCPIP o 25 µL de CV; se llevó a volumen de 5 mL con MSM suplementado con NaCl y ajustado al pH óptimo de cada cepa.

Interpretación.

La presencia de los indicadores tornó a cultivos y controles de color azul, en el caso de DCPIP, y violeta con el CV. Cada muestra de cultivo y sus controles se prepararon por triplicado y se sometieron a incubación a 37°C durante 5 días (120 h). Muestras y controles fueron primeramente centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes de todas las muestras y controles fueron medidos a las 0 h y 120 h en un espectrofotómetro marca Biotech® modelo EPOCH a la longitud de onda correspondiente, de acuerdo con el indicador utilizado (600 nm para DCPIP (118) y 590 nm para CV (119)). La disminución en la intensidad del color indica preliminarmente posible resultado positivo a la prueba cualitativa de biodegradación. Se utilizaron 3 criterios para la selección de las cepas: para el primer criterio se compararon las relaciones de absorbancias de las muestras y el control-1 (solución del indicador) a las 0 y 120 horas de incubación; se hizo lo mismo en el segundo criterio, salvo que esta vez se utilizó el control-2 (solución del indicador con

diclofenaco, ibuprofeno o paracetamol). Las cepas que mostraron diferencias entre las muestras y los controles 1 y 2 a las 120 h se sometieron al tercer criterio, en el cual se compararon las relaciones de absorbancia entre las muestras y el control-3 (solución del indicador con la cepa bacteriana) a las 0 y 120 horas de incubación. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Las cepas potencialmente degradadoras son aquellas que “pasaron” los 3 criterios evaluados. Se considera que una muestra es diferente a un control cuando la p obtenida en la prueba de comparación de medias de t-student es menor a 0.05.

6.5.6 Cinética de crecimiento en Medio Mínimo de Sales.

Para la determinación de la curva de crecimiento de las bacterias que demostraron tener la capacidad de degradar al menos uno de los AINEs a los que se expusieron, se emplea el Medio Mínimo de Sales (MSM).

Se inoculó cada una de las cepas con capacidad degradadora (6×10^7 células/mL) en el medio de cultivo con las características fisicoquímicas óptimas para cada cepa (previamente determinadas). Los matraces se mantuvieron en una incubadora a 37°C. El crecimiento bacteriano fue determinado midiendo su densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro. Las lecturas de densidad óptica fueron tomadas desde las 0 horas hasta alcanzar la fase estacionaria de cada una de las cepas.

Por otro lado, se midió la cinética de crecimiento de las bacterias utilizando el antiinflamatorio que, potencialmente, es capaz de degradar, como única fuente de carbono. Se transfirió un inóculo equivalente a 6×10^8 células/mL a un matraz que contenía 100 mL de Medio Mínimo de Sales ajustado a pH y complementado con la concentración de NaCl óptimo de crecimiento, conteniente de 1 g/L del AINE a probar (diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol). Los cultivos bacterianos se incubaron a 37°C.

6.5.7 Prueba semicuantitativa de biodegradación

Separación en fase sólida (SPE) de AINEs.

Para determinar la cantidad de AINE (diclofenaco, ibuprofeno o paracetamol) presente en el cultivo bacteriano de las bacterias potencialmente degradadoras, es necesario separarlo. Para ello se implementó el método de extracción en fase sólida (SPE) (120).

SPE Diclofenaco

Para evaluar la efectividad y eficiencia del método se prepararon soluciones de diclofenaco de concentraciones 50, 100, 200, 500 y 1000 mg/L preparadas MSM suplementado con NaCl y ajustado al pH de óptimo crecimiento de cada cepa, para simular lo más posible las condiciones de los cultivos bacterianos. A estas soluciones se les determinó el espectro de absorción entre 200 y 300 nm. A partir de las absorbancias medidas a la longitud de onda de máxima absorción se construyó una curva de calibración utilizando el espectrofotómetro EPOCH Biotek®. Las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo utilizando como blanco MSM suplementado con NaCl y ajustado al pH de óptimo crecimiento de cada cepa.

Un mL de una solución estándar de 500 ppm de diclofenaco se depositó en una columna Sep-Pak® C18 Vac 6cc previamente acondicionada con 5 mL de metanol y 5 mL de agua destilada. Una vez depositada la muestra, la columna se lavó con 1 mL de metanol al 5%; seguido de 1 mL de metanol al 20% y 1 mL de metanol al 40%. Posteriormente el diclofenaco se eluyó con 500 µL de metanol seguido de 500 µL de una solución de metanol: acetonitrilo: ácido acético (35:35:30) (121). Una vez eluído el diclofenaco, la columna se lavó y reconstituyó con 5 mL de metanol. Al diclofenaco eluído de la columna de SPE se le determinó el espectro de absorción y se cuantificó con la curva de calibración previamente determinada. Este experimento se hizo por triplicado. A partir de los valores obtenidos se determinó la eficiencia y reproducibilidad del método implementado.

SPE Ibuprofeno

Para evaluar la efectividad y eficiencia del método se prepararon soluciones de ibuprofeno de concentraciones 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L preparadas MSM suplementado con NaCl y ajustado al pH de óptimo crecimiento de cada cepa, para

simular lo más posible las condiciones de los cultivos bacterianos. A estas soluciones se les determinó el espectro de absorción entre 200 y 300 nm. A partir de las absorbancias medidas a la longitud de onda de máxima absorción se construyó una curva de calibración utilizando el espectrofotómetro EPOCH Biotek®. Las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo utilizando como blanco MSM suplementado con NaCl y ajustado al pH de óptimo crecimiento de cada cepa.

La técnica implementada fue la siguiente: un mL de una solución estándar de 500 ppm de ibuprofeno se depositó en una columna Sep-Pak® C18 Vac 6cc previamente acondicionada con 3 mL de acetona, 3 mL de metanol y 3 mL de agua destilada. Una vez depositada la muestra, la columna se lavó con 2 mL de agua destilada y se eluyó con 2 mL de metanol; este procedimiento se repitió 5 veces). Una vez eluído el ibuprofeno, la columna se reconstituyó con 2 mL de acetonitrilo (122). Al ibuprofeno eluído de la columna de SPE se le determinó el espectro de absorción y se cuantificó con la curva de calibración previamente determinada. Este experimento se hizo por triplicado. A partir de los valores obtenidos se determinó la eficiencia y reproducibilidad del método utilizado.

SPE Paracetamol

Para evaluar la efectividad y eficiencia del método se prepararon soluciones de paracetamol de concentraciones 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L preparadas en MSM complementado con 5% de NaCl y ajustado a pH óptimo de cada cepa, para simular lo más posible las condiciones de los cultivos bacterianos. A estas soluciones se les determinó el espectro de absorción entre 200 y 300 nm. A partir de las absorbancias medidas a la longitud de onda de máxima absorción se construyó una curva de calibración utilizando el espectrofotómetro EPOCH Biotek®. Las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo utilizando como blanco MSM suplementado con NaCl y ajustado al pH de óptimo crecimiento de cada cepa.

La técnica implementada fue la siguiente: un mL de una solución estándar de 500 ppm de paracetamol se depositó en una columna Sep-Pak® C18 Vac 6cc previamente acondicionada con 2 mL de metanol, 2 mL de agua destilada y 2 mL de agua destilada a pH 2. Una vez depositada la muestra, la columna se lavó con 1 mL de agua destilada y se eluyó con 5 mL de metanol seguido de 5 mL de una solución de NH₄OH al 5% (en agua). Una vez eluído el paracetamol, la columna se reconstituyó con 2 mL de una solución de metanol al 10% (en agua) (123). Al paracetamol eluído de la columna de SPE se le determinó el espectro de absorción

y se cuantificó con la curva de calibración previamente determinada. Este experimento se hizo por triplicado. A partir de los valores obtenidos se determinó la eficiencia y reproducibilidad del método utilizado.

Determinación por espectrofotometría UV

Las cepas bacterianas que mostraron potencial capacidad para degradar AINEs (las que decoloraron a los indicadores), fueron inoculadas en medio MH líquido complementado con NaCl y ajustando al pH de óptimo de cada una. Fueron incubadas durante 2 días a 37°C. Posteriormente, se transfirió un inóculo de 6×10^8 células/mL (3 McFarland) a un matraz que contenía 20 mL de MSM suplementado con NaCl y ajustado al pH de óptimo crecimiento de cada cepa. Los 20 mL del medio contenían además una concentración de 500 µg/mL del AINE a evaluar (diclofenaco, ibuprofeno o paracetamol).

Por otro lado, se prepararon controles, los cuales consistieron en 20 mL de MSM con 5% de NaCl y pH 7; el medio contenía una concentración de 500 µg/mL del AINE. Los cultivos bacterianos y los controles se incubaron a 37°C. Se tomó una alícuota de 3 mL de los matraces a las 0 y 720 horas, la cual se centrifugó a 3000 rpm por un tiempo de 10 minutos. Un mL de sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de los AINEs, utilizando los métodos de SPE anteriormente descritos para cada uno. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados de absorbancias obtenidos se interpolaron en la curva de calibración de diclofenaco, ibuprofeno o paracetamol para determinar la concentración en cada muestra analizada.

