



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

BIODEGRADACIÓN DE BETALACTÁMICOS EN MEDIO
ACUOSO MEDIANTE UN BIORREACTOR CON
BACTERIAS AISLADAS DE AGUA RESIDUAL DE UN
HOSPITAL Y SU MONITOREO POR CROMATOGRFÍA
DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

M. en C. Q. ESMERALDA RIVERA GUTIÉRREZ

DIRIGIDO POR:

DR. JORGE JAVIER RAMÍREZ GARCÍA

DR. ARMANDO RAMÍREZ SERRANO



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

MARZO 2021

El presente trabajo de investigación está registrado en la dirección de estudios avanzados de la UAEM y su Número de registro es: DSCSQM-0917. Se realizó dentro del programa de Doctorado en Ciencias Químicas de la Facultad de Química en la Universidad Autónoma del Estado de México con el apoyo de la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de registro 429367.

La parte experimental se desarrolló en el laboratorio de Microbiología y Análisis Instrumental de la facultad de Química de la UAEM, como parte del proyecto CONACYT “ Proyectos de desarrollo científico para resolver problemas Nacionales ” con clave de registro 215997, las pruebas de PCR se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de Zoología del Instituto de Biología de la UNAM y el análisis de microscopia electrónica de barrido se realizó en laboratorio de Microscopio electrónico en el Instituto de Biología de la UNAM.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
TABLA DE ABREVIATURAS	11
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	13
RESUMEN	15
ABSTRACT	17
INTRODUCCIÓN	19
I ANTECEDENTES	23
1.1 Antibióticos Betalactámicos.....	23
1.2 Propiedades farmacocinéticas de antibióticos betalactámicos.....	24
1.2.1 Penicilina G.....	28
1.2.2 Ceftriaxona	30
1.2.3 Dicloxacilina.....	32
1.3 Biodegradación	34
1.4 Bacterias	36
1.5 Biorreactor	37
1.5.1 Modelado matemático del Biorreactor	38
1.5.1.1 Crecimiento celular	38
1.5.1.2 Parámetros del crecimiento.....	39
1.5.1.3 Tiempo de generación (G).....	40
1.5.1.4 Métodos para medir el crecimiento de bacterias	41
1.5.1.5 Conteo de colonias	41
1.5.1.6 Ecuación de Monod	42
1.5.1.7 Estimación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod.	45
II. JUSTIFICACIÓN	46
III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
3.1 HIPÓTESIS	47
3.2. Objetivo general.....	47
3.3 Objetivos específicos	47
IV DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	48
4.3.-Montaje del método analítico	50

4.4.-Obtención de cepas y caracterización bacteriana.	50
4.5.-Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	53
4.6.-. Evaluación de la eficiencia de las cepas en la biodegradación in vitro.	53
4.7.- Cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución.....	54
4.8.- Modelado matemático para la biodegradación de betalactámicos en medio acuoso mediante un biorreactor.	54
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADO	57
5.1 CARACTERIZACIÓN.....	57
5.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo de los antibióticos	57
5.1.2 Espectroscopia Ultravioleta	60
5.1.3 Solubilidad de los antibióticos	61
5.1.4 Montaje del método analítico.....	63
5.2 OBTENCIÓN DE CEPAS Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA.....	64
5.2.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria para los antibióticos.	68
5.3 DEGRADACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.....	70
5.3.1 Degradación de penicilina.....	70
5.3.2 Degradación de dicloxacilina	80
5.3.3 Degradación de ceftriaxona.....	88
5.4 CÁLCULOS PARA EL MODELADO DEL BIORREACTOR.....	93
5.4.1 Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod.....	97
CONCLUSIONES.....	100
RECOMENDACIONES.....	102
REFERENCIAS.	103
ANEXOS	110
ANEXO 1: Diagrama de la validación del Método Analítico (Dávila Estrada, 2018) con modificaciones para métodos biológicos.....	111
ANEXO 2: Extracción de ADN con el kit Jena Bioscience	112
ANEXO 3: Reacciones de PCR	113
ANEXO 4: Fotografías del gel agarosa para las amplificaciones y placa de gel revelada.	114

ANEXO 5: Deducción de las ecuaciones para evaluar los parámetros de Monod por el método integral	115
ANEXO 6: Cálculo de los parámetros de Monod por el método integral	118
ANEXO 7: Artículo publicado en una versión impresa.....	122
ANEXO 8: Carta de envío del segundo artículo.....	124
ANEXO 9: Constancia de congreso	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura base de betalactámicos (Silvia Noemy S and Paredes Castillo, 2010).	23
Figura 2: Tendencias del consumo intrahospitalario de antibacterianos β -lactámicos (penicilinas y otros β -lactámicos seleccionados) (Rodríguez-Ganen and Asbun-Bojalil, 2012).	26
Figura 3: Tendencias del consumo intrahospitalario de cefalosporinas (Rodríguez-Ganen and Asbun-Bojalil, 2012).	26
Figura 4: Consumo de antimicrobianos (DDD/100 estancias) en los hospitales de la Red PUCRA en 2018 cada barra representa un hospital (López, Ponce de León and Novales, 2019).	27
Figura 5: Promedio de consumo de los antibióticos sistémicos más utilizados en DDD/100 estancias. Red VINCat2 vs. Red PUCRA (López, Ponce de León and Novales, 2019).	28
Figura 6: Estructura química de la penicilina G (Flesia, 2011).	29
Figura 7: Estructura química de la ceftriaxona (Shrestha, Bhuyan and Sinha, 2013).	31
Figura 8: Estructura química de la dicloxacilina (Colina-Márquez and Castilla-Caballero, 2013).	32
Figura 9: Diagrama de clasificación de biorremediación de acuerdo al microorganismo que realiza la degradación (Sharma, Dangi and Shukla, 2018).	35
Figura 10: Técnicas de biorremediación. La divergencia de cada técnica es hipotética; por lo tanto, el orden de izquierda a derecha de los nodos internos no es el orden de evolución (desarrollo de la técnica). La barrera reactiva permeable (PBR) no es la raíz arbitraria del árbol. Es una técnica de remediación física con algunos elementos de biorremediación, de ahí la divergencia hipotética temprana (Azubuiké, Chikere and Okpokwasili, 2016).	35
Figura 11: Esquema de una bacteria (Http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO 8, no date).	37
Figura 12: Proceso general de la fisión binaria de la célula procariota en forma de bacilo. Para simplificar, el nucleóide se representa como un círculo sencillo de color verde (Madigan, Martinko and Parker, 2003).	39
Figura 13: Diagrama de siembra por vertido en placa (Madigan, Martinko and Parker, 2003).	42
Figura 14: Gráfica del efecto de la concentración del sustrato (S) sobre la velocidad de crecimiento (μ) con $\mu_{max}=0.9$ y $K_s=6$ (Http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO 8, no date).	43
Figura 15: Diagrama de Lineweaver-Burk (Bello, 2014).	45
Figura 16: Espectro infrarrojo de penicilina a) estándar de Israel y b) estándar de China.	57
Figura 17: Infrarrojo de la ceftriaxona.	58
Figura 18: Infrarrojo de la dicloxacilina.	59
Figura 19: Espectro UV de 50 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina con agua, metanol, acetonitrilo y ácido fórmico 0.05%.	60
Figura 20: Espectro UV de 50 $\mu\text{g/mL}$ de dicloxacilina con con agua, metanol, acetonitrilo y ácido fórmico 0.05%.	61
Figura 21: Espectro UV de 50 $\mu\text{g/mL}$ de ceftriaxona con agua, metanol, acetonitrilo y ácido fórmico 0.05%.	61
Figura 22: Fotografías del muestreo (Rivera Gutiérrez, 2016).	65
Figura 23: Estudios de MEB a) C1, b) C2, c) A, d) I, e) O, f) E.	66
Figura 24: Microscopía con focal de la tinción de Gram de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , equipo TCS SPE/CTR 4000 (Leica) a) fluorescencia en tono verde, b) fluorescencia en tono rojo, c) fluorescencia en verde y gris, d) imágenes de las cuatro fluorescencias sobrepuestas	68
Figura 25: Fotografías de la CMI.	69
Figura 26: Concentración Mínima Inhibitoria.	70
Figura 27: Fotos de estándares de penicilina G sódica.	71
Figura 28: Gráfica de la degradación de los dos estándares de penicilina con bacterias.	72
Figura 29: Degradación de penicilina.	73

Figura 30: Cromatogramas de la degradación de penicilina con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y en consorcio. _____	77
Figura 31: Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> con respecto la degradación a 30°C. _____	78
Figura 32: Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> con respecto la degradación a 34 °C. _____	79
Figura 33: Crecimiento del consorcio bacteriano con respecto a la degradación de penicilina. ____	79
Figura 34: Degradación de dicloxacilina. _____	80
Figura 35: Cromatogramas de degradación de dicloxacilina con <i>Pseudomonas</i> . _____	82
Figura 36: Degradación de dicloxacilina con consorcio bacteriano. _____	84
Figura 37: Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> con respecto a la concentración de dicloxacilina. _____	87
Figura 38: Crecimiento de consorcio bacteriano con respecto a dicloxacilina. _____	88
Figura 39: Degradación de ceftriaxona. _____	89
Figura 40: Cromatogramas de la biodegradación de ceftriaxona. _____	91
Figura 41: Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> con respecto a la concentración de ceftriaxona. _____	92
Figura 42: Crecimiento del consorcio bacteriano con respecto a la concentración de ceftriaxona. _	93
Figura 43: Orden de reacción en la degradación con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en: a) Penicilina a 34 °C, b) Penicilina a 30 °C, c) Dicloxacilina a 30 °C, d) Ceftriaxona a 30 °C. _____	94
Figura 44: Orden de reacción en la degradación con consorcio bacteriano en: a) Penicilina a 30 °C, b) Dicloxacilina a 30 °C, c) Ceftriaxona a 30 °C. _____	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades farmacocinéticas de los betalactámicos (Marín and Gudiol, 2003).	24
Tabla 2: Métodos de eliminación de la penicilina G.	30
Tabla 3: Métodos de eliminación de ceftriaxona.	31
Tabla 4: Propiedades físicas de la dicloxacilina (Benito Peña, 2006).	33
Tabla 5: Métodos de eliminación de dicloxacilina.	33
Tabla 6: Grupos funcionales de ceftriaxona.	58
Tabla 7: Grupos funcionales de dicloxacilina.	59
Tabla 8: Solubilidad de 50 µg/mL de penicilina sódica y pH.	62
Tabla 9: Solubilidad de 50 µg/mL de ceftriaxona y pH.	62
Tabla 10: Solubilidad de 50 µg/mL de dicloxacilina y pH.	62
Tabla 11: Condiciones cromatografías para fármacos por separado.	63
Tabla 12: Validación de Antibióticos.	64
Tabla 13: Identificación bacteriana por PCR.	67
Tabla 14: Valores de los parámetros de la ecuación de Monod con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	97
Tabla 15: Valores de los parámetros de la ecuación de Monod con consorcio bacteriano.	98

TABLA DE ABREVIATURAS

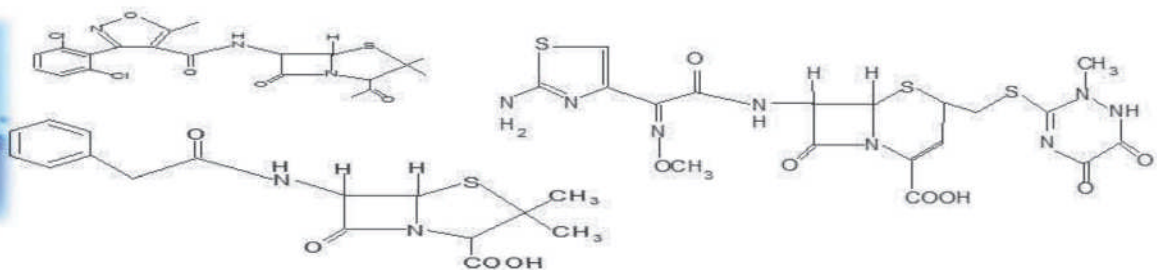
PEN G	Penicilina G
pKa	Constante de acidez, es un valor que indica que tan fuerte o débil es un ácido e indica que tan disociado esta
pH	Potencial de Hidrógeno, indica el grado de alcalinidad o acidez en disolución
DDD	Dosis Diaria Definida
PUCRA	Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
CLAR	Cromatografía Liquida de Alta Resolución
r^2	Coefficiente de correlación
CV	Coefficiente de variación o desviación estándar relativa
N	Número de platos teóricos
T	Factor coleo
G	Tiempo de generación celular
t	Tiempo
n	Número de generaciones transcurridas
Nf	Número de células finales
N0	Número de células iniciales
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
E	Energía de activación

μ_m	Velocidad específica máxima de crecimiento
K_s	Concentración del sustrato a una velocidad específica de crecimiento
$Y_{x/s}$	Factor de rendimiento del sustrato en producto
μ_m	micrómetros

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Exactitud	Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.
Límite de cuantificación	Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables.
Límite de detección	Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.
Linealidad	Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado
Repetibilidad	Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.
Antibióticos	son medicamentos que matan las bacterias que causan infecciones en personas y animales.
Antibióticos betalactámicos	Se clasifican de acuerdo a su estructura química, la cual posee un anillo betalactámico el cual le confiere sus propiedades de antibiótico.
Metabolitos	Es el producto que queda después de la descomposición (metabolismo) de un fármaco por parte del cuerpo.

Biorremediación	Es el proceso mediante el cual los microorganismos absorben o degradan contaminantes, limpiando de esta manera su entorno, y ayudando a la naturaleza a superar un desequilibrio.
betalactamasas	Son enzimas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de los antibióticos.
Bacterias	Son microorganismos pertenecientes al reino procariota, tienen una membrana celular y ribosomas que contienen la información genética. También tienen una pared rígida y una membrana que encapsula el citoplasma. El núcleo contiene los componentes genéticos de la célula. La mayoría de las bacterias pueden moverse debido a que poseen un flagelo.
Cepa	Es una población de microorganismos de una sola especie.



RESUMEN

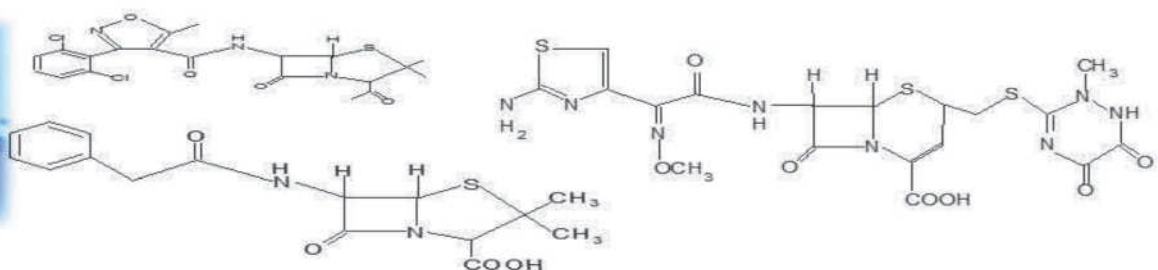
La biorremediación es el proceso mediante el cual los microorganismos absorben o degradan contaminantes, limpiando de esta manera su entorno, y ayudando a la naturaleza a superar un desequilibrio y en el mejor de los casos a recuperar un ecosistema dañado.

Lo que lo convierte en una alternativa importante para lidiar con los llamados contaminantes emergentes (fármacos), los cuales se encuentran en concentraciones significativas en el ambiente, y las técnicas convencionales como la filtración, coagulación, floculación, sedimentación, fenton y foto-fenton no son capaces de eliminar por completo a los fármacos o bien se reporta la presencia de subproductos, que en ocasiones suelen ser más tóxicos que los iniciales.

Aunado a lo anterior se considera que las aguas residuales de hospitales son una de las principales fuentes de contaminación, que contienen cantidades considerables de diversos fármacos, que no son eliminados en su totalidad por las plantas tratadoras de aguas residuales. Las cuales pueden actuar como reservorios y proveedores ambientales de resistencia a los antibióticos al desembocar en cuerpos de agua superficiales.

Con base en lo anterior y debido a que las bacterias de vida libre poseen una gran capacidad de adaptación a condiciones ambientales poco favorables, el presente trabajo tiene por objetivo evaluar la degradación de penicilina G, ceftriaxona y dicloxacilina con bacterias de vida libre, estos tres antibióticos son los más utilizados en el Hospital Adolfo López Mateos del Estado de México, para esto se utilizaron las cepas degradadoras de penicilina las cuales se aislaron del agua residual de un hospital del Estado de México en 2016.

Se utilizaron seis colonias fenotípicamente diferentes las cuales se identificaron como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, dos cepas de *Escherichia coli*



y dos de *Klebsiella pneumoniae*. Además, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria a cada una, siendo *Pseudomonas aeruginosa* la más resistente a los tres antibióticos.

La biodegradación se realizó en medio acuoso y se monitoreo por cromatografía de líquidos de alta resolución. Los resultados mostraron que las bacterias son capaces de eliminar al 100 % la penicilina, dicloxacilina y ceftriaxona e incluso son capaces de actuar sobre los metabolitos generados.

Con los datos obtenidos se estableció el cálculo matemático del biorreactor tamaño laboratorio, tipo batch. Los resultados muestran que la degradación con *Pseudomonas aeruginosa* de penicilina a 30 y 34 °C presenta un orden de reacción de cero, al igual que la dicloxacilina, mientras que la ceftriaxona tiene un orden de reacción de 0.5

En el caso del consorcio bacteriano el orden de reacción de la penicilina es 0.3, para la dicloxacilina es cero y el de ceftriaxona es de 0.5.

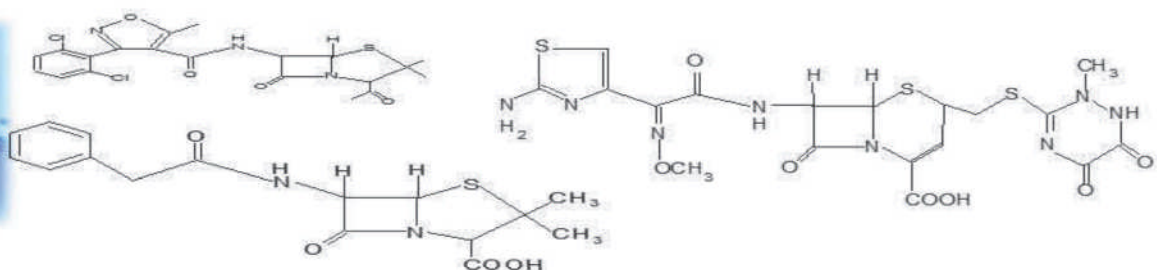
Por otro lado, se calculó la energía de activación de la degradación con penicilina utilizando *Pseudomonas aeruginosa* el resultado fue $143.214 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}}$, lo cual indica que la biodegradación es buena y se corrobora con los cromatogramas donde se evidencia la eliminación completa del fármaco.

También, se calculó el tiempo de generación de *Pseudomonas aeruginosa* y del consorcio durante la biodegradación con cada antibiótico, se obtuvo lo siguiente:

Degradación con penicilina: tiempo de generación de *Pseudomonas aeruginosa* es de 47 minutos, y del consorcio es de 45 minutos.

Degradación con dicloxacilina: tiempo de generación de *Pseudomonas aeruginosa* es de 109 minutos, y del consorcio es de 63 minutos.

Degradación con ceftriaxona: tiempo de generación de *Pseudomonas aeruginosa* es de 57 minutos, y del consorcio es de 536 minutos.



ABSTRACT

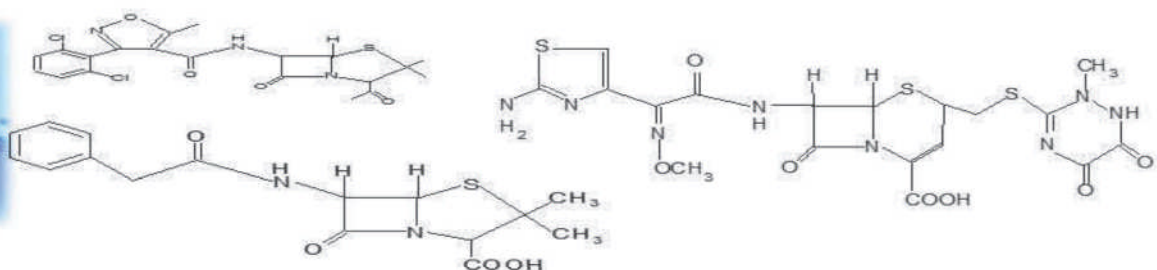
Bioremediation is the process by which microorganisms absorb or degrade pollutants, thus cleaning their environment, and helping nature to overcome an imbalance and in the best of cases to recover a damaged ecosystem.

Which makes it an important alternative to deal with the so-called emerging pollutants (drugs), which are found in significant concentrations in the environment, and conventional techniques such as filtration, coagulation, flocculation, sedimentation, fenton and photo-fenton are not capable to completely eliminate the drugs or the presence of by-products is reported, which sometimes tend to be more toxic than the initial ones.

In addition to the above, it is considered that hospital wastewater is one of the main sources of contamination, containing considerable amounts of various drugs, which are not completely eliminated by wastewater treatment plants. Which can act as reservoirs and environmental providers of resistance to antibiotics when flowing into surface water bodies.

Based on the above and due to the fact that free-living bacteria have a great capacity to adapt to unfavorable environmental conditions, the present work aims to evaluate the degradation of penicillin G, ceftriaxone and dicloxacillin with free-living bacteria, these three Antibiotics are the most used in the Hospital Adolfo López Mateos of the State of Mexico, for this there were used the degrading strains of penicillin, which were isolated from the wastewater of a hospital in the State of Mexico in 2016.

Six phenotypically different colonies were used which were identified as: *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, two strains of *Escherichia coli* and two of *Klebsiella pneumoniae*. In addition, the Minimum Inhibitory Concentration was determined for each one, with *Pseudomonas aeruginosa* being the most resistant to the three antibiotics.



Biodegradation was carried out in an aqueous medium and was monitored by high-performance liquid chromatography. The results showed that the bacteria are capable of eliminating 100 % Penicillin, Dicloxacillin and Ceftriaxone and are even capable of acting on the metabolites generated.

With the data obtained, the mathematical calculation of the batch-type laboratory-size bioreactor was established. The results show that the degradation with *Pseudomonas aeruginosa* of penicillin at 30 and 34 ° C presents a reaction order zero, as does dicloxacillin, while ceftriaxone has a reaction order of 0.5.

In the case of the bacterial consortium, the reaction order of penicillin is 0.3, for dicloxacillin it is zero and that of ceftriaxone is 0.5.

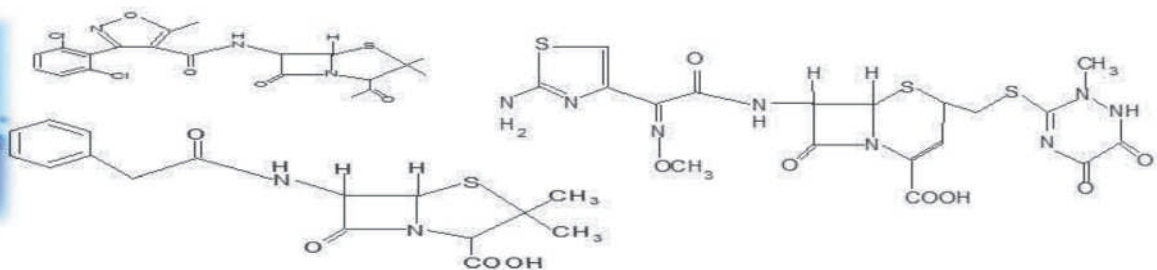
On the other hand, the activation energy of degradation with penicillin was calculated using *Pseudomonas aeruginosa*, the result was $143.214 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}}$, which indicates that the biodegradation is good and is corroborated with the chromatograms where the complete elimination of the drug is evidenced.

Also, the generation time of *Pseudomonas aeruginosa* and the consortium during biodegradation with each antibiotic was calculated, the following was obtained:

Degradation with penicillin: *Pseudomonas aeruginosa* generation time is 47 minutes, and the consortium is 45 minutes.

Degradation with dicloxacillin: generation time of *Pseudomonas aeruginosa* is 109 minutes, and that of the consortium is 63 minutes.

Degradation with ceftriaxone: generation time of *Pseudomonas aeruginosa* is 57 minutes, and that of the consortium is 536 minutes.



INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los antibióticos se utilizan ampliamente en el tratamiento de enfermedades, además de que su uso se ha vuelto muy común en la ganadería y la acuicultura. Por lo que su creciente consumo, ha comenzado a ocasionar serios problemas, debido a que una vez ingeridos por los individuos, se excretan en forma de metabolitos y otra parte es eliminada sin metabolizarse.