6.5.8. Identificación genética

Obtención de biomasa.

La biomasa fue obtenida a partir de las cepas bacterianas purificadas que se inocularon en el medio líquido MH, y se utilizó la metodología siguiente:

1. En un matraz de 125 mL con 30 mL de medio de cultivo líquido estéril MH, se inoculan las cepas aisladas.
2. Una vez que se observe un crecimiento suficiente, se transfiere todo el contenido del matraz a tubos Falcón de 15 mL previamente esterilizados y se centrifugan durante 15 minutos a 3000 rpm, se decanta el líquido sobrenadante y el material sedimentario que queda al fondo del tubo se transfiere a tubos eppendorf de 1.5 mL, los cuales, a su vez, se centrifugan a 14000 rpm por 5 minutos; nuevamente se descarta el líquido sobrenadante y se procede a iniciar el protocolo de extracción de ADN con el sedimento bacteriano.

Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN se utilizó el kit Promega Wizard® Genomic; de la misma manera que se hizo en la comprobación de la purificación de las cepas.

La visualización del ADN se hizo a través de una electroforesis en gel con concentración de agarosa al 1%, se utilizaron los productos de extracción de ADN para comprobar la presencia y observar la calidad del ADN; la metodología utilizada fue la misma que en el apartado 6.5.4.

Por otro lado, la calidad y cantidad del ADN se determinó en el espectrofotómetro EPOCH Biotech® siguiendo la metodología del Anexo 4.

Amplificación del gen rRNA 16S

Se realizó a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se utilizaron los cebadores o secuencias de nucleótidos siguientes:

27F: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'

518F: 5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3'

1492R: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

800R: 5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'

Se utilizó Taq ADN polimerasa comercial para llevar a cabo la reacción. El ciclo térmico se acondicionó de la siguiente manera: un ciclo de pre-desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, desnaturalización a 94°C por 60 segundos, acoplamiento a

59°C durante 30 segundos, elongación a 72°C por 60 segundos, los ciclos se repiten 30 veces y posteriormente un ciclo de post-elongación a 72°C durante 10 minutos. En un gel de agarosa al 1% se visualizan los productos amplificados y se revela con bromuro de etidio por 7 segundos.

Purificación del amplicón.

La purificación del producto de PCR se llevó a cabo utilizando el kit "PCR Clean up System Promega®":

1. Añadir un volumen igual de solución aglutinante de membrana a la amplificación de PCR.
2. Colocar una columna en un tubo de recolección para cada producto de PCR.
3. Transferir el producto de PCR preparado con solución aglutinante e incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
5. Quitar la mini columna y desechar el líquido del tubo de recolección.
6. Devolver la mini columna al tubo de recolección.
7. Lavar la columna añadiendo 700µL de solución de lavado de membrana previamente diluida con etanol al 95%
8. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto.
9. Vaciar el líquido del tubo recolector y volver a colocar la columna.
10. Repetir el lavado con 500µL de solución de lavado de membrana.
11. Centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos.
12. Retirar la columna, vaciar el tubo de recolección y volver a centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
13. Cuidadosamente, transferir la columna a un tubo de micro centrifuga de 1.5mL.
14. Aplicar 25µL de agua libre de nucleasas directamente en el centro de la columna.
15. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y volver a centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.

La pureza se comprobó en el espectrofotómetro EPOCH Biotech®, utilizando la placa Take 3 en su función de nanogota. Se obtuvo un único pico a 260 nm, lo que indicó que no había impurezas en el amplicón. Así mismo, el equipo reportó la

concentración final del producto de PCR, ya que se requieren 50 ng/ μ L para proceder con la secuenciación.

Secuenciación.

Se eligió el servicio de secuenciación de MacroGen Maryland, U.S.A. para enviar los productos amplificados

Identificación de cepas.

Se revisaron y corrigieron las secuencias obtenidas, utilizando el programa Chromas Pro (124). A partir de los fragmentos forward y reverse, las secuencias consenso fueron construidas utilizando la versión 7.0.9 del programa BioEdit. (125)

La comparación de las secuencias consenso se llevó a cabo con las secuencias que se encuentran almacenadas en las bases de datos del GenBank a través de los programas BLAST, del National Center of Biotechnology (NCBI), (126) y de EzBiocloud (102) para llegar a determinar el porcentaje de semejanza.

6.6 Análisis de datos

Todos los experimentos se realizarán por triplicado. Los datos obtenidos fueron analizados por t student, utilizando el paquete estadístico STATISTICA 7.

6.7 Aspectos éticos

Convenio sobre la diversidad biológica de las Naciones Unidas, suscrito en Río de Janeiro en junio de 1992.

El convenio tiene como objetivos principales:

- La conservación de la diversidad biológica.
- El uso sostenible de componentes de la diversidad biológica.
- El reparto justo y equitativo de los beneficios derivados de la utilización de recursos genéticos.

Así mismo, el Convenio establece que se deberá evitar o minimizar el impacto negativo que resulta del uso de los recursos biológicos.

Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica.

El protocolo tiene como objetivo contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, y centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos.

7. RESULTADOS

7.1 Capítulo de libro aceptado

7.1.1. Título del capítulo de libro aceptado

Detección de bacterias halotolerantes potencialmente degradadoras de ibuprofeno y paracetamol. Prueba rápida cualitativa.

7.1.2. Portada del capítulo de libro

**DETECCIÓN DE BACTERIAS HALOTOLERANTES
POTENCIALMENTE DEGRADADORAS DE IBUPROFENO Y
PARACETAMOL. PRUEBA RÁPIDA CUALITATIVA**

M. en C. Lorna Catalina Can-Ubando^{1,4}, Dra. Keila Isaac-Olivé², Dr.
Ángel Horacio Sandoval-Trujillo³, Dra. Ninfa Ramírez-Durán^{*4}.

1. Estudiante del Doctorado en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias de la Conducta, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. (ORCID: 0000-0002-3918-3348).

2. Laboratorio de Investigación en Teranóstica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. (ORCID: 0000-0003-4388-3811).

3. Laboratorio de Producción de Biológicos. Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Ciudad de México, México. (ORCID: 0000-0002-7762-1775).

4. Laboratorio de Investigación en Microbiología Médica y Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México, México. (ORCID:0000-0003-3108-895X)

*Autor de correspondencia. e-mail: nramirezd@uaemex.mx

Cel: 7223373619

7.1.3. Resumen

Introducción: El uso indiscriminado y la mala disposición de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) ha llevado a la contaminación de cuerpos de agua, causando ecotoxicidad y daño a la salud del ser humano. La biorremediación es la mejor opción para mitigar el daño hecho y las bacterias producen enzimas que podrían ocasionar la degradación de estos compuestos. **Objetivo:** Implementar una prueba rápida cualitativa para la identificación de bacterias halotolerantes potencialmente degradadoras de AINEs. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio experimental de tipo cualitativo. Se aislaron bacterias de ambientes salinos y se les realizó una caracterización fisiológica para conocer el % de NaCl y pH óptimos para su crecimiento. Las cepas se incubaron a 37°C durante 120h con el indicador redox (DCPIP o CV) y utilizando ibuprofeno o paracetamol como única fuente de carbono. A las cepas que obtuvieron un resultado positivo en la prueba rápida, se les realizó una cinética de crecimiento utilizando glucosa o el AINE (ibuprofeno o paracetamol) como única fuente de carbono. **Resultados:** Cuatro cepas halotolerantes aisladas de suelos salinos, demostraron ser potencialmente degradadoras de AINEs. Las cepas HS4-2 y TXO1-1SG1 dieron un resultado positivo con ibuprofeno y las cepas LB2 (MH) y LB2 (TSA) dieron un resultado positivo con paracetamol. **Conclusiones:** La prueba rápida cualitativa resultó útil en la detección de bacterias potencialmente degradadoras de ibuprofeno y paracetamol.

Palabras clave: Antiinflamatorios no esteroideos, bacteria, halotolerante, biodegradación, DCPIP, cristal violeta.

7.2. Artículo enviado

7.2.1. Título del artículo enviado

Determination of the degradation potential of ibuprofen by *Bacillus safensis* using a combined method of colorimetry and solid-phase extraction-UV spectroscopy

7.2.2. Envío del artículo

Archives of Environmental Contamination and Toxicology
DETERMINATION OF THE DEGRADATION POTENTIAL OF IBUPROFEN BY
***Bacillus safensis* USING A COMBINED METHOD OF COLORIMETRY AND SOLID-**
PHASE EXTRACTION-UV SPECTROSCOPY
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	AECT-D-21-00466	
Full Title:	DETERMINATION OF THE DEGRADATION POTENTIAL OF IBUPROFEN BY <i>Bacillus safensis</i> USING A COMBINED METHOD OF COLORIMETRY AND SOLID-PHASE EXTRACTION-UV SPECTROSCOPY	
Article Type:	Original Research	
Keywords:	Ibuprofen; Bioremediation; <i>Bacillus safensis</i> ; ibuprofen-degrading; redox	
Corresponding Author:	Ninfa Ramírez-Durán, Dr. Universidad Autónoma del Estado de México: Universidad Autonoma del Estado de Mexico Toluca, MEXICO	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autónoma del Estado de México: Universidad Autonoma del Estado de Mexico	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Lorna Catalina Can-Ubando	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Lorna Catalina Can-Ubando	
	Keila Isaac-Olivé	
	Gaudy Lizeth Manzanares-Leal	
	Horacio Sandoval-Trujillo	
	Ninfa Ramírez-Durán, Dr.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Universidad Autónoma del Estado de México (6268/2020/CIF)	Dr. Ninfa Ramírez-Durán

7.2.3. Confirmación de recepción del artículo

AECT-D-21-00466 - Submission Confirmation

Archives of Environmental Contamination and Toxicology (AECT) <em@editorialmanager.com>

Jul 26/08/2021 06:08 PM

Para: Ninfa Ramirez-Durán <ninfard@hotmail.com>

Dear Dr. Ramirez-Durán,

Thank you for submitting your manuscript, DETERMINATION OF THE DEGRADATION POTENTIAL OF IBUPROFEN BY *Bacillus safensis* USING A COMBINED METHOD OF COLORIMETRY AND SOLID-PHASE EXTRACTION-UV SPECTROSCOPY, to Archives of Environmental Contamination and Toxicology.

The submission id is: AECT-D-21-00466

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by log onto the journal's website.

Your username is: ninfard@hotmail.com

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/aect/>.

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office

Archives of Environmental Contamination and Toxicology

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding. Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

****Our flexible approach during the COVID-19 pandemic****

If you need more time at any stage of the peer-review process, please do let us know. While our systems will continue to remind you of the original timelines, we aim to be as flexible as possible during the current pandemic.

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

7.2.4. Resumen

ABSTRACT

Introduction: Ibuprofen is one of the most widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). It can be found in aquatic environments; its presence increases the risk of ecotoxicity in exposed organisms. Viable options are required to mitigate environmental damage, and bacteria have shown significant potential in bioremediation. **Objective:** To demonstrate the ability of strain HS4-2 as a potential ibuprofen-degrading species and to identify it. **Materials and methods:** Strain HS4-2S was reactivated and physiologically characterized (% NaCl and pH optimal for its growth). Its ibuprofen degradation capacity was qualitatively evaluated using the oxidation-reduction indicators (redox) 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) and crystal violet (CV). Growth kinetics were determined using glucose or ibuprofen as carbon sources. After 360 hours of incubation in a bacterial culture, the degradation capacity of ibuprofen was quantitatively determined by solid-phase extraction followed by UV spectroscopy. **Results:** Strain HS4-2 was found to be haloalkalotolerant, potentially degrading ibuprofen by decolorizing redox indicators, growing in the presence of ibuprofen as the sole carbon source, and reducing the concentration of ibuprofen by 9 % after 360 h of incubation. Both qualitative and quantitative methods were helpful; the quantitative method had 110 % recovery. The potentially degrading strain was genetically identified as *Bacillus safensis*. **Conclusions:** This is the first report in which the potential degrader of ibuprofen by *Bacillus safensis* species is proven.

8. RESULTADOS ADICIONALES

8.1. Espectros de las curvas de calibración de diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol

Figura 4. Espectros de la curva de calibración de la solución estándar de diclofenaco en metanol. Se observa el punto máximo de absorbancia a 282 nm.

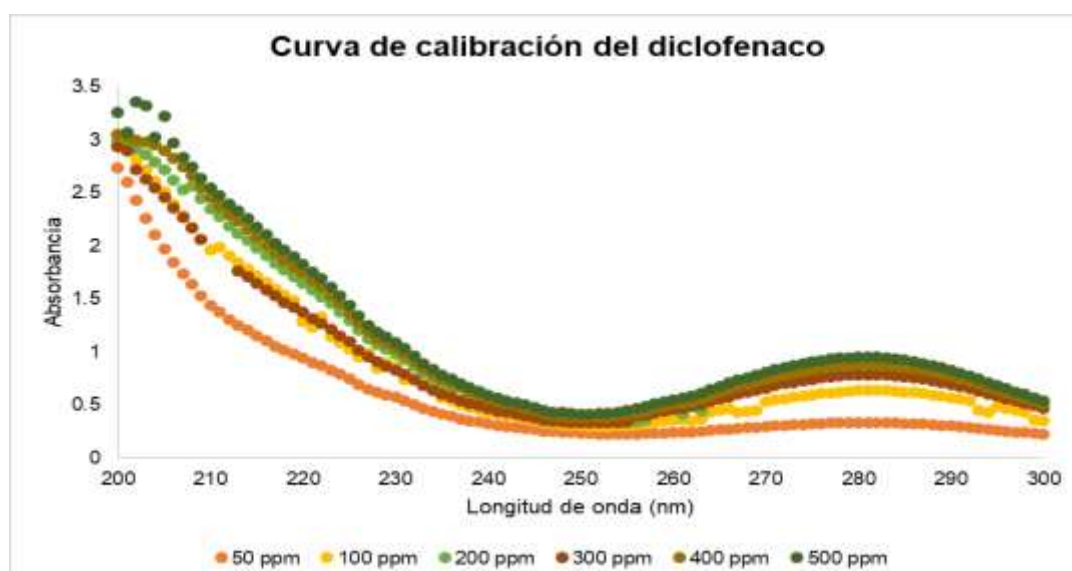


Figura 4. Espectro de la solución estándar de diclofenaco a diferentes concentraciones, utilizadas para realizar la curva de calibración.

Figura 5. Espectros de la curva de calibración de la solución estándar de ibuprofeno en metanol. Se observa el punto máximo de absorbancia a 224 nm.

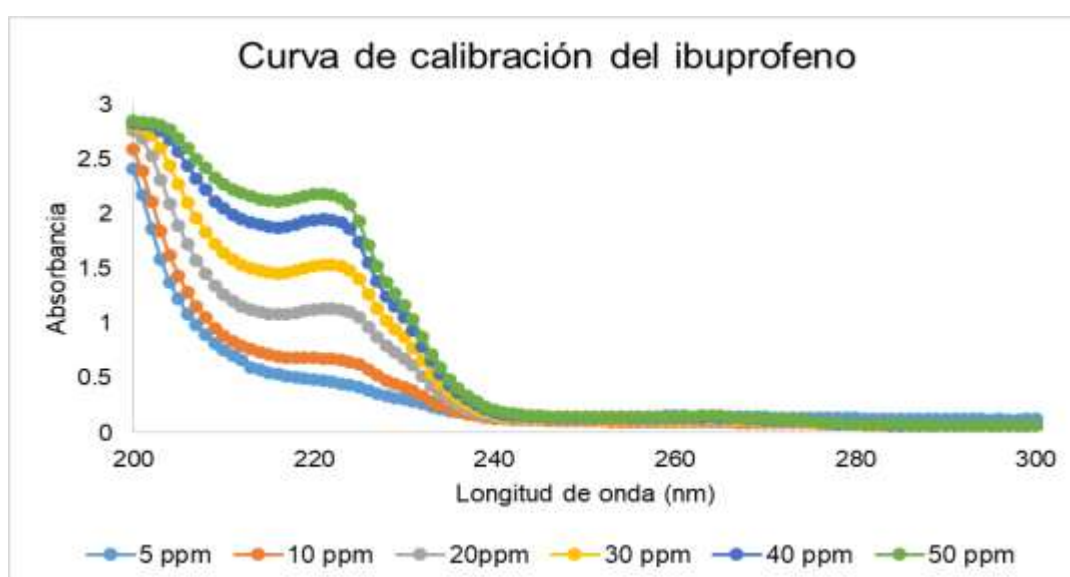


Figura 5. Espectro de la solución estándar de ibuprofeno a diferentes concentraciones, utilizadas para realizar la curva de calibración.

Figura 6. Espectros de la curva de calibración de la solución estándar de paracetamol en NH_4OH al 5%: metanol en una proporción 50:50. Se observa el punto máximo de absorbancia a 260 nm.