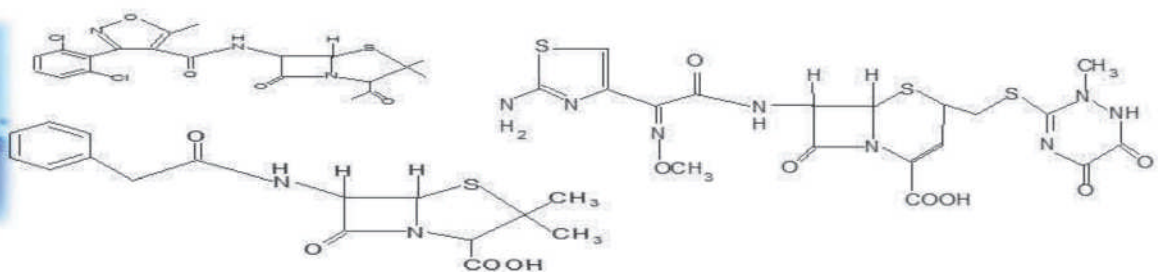
De entre todos los fármacos, los antibióticos β -lactámicos son los más efectivos y utilizados; los dos principales son, las penicilinas y las cefalosporinas, que representan alrededor del 37 % del consumo de antibióticos en Europa (Bottari, Blust and De Wael, 2018).

Por su parte la dicloxacilina es el tercer antibiótico más prescrito en el Hospital General de Cárdenas, Tabasco, México, en el año 2010 (Zavala and Santana, 2014).

Otro estudio realizado en un hospital del Estado de México evidenció que la dicloxacilina es de los antibióticos más consumidos (Villa Morán, 2014).

Por lo que es evidente que los hospitales son las principales fuentes de antibióticos β -lactámicos, en particular las cefalosporinas (Lekunberri *et al.*, 2017).

En las últimas dos décadas se han encontrado fármacos de uso común dispersos en cuerpos de agua que se han vuelto dañinos para los diferentes ecosistemas (Miceli-Montesinos *et al.*, 2014).



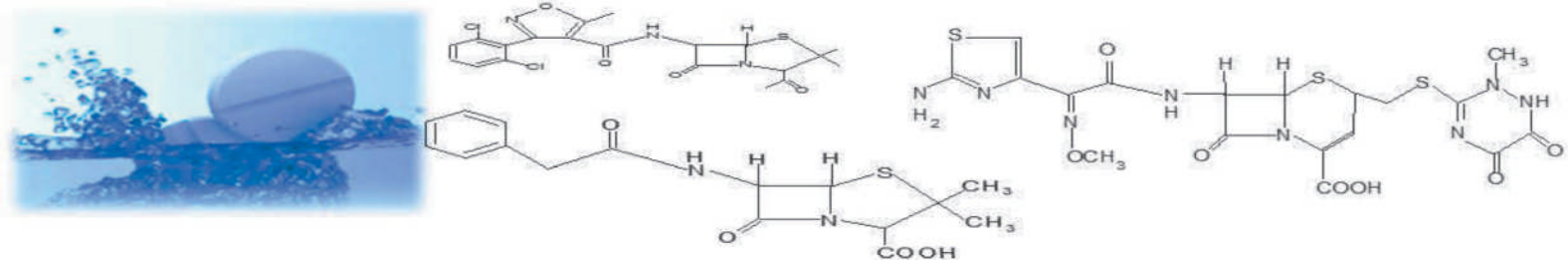
Como ejemplo, la concentración de Penicilina G en aguas residuales municipales de la Habana es $<0.025 \mu\text{g/L}$ (Lastre Acosta, Silva Costa Texeira and Jáuregui Haza, 2012), y en otro estudio realizado en una planta de tratamiento de aguas residuales de una empresa productora de penicilina G en China, se encontró que la concentración fue de $153 \pm 4 \mu\text{g/L}$ (Li *et al.*, 2008).

Otra fuente importante de contaminación proviene de la fabricación y disposición inadecuada de estos productos; que posteriormente son vertidos en los drenajes y llegan a plantas de tratamiento de aguas residuales o a otros cuerpos receptores de agua directa o indirectamente (Miceli-Montesinos *et al.*, 2014).

Se sabe que el agua residual farmacéutica suele ser recalcitrante con características de alta DQO, alta toxicidad biológica, baja biodegradabilidad, color intenso y olor desagradable porque contiene altas concentraciones de disolventes, catalizadores, aditivos, reactivos, especialmente antibióticos. Estos últimos en el efluente de las aguas residuales farmacéuticas son bioactivos, polares y persistentes y, por lo tanto, representan una grave amenaza para el ser humano y el medio ambiente (Huang *et al.*, 2018).

Además, muchos antibióticos son lipófilicos y no biodegradables, lo que representa un gran desafío para las plantas de tratamiento de aguas residuales (Huang *et al.*, 2018). Las cuales no son eficientes en la eliminación de este tipo de contaminantes, ocasionando que las bacterias interactúen e intercambien genes de resistencia a antibióticos. Sin embargo, aún no se dispone ampliamente de pruebas claras que demuestren la evolución de la resistencia microbiana (Karkman *et al.*, 2017).

Según estudios recientes, las plantas de tratamiento de aguas residuales se consideran puntos críticos para la propagación de la resistencia a los antibióticos



(Lucas *et al.*, 2016). Por lo que desempeñan un papel crucial en la proliferación de resistencia entre los microorganismos no resistentes y la creación de fenotipos multirresistentes (Lamba and Ahammad, 2017).

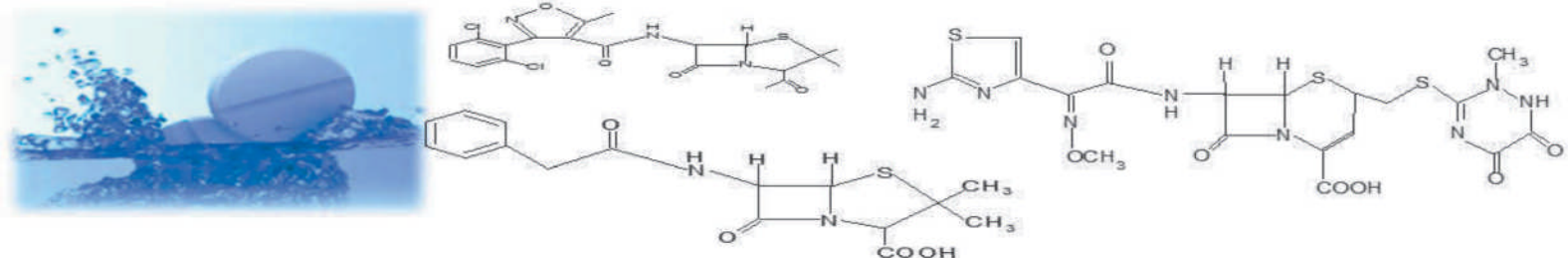
Como tal, los antibióticos y sus efectos sobre el medio ambiente se han convertido en un tema importante en la ciencia ambiental (Yang *et al.*, 2018).

Sin embargo, esta resistencia generada por los microorganismos autóctonos se puede usar como medida biocorrectora para la descontaminación de su entorno y proteger el ambiente.

Entre las principales ventajas de la biorremediación se encuentra su gran eficiencia, ya que sus porcentajes de eliminación llegan a ser comparables o superiores a los de métodos fisicoquímicos, además presentan un menor costo e impacto ambiental en comparación con las técnicas convencionales, debido a que pueden lograr una mineralización completa del contaminante, sin producir desechos potencialmente peligrosos como radicales libres o metabolitos más tóxicos que el contaminante inicial (Ortiz-Hernández *et al.*, 2013).

El presente trabajo se encuentra organizado por capítulos: Se presenta una breve introducción, para abordar la tesis.

El capítulo I contiene información referente a los antecedentes, como son las generalidades sobre los antibióticos betalactámicos, estructura y propiedades de la penicilina, ceftriaxona y dicloxacilina, técnicas de tratamiento para la remoción de antibióticos.



También se incluye una definición de biodegradación y su clasificación, así como información necesaria para realizar los cálculos del biorreactor.

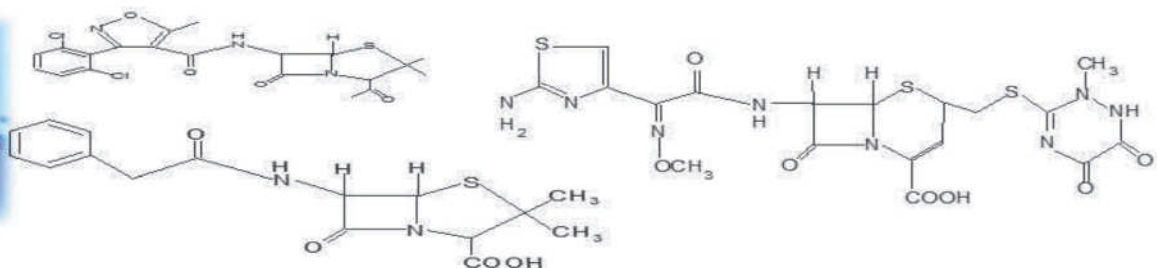
En el capítulo II Se incluye la hipótesis y los objetivos planteados en el desarrollo de la tesis.

En el capítulo III, se hace una descripción de la metodología que se siguió en este proyecto, se presenta un diagrama general de las actividades realizadas.

En el capítulo IV, se muestra el desarrollo experimental.

El capítulo V, muestra los resultados obtenidos en la parte experimental y su discusión. Finalmente, se presentan las conclusiones que se obtuvieron en la presente investigación. Así como las referencias consultadas que soportan los fundamentos de la misma.

Se anexa el artículo producto del proyecto de investigación y la carta de envío del segundo artículo.



son: incremento en el espectro antibacteriano, susceptibilidad a las betalactamasas y variación en sus propiedades farmacocinéticas (Silvia Noemy S and Paredes Castillo, 2010).

Las enzimas llamadas betalactamasas son la principal causa de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, debido a que hidrolizan el anillo β -lactámico de estos antibióticos.

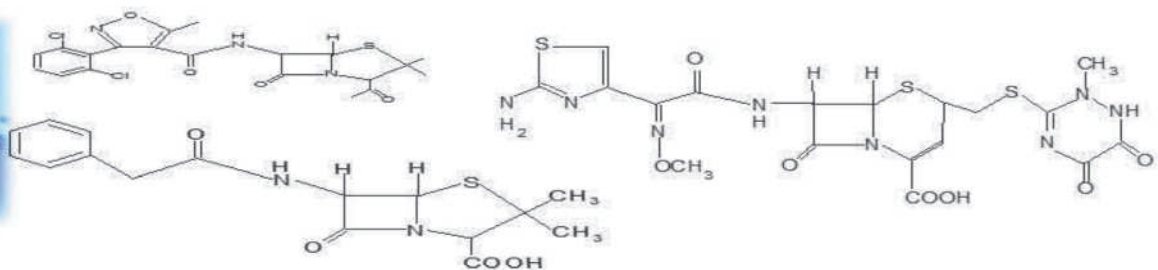
Los antibióticos β -lactámicos son la primera opción para el tratamiento de diferentes infecciones y la presencia de estas enzimas hace que sea difícil elegir la terapia adecuada (Furlan and Stehling, 2017).

1.2 Propiedades farmacocinéticas de antibióticos betalactámicos.

En la [Tabla 1](#) se presentan las propiedades farmacocinéticas de los medicamentos betalactámicos, estas varían conforme a la estructura molecular de cada antibiótico. También se muestra el porcentaje de unión a proteínas y la excreción urinaria.

Tabla 1: Propiedades farmacocinéticas de los betalactámicos (Marín and Gudiol, 2003).

Antibiótico	Dosis	Concentración pico de dosis	Vida media (h)	Unión a proteínas (%)	Excreción urinaria (%)	Excreción biliar
Penicilinas naturales						
Bencilpenicilina	2 mU	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,5	50-60	70	Sí
Penicilina V	250 mg	3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,5	75-85	20-40	Sí
Penicilina procaína	300.000 U	0,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$				
Penicilina benzatina	1,2 mU	0,09 $\mu\text{g}/\text{mL}$				
Penicilinas resistentes a penicilinasas						
Amoxicilina oral	1 g	7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1-1,3	20	70	Sí

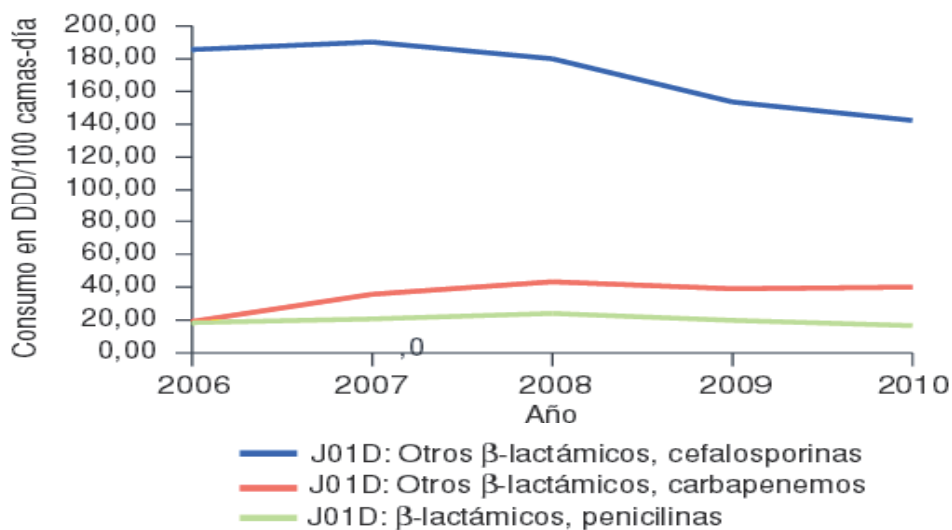
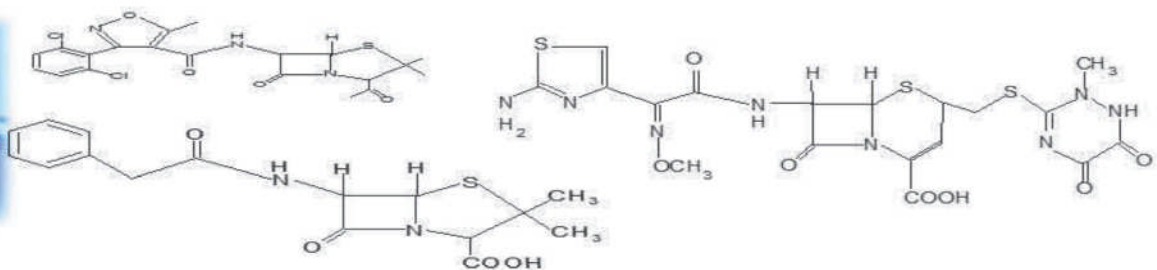


Cefalosporinas de primera generación						
Cefazolina	1 g	180 mg/L	1,8	80	95	Sí
Cefalotina	1 g	50 mg/L	0,7	70	70	Sí
Cefalosporinas de segunda generación						
Cefamandol	1 g	90 mg/L	0,8-1	75	> 90	Sí
Cefuroxima oral	00,5 g	7 mg/L	1,4	40	90	Sí
Cefoxitina	1 g	110 mg/l	0,8	7085	Sí	
Cefonicid	0 2 g	260 mg/L	4,5	98	95	Sí
Cefmetazol	2 g	140 mg/L	1-1,5	85	75	Sí
Cefotetán	0,75 g	40-130 mg/L	1,7	90	95	No
Cefalosporinas de tercera generación						
Ceftazidima	1 g	80 mg/L	1,8	20	85	Sí
Ceftizoxima	1 g	80 mg/L	1.8	30	90	Sí
Ceftriaxona	1 g	150 mg/L	8	90	50	Sí (notable)

Con base en la información presentada en la [Tabla 1](#), se observa que el principio activo de los fármacos estará presente en el ambiente, debido a que el metabolismo de la mayoría de betalactámicos es casi nulo, manteniéndose en forma activa hasta su eliminación renal. En algunas formas farmacéuticas predomina la excreción por vía biliar (cefoperazona, ceftriaxona). Muy pocos sufren metabolismo, como la desacetilación (cefalotina, cefotaxima) o la inactivación por las hidroxipeptidasas renales ([Marín and Gudiol, 2003](#)).

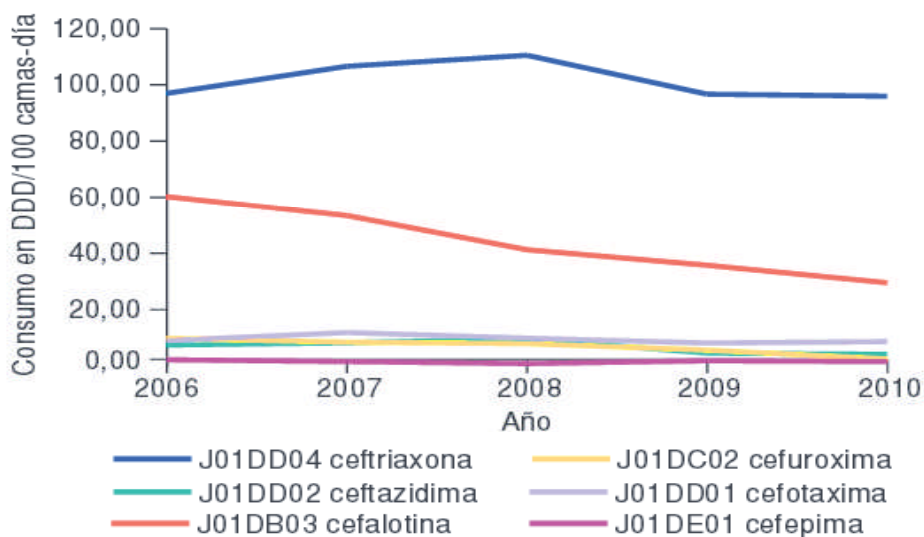
Actualmente, las penicilinas y las cefalosporinas son los antibióticos más ampliamente utilizados en términos de cantidad e importancia en el tratamiento de enfermedades infecciosas ([Rodríguez-Narvaez et al., 2017](#)).

Un estudio realizado en hospitales de México muestra el consumo de los principales betalactámicos como se muestra en la [Figura 2](#), donde se evidencia el uso de cefalosporinas y penicilinas. En la [Figura 3](#) se observa que la ceftriaxona es la más utilizada de las cefalosporinas ([Rodríguez-Ganen and Asbun-Bojalil, 2012](#)).



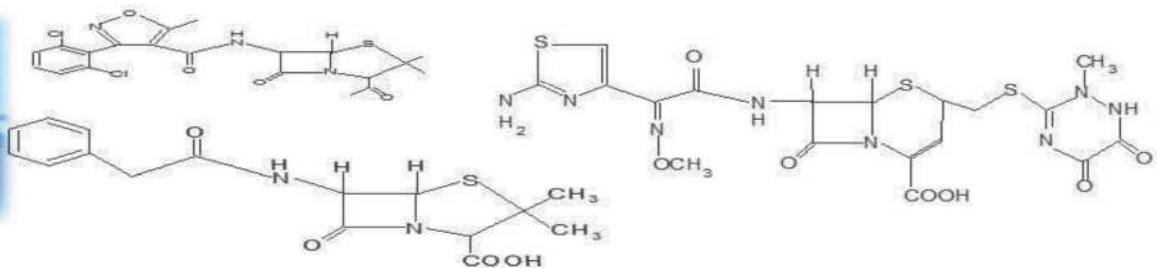
DDD: dosis diaria definida.

Figura 2: Tendencias del consumo intrahospitalario de antibacterianos β-lactámicos (penicilinas y otros β-lactámicos seleccionados) (Rodríguez-Ganén and Asbun-Bojalil, 2012).



DDD: dosis diaria definida.

Figura 3: Tendencias del consumo intrahospitalario de cefalosporinas (Rodríguez-Ganén and Asbun-Bojalil, 2012).



Además, el plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) (López, Ponce de León and Novales, 2019) reportó el consumo de antimicrobianos en 12 Estados de la República Mexicana en 2018, donde se puede apreciar que el consumo de cefalosporinas sigue siendo alto y también evidencia el uso frecuente de penicilinas, [Figura 4](#).

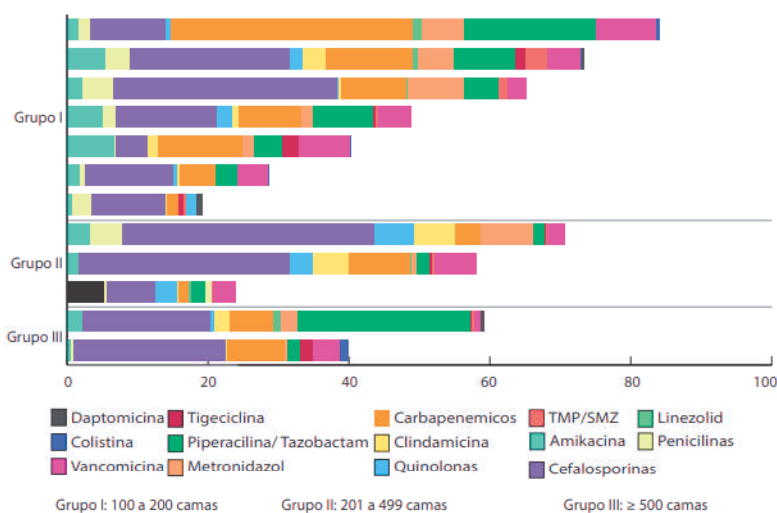
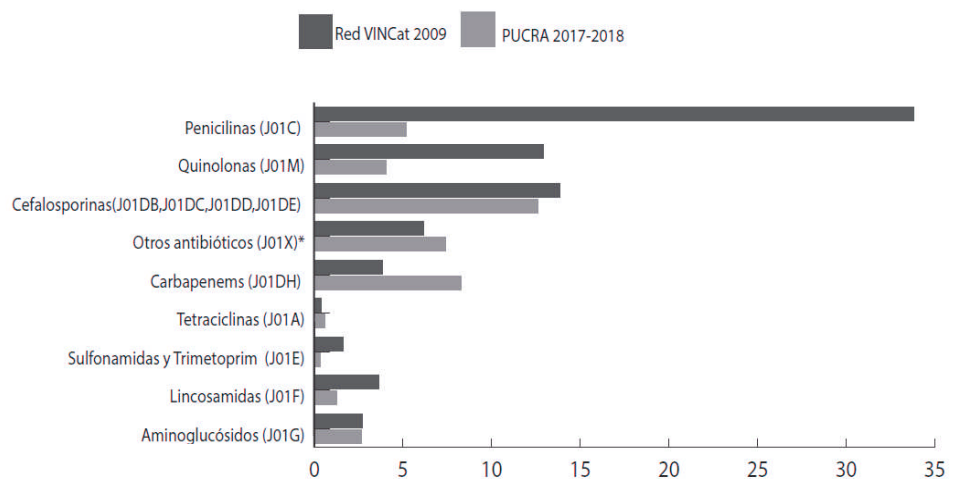
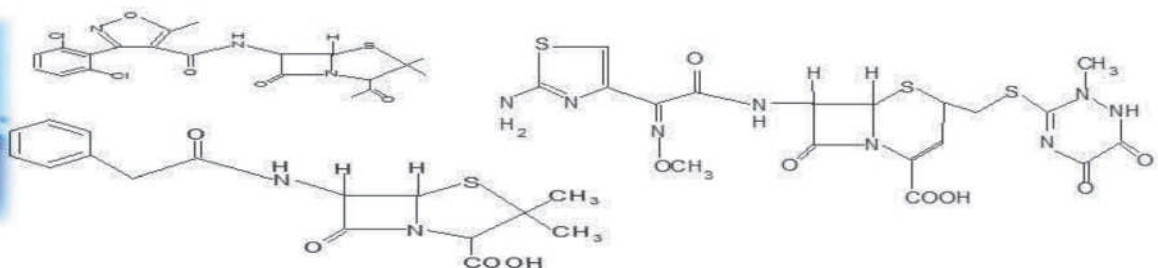


Figura 4: Consumo de antimicrobianos (DDD/100 estancias) en los hospitales de la Red PUCRA en 2018 cada barra representa un hospital (López, Ponce de León and Novales, 2019).

También, se comparó el consumo de los hospitales de la Red PUCRA con lo reportado por la red española VINCAt de 2007 a 2009. Los resultados mostraron que el mayor consumo de la red española correspondió al grupo de las penicilinas, seguido de cefalosporinas y quinolonas; el consumo de cefalosporinas es similar entre las dos redes, no así para los carbapenémicos, que fue superior en los hospitales de México ([Figura 5](#))



*Otros antibióticos: metronidazol, vancomicina, teicoplanina, colistina, linezolid, daptomicina, fosfomicina. Entre paréntesis se muestran los códigos ATC de los antibióticos. Act I r a C

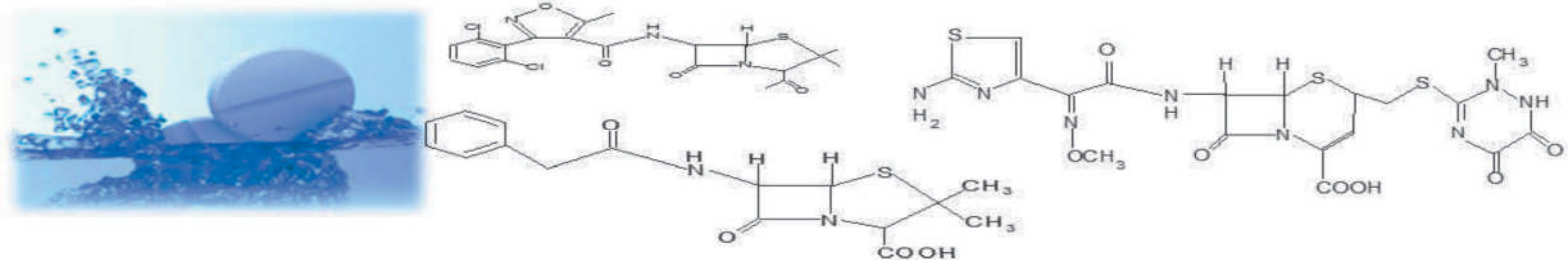
Figura 5: Promedio de consumo de los antibióticos sistémicos más utilizados en DDD/100 estancias. Red VINCat2 vs. Red PUCRA (López, Ponce de León and Novales, 2019).

1.2.1 Penicilina G

La penicilina G (PEN G) fue el primer antibiótico encontrado por los seres humanos y el primer uso masivo de la penicilina se realizó el 6 de junio de 1944 lográndose salvar con ésta miles de vidas (Flesia, 2011). Es usado para infecciones bacterianas humanas, ya que puede impedir la síntesis de la pared celular bacteriana.

Tiene un $pka = 2.75$ y pertenece a los antibióticos β -lactámicos, su uso es común en el tratamiento clínico por lo que podrían aparecer bacterias resistentes a penicilinas en el tratamiento médico y el medio ambiente (Li *et al.*, 2008).

La penicilina G es un antibiótico en polvo micro cristalino e higroscópico. Obtenido mediante el cultivo de *Penicillium* (Benito Peña, 2006).



Es soluble en agua, metanol, etanol, dioxano, poco soluble en hexano, acetonitrilo, acetona, e insoluble en tolueno, éter y cloroformo. Presenta mayor estabilidad a pH 6.5 y a una temperatura de 4 °C. Presenta una reducción de actividad por metales pesados, etanol, glicerina, yodo, ácido láctico, vitaminas B1 y C (Benito Peña, 2006). La solubilidad es de 1.9×10^{-4} g/L. Se inactiva por ácidos, hidróxidos alcalinos y agentes oxidantes.

Su punto de ebullición es de 663.3 °C y el punto de fusión es de 355.0 °C (Bailón Pérez, 2009).

El núcleo de penicilina en sí es el principal requerimiento estructural para la actividad biológica, si el anillo betalactámico, es destruido por betalactamasas, el producto resultante, el ácido peniciloico, carece de actividad antibacteriana. Sin embargo, lleva un determinado antígeno de las penicilinas actuando como estructura sensibilizante (Malgor-Valsecia, 1928).

En general la estructura química básica de las penicilinas consiste en un anillo de tiazolidina, unido a un anillo betalactámico, al que se le une una cadena lateral (R). En la Figura 6 puede observarse la estructura química de la Penicilina G (Flesia, 2011).

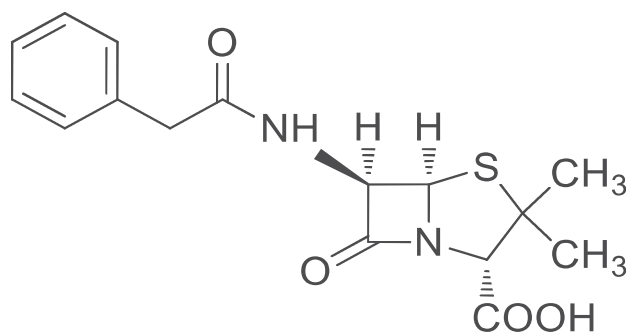
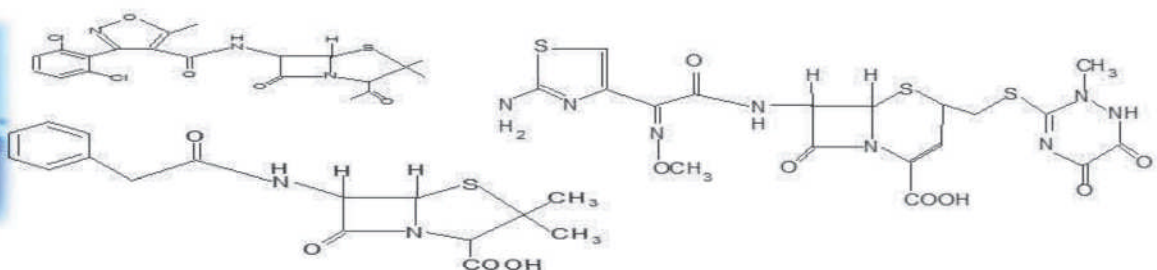


Figura 6: Estructura química de la penicilina G (Flesia, 2011).



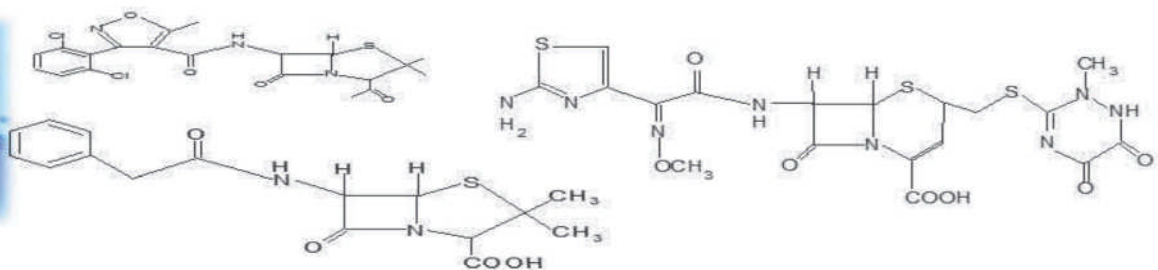
Algunos métodos propuestos para la eliminación o remoción de penicilina G sódica se muestran en la [Tabla 2](#). Destacando los métodos biológicos que prometen ser más sustentables para la eliminación de estos fármacos con altos porcentajes de degradación.

Tabla 2: Métodos de eliminación de la penicilina G.

Método	Penicilina G concentración	Eliminación %	Referencia
Fenton y foto-Fenton	200 mg/L	83.3	(Rahim Pouran, Abdul Aziz and Wan Daud, 2015)
Carbón activado	20 mg/L	74-88	(Ahmed <i>et al.</i> , 2015)
Microextracción en fase sólida con base en un polímero	50-100 µg/L	80.8 - 90.9	(Lirio <i>et al.</i> , 2016)
Fotorreactor de membrana híbrida en combinación con un fotorreactor	-	75 y 84	(Wang and Lim, 2012)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Z1	300 mg/L	99.9	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
<i>Phanerochate chryso sporium</i>	2000 mg/L	61.4	(Mullai <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudomonas putida</i> (feat)	3 mg/L	35	(Gartiser <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus cereus</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	9000 mg/L	80.63	(Yurchenco, Hopper and Warren, 1966)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	1500 mg/L	70–80	(Hammarstrom and Strominger, 1975)
Degradación con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2000 mg/L	100	(Rivera Gutiérrez, 2016)

1.2.2 Ceftriaxona

Es una cefalosporina de tercera generación, con amplio espectro de actividad bactericida, en contra de microorganismos aerobios Gram positivos y Gram



negativos. Es un derivado del núcleo de las penicilinas, es una sulfona del ácido penicilánico (Shrestha, Bhuyan and Sinha, 2013).

La excreción de la ceftriaxona es biliar (en un 70 %, y 40 %, respectivamente); de allí que en la mayoría de ellas debe regularse la dosis en insuficiencia renal y pueden ser retiradas en forma eficaz por hemodiálisis (Dávalos Moscol, 1998). Es soluble en agua, su estructura se muestra en la Figura 7.

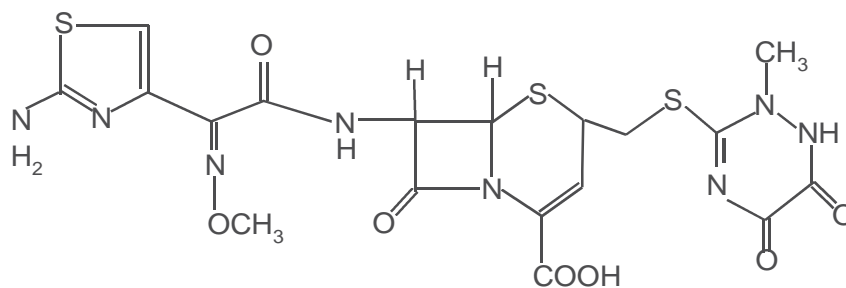
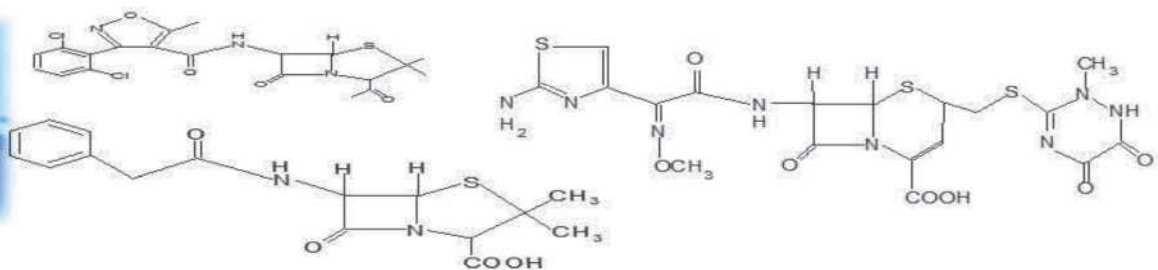


Figura 7: Estructura química de la ceftriaxona (Shrestha, Bhuyan and Sinha, 2013).

Algunos métodos propuestos para la eliminación o remoción de ceftriaxona se presentan en la Tabla 3, donde se aprecia que son muy pocos los estudios para la eliminación de este antibiótico y no existen métodos biológicos.

Tabla 3: Métodos de eliminación de ceftriaxona.

Método	Concentración mg/L	Eliminación %	Referencia
biodegradación inherente	10-20	5	(Gartiser <i>et al.</i> , 2007)
Degradación electro-catalítica	10	97.7	(Guo <i>et al.</i> , 2015)
Remoción con una clinoptilolita modificada con HDTMA	10	75.71	(Dávila Estrada, 2018)



1.2.3 Dicloxacilina

La [Figura 8](#) muestra la molécula de dicloxacilina, es una isoxazolilpenicilina utilizada en el tratamiento de las infecciones producidas por los estafilococos resistentes a las bencil-penicilinas. Además de su uso en personas, también se emplea ampliamente en la medicina veterinaria.

Se ha reportado que el 65 % de la dicloxacilina que entra al cuerpo humano, se excreta vía urinaria y fecal en su forma química original. Debido a su considerable solubilidad en agua y baja biodegradabilidad, gran parte de este fármaco y sus metabolitos permanecen intactos al pasar por plantas convencionales de tratamiento de aguas, lo que representa una amenaza para los cuerpos de agua naturales que posteriormente los reciben ([Colina-Márquez and Castilla-Caballero, 2013](#)). Sus propiedades se muestran en la [Tabla 4](#).

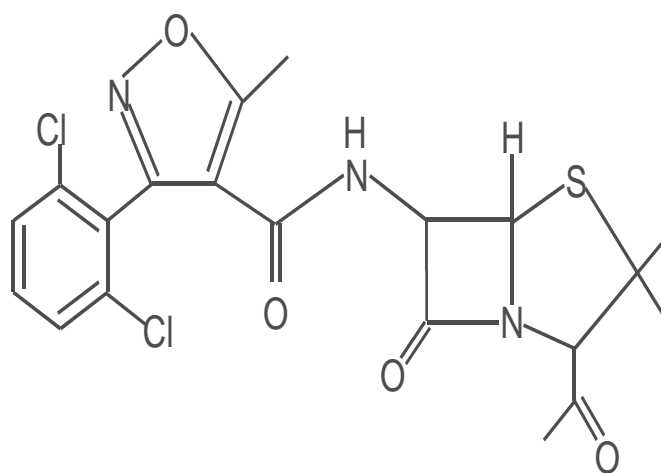


Figura 8: Estructura química de la dicloxacilina ([Colina-Márquez and Castilla-Caballero, 2013](#)).

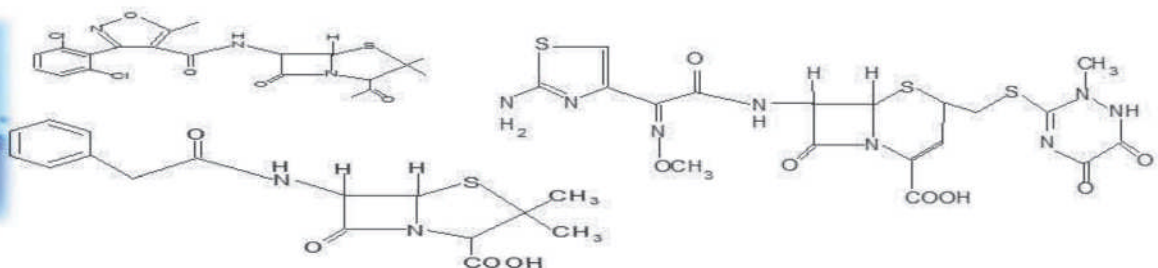


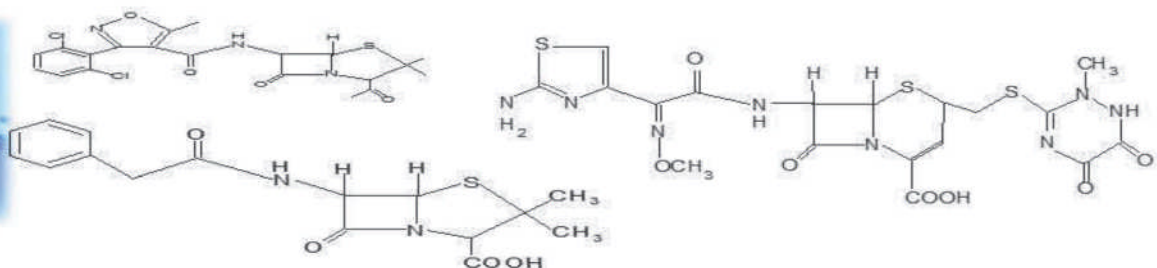
Tabla 4: Propiedades físicas de la dicloxacilina (Benito Peña, 2006).

Propiedad Física	Descripción
Constante de Disociación (pKa)	pKa = 2.7
Solubilidad	Soluble en: agua, metanol, etanol, DMF, DMSO, acetona. Poco soluble en: cloroformo, acetato de etilo. Insoluble en: hexano, benceno, isooctano.
Peso Molecular (P.M)	470.33 g/mol ¹
Fórmula Molecular (F.M)	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₅ S

En la [Tabla 5](#) se muestran algunos métodos propuestos para la eliminación o remoción de dicloxacilina donde destacan los métodos fisicoquímicos mientras que los métodos biológicos son escasos.

Tabla 5: Métodos de eliminación de dicloxacilina.

Método	Concentración	Eliminación %	Referencia
Degradación sonoquímica	3 mg/L	30.00	(Villegas Guzman <i>et al.</i> , 2015)
Fotocatálisis heterogénea solar	25 µg/L	45.82	(Campo and Cohen Rodriguez, 2012)
Mineralización foto catalítica	25 mg/L	45.00	(Colina-Márquez and Castilla-Caballero, 2013)
Fotocatálisis con TiO ₂	100 mg/L	95.00	(Villegas-Guzman <i>et al.</i> , 2015)
Biodegradación con hongo <i>Leptosphaerulina sp</i>	19000 µg/L	~100.00	(Copete-Pertuz <i>et al.</i> , 2018)
Remoción con Zeolita natural modificada con HDTMA	20 mg/L	96.52	(Alvarez García, 2015)



1.3 Biodegradación

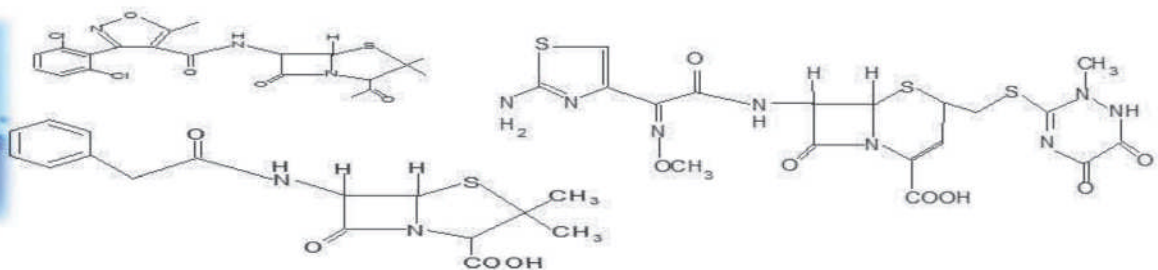
La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, define la biodegradación como la descomposición de una sustancia catalizada por enzimas in vitro o in vivo. Se divide en tres categorías con fines de evaluación de peligros:

1. Primaria. Se refiere a la alteración de la estructura química de una sustancia que resulta en la pérdida de una propiedad específica.
2. Ambientalmente aceptable. Contempla una biodegradación hasta el punto de eliminar las propiedades indeseables del compuesto. A menudo corresponde a la biodegradación primaria, pero depende de las circunstancias en las que los productos se descargan al medio ambiente.
3. Última. Desglose completo de un compuesto en moléculas simples, completamente oxidadas o reducidas como dióxido de carbono, metano, nitrato, amonio y agua (Ortiz-Hernández *et al.*, 2013).

Por consiguiente, el proceso de biorremediación utiliza la habilidad de los microorganismos naturales o genéticamente mejorados para recuperar sitios contaminados y proteger el ambiente. Los procesos de biorremediación pueden clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación en los siguientes tipos:

a.- Fito remediación. Consiste en el uso de plantas para contener, remover o neutralizar contaminantes.

b- Biorremediación microbiana. Utiliza microorganismos capaces de acumular o metabolizar determinados contaminantes. Las más empleadas son las bacterias aunque también se han utilizado varias especies de archaea, hongos, algas y cianobacterias (Sharma, Dangi and Shukla, 2018). La Figura 9 muestra el diagrama



de clasificación de biorremediación de acuerdo al microorganismo que realiza la degradación

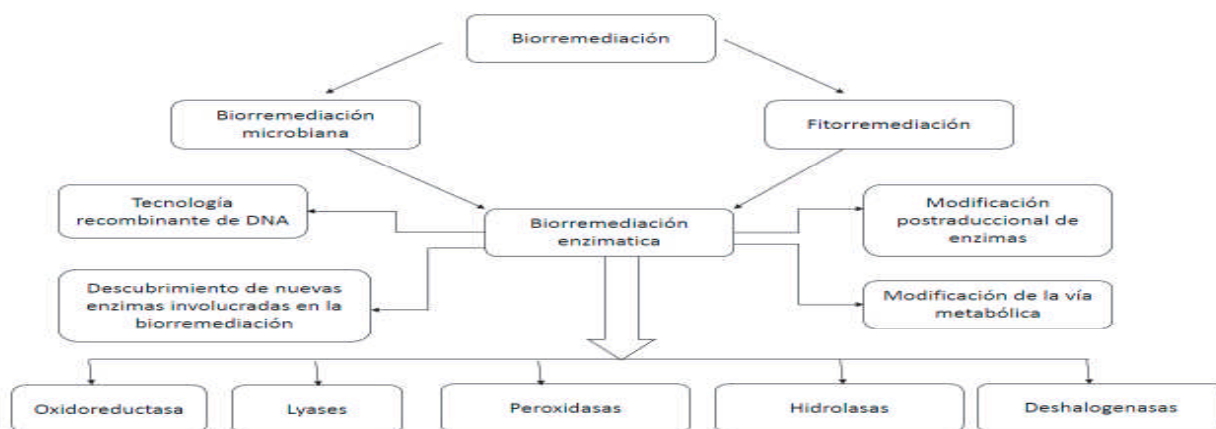


Figura 9: Diagrama de clasificación de biorremediación de acuerdo al microorganismo que realiza la degradación (Sharma, Dangi and Shukla, 2018).

Si se tiene en cuenta el lugar de la aplicación, la biorremediación se puede clasificar como ex situ o in situ como se muestra en la Figura 10 (Azubuiké, Chikere and Okpokwasili, 2016).

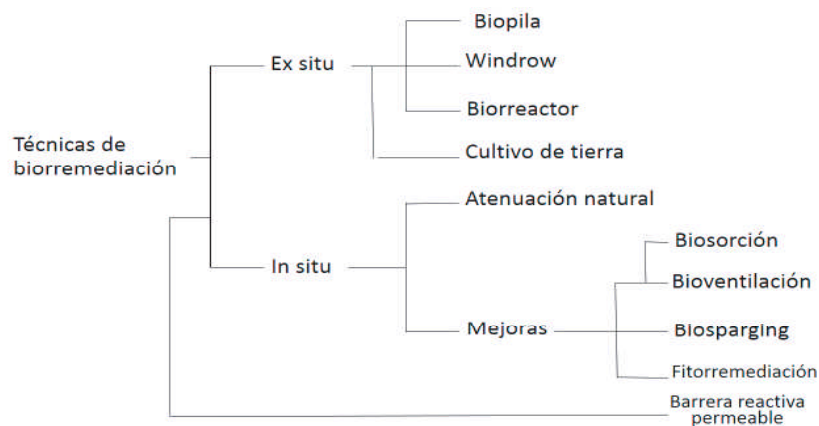
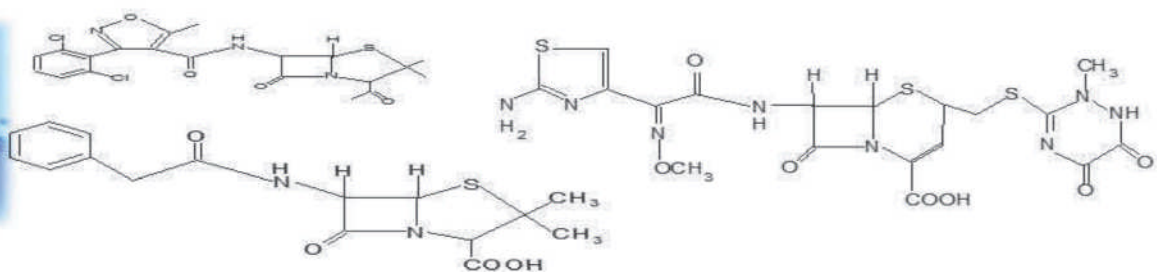


Figura 10: Técnicas de biorremediación. La divergencia de cada técnica es hipotética; por lo tanto, el orden de izquierda a derecha de los nodos internos no es el orden de evolución (desarrollo de la técnica). La barrera reactiva permeable (PBR) no es la raíz arbitraria del árbol. Es una técnica de remediación física con algunos elementos de biorremediación, de ahí la divergencia hipotética temprana (Azubuiké, Chikere and Okpokwasili, 2016).



Entre las principales ventajas de la biorremediación se encuentra la eficiencia, el bajo costo e impacto ambiental, en comparación con las técnicas convencionales (Ortiz-Hernández *et al.*, 2013).

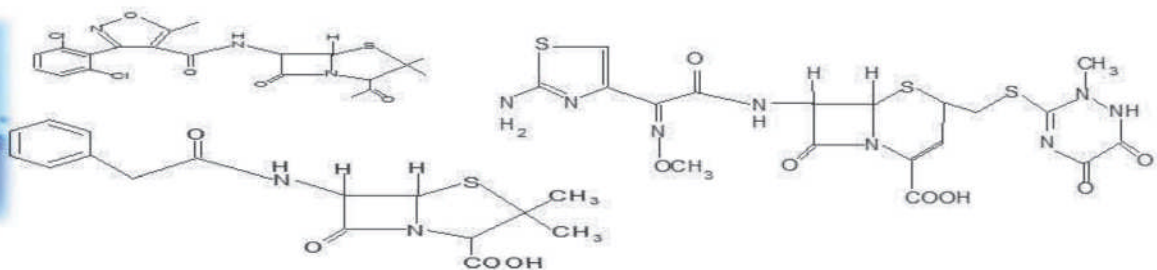
1.4 Bacterias

Las bacterias pertenecen al reino procarionta, son microorganismos que se reproducen mediante fisión binaria, replicando al mismo tiempo su ADN. Estas células poseen una estructura similar a las eucariotas ya que tienen una membrana celular y ribosomas que contienen la información genética (Flores Tatiana and Vargas Alvin, 2014). También tienen una pared rígida y una membrana que encapsula el citoplasma. El núcleo contiene los componentes genéticos de la célula. La mayoría de las bacterias pueden moverse debido a que poseen un flagelo. El tamaño de las bacterias depende de la etapa de crecimiento en que se encuentra ([Http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO 8](http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO%208), no date).

En conjunto las bacterias, presentan características como:

- Pigmentación: que puede ser verde amarillo o grisáceo.
- Olor: frutal o putrefacto
- Consistencia: mucoide, liso o rugoso
- Comportamiento óptico: frente a luz transmitida estos pueden ser opacos, traslúcidos o transparentes; frente a la luz reflejada pueden ser brillantes u opacos (Flores Tatiana and Vargas Alvin, 2014) (Flores Tatiana and Vargas Alvin, 2014).