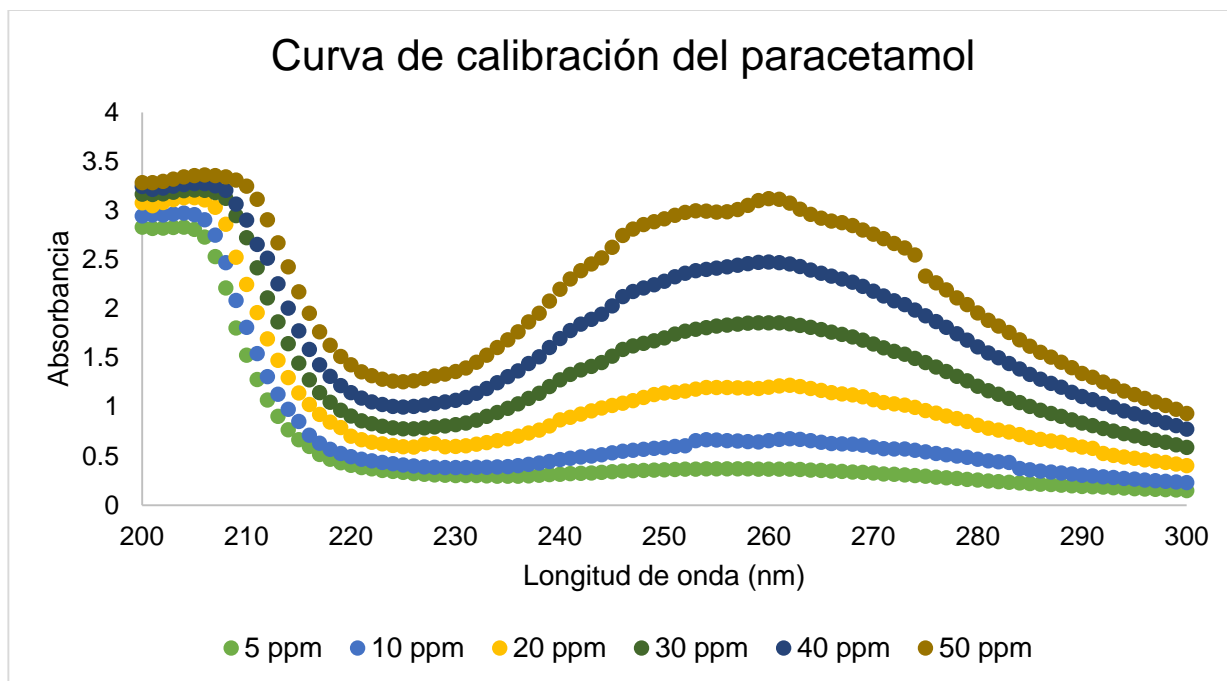


Figura 6. Espectro de la solución estándar de paracetamol a diferentes concentraciones, utilizadas para realizar la curva de calibración.

9. Conclusiones

- Se reactivaron 74 cepas bacterianas, todas son bacilos Gram positivos. Así mismo, 21 de las cepas fueron alcalófilas, 25 alcalotolerantes y 28 crecieron en pH ácido-neutro. Por otro lado, las 74 cepas fueron halotolerantes débiles
- 8 cepas dieron un resultado positivo a la prueba cualitativa de biodegradación de AINEs; 4 para diclofenaco (HA5-1, ESE2-3E, TXV7-6MHG5 y TXO7B-1SG6), 2 para ibuprofeno (HS4-2 y TXO1-1SG1) y 2 para paracetamol (LB2 (MH) y LB2 (TSA)).
- El Cristal Violeta tiene mayor sensibilidad que el DCPIP, por lo que resultó ser mejor indicador de óxido-reducción para la detección de bacterias potencialmente degradadoras de AINEs.
- La cinética de crecimiento se ve afectada con la presencia de AINEs; sin embargo, las bacterias pueden utilizarlos como única fuente de carbono.
- 4 cepas fueron aptas para la prueba semicuantitativa de biodegradación de diclofenaco, 2 cepas con ibuprofeno y 2 cepas con paracetamol.
- Fue necesario realizar la separación en fase sólida con los tres AINEs para poder obtener una lectura confiable de los mismos.
- Se observó un decremento en la concentración de diclofenaco a 276 nm, entre la hora cero y las 720 horas en las cepas HA5-1 y TXO7B-1SG6.
- Las cepas HS4-2 y TXO1-1SG1 degradaron ibuprofeno, de acuerdo a los picos observados a 224 nm en las horas 0 y 720.
- Ninguna de las cepas obtuvo un resultado positivo en la prueba semicuantitativa de degradación de paracetamol.
- Se requiere realizar la identificación y el análisis de los productos para definir el porcentaje de biodegradación de diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol.
- Todas las cepas potencialmente degradadoras de AINEs que han sido identificadas, pertenecen al género *Bacillus*.
- Las cepas HA5-1 y TXO7B-1SG6 demostraron tener potencial degradador de diclofenaco al disminuir la concentración de los productos (276 nm) un 20% y 28% respectivamente. Dichas cepas fueron identificadas como *Bacillus paralicheniformis* en EzBiocloud y como *Bacillus haynesii* en BLAST.
- En el caso del ibuprofeno, hubo una degradación de 9% y 33% por las cepas HS4-2 y TXO1-1SG1 respectivamente.
- La cepa HS4-2 fue identificada como *Bacillus safensis* tanto en EzBiocloud como en BLAST.

- Dentro de las cepas reactivadas, ninguna de ellas demostró ser capaz de degradar paracetamol.
- No hay registros previos del potencial biodegradador de estas cepas bacterianas, de diclofenaco o ibuprofeno.

10. Referencias bibliográficas

1. Gavrilesco M, Demnerova K, Aamand J, Agathos S, Fava F. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*. 2015;32(1):147 - 56.
2. Li H, Dong Z, Weng Q, Chang C-C, Liu B. Emerging Pollutants – Part I: Occurrence, Fate and Transport. *Water Environment Research*. 2015;87(10):1849 - 72.
3. Geissena V, Molb H, Klumppc E, Umlaufd G, Nadale M, van der Ploega M, et al. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*. 2015;3:57 - 65.
4. Voloshenko-Rossin A, Gasser G, Cohen K, Gun J, Cumbal-Flores L, ParraMorales W, et al. Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro–Guayllabamba–Esmeraldas rivers. *Environmental Science Processes & Impacts*. 2015;17:41 - 53.
5. Verlicchi P, Galletti A, Petrovic M, Barceló D. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*. 2010;389:416 - 28.
6. Bilal M, Rasheed T, Iqbal HMN, Yan Y. Peroxidases-assisted removal of environmentally-related hazardous pollutants with reference to the reaction mechanisms of industrial dyes. *Science of the Total Environment*. 2018;644:1 - 13.
7. Estrada-Arriaga EB, Cortés-Muñoz JE, González-Herrera A, Calderón-Mólgora CG, Rivera-Huerta MdL, Ramírez-Camperos E, et al. Assessment of full-scale biological nutrient removal systems upgraded with physico-chemical processes for the removal of emerging pollutants present in wastewaters from Mexico. *Science of the Total Environment*. 2016:1 - 11.
8. Moeder M, Carranza-Diaz O, López-Angulo G, Vega-Aviña R, Chávez-Durán FA, Jomaa S, et al. Potential of vegetated ditches to manage organic pollutants derived from agricultural runoff and domestic sewage: A case study in Sinaloa (Mexico). *Science of the Total Environment*. 2017;598:1106 - 15.
9. Polanco Rodríguez ÁG, Riba López MI, DelValls Casillas TA, Araujo León JA, Kumar Prusty BA, Álvarez Cervera FJ. Levels of persistent organic pollutants in breast milk of Maya women in Yucatan, Mexico. *Environ Monit Assess*. 2017;189(59):1 - 13.
10. Rivera-Jaimes JA, Postigo C, Melgoza-Alemán RM, Aceña J, Barceló D, López de Alda M. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*. 2018;613-614.
11. He B-s, Wang J, Liu J, Hu X-m. Eco-pharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Necessity and opportunities. *Chemosphere*. 2017;181:178 - 89.
12. Mezzelani M, Gorbi S, Da Ros Z, Fattorini D, d'Errico G, Milan M, et al. Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*. 2016:1 - 9.
13. Haley RM, von Recum HA. Localized and targeted delivery of NSAIDs for treatment of inflammation: A review. *Experimental Biology and Medicine* 2018;0:1 - 12.
14. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de las industrias farmacéutica y farmoquímica., (1995).