Las bacterias se clasifican en aerobias (necesitan oxígeno para vivir) y en anaerobias (crecen en ausencia de oxígeno).



Algunas bacterias pueden formar endosporas (esporas dentro de la célula) para poder sobrevivir a condiciones adversas. La [Figura 11](#) muestra un esquema de una bacteria y sus principales componentes.

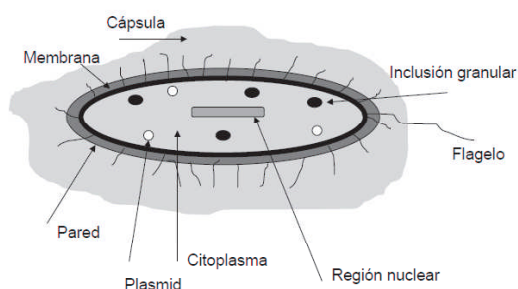


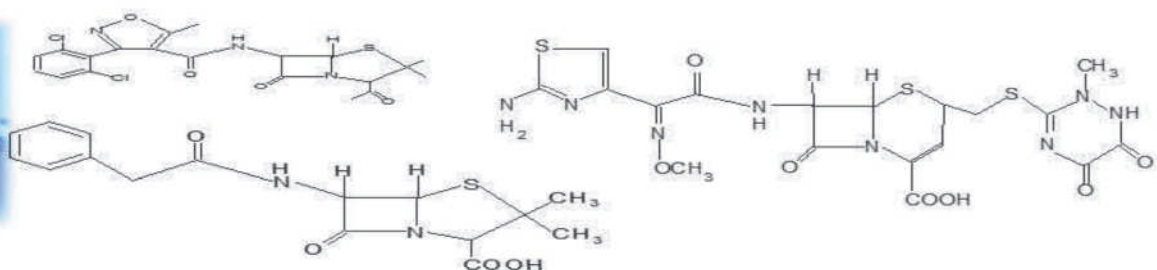
Figura 11: Esquema de una bacteria
([Http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO 8, no date](http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO 8, no date)).

1.5 Biorreactor

Los biorreactores a pequeña escala son ampliamente utilizados para la experimentación en los laboratorios microbiológicos.

Cuando se diseña un biorreactor se necesita de un gran número de experimentos para seleccionar una o varias cepas y optimizar el procedimiento de biodegradación. Durante los últimos 50 años, los científicos han utilizado el matraz erlenmeyer para el desarrollo de procesos a pequeña escala. El uso de los mismos se estima en un 90 % de todos los experimentos de este tipo realizados en la industria biotecnológica y en estudios académicos ([Serrat and Méndez, 2015](#)).

Con la finalidad de mejorar las condiciones del experimento surgieron los biorreactores de tanque agitado los cuales se han ido perfeccionando con el paso del tiempo, llegando a ser un estándar en la industria biotecnológica. Siendo los biorreactores a pequeña escala vitales en procesos de escalado y optimización de cepas, caracterización y desarrollo de procesos ([Serrat and Méndez, 2015](#)).



1.5.1 Modelado matemático del Biorreactor

Para el modelado matemático del reactor se tomó en cuenta lo siguiente:

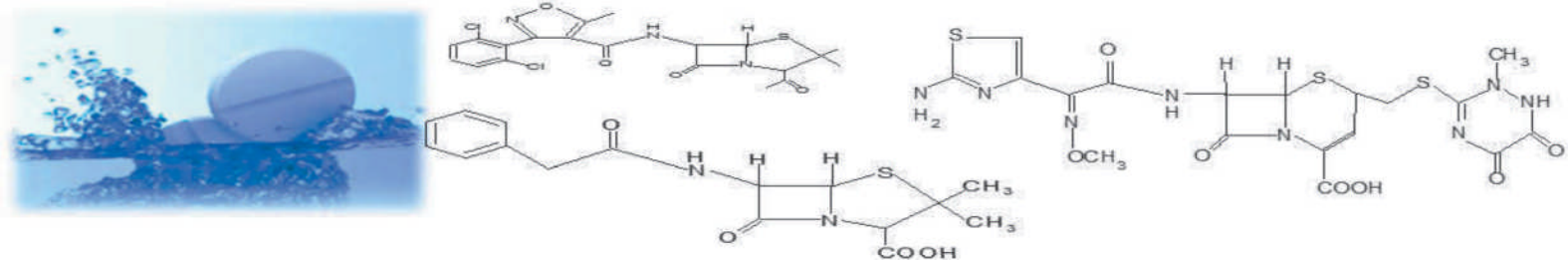
1. Crecimiento celular
2. Tiempo de generación
3. Métodos para medir el crecimiento bacteriano
4. Ecuación de Monod

1.5.1.1 Crecimiento celular

La mayoría de las células procariotas se dividen por fisión binaria; es decir, de una célula individual se forman dos células nuevas. Durante este proceso las células se alargan hasta aproximadamente el doble de la longitud de la célula más pequeña y luego forma un tabique que acaba por separar la célula en dos células hijas. A este tabique se le denomina septo y es el resultado del crecimiento hacia adentro de la membrana citoplasmática y la pared celular desde direcciones opuestas hasta que las dos células hijas se separan.

Durante el ciclo de crecimiento, todos los constituyentes celulares se incrementan, de modo que cada célula hija recibe un cromosoma completo y suficientes copias de todas las macromoléculas, monómeros e iones inorgánicos, como para existir como célula independiente. El reparto del ADN replicado entre las dos células hijas depende de la unión del DNA a la membrana durante la división, y la segregación real de las dos copias es facilitada por la formación del septo, como se muestra en la [Figura 12](#).

El tiempo necesario para completar un ciclo de crecimiento celular en las bacterias es muy variable y depende de varios factores, tanto nutricionales como genéticos. Bajo las mejores condiciones nutritivas, la bacteria *Escherichia coli* puede completar



un ciclo en 20 min; unas cuantas bacterias pueden crecer incluso más rápidamente, pero la mayoría crecen más lentamente. El control de la división celular es un proceso complejo y al parecer está íntimamente relacionado con sucesos que ocurren durante la replicación del cromosoma (Madigan, Martinko and Parker, 2003).

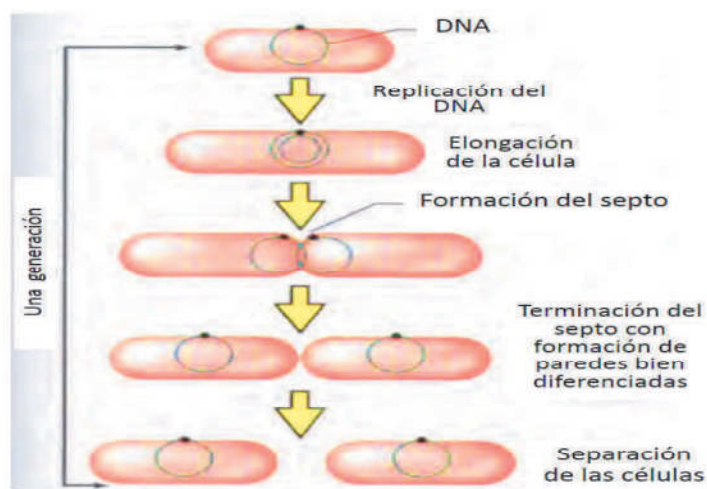
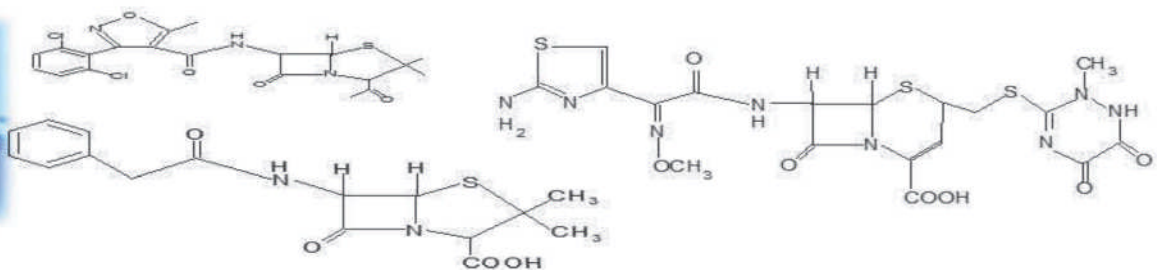


Figura 12: Proceso general de la fisión binaria de la célula procariota en forma de bacilo. Para simplificar, el nucleoide se representa como un círculo sencillo de color verde (Madigan, Martinko and Parker, 2003).

1.5.1.2 Parámetros del crecimiento

Con base en el crecimiento celular (fisión binaria), es razonable pensar que el crecimiento de las bacterias es de tipo exponencial.

El aumento en el número de células que se producen en un cultivo bacteriano creciendo exponencialmente corresponde a una progresión geométrica de base 2. Cuando dos células se dividen, se forman cuatro células después de la tercera generación ocho células. Es decir; en cada generación sucesiva se duplica la



población. La relación que existe entre el número de células y las generaciones de un cultivo creciendo en forma exponencial, puede deducirse matemáticamente de la manera siguiente:

1.5.1.3 Tiempo de generación (G)

Es el tiempo requerido para que una célula se divida o una población se duplique.

$$G = \frac{t}{n}$$

t= tiempo en minutos

G= tiempo de generación

n= número de generaciones transcurridas

Si partimos de N células a un tiempo determinado (T_0) tenemos un número constante de células determinadas (N_0). En la primera generación se duplicará el número de células ($2N_0$) y así sucesivamente de tal manera que al cabo de un tiempo determinado (T_f) el número de células será N_f ($N_f = 2^n N_0$).

Donde:

n= número de generaciones transcurridas desde T_0 hasta T_f

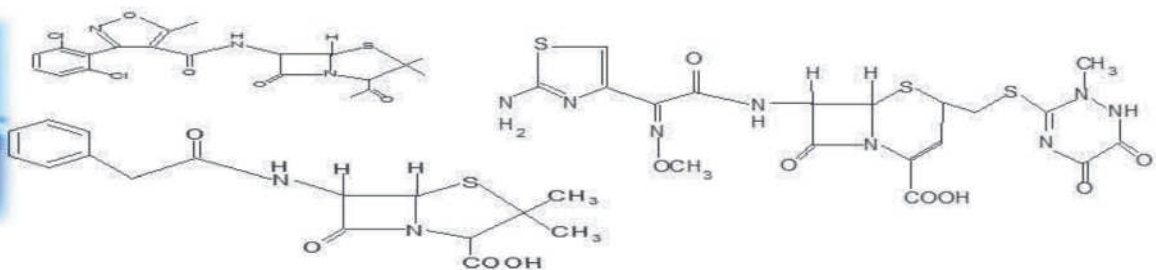
Para evaluar el número de generaciones transcurridas se obtiene de la siguiente manera:

$$N_f = 2^n N_0$$

$$\log N_f = n \log 2 + \log N_0$$

$$n = \frac{\log N_f - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log \frac{N_f}{N_0}}{\log 2} = 3.322 \log \frac{N_f}{N_0}$$

Entonces el tiempo de generación se evalúa como:



$$G = \frac{t}{3.322 \log \frac{N_f}{N_0}}$$

N_f = células finales

N_0 = células iniciales

El tiempo de generación es importante porque explica la variación en la duplicación celular de cada bacteria en estudio (Madigan, Martinko and Parker, 2003).

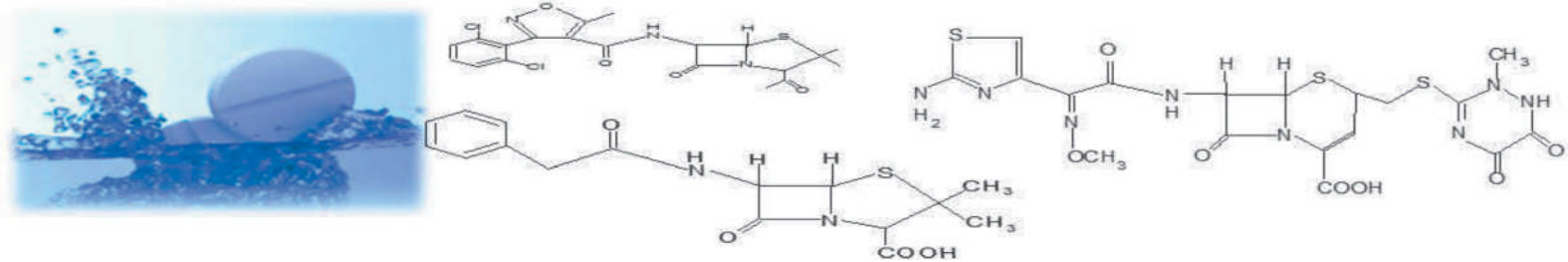
1.5.1.4 Métodos para medir el crecimiento de bacterias

Al colocar una cantidad de células vivas (bacterias) en una solución líquida con nutrientes esenciales, a una temperatura y un pH determinado, las células crecerán. Para medir y monitorear los procesos de crecimiento se desarrollaron diferentes métodos experimentales. Los dos más comunes son: por turbidimetría y por conteo de colonias.

En este trabajo se utilizó el conteo de colonias debido a que con el método de turbidimetría se tiene como principal inconveniente, la imposibilidad de distinguir entre células vivas o muertas o entre células y otro tipo de material particulado.

1.5.1.5 Conteo de colonias

Se coloca en una caja Petri un volumen del inóculo y se agrega un pequeño volumen del medio de cultivo que contenga los nutrientes necesarios para las bacterias, se homogeniza y se deja gelificar. Estas placas son incubadas en condiciones adecuadas.



En la caja de petri se forman colonias que son fácilmente contadas a simple vista como se muestra en la [Figura 13](#). Se asume que cada colonia ha sido formada por una única célula del medio de cultivo original. Las células son entonces medidas como unidades formadoras de colonia UFC (colony-forming units, CFU). La suposición que una colonia es formada por una única célula bacteriana puede subestimar la densidad de población. Al efecto de minimizar esta subestimación, una serie de diluciones debe ser usada.

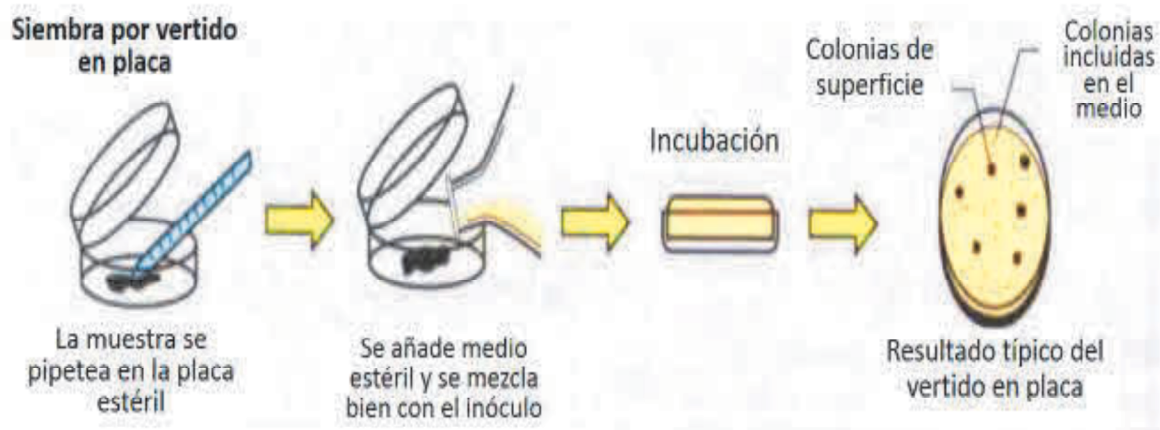
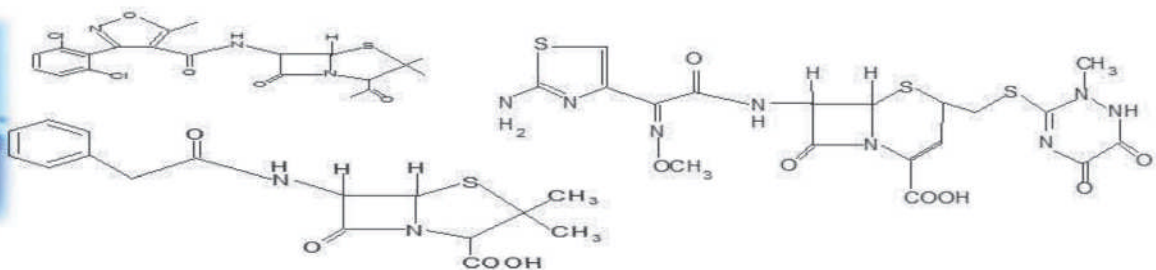


Figura 13: Diagrama de siembra por vertido en placa (Madigan, Martinko and Parker, 2003).

1.5.1.6 Ecuación de Monod

El crecimiento de los microorganismos durante un cultivo en lote puede ser cuantificado gracias a los estudios realizados por Jaques Monod en 1950 (Bello, 2014). La ecuación de Monod, que se conoce también como el modelo de crecimiento celular, describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento $\mu(S)$ y la concentración del nutriente limitante (S) en un cultivo microbiano, y se



representa por la siguiente expresión matemática
([Http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO 8](http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO 8), no date):

$$\mu(S) = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad \text{ecuación 1}$$

Donde:

μ_{max} es la máxima velocidad específica de crecimiento

K_s es la constante específica de cada sustrato

La gráfica de μ como función del sustrato aparece en la [Figura 14](#)

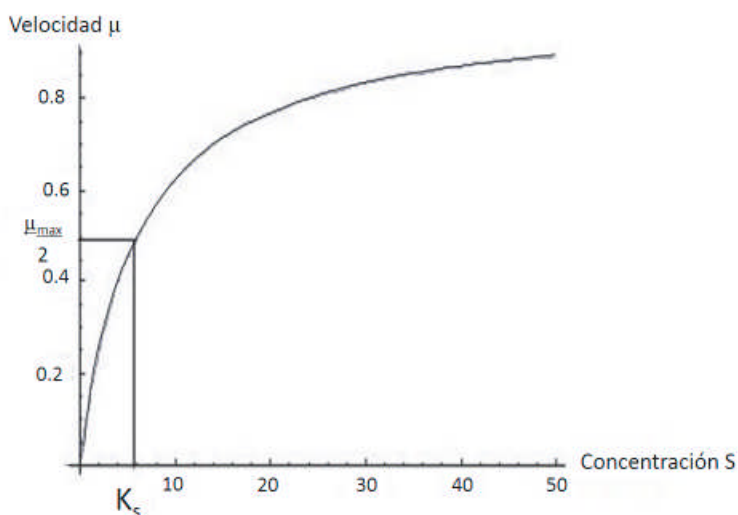
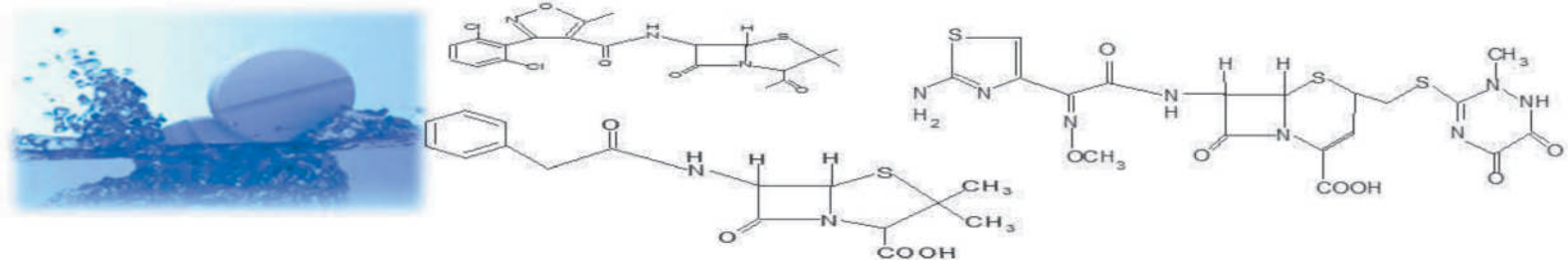


Figura 14: Gráfica del efecto de la concentración del sustrato (S) sobre la velocidad de crecimiento (μ) con $\mu_{max}=0.9$ y $K_s=6$
([Http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO 8](http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO 8), no date).

Con base a la ecuación de Monod y la forma de la gráfica anterior, se puede observar que:

Si la concentración de sustrato limitante (S) es cero, la velocidad específica de crecimiento $\mu(0)$ también lo es.



Cuando S es muy grande, la velocidad específica de crecimiento $\mu(S)$ tiende a la velocidad máxima μ_{max} .

La velocidad específica de crecimiento $\mu(S)$ depende de S , iniciando con S pequeño crece rápidamente hasta que $S = K_s$ donde toma el valor de $\frac{\mu_{max}}{2}$ y sigue creciendo a un ritmo cada vez menor a μ_{max} .

La dinámica del crecimiento celular para biomasa y decrecimiento del sustrato durante el cultivo en lote es descrita por las siguientes ecuaciones diferenciales: la primera específica que la velocidad de crecimiento de biomasa es directamente proporcional a la cantidad de biomasa existente, y la segunda que la velocidad de consumo del sustrato es inversamente proporcional a la cantidad de biomasa existente, y así se tiene que:

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu(s)X(t) \quad \text{ecuación 2}$$

$$\frac{dS(t)}{dt} = -\frac{1}{Y_{xs}} \left(\frac{dX(t)}{dt} \right) \quad \text{ecuación 3}$$

$$X(0) = X_0, S(0) = S_0 \quad \text{ecuación 4}$$

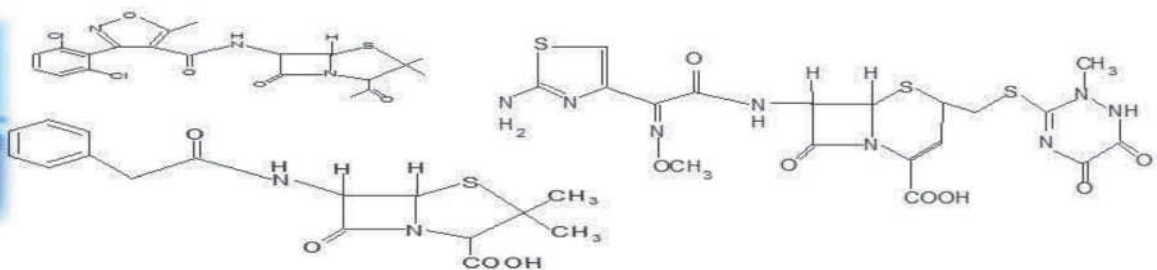
Donde:

$X(t)$ cantidad de células o biomas al tiempo t : su unidad de medida es gr/L.

$\mu(s)$ velocidad específica de crecimiento en S : su unidad de medida es gr/L.

t es tiempo.

Y constante de rendimiento del sustrato limitante, se define como: cantidad de biomasa producida/cantidad de sustrato consumido.



$X(0)$ y $S(0)$ condiciones iniciales de biomasa y sustrato respectivamente.

1.5.1.7 Estimación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod.

Los valores de los parámetros μ_{max} , Y , K_s se obtienen en la linealización de la ecuación No.5 de Monod y obteniendo la ecuación No. 6 de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{\mu(S)} = \left(\frac{K_S}{\mu_{max}}\right) \left(\frac{1}{S}\right) + \frac{1}{\mu_{max}} \quad \text{ecuación 5}$$

Donde la pendiente y la ordenada corresponden a:

$$m = \frac{K_S}{\mu_{max}} \quad b = \frac{1}{\mu_{max}} \quad \text{ecuación 6}$$

La Figura 15 muestra gráficamente la ecuación de Lineweaver-Burk.

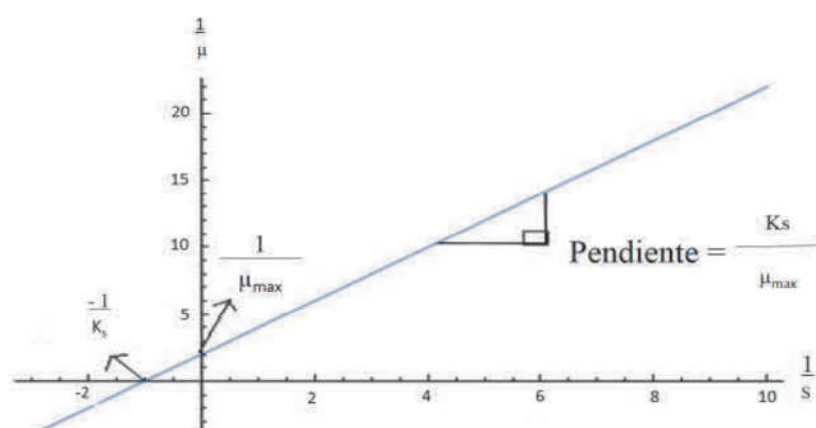
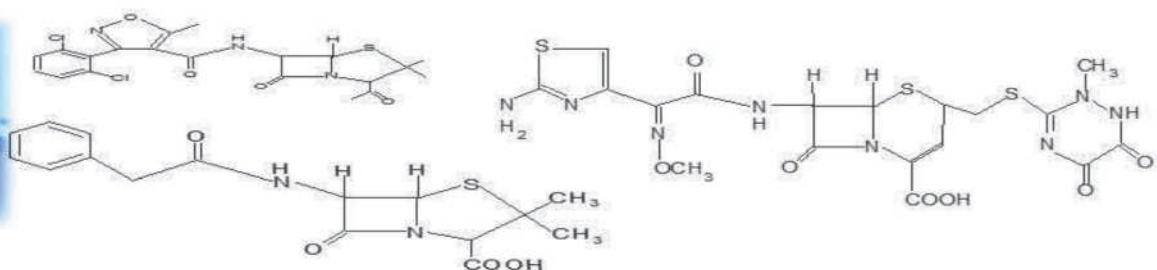


Figura 15: Diagrama de Lineweaver-Burk (Bello, 2014).