15. Wang J, He B, Yan D, Hu X. Implementing ecopharmacovigilance (EPV) from a pharmacy perspective: A focus on non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Science of the Total Environment*. 2017;1 - 13.
16. Wang J, Zhao S-q, Zhang M-y, He B-s. Targeted ecopharmacovigilance for ketoprofen in the environment: Need, strategy and challenge. *Chemosphere*. 2018;194:450 - 62.
17. Bacchi S, Palumbo P, Sponta A, Coppolino MF. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry*. 2012;11(1):52-64.
18. McGettigan P, Henry D. Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High- Income Countries. *PLOS Medicine*. 2013;2(10):1 - 6
19. Altman R, Bosch B, Brune K, Patrignani P, Young C. Advances in NSAID Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology. *Drugs*. 2015;75:859 - 77.
20. Uriarte V, Trejo S. *Farmacología Clínica*. Primera ed: Trillas; 2003.
21. Katzung B. *Farmacología básica y clínica*. Décima ed: El Manual Moderno; 2007 2007.
22. Pérez-Estrada LA, Malato S, Gernjak W, Agüera A, Thurman EM, Ferrer I, et al. Photo-fenton degradation of diclofenac: identification of main intermediates and degradation pathway. *Environ Sci Technol*. 2005;39(21):8300-6.
23. Shin D, Lee SJ, Ha Y-M, Choi Y-S, Kim J-W, Park S-R, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation according to absorption differences in three formulations of ibuprofen. *Drug Design, Development and Therapy*. 2017;11:135 - 41.
24. Liu D, Zhang H, Wei Y, Liu B, Lin Y, Li G, et al. Enhanced degradation of ibuprofen by heterogeneous electro-Fenton at circumneutral pH. *Chemosphere*. 2018;209:998-1006.
25. Greenstein B, Greenstein A. *Concise Clinical Pharmacology*. Primera ed. Gran Bretaña: Pharmaceutical Press; 2007.
26. Rainsford KD. *Aspirin and Related Drugs*. Primera ed. USA: Taylor and Francis; 2004.
27. Bennet N, Brown MJ, Sharma P. *Clinical Pharmacology*. 11 ed. China: Elsevier; 2012.
28. Moctezuma E, Leyva E, Aguilar CA, Luna RA, Montalvo C. Photocatalytic degradation of paracetamol: intermediates and total reaction mechanism. *Journal of hazardous materials*. 2012;243:130-8.
29. Mora C, Tello M, Martínez F. Validación de una metodología analítica para la cuantificación de naproxeno en estudios de reparto líquido/líquido mediante espectrofotometría ultravioleta. *Rev Col Cienc Quim Farm*. 2006;35(1):81 - 105.
30. Sunaric S, Petkovic M, Denic M, Pavlovic A. Determination of ibuprofen in combined dosage forms and cream by direct UV spectrophotometry after solid-phase extraction. *Acta Poloniac Pharmaceutica - Drug Research*. 2013;70(3):403 - 11.
31. Damiani P, Bearzotti M, Cabezón MA. Spectrofluorometric determination of naproxen in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002;29:229 - 38.
32. Sadecka J, Cakrt M, Hercegova A, Polonsky J, Skacani I. Determination of ibuprofen and naproxen in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001;25(5 - 6):881 - 91.

33. Fatoki OS, Opeolu BO, Genthe B, Olatunji OS. Multi-residue method for the determination of selected veterinary pharmaceutical residues in surface water around Livestock Agricultural farms. *Helyon*. 2018;4:1 - 16.
34. James T, Collins S, Amlótb R, Marczylo T. Optimisation and validation of a GC–MS/MS method for the analysis of methyl salicylate in hair and skin samples for use in human volunteer decontamination studies. *Journal of Chromatography B*. 2019;1109:84 - 9.
35. Thomas O, Burgess C. *UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater*. Elsevier. 2007;Segunda edición:2 - 18.
36. Bosch Ojeda C, Sanchez Rojas F. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*. 2004;518:1 - 24.
37. Hemmateenejad B, Nekoeinia M, Absalan G, Ansari M. Photodegradation Study of Nystatin by UV-Vis Spectrophotometry and Chemometrics Modeling. *Journal of AOAC International*. 2014;97(4):1206 - 12.
38. Saetama V, Vera L, Vanegas M, Cruzat C, Brazales D. Evaluación toxicológica de soluciones acuosas de ibuprofeno mediante bioensayos con *Artemia salina*, *Allium schoenoprasum* L y *Lactucasativa*. *Revista de Toxicología*. 2018;35:112 - 8.
39. Matiz-Melo G, Rodríguez-Cavallo E, Osorio M. Estudio comparativo de la calidad biofarmacéutica de marcas comerciales y multifuente de tabletas de ibuprofeno en el mercado colombiano. *Rev Col Cienc Quim Farm*. 2017;46(1):61 - 83.
40. Ahmad MH, Sahar A, Hitzmann B. Fluorescence Spectroscopy for the Monitoring of Food Processes. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 2017:121 - 51.
41. Li Y, Yang H, Wang Y, Bu S. Pharmacokinetics and residues elimination of diclofenac sodium administration in pigs by a new HPLC/MS method. *Cellular and Molecular Biology*. 2019:1 - 5.
42. Abdelwahab NS, Abdelrahman MM. Simultaneous Determination of Methocarbamol and Ibuprofen by First Derivative Synchronous Fluorescence Spectroscopic Method in Their Binary Mixture and Spiked Human Plasma. *Journal of Fluorescence*. 2013;24(1):1 - 7.
43. Valcarcel M, Gómez A. *Técnicas Analíticas de Separación*. Primera ed. España: Reverté; 1988.
44. Barquero M. *Principios y aplicaciones de la Cromatografía de Gases*. Primera ed. Costa Rica: UCR; 2006.
45. Harris D. *Análisis Químico Cuantitativo*. Tercera ed. España: Reverté; 2007.
46. Skoog D, West D, Holler J. *Fundamentos de Química Analítica*. Cuarta ed. España: Reverté; 2001.
47. Rodríguez I, Quintana JB, Carpinteiro J, Carro AM, Lorenzo RA, Cela R. Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography–mass spectrometry as tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography A*. 2003;985:265 - 74.
48. Sebok A, Vasanits-Zsigraia A, Palko G, Zaray G, Molnar-Perl I. Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry. *Talanta*. 2008;76:642 - 50.
49. Gennaro A. *Remington: Farmacia*. 20 ed. Argentina: Médica Panamericana; 2003.

50. De Castro A. Aplicación de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tandem a la determinación de antidepresivos en plasma y fluido oral [Doctorado]. España: Universidad de Santiago de Compostela; 2007.
51. Gómez-Canela C, Sala-Comorera T, Pueyo V, Barata C, Lacorte S. Analysis of 44 pharmaceuticals consumed by elderly using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;168:55 - 63.
52. Aguilar-Arteaga K, Rodríguez JA, Miranda JM, Medina J, Barrado E. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters by magnetic matrix solid phase dispersion–HPLC. *Talanta*. 2010;80:1152 - 7.
53. Ramos Payán M, Bello López MÁ, Fernández Torres R, Villar Navarro M, Callejón Mochón M. Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples. *Talanta*. 2011;85:394 - 9.
54. Sultana N, Arayne MS, Siddiqui R, Naveed S. RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Lisinopril and NSAIDs in API, Pharmaceutical Formulations and Human Serum. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2012;3:147 - 52.
55. Shakeel S, Naveed S, Usmanghani K, Sarwar G, Tanweer Alam M. RP-HPLC Simultaneous Analysis of Glimepride and NSAIDs in Active Pharmaceutical Ingredient, Formulations and Human Serum. *RADS-JPPS*. 2015;3(2):58 - 64.
56. Kim JM, Myung S-W. Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Urine by HPLC–UV/Vis Analysis Coupled with Electromembrane Extraction. *Korean Chemical Society*. 2018:1 - 6.
57. García Peña CM, Pereda Rodríguez D, González Cortezón A, Montes de Oca Porto Y, Cañizares Arencibia Y, León Guerrero GM. Determinación de diclofenaco de sodio por cromatografía líquida de alta resolución en un colirio al 0,1 %. *Revista Cubana de Farmacia*. 2009;43(3):1 - 10.
58. Gohel NR, Patel BK, Parmar VK. Chemometrics-Assisted UV Spectrophotometric and RP-HPLC Methods for the Simultaneous Determination of Tolperisone Hydrochloride and Diclofenac Sodium in their Combined Pharmaceutical Formulation. *Scientia Pharmaceutica*. 2013;81(4):1 - 20.
59. Cha YI, Solnica-Krezelb L, DuBois RN. Fishing for prostanoids: Deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Developmental Biology*. 2006;289:263 - 72.
60. Ohd J, Wikstrom K, Sjolander A. Leukotrienes induce cell-survival signaling in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2000;119(4):1007 - 18.
61. Cardoso-Vera JD, Islas-Flores HI, SanJuan-Reyes N, Montero-Castro EI, Galar-Martínez M, García-Medina S, et al. Comparative study of diclofenac-induced embryotoxicity and teratogenesis in *Xenopus laevis* and *Lithobates catesbeianus*, using the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX). *Science of the Total Environment*. 2017;574:467 - 75.
62. Islas-Flores H, Gomez-Oliván LM, Galar-Martínez M, Colín-Cruz A, Neri-Cruz N, Garcia-Medina S. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013;92:32 - 8.
63. Oviedo-Gómez DGC, Galar-Martínez M, García-Medina S, Razo-Estrada C, Gómez-Oliván LM. Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2010;29:39 - 43.
64. Islas-Flores H, Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, García-Medina S, Neri-Cruz N, Dublán-García O. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and

brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environ Sci Pollut Res*. 2014;2014:1 - 10.

65. Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, Islas-Flores H, García-Medina S, SanJuan-Reyes N. DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 2014;164:21 - 6.

66. Walter S, Mitkidis K. The Risk Assessment of Pharmaceuticals in the Environment: EU and US Regulatory Approach. *European Journal of Risk Regulation*. 2018;0:1 - 21.

67. Alshakka M, Izham M, Ibrahim M, Azmi Hassali M, Palaian S, Aljadhey H. Hazards of Pharmaceuticals in Water as New Area in Eco-Pharmacovigilance Research. *Journal of Pharmacy Practice and Community Medicine*. 2016;2(1):3 - 8.

68. Monteiro C, Miranda C, Brito F, Fonseca F, Araujo ARTS. Consumption patterns of NSAIDs in central Portugal and the role of pharmacy professionals in promoting their rational use. *Drugs Ther Perspect*. 2016:1 - 9.

69. Castro-Pastrana LI, Baños-Medina MI, López-Luna MA, TorresGarcía BL. Ecofarmacovigilancia en México: perspectivas para su implementación. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2015;46(3):16 -40.

70. Sánchez Pérez FJ. Biodegradación en la gestión de residuos. *Moleqlla*. 2018;29:1 - 3.

71. Alneyadi AH, Rauf MA, Ashraf SS. Oxidoreductases for the remediation of organic pollutants in water – a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2018:1 - 19.

72. Almeida B, Oehmen A, R M, Brito D, Carvalho G, Barreto Crespo MT. Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture. *Bioresource Technology*. 2013;133:31 - 7.

73. Carter CF, Smith AL. *Principles of Microbiology*: Mosby; 1961. 603 p.

74. Chandra Parija S. *Quick Review Series: Microbiology*. Primera ed. Delhi, India: El Sevier; 2009. 420 p.

75. Soininen J, Korhonen J, Luoto M. Stochastic species distributions are driven by organism size. *Ecology*. 2013;94:660-70.

76. Liu J, Tu T, Gao G, Bartlam M, Wang Y. Biogeography and Diversity of Freshwater Bacteria on a River Catchment Scale. *Microbial ecology*. 2019;78(2):324-35.

77. Livermore JA, Jones SE. Local-global overlap in diversity informs mechanisms of bacterial biogeography. *The ISME journal*. 2015;9(11):2413-22.

78. Pala C, Molari M, Nizzoli D, Bartoli M, Viaroli P, Manini E. Environmental Drivers Controlling Bacterial and Archaeal Abundance in the Sediments of a Mediterranean Lagoon Ecosystem. *Current microbiology*. 2018;75(9):1147-55.

79. Bowen JL, Crump BC, Deegan LA, Hobbie JE. Salt marsh sediment bacteria: their distribution and response to external nutrient inputs. *The ISME journal*. 2009;3(8):924-34.

80. Kalkan S, Altuğ G. Bio-indicator bacteria & environmental variables of the coastal zones: The example of the Güllük Bay, Aegean Sea, Turkey. *Marine pollution bulletin*. 2015;95(1):380-4.

81. Chang BV, Chang YT, Chao WL, Yeh SL, Kuo DL, Yang CW. Effects of sulfamethoxazole and sulfamethoxazole-degrading bacteria on water quality and microbial communities in milkfish ponds. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2019;252(Pt A):305-16.

82. Bhatt P, Pal K, Bhandari G, Barh A. Modelling of the methyl halide biodegradation in bacteria and its effect on environmental systems. *Pesticide biochemistry and physiology*. 2019;158:88-100.

83. Shartooh SM, Abood MF, Yakob HK. Biodegradation of low viscosity spindle oil causing environmental pollution. 2020;202(8):2189-96.
84. Mazzeo DE, Levy CE, de Angelis Dde F, Marin-Morales MA. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *The Science of the total environment*. 2010;408(20):4334-40.
85. Smulek W, Sydow M, Zabielska-Matejuk J, Kaczorek E. Bacteria involved in biodegradation of creosote PAH - A case study of long-term contaminated industrial area. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;187:109843.
86. Zhu X, Ni X, Waigi MG, Liu J, Sun K, Gao Y. Biodegradation of Mixed PAHs by PAH-Degrading Endophytic Bacteria. *International journal of environmental research and public health*. 2016;13(8).
87. Pawlik M, Piotrowska-Seget Z. Endophytic Bacteria Associated with *Hieracium piloselloides*: Their Potential for Hydrocarbon-Utilizing and Plant Growth-Promotion. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2015;78(13-14):860-70.
88. Mitter EK, Kataoka R, de Freitas JR, Germida JJ. Potential use of endophytic root bacteria and host plants to degrade hydrocarbons. *International journal of phytoremediation*. 2019;21(9):928-38.
89. Mello IS, Targanski S, Pietro-Souza W, Frutuoso Stachack FF, Terezo AJ, Soares MA. Endophytic bacteria stimulate mercury phytoremediation by modulating its bioaccumulation and volatilization. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;202:110818.
90. Mesa V, Navazas A, González-Gil R, González A, Weyens N, Lauga B, et al. Use of Endophytic and Rhizosphere Bacteria To Improve Phytoremediation of Arsenic-Contaminated Industrial Soils by Autochthonous *Betula celtiberica*. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(8).
91. Weyens N, Croes S, Dupae J, Newman L, van der Lelie D, Carleer R, et al. Endophytic bacteria improve phytoremediation of Ni and TCE co-contamination. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2010;158(7):2422-7.
92. Chen J, Li N, Han S, Sun Y, Wang L, Qu Z, et al. Characterization and bioremediation potential of nickel-resistant endophytic bacteria isolated from the wetland plant *Tamarix chinensis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2020;367(12).
93. Santero E, Díaz E. Special Issue: Genetics of Biodegradation and Bioremediation. *Genes*. 2020;11(4).
94. Liang C, Huang Y, Wang H. *pahE*, a Functional Marker Gene for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2019;85(3).
95. Pei A, Nossa CW, Chokshi P, Blaser MJ, Yang L, Rosmarin DM, et al. Diversity of 23S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. *PLoS ONE*. 2009;4(5):1 - 9.
96. ROLLER C, LUDWIG W, HEINZ SCHLEIFE K. Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23s rRNA genes *Journal of General Microbiology*. 1992;138:1167 - 75.
97. Ramírez-Durán N, Ramírez-Saad H, Melgoza-Contreras LM, Sandoval H. Amplification of the specific insertion in the rRNA 23S gene, as a criterion of purity in preparation of actinomycetes DNA. *Journal de Mycologie Médicale*. 2006;16:26 - 9.
98. Zaragoza Bastida A, Karam Calderón MÁ, Bustamante Montes LP, Sandoval Trujillo ÁH, Ramírez Durán N. Marcador molecular de actinomicetos utilizado para detectar micobacterias en muestras de esputo. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2014;45(1):35 - 40.

99. Kasai A, Ohta A, Maeda Y, Yamada K, Tao K, Saito R. Novel mechanism responsible for high-level macrolide resistance in *Moraxella catarrhalis*. *Infection and Drug Resistance*. 2018;11:2137 - 40.
100. Louca S, Doebeli M, Wegener Parfrey L. Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem. *Microbiome*. 2018;6(41):1 - 12.
101. Laserna Mendieta EJ, Claesson MJ. CREACIÓN DE LIBRERÍAS MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL ARN RIBOSOMAL 16S PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA. *Laboratory Medicine at a glance*. 2016;4:9 - 13.
102. Yoon SH, Ha S, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, et al. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017;67:1613 - 317.
103. Langenhoff A, Inderfurth N, Veuskens T, Schraa G, Blokland M, Kujawa-Roeleveld K, et al. Microbial Removal of the Pharmaceutical Compounds Ibuprofen and Diclofenac from Wastewater. *BioMed Research International*. 2013;2013:1 - 9.
104. Wojcieszynska D, Domaradzka D, Hupert-Kocurek K, Guzik U. Bacterial degradation of naproxen e Undisclosed pollutant in the environment. *Journal of Environmental Management*. 2014;145:157 - 61.
105. Murdoch R, Hay A. The biotransformation of ibuprofen to trihydroxyibuprofen in activated sludge and by *Variovorax Ibu-1*. *Biodegradation*. 2015;26:105 - 13.
106. Aissaoui S, Ouled-Haddar H, Sifour M, Harrouche K, Sghaier H. Metabolic and Co-Metabolic Transformation of Diclofenac by *Enterobacter hormaechei* D15 Isolated from Activated Sludge. *Curr Microbiol*. 2017;74:381 - 8.
107. Górny D, Guzik U, Hupert-Kocurek K, Wojcieszynska D. Naproxen ecotoxicity and biodegradation by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) strain. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;167:505 - 212.
108. Ivshina IB, Tyumina EA. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346. 2019;9(1):9159.
109. Moreiraa IS, Bessaa VS, Murgolob S, Piccirilloa C, Mascolob G, Castroa PML. Biodegradation of Diclofenac by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018;152:104 - 13
110. Nguyen LN, Nghiem LD, Pramanikb BK, Oh S. Cometabolic biotransformation and impacts of the anti-inflammatory drug diclofenac 2 on activated sludge microbial communities. *Science of the Total Environment*. 2018:1 - 25.
111. Zhang Y, Zhu H, Szewzyk U, Geissen SU. Removal of pharmaceuticals in aerated biofilters with manganese feeding. *Water Research*. 2015;72:218 - 26.
112. Nawani N, Aigle B, Mandal A, Bodas M, Ghorbel S, Prakash D. Actinomycetes: Role in Biotechnology and Medicine. *BioMed Research International*. 2013;2013:687190.
113. Vieno N, Sillanpää M. Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant — A review. *Environment International*. 2014;69:28 - 39.
114. Ruhí A, Acuña V, Barceló D, Huerta B, Mor J-R, Rodríguez-Mozaz S, et al. Bioaccumulation and trophic magnification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in a Mediterranean river food web. *Science of the Total Environment*. 2015:1 - 10.
115. Quesada E, Ventosa A, Rodríguez-Valera F, Megias L, Ramos-Cormenzana A. Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Bacteria from Hypersaline Soils. *Journal of General Microbiology*. 1983;129:2649 - 57.