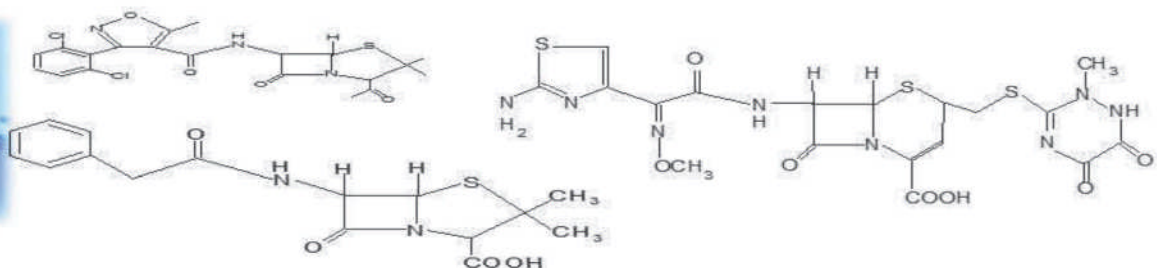
Los parámetros de la ecuación de Monod se pueden estimar por diferentes métodos como el integral o el método de Euler (Bello, 2014).



II. JUSTIFICACIÓN

La presencia de los fármacos en aguas residuales, se han ido incrementando debido a su uso indiscriminado. Además, cada vez más existen evidencias que demuestran sus efectos tóxicos en el ambiente, por lo que su presencia representa un grave problema para las plantas tratadoras ya que no eliminan con eficiencia este contaminante emergente, debido a que no fueron diseñadas para este fin. Por esta razón diversos métodos físicos y biológicos están siendo probados para la remoción y eliminación de estos contaminantes, siendo los métodos biológicos los que presentan la más alta remoción.

Aunado a esto las bacterias de vida libre son las candidatas ideales para la biorremediación de su entorno ya que son muy resistentes debido a su capacidad de sobrevivir en un ambiente abierto donde existe competencia por los nutrientes, así como factores ambientales adversos. En cambio, en un laboratorio las condiciones son más controladas, y las bacterias son más susceptibles. Por esta razón el presente trabajo evaluó la degradación de penicilina, dicloxacilina y ceftriaxona con bacterias aisladas del agua residual de un hospital.



III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

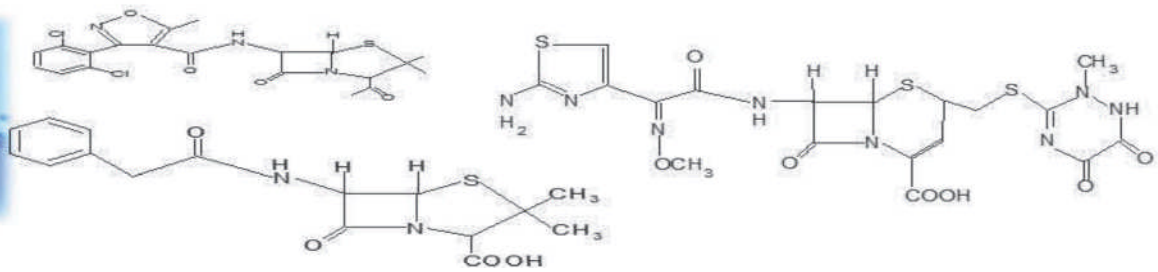
Es posible la eliminación de betalactámicos en medio acuoso con bacterias aisladas de agua residual de un hospital y su monitoreo por cromatografía de líquidos de alta resolución.

3.2. Objetivo general

Biodegradar penicilina G, ceftriaxona y dicloxacilina, con bacterias aisladas del agua residual proveniente de un hospital, y su monitoreo por Cromatografía de líquidos de alta resolución.

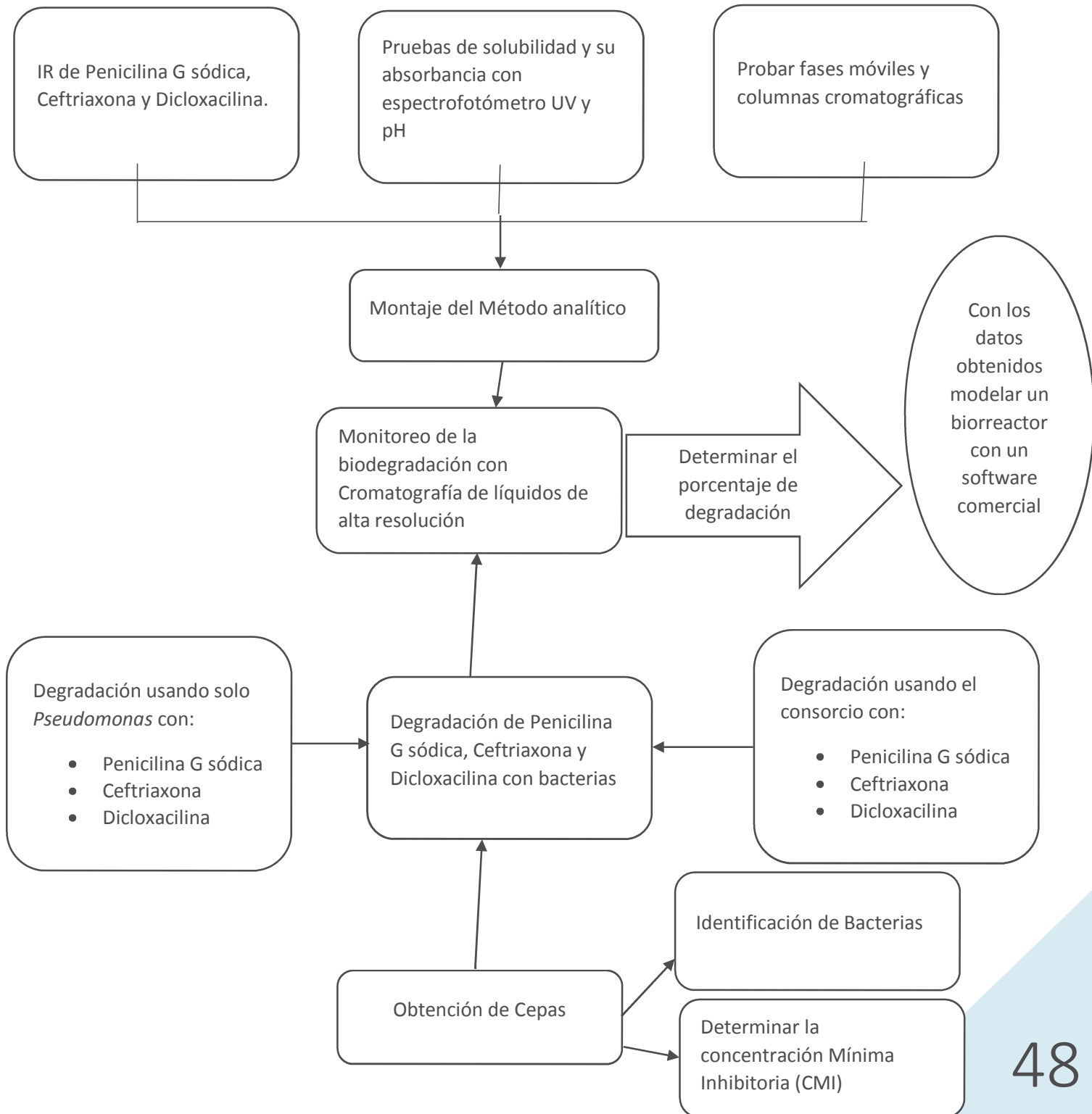
3.3 Objetivos específicos

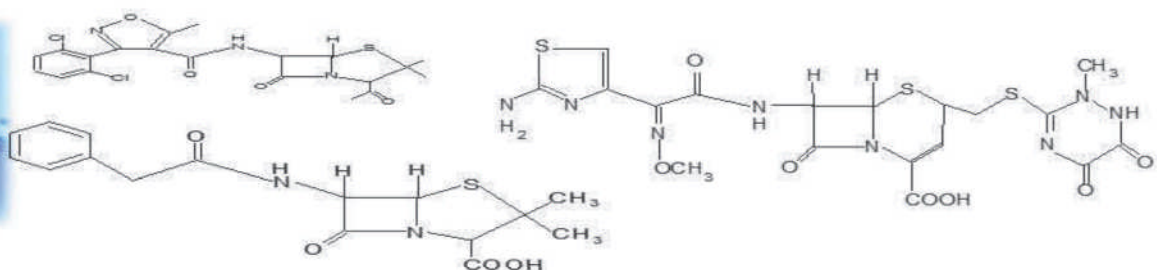
- Implementar un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para la cuantificación de penicilina G, Ceftriaxona y Dicloxacilina en medio acuoso.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de los antibióticos.
- Monitorear la biodegradación de penicilina G, Ceftriaxona y Dicloxacilina por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).
- Determinar el orden de reacción de la biodegradación y el perfil de concentración celular con respecto al tiempo
- Calcular los parámetros cinéticos de la biodegradación con la ecuación de Monod



IV DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Diagrama de la metodología





4.2 Materiales y reactivos

Penicilina G sódica de Sigma Aldrich, con número de CAS 69-57-8, PENNA-10 MU, con número de lote #SLBJ8735V producto de China

Penicilina G sódica de Sigma Aldrich, con número de CAS 69-57-8, PENNA-10 MU con número de lote # 077M4776V producto de Israel

Dicloxacilina Pureza 90.4 % B.H. Marca Fersinsa

Ceftriaxone sodium pharmaceutical secondary estándar; traceable to USP, PhEur and BP. CAS:104376-79-6. Lote#LRAA9170. Producto de USA.

Solución salina 0.85 %

Tubo No. 0.5 del nefelómetro de McFarland (1.5×10^8 UFC/ mL)

Caldo Mueller Hinton

Medios para pruebas bioquímicas mínimas

Equipo de infrarrojo Nicolet modelo 550 intervalos de $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$

Cromatógrafo Waters 1515 con detector UV-vis

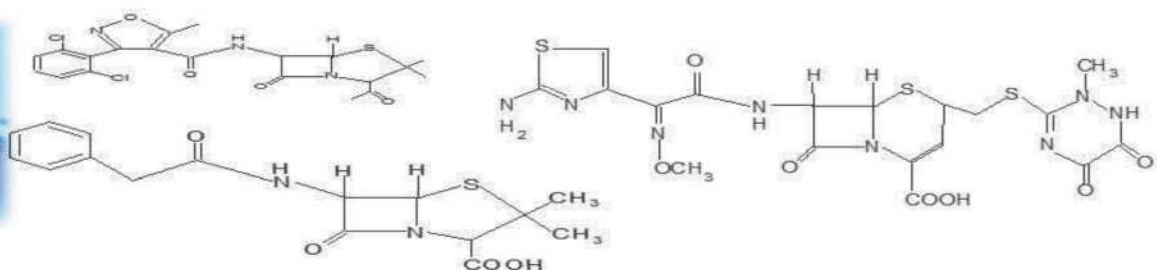
Columna Agilent, Eclipse XDB-C18, $5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 250 \text{ mm}$

Metanol grado HPLC

Agua grado Milli- Q

Ácido fórmico 0.1 % (EMSURE, lote K47929664619, pureza 98-100 %)

Primero se caracterizaron los estándares de penicilina, ceftriaxona y dicloxacilina, para esto se realizó un Infrarrojo, pruebas de solubilidad y un barrido en UV para conocer la longitud de onda a la cual se tiene mayor absorbancia para la cuantificación. También, se tomó el pH de las fases móviles probadas y se obtuvo el método analítico.



4.3.-Montaje del método analítico

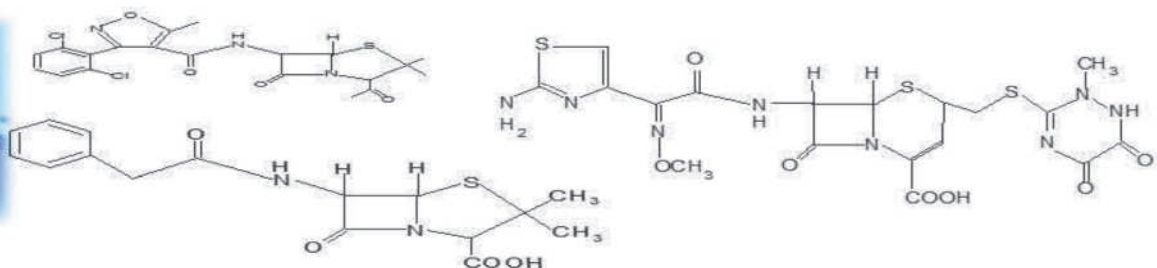
Dentro de la optimización del método analítico, se pretende una metodología que sea versátil para determinar y cuantificar la penicilina G sódica, dicloxacilina, y ceftriaxona.

Para esto se validó la técnica analítica por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Utilizando como base la guía de validación de métodos analíticos (2009) del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C. y las guías ICH Q2 R1, (2005). Validation of analytical procedures: Text and Methodology. Food and Drug Administration (FDA). USA ([ver anexo 1](#)).

4.4.-Obtención de cepas y caracterización bacteriana.

Las cepas que se utilizaron se encuentran en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química de la UAEMex. Obtenidas del agua residual del afluyente de un hospital del Estado de México que fue recolectada con base a la Norma Oficial Mexicana de muestreo NMX-AA-003-1980. Estas cepas son capaces de degradar penicilina G sódica y se encuentran reportadas en la tesis de maestría realizada por [Rivera-Gutiérrez](#) en 2016 y forma parte del proyecto Conacyt con número de registro 215997.

Se realizó una tinción de Gram y se incluyó un estudio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de cada bacteria, para esto fue necesario fijar las bacterias con formaldehído al 2 %, durante 48 horas, posteriormente se realizó un lavado con solución salina 0.85 % y se deshidrataron gradualmente con etanol (10–100 %). Las muestras se secaron por punto crítico (se utilizó CO₂ líquido para desplazar el alcohol y se llevó a condiciones de temperatura y presión de su punto crítico, es



decir: al límite fisicoquímico, donde el volumen de un líquido es igual a la de una masa igual de vapor), para después fijarse en el porta muestras y ser recubiertas con oro. Para su análisis se utilizó un microscopio electrónico de barrido SU1510-Hitachi a 10 kV.

Después se procedió con la identificación bacteriana mediante PCR. Como se muestra a continuación.

4.4.1 La extracción de ADN se realizó con el kit Jena Bioscience (Jena Bioscience, 2016)(anexo 2)

- Lisis celular:

Las cepas bacterianas se incubaron en caldo nutritivo por 24 horas a 37 °C, estas cepas se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos. El pellet celular se re suspendió en 300 µL de solución de lisis celular, se homogenizó, se adicionó 1.5 µL de solución de proteinasa K al lisado y se mezcló invirtiendo varias veces, y se incubó a 55 °C durante 1 h. Se homogenizó y se centrifugó a 15000 g durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante.

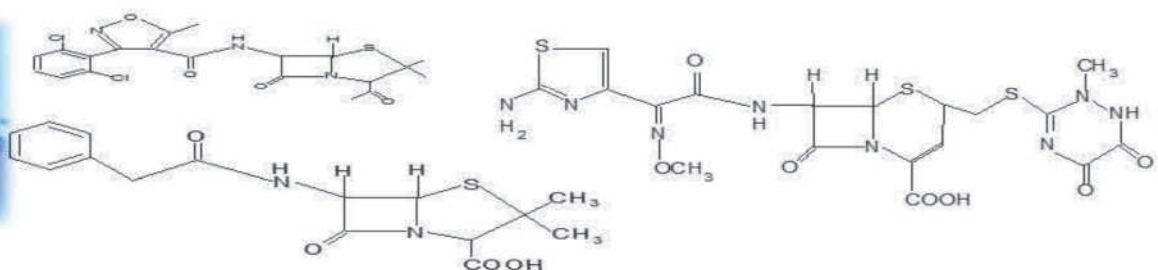
- Precipitación de la proteína:

Se re suspendió el sedimento celular en 300 µL de solución de lisis celular, se le adicionó 100 µL de solución de precipitación de proteínas al lisado celular, se mezcló la solución utilizando el vortex por 20 segundos, se centrifugó a 15000 g por 3 minutos.

- Precipitación de ADN:

Se transfirió el sobrenadante a un microtubo limpio de 1.5 µL que contenía 300 µL de isopropanol >99 %, se mezcló la muestra invirtiendo suavemente y dejando que precipitara.

Se centrifugó a 15000 g durante 1 minuto. Cuando estuvo visible el ADN, se descartó el sobrenadante y se drenó el tubo brevemente sobre papel absorbente limpio. Después el sedimento se secó en una centrifuga de vacío.



Finalmente se adicionó 50 μL de solución de hidratación de ADN al sedimento de ADN seco.

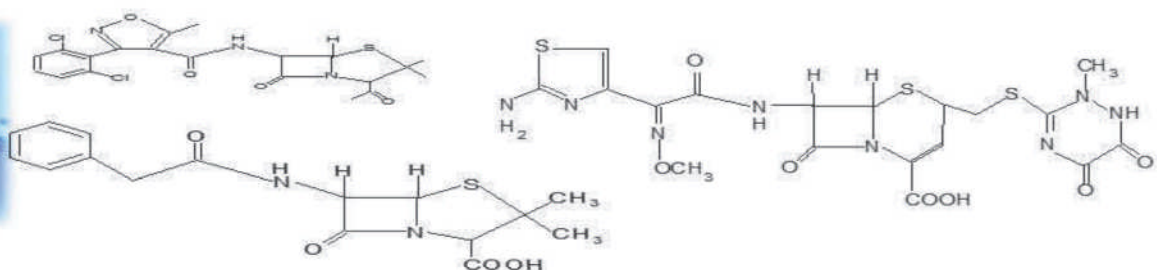
4.4.2 Las reacciones de PCR se realizaron en 15 μL que contenían 1 μL de ADN, 3 μL de de buffer, 10.5 μL de agua, 0.2 μL de primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 0.2 μL de primer 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') y 0.1 μL de MyTaq PCR kit Master Mix (Bioline).

Esta mezcla se colocó en un Thermo Ciclador Veriti 96-Well Thermal Cycler en las siguientes condiciones: 2 min a 95 °C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos que consisten en desnaturalización durante 1 minuto a 95 °C, recocido durante 1 minuto a 58 °C y alargamiento a 72 °C por 2 minutos, seguido de una etapa de extensión final de 5 minutos a 72 °C ([ver anexo 3](#)).

4.4.3 Las amplificaciones por PCR se analizaron por electroforesis en gel, en geles de agarosa al 1.5 % que contenían 1xTAE y 1x GelRed, en un sistema de electroforesis horizontal (fuente de alimentación Thermo Electron Corporation EC250-90) durante 30 minutos a 100 V.

Se usó el marcador de ADN HyperLadder de tamaño molecular 100 bp y se reveló el gel de agarosa con un fotodocumentador UVP 2 UV benchtop con sistema Multidoc-iT.

Adicionalmente, mediante microscopia con focal se determinó la fluorescencia de la cepa más resistente en un equipo TCS SPE/CTR 4000 (Leica), para esto se realizó una fijación de la misma en un portaobjetos con y sin tinción de Gram.



4.5.-Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con base a la metodología seguida por (Rivera Gutiérrez, 2016) y que concuerda con los lineamientos que establece el documento CLSI (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th edn, 2017*).

La CMI fue interpretada como la concentración del antimicrobiano, contenida en el pocillo de la micro placa que inhibió el crecimiento visible de la bacteria, para lo cual fue necesario comparar cada pocillo con los controles positivo y negativo.

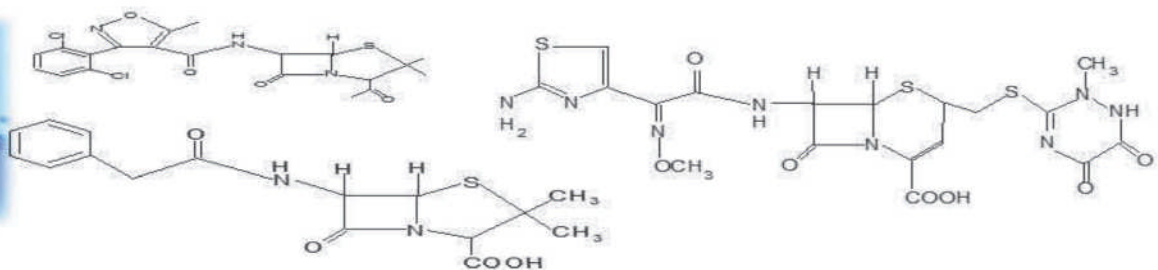
4.6.-. Evaluación de la eficiencia de las cepas en la biodegradación in vitro.

Para evaluar el potencial de biodegradación se siguió la metodología de Rivera (Rivera Gutiérrez, 2016), a la cual se le se realizaron modificaciones quedando de la siguiente manera:

Se preparó dos blancos como control y dos modelos biológicos de degradación para cada antibiótico (se usó 1000 µg/mL para penicilina y 40 µg/mL para dicloxacilina y ceftriaxona):

El blanco 1 (estabilidad del antibiótico) consistió en 200 mL de caldo Mueller Hinton y la concentración del antibiótico (por ejemplo 40 µg/mL de dicloxacilina). La mezcla se distribuyó en tubos estériles y fueron colocados en baño maría con agitación helicoidal lenta, a una temperatura de 30 °C. El comportamiento del antibiótico se monitoreo por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Blanco 2 (Crecimiento de bacterias en caldo Mueller Hinton): 200 mL de caldo Mueller Hinton y 28 mL de una suspensión bacteriana en solución salina 0.85 %, la densidad celular del fluido inoculante se ajustó a 0.5 nefelómetro de McFarland (1.5×10^8 UFC/ mL). Nota: esté blanco se prepara para la cepa más resistente y para el consorcio.



Modelo biológico 1 (degradación con la cepa más resistente): 200 mL de caldo Mueller Hinton, concentración del antibiótico y 28 mL de una suspensión de la cepa más resistente (bacteria en solución salina 0.85 %), la densidad celular del fluido inoculante se ajustó a 0.5 nefelómetro de McFarland (1.5×10^8 UFC/ mL). La mezcla se distribuyó en tubos estériles y fueron colocados en baño maría con agitación helicoidal lenta, a una temperatura de 30 °C. La degradación fué monitoreada por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Modelo biológico 2 (degradación con consorcio bacteriano): 200 mL de caldo Mueller Hinton, concentración del antibiótico y 28 mL de una suspensión del consorcio microbiano (9.6 mL de la cepa más resistente en solución salina 0.85 % ajustada a 0.5 nefelómetro McFarland y 4.6 mL de cada una de las cepas restantes de en solución salina 0.85 % ajustada a 0.5 nefelómetro McFarland).

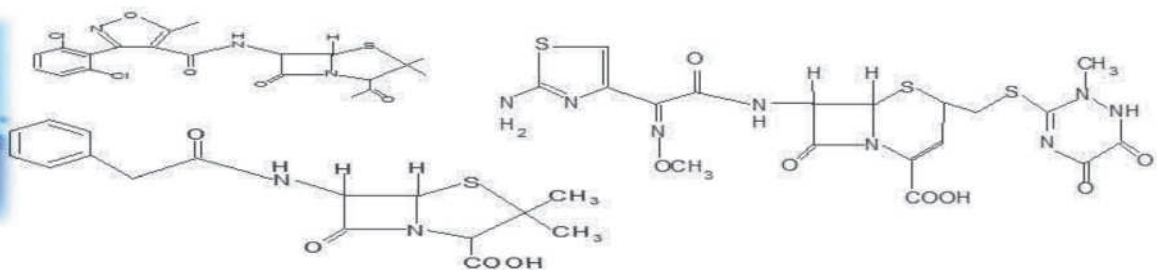
NOTA: La densidad celular del fluido inoculante (28 mL de suspensión del consorcio) fue ajustada a 0.5 nefelómetro McFarland (1.5×10^8 UFC/ mL).

4.7.- Cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución

La cuantificación se realizó, inyectando 20 μ L de muestra. Las lecturas se realizaron cada 15 minutos durante 5 horas y después cada 4 horas durante 72 horas.

4.8.- Modelado matemático para la biodegradación de betalactámicos en medio acuoso mediante un biorreactor.

El biorreactor tamaño laboratorio, es tipo batch, por lo que el modelo matemático a emplear es el de Jackes Monod, ya que es el más usado.



4.8.1.- Perfil de concentración celular respecto al tiempo

Para conocer el comportamiento del crecimiento microbiano con respecto al tiempo durante la degradación fue necesario un muestreo adicional, que se realizó de la siguiente manera:

Para la degradación con la cepa más resistente: se tomó 1 mL de muestra y se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^{-7} . A continuación se sembraron por vaciado en placa y por duplicado en agar Mueller Hinton las diluciones 1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} . El muestreo se realizó cada dos horas.

Degradación con consorcio: Es el mismo procedimiento que la degradación con la cepa más resistente. Solo que el muestreo fue cada hora.

4.8.2.- Cinética de reacción para la biodegradación del betalactámico

Para conocer el comportamiento del crecimiento microbiano con respecto a la concentración del antibiótico durante la degradación, fue necesario tomar una muestra adicional de los tiempos usados para el perfil de concentración celular, e inyectarlas en el cromatógrafo.

4.8.3.- modelo matemático

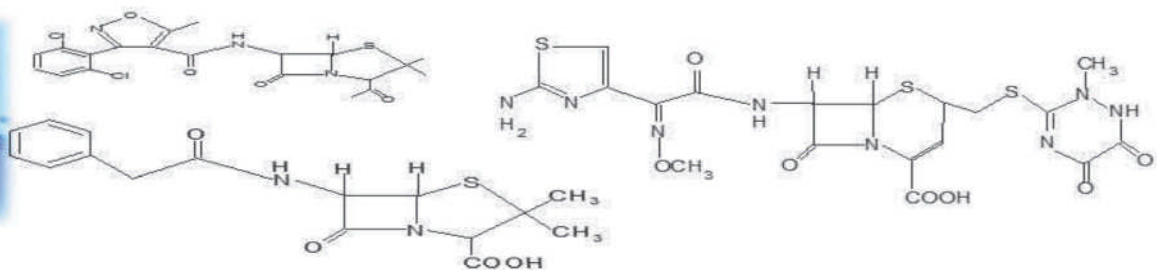
Con base en el modelo de Monod y en el artículo de Alberto Duarte Torres (Torres, 1996) se determinaron los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod.

Se resolvió el modelo de Monod por el método integral. Las deducciones de las ecuaciones utilizadas se encuentran en el [anexo 5](#)

Primero para obtener el factor de rendimiento de sustrato en producto: se graficó la biomasa vs (sustrato inicial-sustrato a un tiempo determinado), la pendiente de esta gráfica nos da el valor del factor de rendimiento (ver [anexo 6](#)).

Lo anterior con base a la ecuación $X = X_0 + Y_{x/s}(S_0 - S)$

Con este valor podemos conocer la constante $a = Y_{x/s}/X_0$



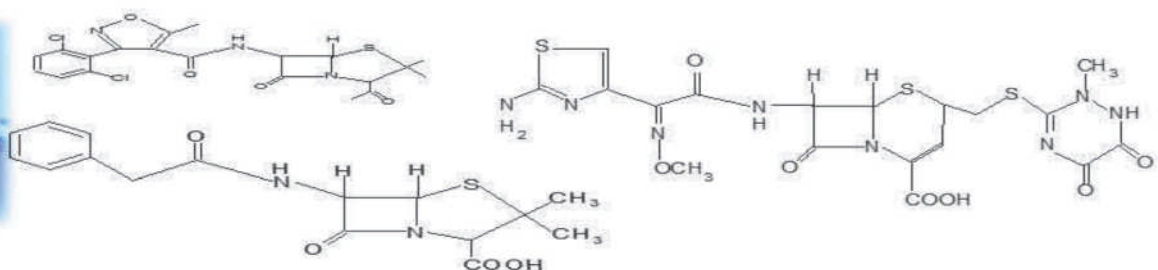
Posteriormente se grafica $(1/t)\ln(S/S_0)$ vs $(1/t) \ln(1+ad)$ de la ecuación

$$\frac{1}{t} \ln \frac{S}{S_0} = b \frac{1}{t} \ln(1 + ad) - c \text{ ver } \text{anexo 5 y 6.}$$

La pendiente nos dará el valor de b, mientras que la intersección nos dará el valor de c, y con esos datos podemos conocer la velocidad específica máxima de crecimiento μ_m y la concentración del sustrato a una velocidad específica de crecimiento K_s . Ver [anexo 5 y 6](#).

De acuerdo con el artículo los mejores valores de a,b y c, asociados con la mejor línea recta obtenida, son seleccionados como los mejores estimativos y utilizados en la evaluación de μ_m y K_s .

Por lo que $\mu_m = c/(b-1)$ y $K_s = ((1/a) + S_0)/(b-1)$.



V RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADO

5.1 CARACTERIZACIÓN

5.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo de los antibióticos

Los espectros de infrarrojo de cada antibiótico se analizaron para conocer los principales grupos funcionales, para ello se utilizó un infrarrojo Nicolet modelo 550 intervalo de 400 – 4000 cm^{-1} .

Durante la experimentación se tuvo un problema con el estándar de penicilina, debido a que, al pedir un nuevo frasco de estándar con el mismo proveedor y número de CAS, el producto recibido resultó ser diferente, como se evidencia en los espectros de la [Figura 16](#). Al indagar en el origen de cada estándar se encontró que el primer estándar fue hecho en China, mientras que el segundo es de Israel.

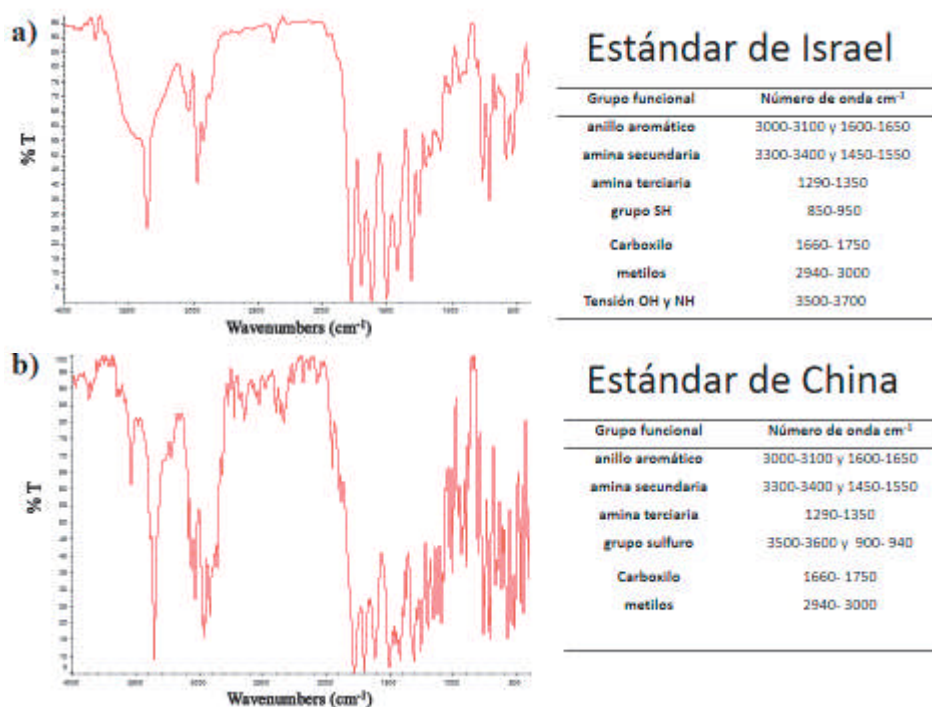


Figura 16: Espectro infrarrojo de penicilina a) estándar de Israel y b) estándar de China.

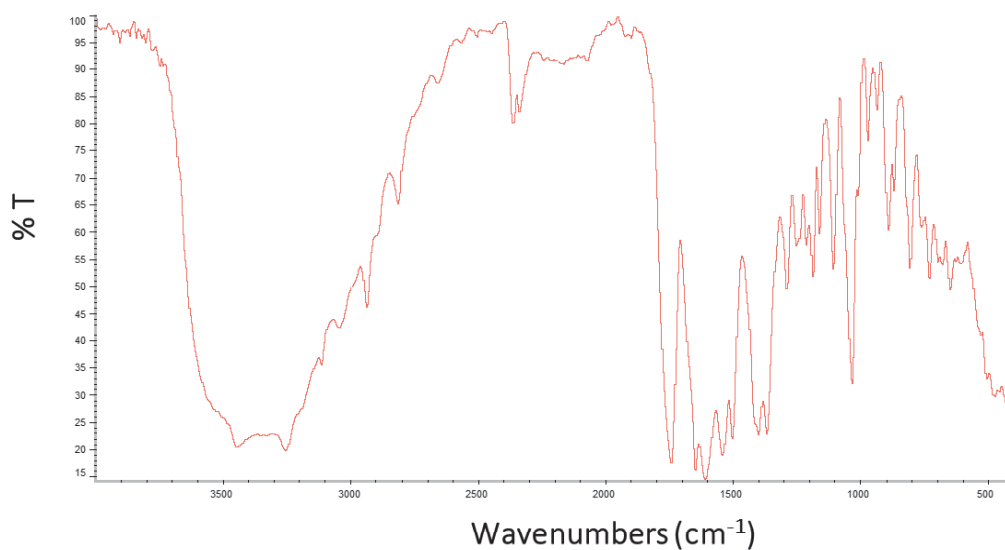
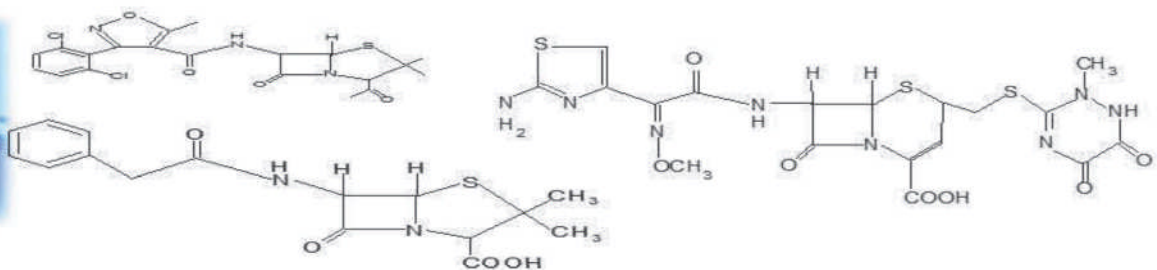


Figura 17: Infrarrojo de la ceftriaxona.

Tabla 6: Grupos funcionales de ceftriaxona.

Grupo funcional	Número de onda cm^{-1}
-NH-	3100-3400, 1550, 1240
-C=C-	3150
CH ₃	3175, 1350
-S-	2500 y 740
Tensión C=O	2100-2200
COOH	1700-1800, 1200
C=O anillo con tensión betalactámico	1700-1800, 1250
-C=NH	1650
-C=N-C	1600
-C=C	1400
-N-	1000-1050

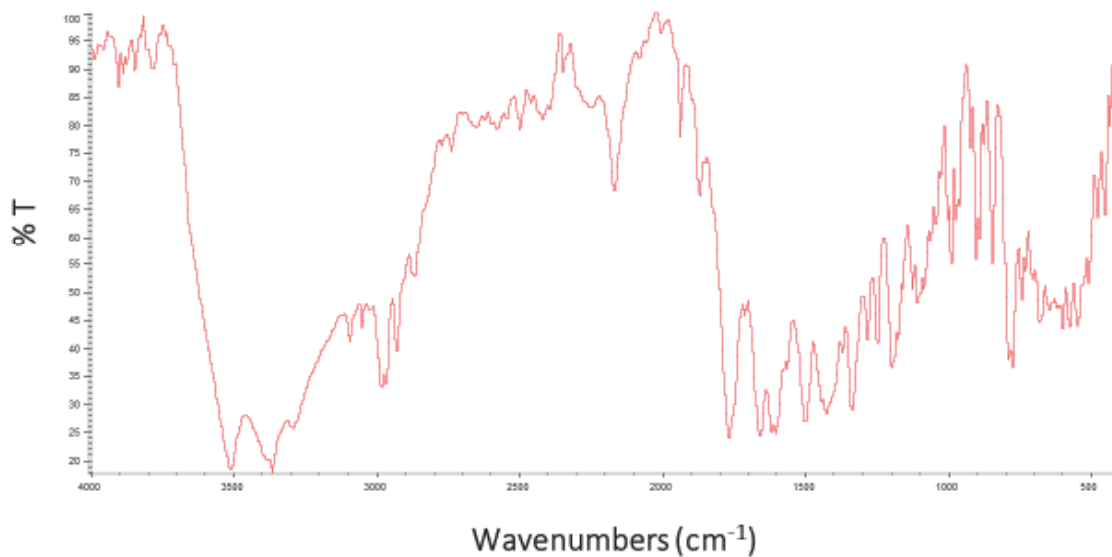
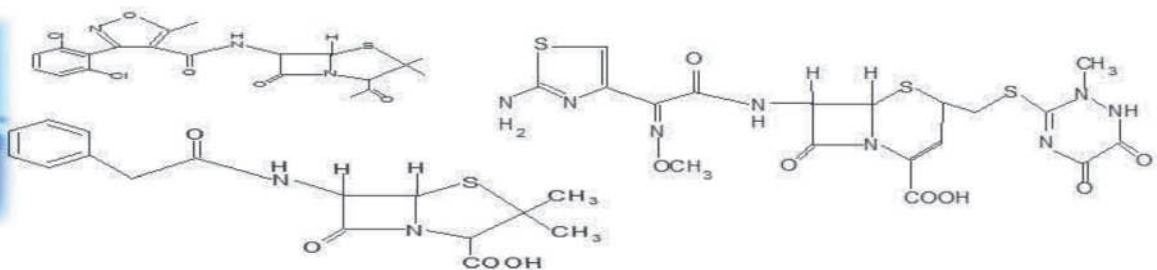
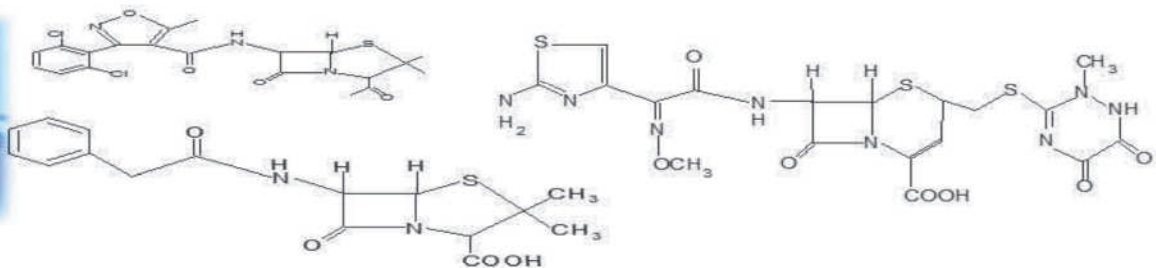


Figura 18: Infrarrojo de la dicloxacilina.

Tabla 7: Grupos funcionales de dicloxacilina.

Grupo funcional	Número de onda cm^{-1}
-NH-	3100-3400, 1550, 1240
C=C	1650
CH ₃	1400
-S-	2500 y 740
Tensión C=O	2100-2200
COOH	1700-1800 , 1200
C=O anillo con tencion betalactámico	1700-1800 , 1250
Benceno trisustituido	3000-3100, 1200,1500, 1850, 1600
CH ₃ -C	3000
Tensión C-H	2900
-N-	1100
C-O-H	3500-3550
Cl	750



5.1.2 Espectroscopia Ultravioleta

Se realizaron pruebas de solubilidad en agua, agua con ácido fórmico, metanol y acetonitrilo para elegir las fases móviles a usar con base en la literatura. Se observó que Penicilina no presenta un máximo de absorbancia incluso al disminuir la concentración, como se observa en la **Figura 19**, por lo que se decidió usar la longitud de onda de 220 nm como lo marca la farmacopea, debido a que a esta longitud de onda se encuentra el anillo betalactámico.

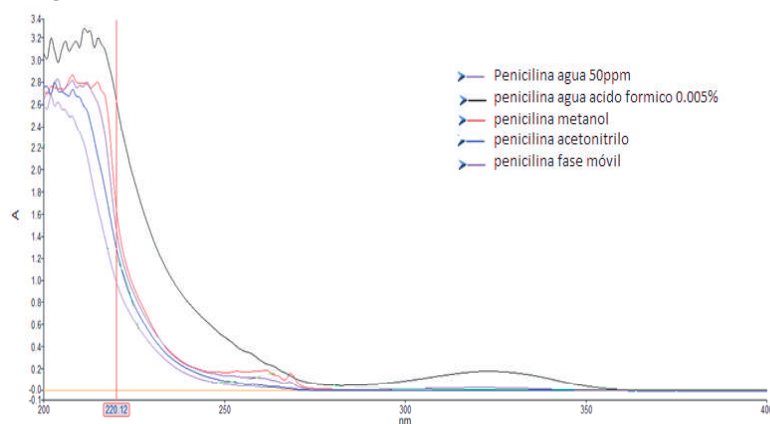
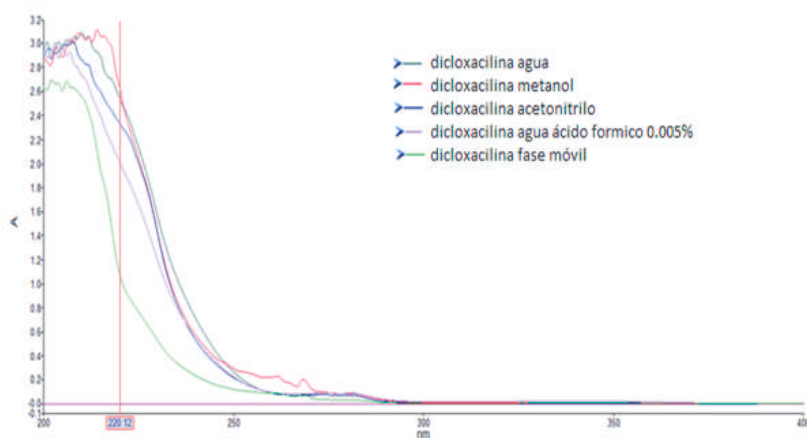


Figura 19: Espectro UV de 50 µg/mL de penicilina con agua, metanol, acetonitrilo y ácido fórmico 0.05%.

En el caso de la dicloxacilina el comportamiento es algo similar al de la penicilina a concentraciones altas y al disminuir la concentración se ve un máximo entre 215 nm y 220 nm. Y debido a que el anillo betalactámico se lee a 220 nm se decidió leer a esta longitud de onda.



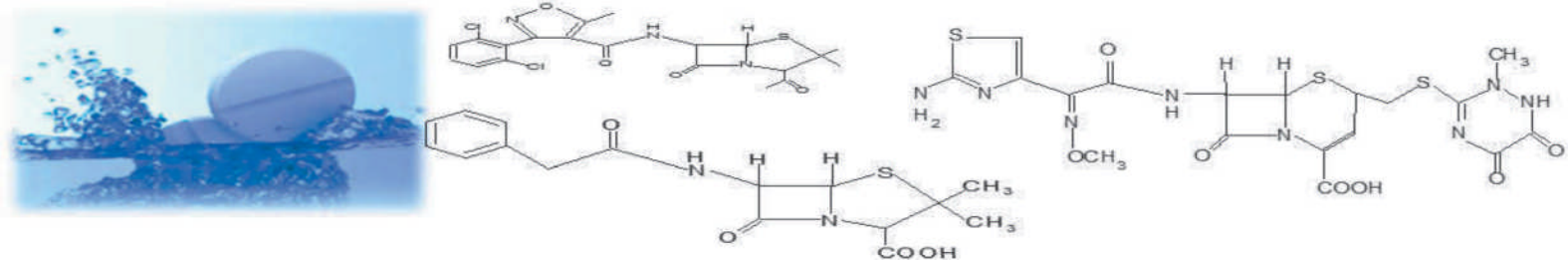


Figura 20: Espectro UV de 50 $\mu\text{g/mL}$ de dicloxacilina con con agua, metanol, acetonitrilo y ácido fórmico 0.05%.

Por otro lado, en el caso de ceftriaxona en agua presenta un máximo a 240 nm lo cual coincide con la farmacopea.

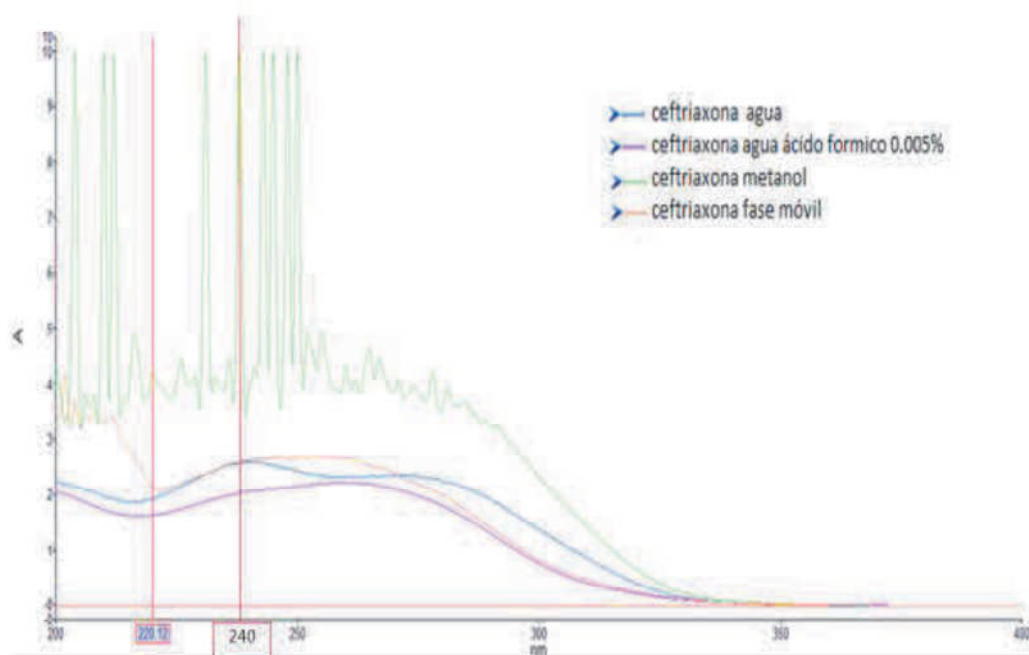


Figura 21: Espectro UV de 50 $\mu\text{g/mL}$ de ceftriaxona con agua, metanol, acetonitrilo y ácido fórmico 0.05%.

Se concluye que penicilina y dicloxacilina se leerán a 220 nm y ceftriaxona a 240 nm

5.1.3 Solubilidad de los antibióticos

En las Tablas 8, 9 y 10 se observa la solubilidad de los tres antibióticos en diferentes solventes. Donde se muestra que la penicilina y dicloxacilina son solubles en agua, metanol y acetonitrilo. Sin embargo, la ceftriaxona es insoluble en acetonitrilo.

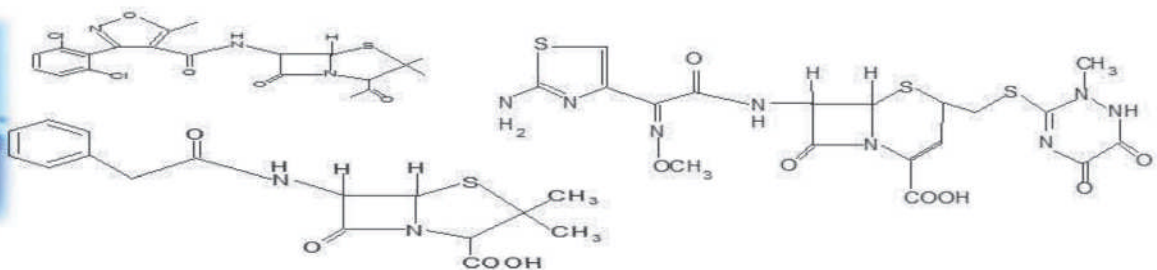


Tabla 8: Solubilidad de 50 µg/mL de penicilina sódica y pH.