116. Sandoval Trujillo H, Sanchez Saucedo N, Ramírez-Durán N, Beer Chavero L. Design of an economic method for the isolation of nocardioform actinomycetes from the soil. *J Mycol Med.* 1997;7(4):232 - 3.
117. Song H, Kim TY, Choi B-K, Choi SJ, Nielsen LK, Chang HN, et al. Development of chemically defined medium for *Mannheimia succiniciproducens* based on its genome sequence. *Applied Microbial and Cell Physiology.* 2008;79:263 - 72.
118. Jahn B, Jonasson NS, Hu H, Singer H, Pol A, Good NM, et al. Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 2020:1-14.
119. Yang J, Zhang Y, Wang S, Li S, Wang Y, Wang S, et al. Biodegradation of crystal violet mediated by CotA from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of bioscience and bioengineering.* 2020;130(4):347-51.
120. Marko V, Šoltés L, Radová K. Polar Interactions in Solid-Phase Extraction of Basic Drugs by Octadecylsilylanized Silica *Journal of Chromatographic Science.* 1990;28(8):403 - 6.
121. Arcelloni C, Lanzi R, Pedercini S, Molteni G, Fermo I, Pontiroli A, et al. High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B.* 2001;763(1 - 2):195 - 200.
122. Paíga P, Delerue-Matos C. Response surface methodology applied to SPE for the determination of ibuprofen in various types of water samples. *Journal of separation science.* 2013;36(19):3220-5.
123. Santos LH, Paíga P, Araújo AN, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MC. Development of a simple analytical method for the simultaneous determination of paracetamol, paracetamol-glucuronide and p-aminophenol in river water. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 2013;930:75-81.
124. Pro C.
125. Hall L. *BioEdit.* 2005.
126. Benson D, Cavanaugh M, Clark K, Karsh-Mizrachi I, Liman D, Ostell J. GenBank. *Nucleic Acids Research.* 2012;41:7.

11. ANEXOS

**ANEXO 1. MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LAS
CEPAS REACTIVADAS**

Tabla 3. Caracterización morfológica			
No.	Clave de la cepa	Morfología macroscópica	Morfología microscópica
1	LRS4.044	DIMENSIÓN: 3 – 5 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
2	LRS4.053	DIMENSIÓN: 1 – 2 mm COLORACIÓN: Amarillo SILUETA: Puntiforme CANTOS: Definidos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
3	LRS4.058	DIMENSIÓN: 3 – 5 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Circular CANTOS: Definidos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos
4	LRS4.075	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Estrellada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos

5	LRS4.078	DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Circular CANTOS: Definidos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Membranosa	Bacilos Gram Positivos
6	LRS4.085	DIMENSIÓN: 3 – 5 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Regulares PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos
7	LRS4.113	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
8	LRS4.128	DIMENSIÓN: 3 – 5 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Estrellada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
9	HA4-1a	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
10	HA5-1	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada	Bacilos Gram Positivos

		<p>CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Húmedo REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable</p>	
11	HS1-3	<p>DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable</p>	Bacilos Gram Positivos
12	HS4-2	<p>DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Definidos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa</p>	Bacilos Gram Positivos
13	HS4-1b	<p>DIMENSIÓN: 3 – 5 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Estrellada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable</p>	Bacilos Gram Positivos
14	IAS2-2	<p>DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Estrellada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Dura</p>	Bacilos Gram Positivos
15	ICA2-3	<p>DIMENSIÓN: 1 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Circular CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa</p>	Bacilos Gram Positivos

		<p>APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable</p>	
16	ICS4-3a	<p>DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable</p>	Bacilos Gram Positivos
17	LB2(MC)	<p>DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Estrellada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable</p>	Bacilos Gram Positivos
18	LB2 (MH)	<p>DIMENSIÓN: 1 – 2 mm COLORACIÓN: Amarillo SILUETA: Puntiforme CANTOS: Regulares PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Transparente MALEABILIDAD: Cremosa</p>	Bacilos Gram Positivos
19	LB2 (TSA)	<p>DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Estrellada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Membranosa</p>	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
20	SOSSI-3E	<p>DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Irregulares PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate</p>	Bacilos Gram Positivos

		TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	
21	SOSSI-3C	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Estrellada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
22	SOSSI-1A	DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
23	ESE2-2C	DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Definidos PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
24	ESE2-3E	DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Estrellada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
25	COSE1-3A	DIMENSIÓN: 3 – 5 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Definidos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos

26	COSE1-C	DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Membranosa	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
27	SFA1-3	DIMENSIÓN: 1 – 2 mm COLORACIÓN: Amarillo SILUETA: Puntiforme CANTOS: Definidos PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Transparente MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
28	SFS3-3	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Circular CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
29	UT3-3	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos
30	UT7-3	DIMENSIÓN: 1 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Estrellada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
31	TX4SC- 5MHG4	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige	Bacilos Gram Positivos

		<p>SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable</p>	
32	TXV7-6MHG5	<p>DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Membranosa</p>	Bacilos Gram Positivos
33	TXV7-3MHG5	<p>DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable</p>	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
34	TXV8-6MHG2	<p>DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable</p>	Bacilos Gram Positivos
35	TXV9-4MHG2	<p>DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Transparente MALEABILIDAD: Friable</p>	Bacilos Gram Positivos
36	TXV12-8MHG3	<p>DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Estrellada CANTOS: Aserrados</p>	Bacilos Gram Positivos

		PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Membranosa	
37	TXV13-7MHG3	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Membranosa	Bacilos Gram Positivos
38	TXV13-14MHG2	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
39	TXV14-2MHG3	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Transparente MALEABILIDAD: Membranosa	Bacilos Gram Positivos
40	TXV15-1MHG4	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Membranosa	Bacilos Gram Positivos
41	TXV15-3MHG4	DIMENSIÓN: 1 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa	Bacilos Gram Positivos

		<p>APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable</p>	
42	TXV16-7MHG2	<p>DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable</p>	Bacilos Gram Positivos
43	TXV6-1SG3	<p>DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Lobulados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa</p>	Bacilos Gram Positivos
44	TXV11-13SG3	<p>DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa</p>	Bacilos Gram Positivos
45	TXV15-3SG6	<p>DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Lobulados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Membranosa</p>	Bacilos Gram Positivos
46	TXV15-2SG6	<p>DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca</p>	Bacilos Gram Positivos

		MALEABILIDAD: Cremosa	
47	TXO1-1MHG2	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
48	TXO1-2MHG2	DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Lobulados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos
49	TXO1-1MHG3	DIMENSIÓN: 3 – 5 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos
50	TXO1-1MHG4	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
51	TXO5A-1MHG13	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos

52	TXO6A-3MHG6	DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
53	TXO7B-2MHG3	DIMENSIÓN: 1 – 2 mm COLORACIÓN: Amarillo SILUETA: Puntiforme CANTOS: Definidos PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos
54	TXO7D-1MHG8	DIMENSIÓN: 1 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
55	TXO1-1SG1	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
56	TXO1-1SG2	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos
57	TXO1-1SG3	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos

		<p>CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Membranosa</p>	
58	TXO1-1SG4	<p>DIMENSIÓN: 1 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Circular CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmedo REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa</p>	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
59	TXO2-2SG2	<p>DIMENSIÓN: 1 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Circular CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa</p>	Bacilos Gram Positivos
60	TXO3B-3SG1	<p>DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable</p>	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
61	TXO3B-2SG4	<p>DIMENSIÓN: 1 – 2 mm COLORACIÓN: Amarillo SILUETA: Puntiforme CANTOS: Definidos PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa</p>	Bacilos Gram Positivos