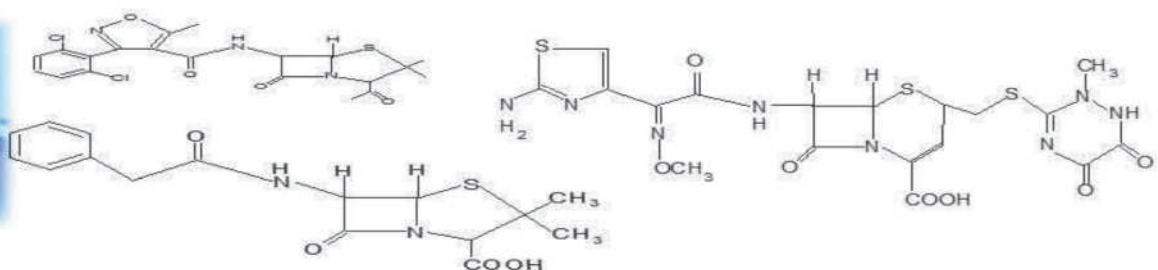
Disolvente	pH ₁	pH ₂	pH ₃	pH promedio
Agua	5.60	5.59	5.59	5.59
Agua acidificada	3.06	3.10	3.09	3.08
Metanol	6.90	6.91	6.89	6.9
Metanol agua acidificada 0.005 %	3.70	3.71	3.72	3.71
Acetonitrilo	8.09	8.10	8.07	8.09

Tabla 9: Solubilidad de 50 µg/mL de ceftriaxona y pH.

disolvente	pH ₁	pH ₂	pH ₃	pH promedio
Agua	6.23	6.30	6.34	6.29
Agua acidificada	3.19	3.20	3.21	3.2
Metanol	7.57	7.42	7.41	7.47
Metanol agua acidificada 0.005 %	3.90	3.91	3.93	3.91
Acetonitrilo	no	soluble		

Tabla 10: Solubilidad de 50 µg/mL de dicloxacilina y pH.

disolvente	pH ₁	pH ₂	pH ₃	pH promedio
Agua	5.17	5.20	5.20	5.19
Agua acidificada	3.12	3.11	3.12	3.12
Metanol	6.95	6.91	6.94	6.93
Metanol agua acidificada 0.005 %	3.61	3.60	3.62	3.61
Acetonitrilo	7.47	7.40	7.43	7.43



5.1.4 Montaje del método analítico

Con base a los datos de solubilidad se probaron diversas fases móviles y cuatro diferentes columnas, para encontrar la más adecuada para el método analítico, las condiciones para la cuantificación de cada antibiótico se muestran en la [Tabla 11](#).

Tabla 11: Condiciones cromatografías para fármacos por separado.

Fármaco	Longitud de onda (nm)	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Columna
Penicilina G	220	Metanol-agua con ácido fórmico 0.05 % (60:40 v/v)	1	Eclipse XDB C18 5 µm 4.6x 250mm
Dicloxacilina	220	Metanol - agua con ácido fórmico 0.1 % (60:40 v/v)	1	Eclipse XDB C18 5 µm 4.6x 250mm
Ceftriaxona	240	Metanol-agua con ácido fórmico 0.05 % (30:70 v/v)	1	Eclipse XDB C18 5 µm 4.6x 250mm

En la [Tabla 12](#) se muestran los resultados de la validación de los tres antibióticos, los cuales indican que todos los parámetros evaluados cumplen con los criterios de aceptación de la (*Guía de Validación de Métodos Analíticos, 2009*) del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C. Por lo que el método de cuantificación es preciso, exacto y confiable.

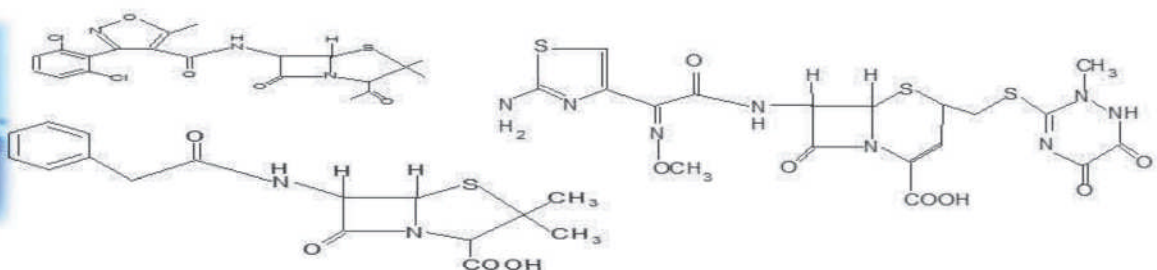


Tabla 12: Validación de Antibióticos.

Parámetro	Penicilina	Dicloxacilina	Ceftriaxona	Criterio de aceptación
Límite de detección	90 µg/mL	0.1 µg/ mL	0.3 µg/mL	
Límite de cuantificación	300 µg/mL	1.0 µg/ mL	1.0 µg/mL	
Linealidad del sistema	$r^2 = 0.992$	$r^2 = 0.9993$	$r^2 = 0.9991$	$r^2 \geq 0.98$
Linealidad del método	$r^2 = 0.997$ CV=1.26	$r^2 = 0.9991$ CV 1.24	$r^2 = 0.997$ CV=1.12	$r^2 \geq 0.98$ CV ≤ 5
Precisión del sistema	CV=2.8	CV=1.18	CV=0.46	≤ 3
Adecuabilidad del sistema	CV=1.25 T=1.05 N=5900	CV=0.85 T =1.45 N=4025	CV=1.17 T=1.08 N=5600	CV ≤ 2 T < 2 N > 1000
Exactitud y repetibilidad	CV=4.53	CV=1.9	CV=1.31	CV ≤ 5
Precisión del método	CV= 2.84	CV=1.27	CV=1.09	CV ≤ 5

5.2 OBTENCIÓN DE CEPAS Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA

En la [Figura 22](#) se aprecia la toma de muestra en el afluente del hospital, la cual se realizó en el 2016 con base en la NMX-AA-003-1980 ([Rivera Gutiérrez, 2016](#)).



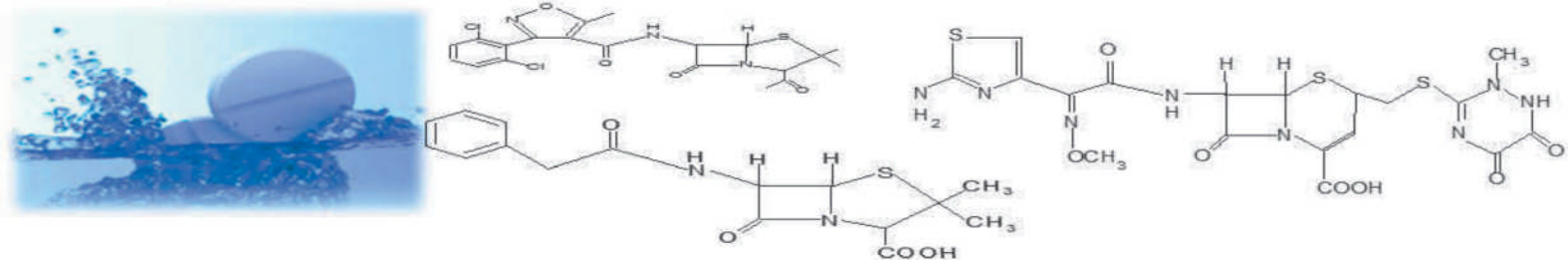


Figura 22: Fotografías del muestreo(Rivera Gutiérrez, 2016).

Se trabajó con seis de las 13 cepas que había en el laboratorio de microbiología, debido a que el resto de las cepas había mutado o se contaminaron, solo seis conservaron sus características iniciales, estas estaban etiquetadas como: C1, C2, A, E, I, O.

A las seis cepas se les realizó pruebas con discos de DBL becton Dickinson DBL cefinase paper disc y se encontró que todas las cepas poseen enzimas betalactamasas.

Las tinciones de Gram mostraron que todas las bacterias son bacilos Gram negativos, mientras que las microfotografías de la [Figura 23](#) confirma que se trata de bacilos, los cuales se midieron por cuadruplicado y se reportó el promedio de la medición, la C1- mide $1.77 \pm 0.26 \times 0.43 \pm 0.04 \mu\text{m}$, C2- $1.42 \pm 0.21 \times 0.53 \pm 0.05 \mu\text{m}$, A- $1.54 \pm 0.35 \times 0.51 \pm 0.04 \mu\text{m}$, E- $1.58 \pm 0.12 \times 0.51 \pm 0.05 \mu\text{m}$, I- $1.48 \pm 0.49 \times 0.56 \pm 0.01 \mu\text{m}$ y O- $1.85 \pm 0.11 \times 0.55 \pm 0.03 \mu\text{m}$, siendo los bacilos de la cepa O los más grandes seguidos por C1, E, A, I y C2 respectivamente.

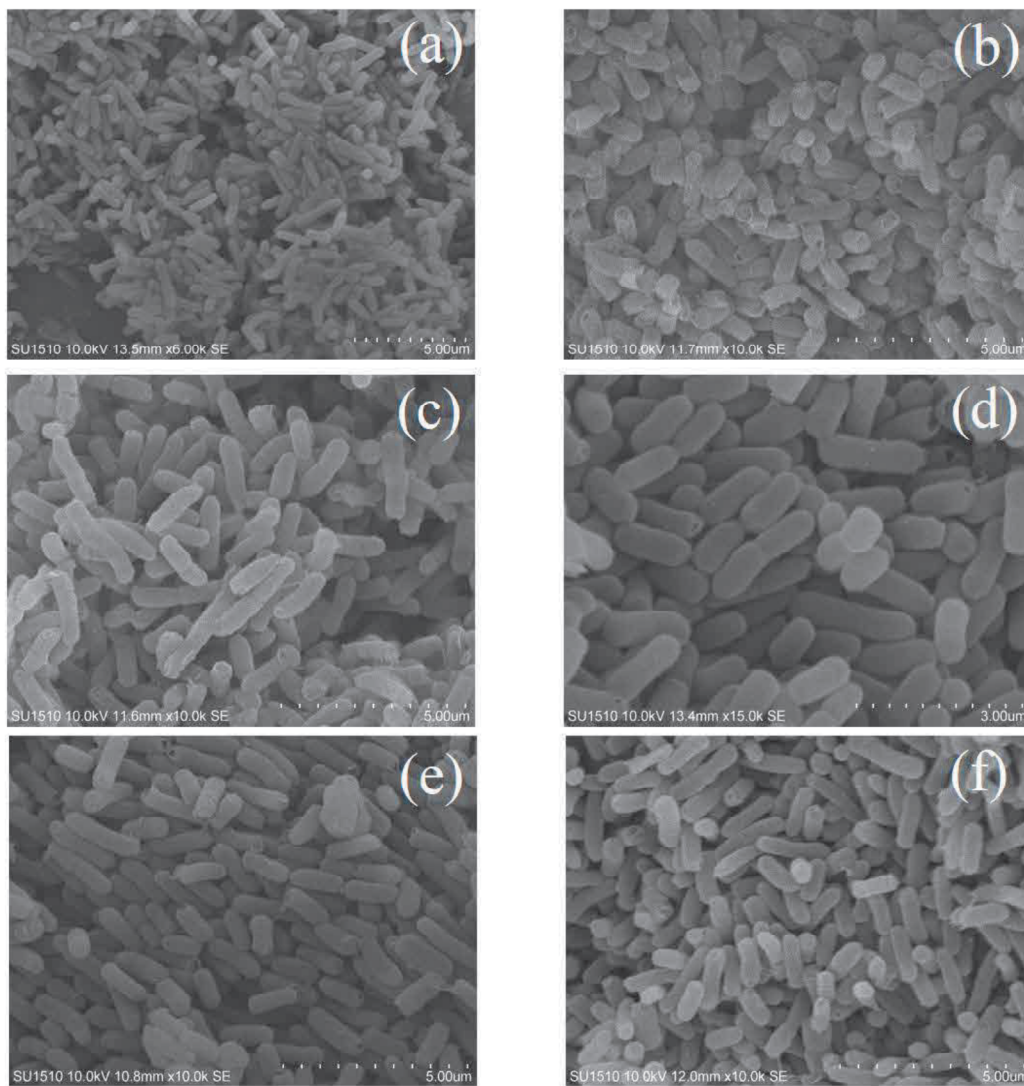
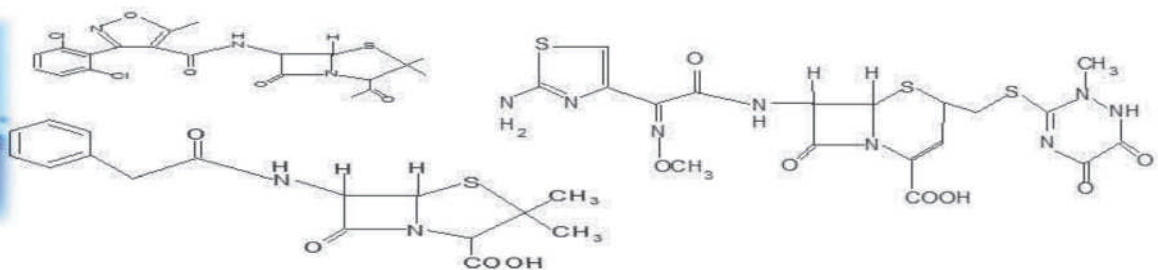


Figura 23: Estudios de MEB a) C1, b) C2, c) A, d) I, e) O, f) E.

Con respecto a la identificación mediante PCR, se realizó el análisis de la secuenciación de DNA con el programa Geneious prime 2019 la base de datos consultada fue Gen Bank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Los resultados de identificación del género de las bacterias se indican en la Tabla 13.

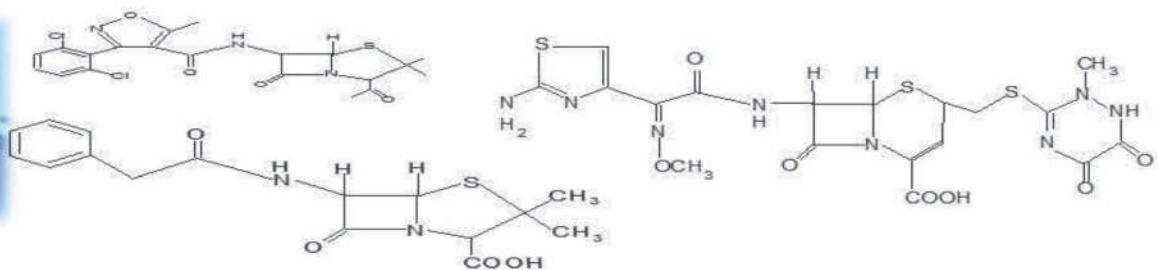


Tabla 13: Identificación bacteriana por PCR.

BACTERIA	Identificación por PCR
C1	99.5% <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C2	99.9% <i>Citrobacter freundii</i>
A	99.4% <i>Klebsiella pneumoniae</i>
E	99.5% <i>Klebsiella pneumoniae</i>
I	99.3% <i>Escherichia coli</i>
O	99.9% <i>Escherichia coli</i>

El [anexo 4](#) muestra fotos del gel de agarosa para las amplificaciones y la placa de gel revelada.

Adicionalmente se determinó la fluorescencia de *Pseudomonas aeruginosa* por Microscopia con focal, para saber si poseía auto fluorescencia, o si era necesario el uso de un cromóforo. Se observó una fijación de la muestra en un portaobjetos y esta no presentó fluorescencia por sí sola; así que, se le determinó fluorescencia secundaria a la tinción de Gram, observándose fluorescencia en el tono verde [Figura 24 a\)](#) y rojo [Figura 24 b\)](#), mientras que en el azul y gris refleja solo el fondo de la tinción.

En la [Figura 24 c\)](#) se observa la imagen sobrepuesta de los tonos verde y gris, y se puede apreciar que el tono gris corresponde al fondo de la imagen, el caso del inciso [d\)](#) se encuentra sobrepuestas las cuatro imágenes y en este caso se aprecia mejor que el tono azul corresponde al fondo.

Esta información es de ayuda por si en un futuro se quiere saber la distribución de esta cepa dentro del consorcio en una superficie específica.

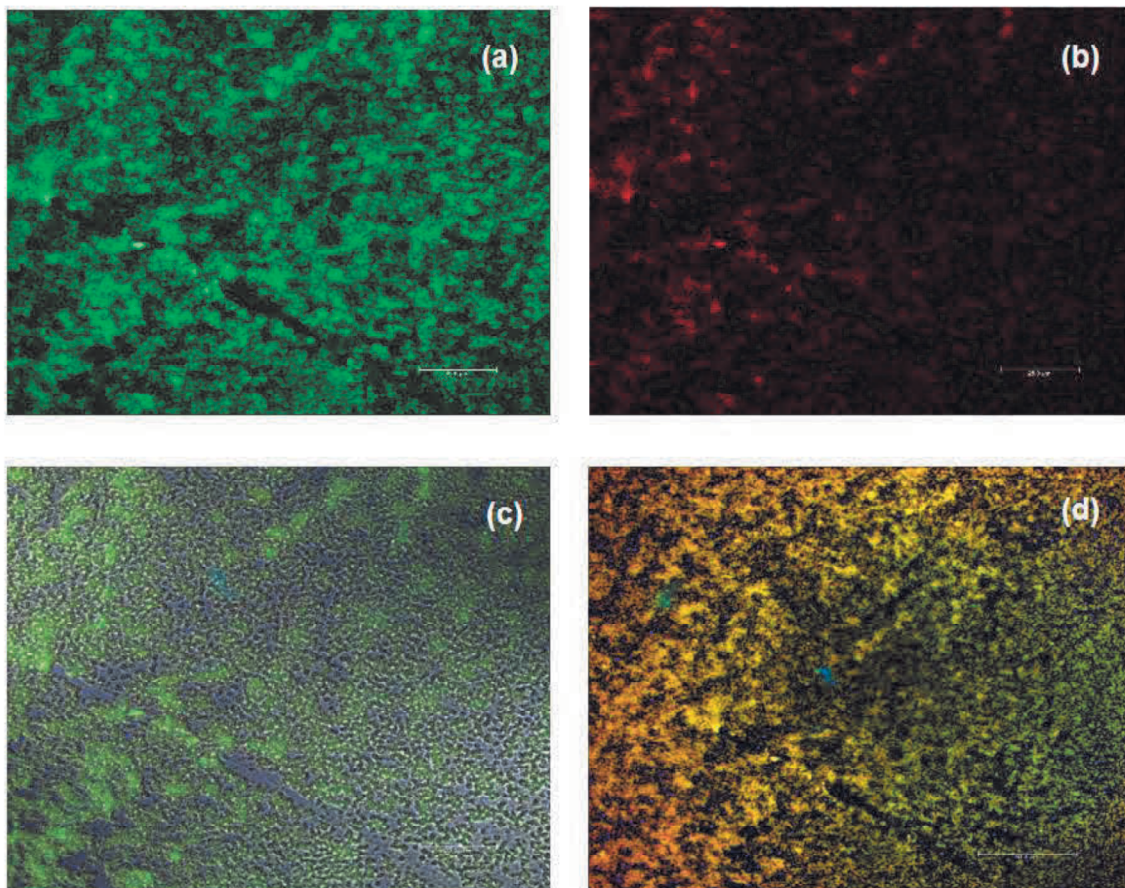
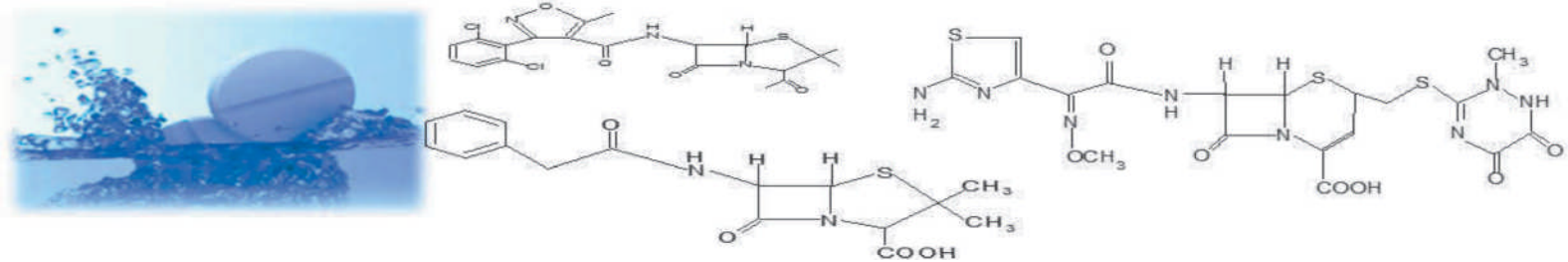


Figura 24: Microscopia con focal de la tinción de Gram de *Pseudomonas aeruginosa*, equipo TCS SPE/CTR 4000 (Leica) a) fluorescencia en tono verde, b) fluorescencia en tono rojo, c) fluorescencia en verde y gris, d) imágenes de las cuatro fluorescencias sobrepuestas

5.2.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria para los antibióticos.

En la [Figura 25 a](#)) se observa la inoculación de la microplaca para la prueba de la concentración mínima inhibitoria, por consecuencia en la [Figura 25 b](#)) se muestra la lectura de la placa a las 24 horas de incubación en donde se puede apreciar la presencia de crecimiento microbiano en los pocillos.

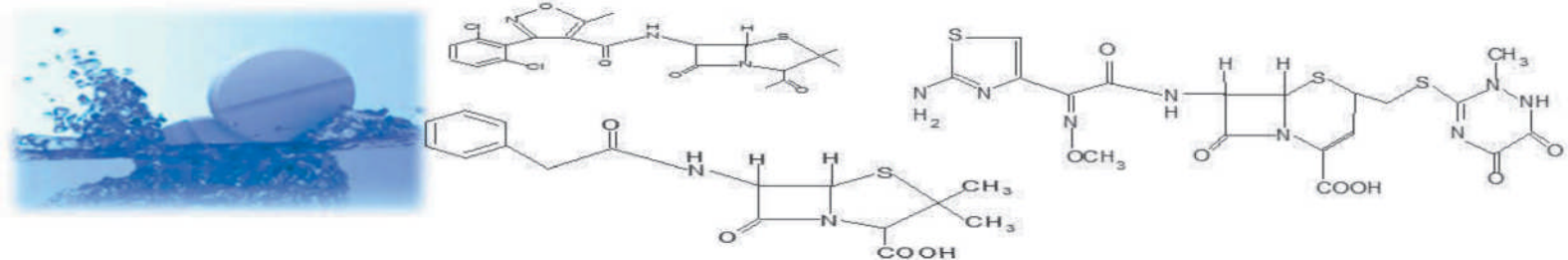


Figura 25: Fotografías de la CMI.

En la Figura 26 se presentan los resultados de la CMI para cada antibiótico con respecto a cada cepa, así mismo se determinó que la cepa más resistente a los tres fármacos es *Pseudomona* y la menos resistente es *Klebsiella*. Es por esta razón que se decidió utilizar a *Pseudomona aeruginosa* sola en la degradación y comparar su eficiencia con el consorcio bacteriano.

Al comparar estos resultados con los obtenidos por (Rivera Gutiérrez, 2016) se observa que su resistencia a penicilina aumento considerablemente, por ejemplo, la C1 era resistente a 2000 $\mu\text{g/mL}$, y aumento a 5000 $\mu\text{g/mL}$ y la C2 era resistente a 500 $\mu\text{g/mL}$ y aumento a 925 $\mu\text{g/mL}$.

En el caso de las cepas A y E que se identificaron como *Klebsiella pneumoniae*, se aprecia que la etiquetada como E es más resistente a los antibióticos, mientras que de las *Escherichia coli* la más resistente es la etiquetada como O.

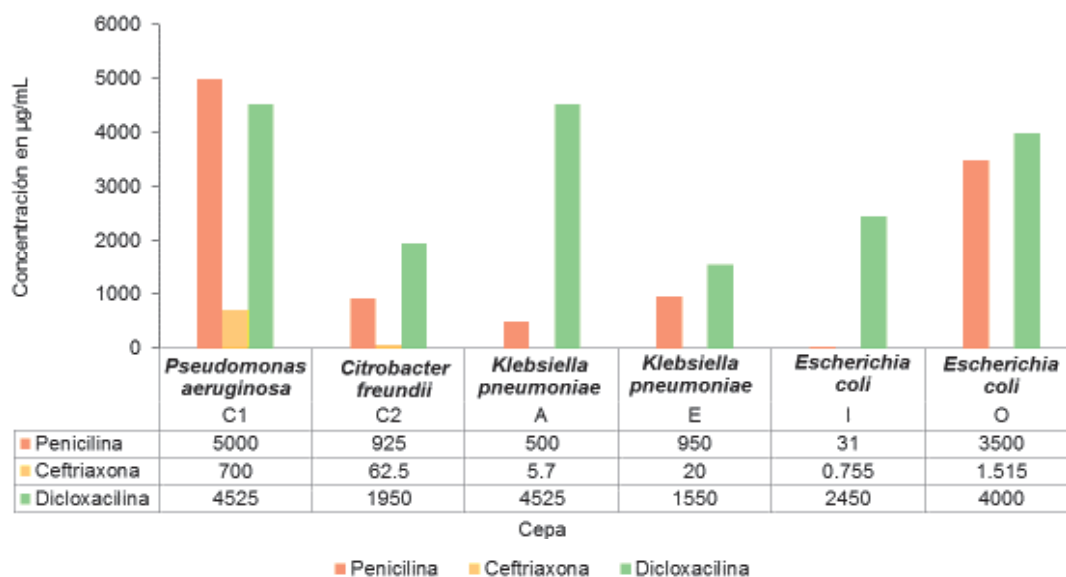
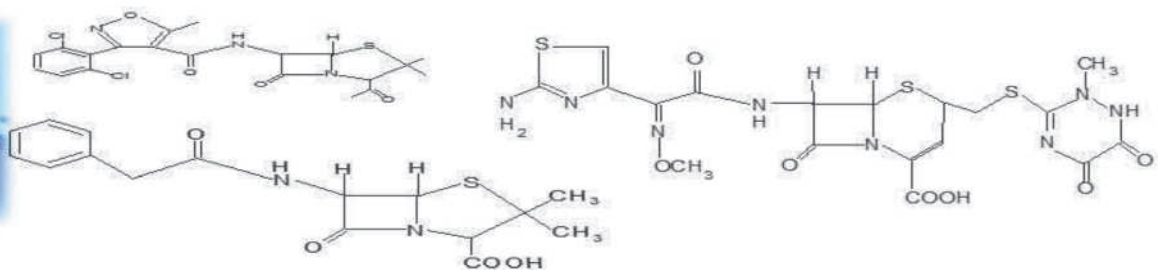


Figura 26: Concentración Mínima Inhibitoria.