62	TXO4A-5SG1	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos
63	TXO4B-2SG7	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Lobulados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
64	TXO4B-1SG8	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
65	TXO4B-1SG11	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Lobulados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
66	TXO6A-7SG2	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Lobulados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos

67	TXO7A-8SG1	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Lobulados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
68	TXO7A-4SG3	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
69	TXO7B-1SG6	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos
70	TXO7B-2SG6	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Circular CANTOS: Aserrados PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
71	TXO7B-2SG8	DIMENSIÓN: 2 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos

		TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	
72	TXI6-2MHG3	DIMENSIÓN: 2 – 4 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalado CANTOS: Definidos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos
73	TXI6-1MHG5	DIMENSIÓN: 1 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Ovalada CANTOS: Filamentosos PROMINENCIA: Plana TEXTURA: Rugosa APARIENCIA: Seca REFLEXIÓN DE LUZ: Mate TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Friable	Bacilos Gram Positivos, crecimiento filamentosos
74	TXI3-1SG3	DIMENSIÓN: 1 – 3 mm COLORACIÓN: Beige SILUETA: Puntiforme CANTOS: Definidos PROMINENCIA: Convexa TEXTURA: Lisa APARIENCIA: Húmeda REFLEXIÓN DE LUZ: Brillante TRANSMISIÓN DE LUZ: Opaca MALEABILIDAD: Cremosa	Bacilos Gram Positivos

ANEXO 2. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS CEPAS REACTIVADAS

Tabla 4. Caracterización fisiológica de las cepas				
Clave de la cepa	Rango %NaCl	% NaCl óptimo	Rango de pH	pH óptimo
LRS4.044	0 - 15	10	7 - 10	8
LRS4.053	0 - 15	10	7 - 10	8
LRS4.058	0 - 10	5	7 - 10	8
LRS4.075	0 - 15	10	7 - 11	8
LRS4.078	0 - 15	10	7 - 11	8
LRS4.085	0 - 10	5	7 - 10	8
LRS4.113	0 - 15	10	7 - 10	8
LRS4.128	0 - 15	10	7 - 10	8
HA4-1a	0 - 10	5	7 - 10	7
HA5-1	0 - 10	5	7 - 10	8
HS1-3	0 - 10	0	7 - 10	7
HS4-2	0 - 10	0	8 - 12	8
IAS2-2	0 - 10	5	7 - 10	8
ICA2-3	0 - 10	0	7 - 10	7
ICS4-3a	0 - 10	5	7 - 10	7
HS4-1b	0 - 10	5	7 - 10	8
LB2 (MC)	0 - 10	5	7 - 10	8
LB2 (MH)	0 - 10	5	7 - 10	8
LB2 (TSA)	0 - 10	10	7 - 9	8
SOSSI-3E	0 - 10	5	7 - 10	7
SOSSI-3C	0 - 10	5	7 - 10	7
SOSSI-1A				
ESE2-2c	0 - 10	0	7 - 10	7
ESE2-3E	0 - 10	5	7 - 10	7
COSE1-3A	0 - 10	5	7 - 10	8
COSE1-C	0 - 10	5	7 - 10	7
SFA1-3	0 - 15	5	7 - 11	8
SFS3-3	0 - 10	5	7 - 11	8

UT3-3 (MC)	0 – 5	0.5	6 – 8	7
UT7-3	0 - 10	0	7 - 10	7
TX4SC- 5MHG4	0 - 10	5	7 - 10	7
TXV1- 4MHG5	0 – 10	10	7 – 10	9
TXV7- 6MHG5	0 – 5	5	7 – 10	10
TXV7- 3MHG5	0 - 10	5	7 - 10	9
TXV8- 6MHG2	0 – 10	10	7 – 10	10
TXV9- 4MHG2	0 – 10	10	7 – 10	8
TXV12- 8MHG3	0 – 10	10	7 – 10	8
TXV13- 7MHG3	0 - 10	5	7 - 10	9
TXV13- 14MHG2	0 - 15	5	7 - 10	9
TXV14- 2MHG3	0 - 10	5	7 - 10	9
TXV15- 1MHG4	0 - 10	5	7 - 10	9
TXV15- 3MHG4	0 - 10	5	7 - 11	8
TXV16- 7MHG2	0 – 10	10	7 – 10	9
TXV6-1SG3	0 - 10	5	7 - 11	10
TXV11- 13SG3	0 – 10	10	7 – 10	9
TXV15- 3SG6	0 - 10	5	7 - 10	8
TXV15- 2SG6	0 - 10	5	7 - 11	9

TXO1- 1MHG2	0 - 10	5	7 - 11	9
TXO1- 2MHG2	0 - 10	5	7 - 10	8
TXO1- 1MHG3	0 - 10	5	7 - 11	10
TXO1- 1MHG4	0 - 10	5	7 - 11	10
TXO1- 2MHG6	0 - 5	3	6 - 8	7
TXO5A- 1MHG13	0 - 5	5	7 - 9	9
TXO6A- 3MHG6	0 - 10	5	6 - 8	7
TXO7B- 2MHG3	0 - 10	5	6 - 8	6
TXO7D- 1MHG8	0 - 5	3	6 - 8	7
TXO1- 1SG1	0 - 10	5	6 - 8	7
TXO1- 1SG2	0 - 10	10	7 - 10	8
TXO1- 1SG3	0 - 10	5	7 - 11	7
TXO1- 1SG4	0 - 5	0.5	6 - 8	7
TXO2- 2SG2	0 - 10	5	7 - 10	7
TXO3B- 3SG1	0 - 10	5	7 - 10	7
TXO3B- 2SG4	0 - 15	5	7 - 11	10
TXO4A- 5SG1	0 - 10	5	6 - 9	6

TXO4B- 2SG7	0 – 5	3	6 – 8	7
TXO4B- 1SG8	0 – 5	0.5	7 – 10	9
TXO4B- 1SG11	0 – 5	3	7 – 10	9
TXO6A- 7SG2	0 – 10	5	5 – 8	6
TXO7A- 8SG1	0 – 5	0.5	6 – 9	7
TXO7A- 4SG3	0 – 10	5	6 – 9	7
TXO7B- 1SG6	0 – 5	3	7 – 10	10
TXO7B- 2SG6	0 - 10	5	7 - 11	10
TXO7B- 2SG8	0 - 10	5	7 - 10	8
TXI6- 2MHG3	0 – 10	10	7 – 10	7
TXI6- 1MHG5	0 – 10	5	7 – 10	8
TXI3-1SG3	0 - 10	5	7 - 10	8

ANEXO 3. CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE BIODEGRADACIÓN DE AINES UTILIZANDO EL ESPECTROFOTÓMETRO EPOCH BIOTECH®

1. Encender el equipo y abrir el programa Gen5
2. Crear un protocolo nuevo
3. Elegir la opción “scanning”
4. Las condiciones de escaneo son de 200 nm a 300 nm a intervalos de 1 nm
5. Elegir el tipo de placa que se va a utilizar (Take 3) y seleccionar el espacio que se va a medir (A9). Solo puede ser uno debido a que se utiliza la biocelda de cuarzo
6. Encender el equipo para poder validar el protocolo
7. Colocar la biocelda en el take 3 y verificar que se acomode correctamente en el plato del equipo
8. Verificar que la biocelda se encuentre limpia haciendo un escaneo primario con agua o aire
9. Colocar la muestra a analizar en la biocelda (1mL) e iniciar el escaneo
10. Al terminar el escaneo, se genera una gráfica. Verificar la absorbancia del pico máximo obtenido
11. Exportar los resultados a una hoja de Excel
12. Limpiar la biocelda y volver a realizar el escáner para verificar que no queden residuos
13. Salir del programa, apagar el equipo y por último la computadora

ANEXO 4. CUANTIFICACIÓN DE ADN Y PRODUCTOS DE PCR UTILIZANDO EL ESPECTROFOTÓMETRO EPOCH BIOTECH®

1. Encender el equipo y abrir el programa Gen5
2. Elegir la opción new read
3. Elegir la opción “cuantificación de ácidos nucleicos”
4. Elegir el tipo de placa que se va a utilizar (Take 3) y seleccionar el espacio que se va a medir. Se utiliza la función nanogota
5. Limpiar el take 3 con agua libre de nucleasas y papel cera.
6. Verificar que se acomode correctamente en el plato del equipo y realizar un primer análisis para verificar que el Take 3 se encuentre limpio
7. Colocar la muestra a analizar en el plato (2 μ L) e iniciar el escaneo
8. Al terminar el escaneo, se genera una gráfica. Verificar la absorbancia del pico máximo obtenido, se debe obtener solo un pico
9. Exportar los resultados a una hoja de Excel
10. Revisar los datos obtenidos en la relación 230/260 y 260/280 para verificar la pureza de las muestras
11. Revisar la concentración de las muestras que el equipo calcula
12. Limpiar nuevamente el Take 3 como se realizó anteriormente y realizar el análisis para verificar que se encuentre limpio.
13. Salir del programa, apagar el equipo y por último la computadora