5.3 DEGRADACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

5.3.1 Degradación de penicilina

Durante el desarrollo del experimento se tuvo un contratiempo con el estándar ya que al solicitarlo con el mismo proveedor de Sigma Aldrich y con el mismo número de CAS 69-57-8 PENNA-10MU. Entregaron un estándar diferente como se muestra en la [Figura 27](#). El primer estándar con el que se trabajó fue hecho en china (resultados de [\(Rivera Gutiérrez, 2016\)](#) y primeras pruebas del doctorado). El segundo estándar fue hecho en Israel (resultados de este trabajo).

El método se validó utilizando los dos estándares de la penicilina.

Los resultados reportados por Rivera mostraron que los dos productos principales de degradación del estándar de China son el ácido penicilóico y ácido penicilánico, lo que concuerda con el artículo de [\(Li et al., 2008\)](#), Sin embargo, los subproductos de degradación del estándar de Israel no concuerdan con estos.

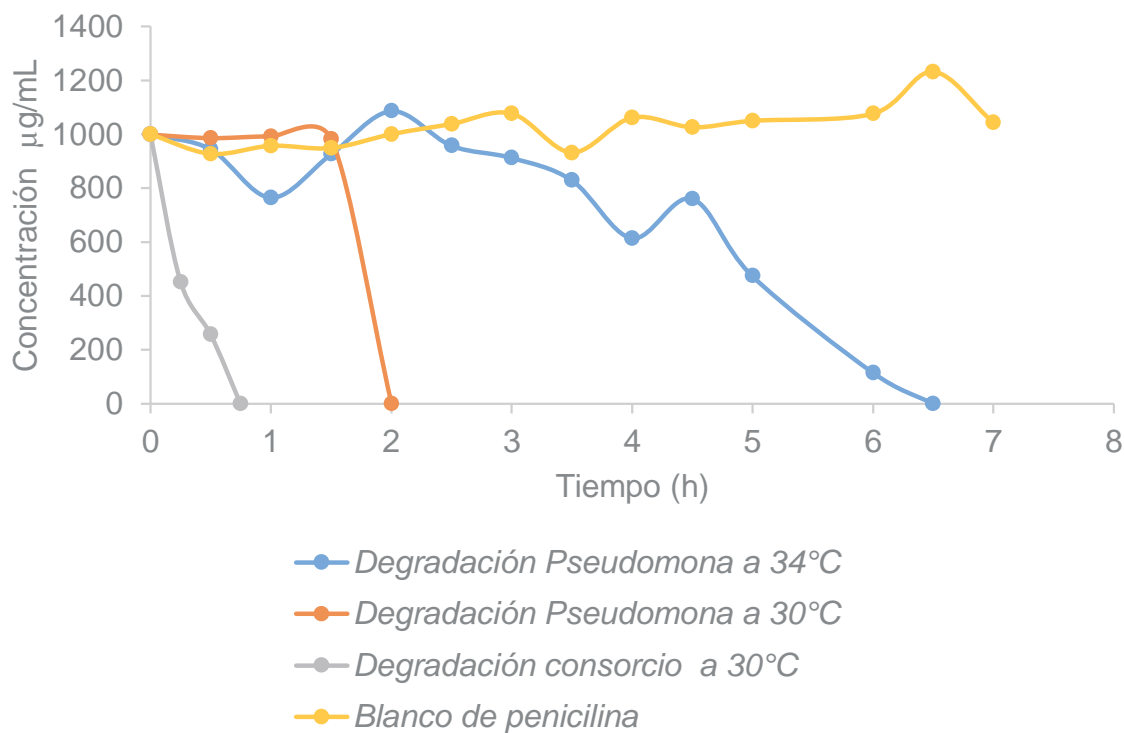
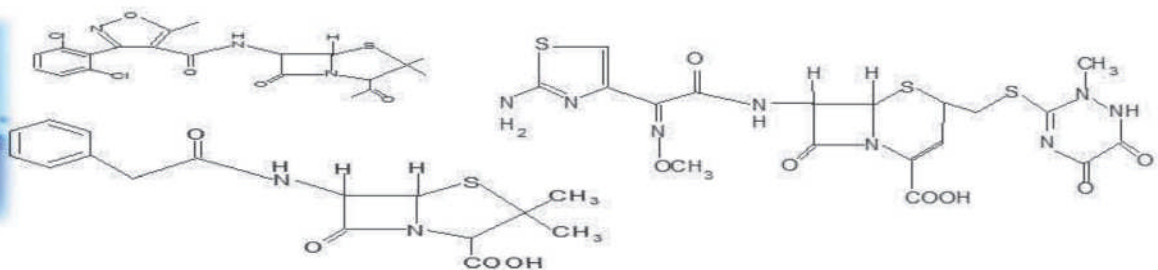
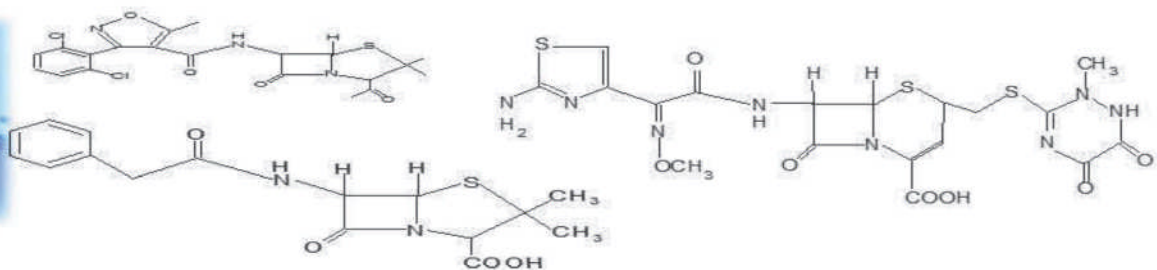


Figura 29: Degradación de penicilina.

Durante la degradación de penicilina a 30 °C se forman 7 metabolitos, mientras que a 34 °C se forman solo 4 metabolitos y en consorcio microbiano se forman 6 metabolitos los cuales se eliminan casi por completo a las 54 horas, en todos los casos.

En la Figura 30 se observan los cromatogramas de la degradación de penicilina, del lado izquierdo se aprecia la degradación con *Pseudomonas aeruginosa*, en el tiempo cero se observa el pico del medio de cultivo en un intervalo de tiempo de 2 a 4 minutos, mientras que la penicilina presenta un tiempo de retención de 6.7 minutos. A las 1.5 horas el pico de penicilina disminuyó, a las 2 horas siguientes aparecieron dos picos que corresponden a metabolitos de la degradación, uno con



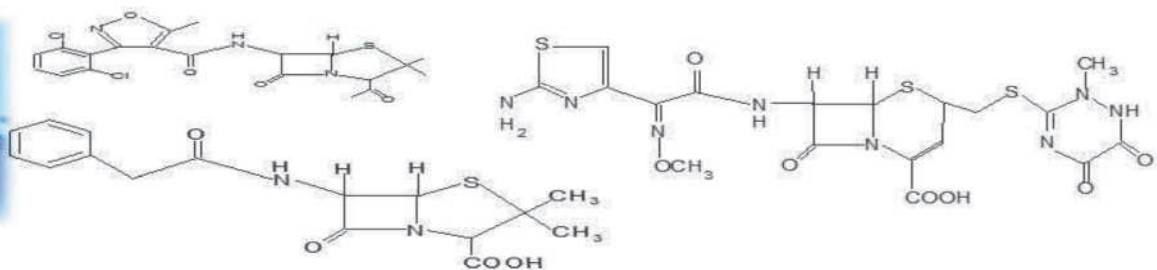
tiempo de retención de 4.9 minutos y otro de 7 minutos, este último está muy cercano al pico de la penicilina.

Posteriormente a las 8 horas se observa que el pico con tiempo de retención de 6.9 minutos disminuye mientras que aumenta el pico con tiempo de retención de 4.7 minutos, luego a las 22 horas el pico con tiempo de retención 3.6 correspondiente al medio de cultivo comenzó a aumentar de área, y se observa la presencia de tres picos más.

Finalmente, a las 54 horas se aprecia la presencia de cinco picos uno con tiempo de retención de 3.47 minutos el cual aumento y se encuentra en el rango de la señal del medio de cultivo, los picos con tiempos de retención de 4.04, 4.1, 4.4 y 4.9 minutos poseen áreas muy pequeñas y son consecuencia del metabolismo de penicilina, lo cual se corrobora con el cromatograma control de medio de cultivo con *Pseudomonas aeruginosa* a las 54 horas donde sólo se muestra la señal del medio de cultivo.

Por otra parte, en [la Figura 30](#) de lado derecho se muestran los cromatogramas de la degradación de penicilina con el consorcio bacteriano el cual consta de cinco cepas diferentes.

A diferencia de la degradación con *Pseudomonas aeruginosa* en tiempo cero, donde solo se observa el medio de cultivo y la penicilina, el consorcio en el tiempo cero se observa la señal del medio de cultivo en un intervalo de 2 a 4 minutos, el pico correspondiente a la penicilina en un tiempo de retención de 7.5 minutos, y un pico más ocasionado por el metabolismo de las bacterias el cual posee un tiempo de retención de 5.1 minutos, posteriormente a los 30 minutos el pico de la penicilina disminuyó considerablemente mientras que el otro pico aumentó.



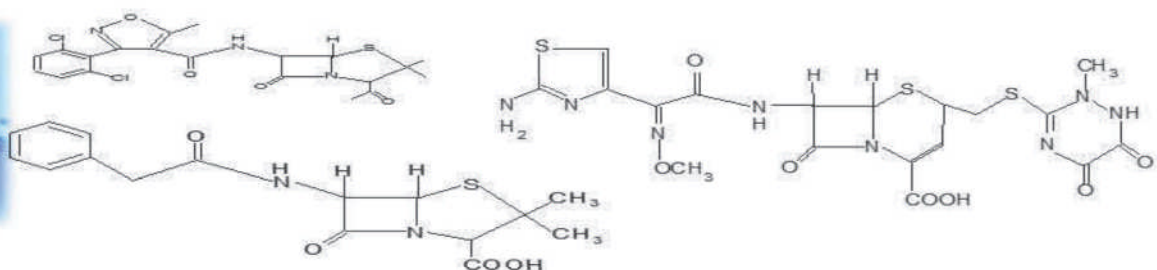
Después a los 45 minutos el pico correspondiente a la penicilina se eliminó y solo se observa el pico con tiempo de retención de 4.9. Al cabo de 12 horas se observa la presencia de otro metabolito el cual presenta un tiempo de retención de 5.5, el cual a las 24 horas disminuye y se forma otro pico con tiempo de retención de 9.3.

Luego de 72 horas se observa la presencia de la señal del medio de cultivo y dos picos pegados los cuales tienen un tiempo de retención de 4.5 y 4.8 respectivamente. Finalmente se presenta el cromatograma control en la [Figura 30 d\)](#) el cual consta de medio de cultivo con consorcio bacteriano a las 72 horas, donde se observa la señal del medio de cultivo en un intervalo de 2-4 minutos y dos picos ocasionados por el metabolismo de las bacterias en este medio estos poseen un tiempo de retención de 5.1 y 8.3 respectivamente.

Al comparar el cromatograma de degradación a las 72 horas con el cromatograma control, se concluye que el pico con tiempo de retención de 4.8 es parte del metabolismo de las bacterias en el medio de cultivo, por lo que el pico de 4.5 minutos es ocasionado por la biodegradación de la penicilina.

Por último, se evidencia que la degradación con *Pseudomonas aeruginosa*, al cabo de 54 horas, presenta la formación de 4 metabolitos los cuales podrían desaparecer con más tiempo de contacto, esto se concluye con base a la tendencia del monitoreo. En contraste se evidencia que la degradación del consorcio microbiano es más rápida, que con *Pseudomonas aeruginosa* y solo presenta la presencia de un metabolito al término del experimento.

Al comparar estos resultados con los reportados en la [Tabla 2](#) podemos observar que, con respecto a la concentración a degradar, la probada en este artículo (1000 µg/mL) es mayor que en el caso de los métodos fisicoquímicos y la biodegradación



es de 100% y además las bacterias actúan sobre los metabolitos de la degradación por el contrario los métodos fisicoquímicos alcanzan porcentajes de eliminación del 90% pero con reportes de subproductos.

Con respecto a los métodos biológicos, el que presenta una mayor biodegradación fue el de *Klebsiella pneumoniae* Z1 el cual biodegradó el 99.9% de penicilina, sin embargo, la cantidad de penicilina a degradar fue de 300mg/L, en contraste el presente método biodegradó el 100% de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que podría representar una ventaja sobre *Klebsiella pneumoniae* Z1.

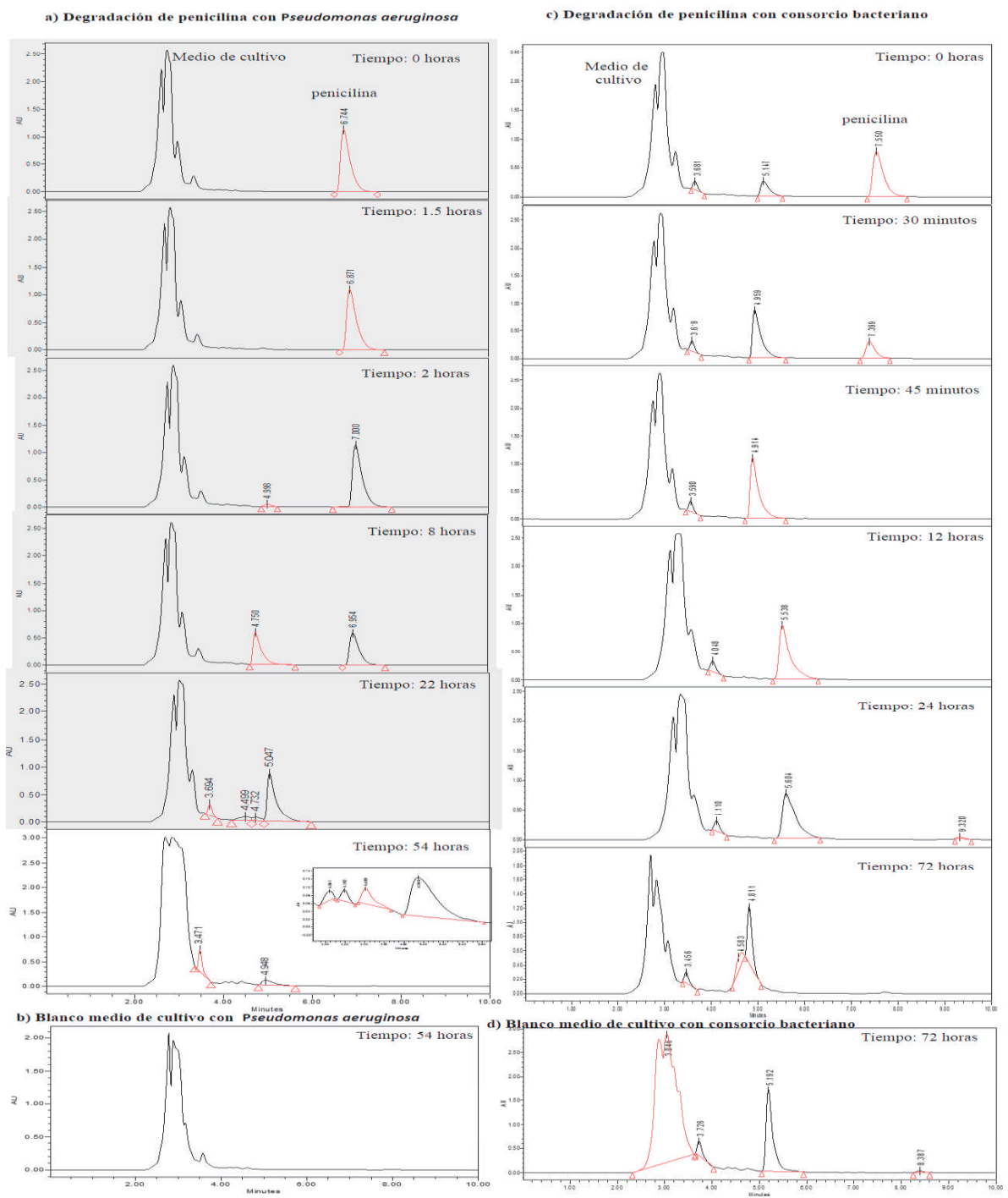
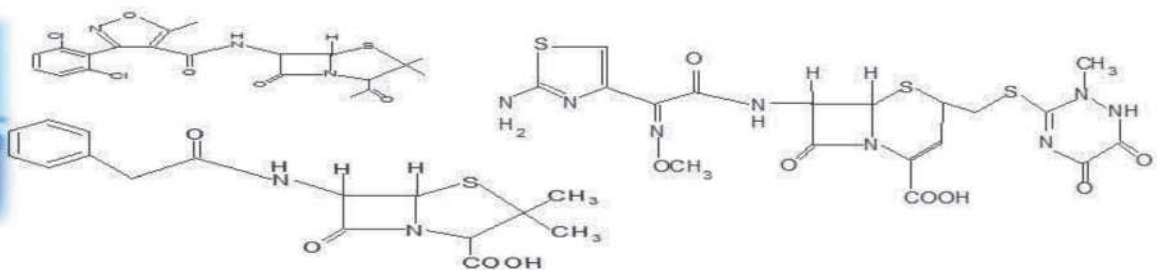
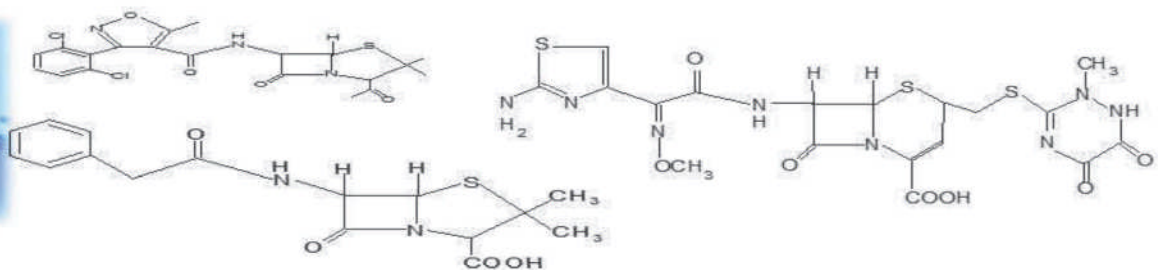


Figura 30: Cromatogramas de la degradación de penicilina con *Pseudomonas aeruginosa* y en consorcio.



En la [Figura 31](#) se aprecia cómo las bacterias crecen mientras la cantidad de antibiótico disminuye y justo cuando ambas curvas se intersectan es cuando se ha eliminado aproximadamente el 50 % del antibiótico, este dato es importante porque se puede conocer la cantidad de bacterias y la concentración de antibiótico en cada instante, permitiendo encontrar un modelo matemático que prediga su comportamiento sin recurrir la experimentación en un biorreactor.

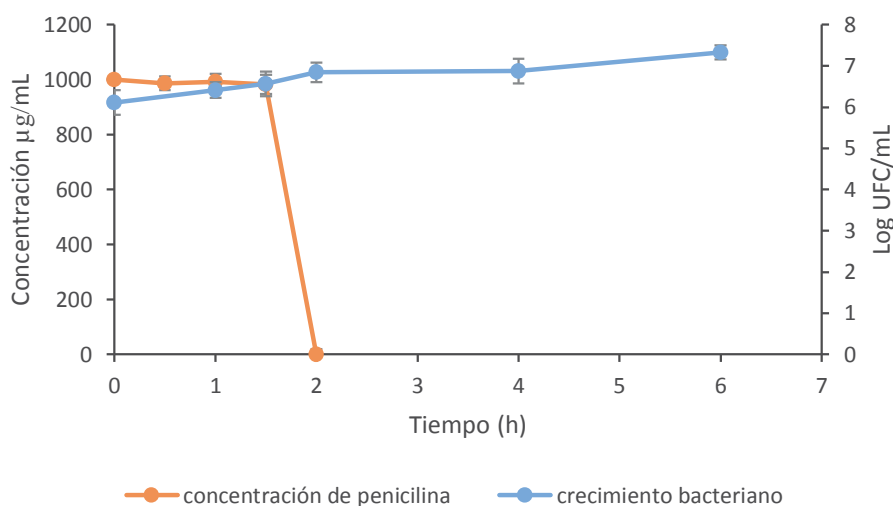


Figura 31: Crecimiento de *Pseudomonas* con respecto a la degradación a 30°C.

En la [Figura 32](#) se muestra el crecimiento microbiano de *Pseudomonas* a 34 °C, la cual presenta el mismo comportamiento que la gráfica anterior, es decir no se observa una fase de adaptación como tal, por el contrario, es evidente que la degradación comenzó de inmediato.

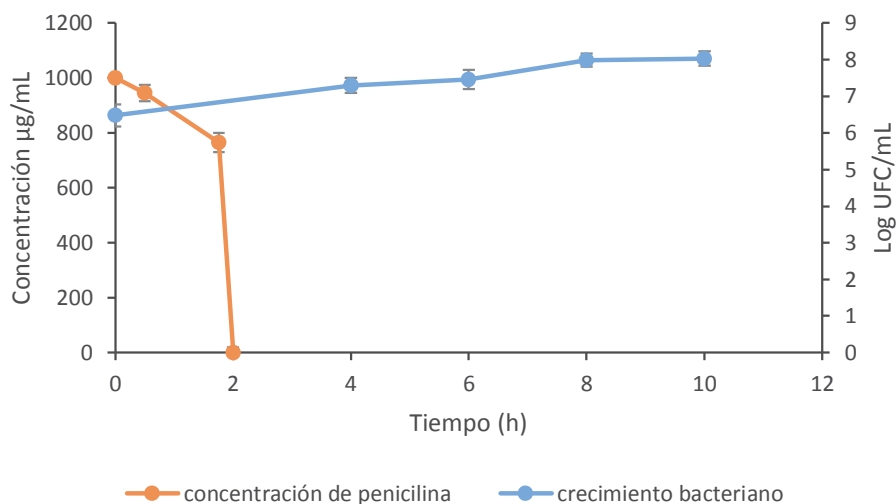
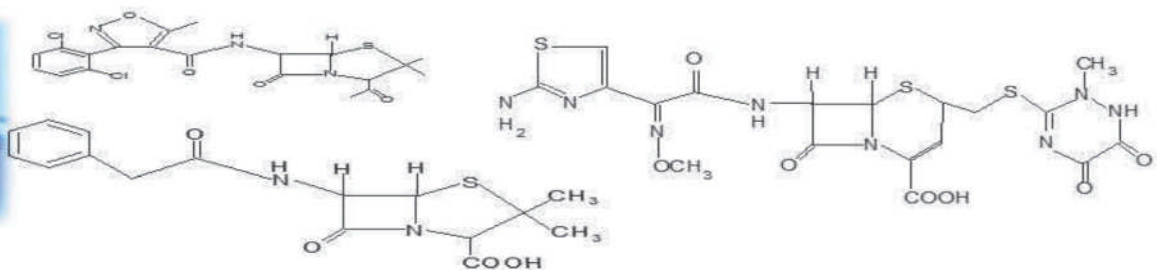


Figura 32: Crecimiento de *Pseudomonas* con respecto a la degradación a 34 °C.

La Figura 33 muestra el crecimiento del consorcio bacteriano con respecto a la degradación de penicilina, donde se observa que la degradación comienza de inmediato y lo que parece ser la fase de adaptación es en realidad el tiempo de generación más corto que corresponde a la bacteria *E. coli* que es parte del consorcio microbiano, por eso al cabo de 1 hora se evidencia un aumento en las UFC.

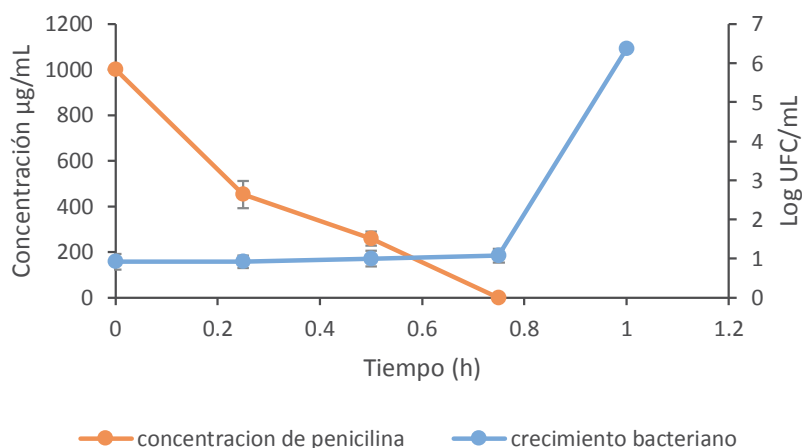
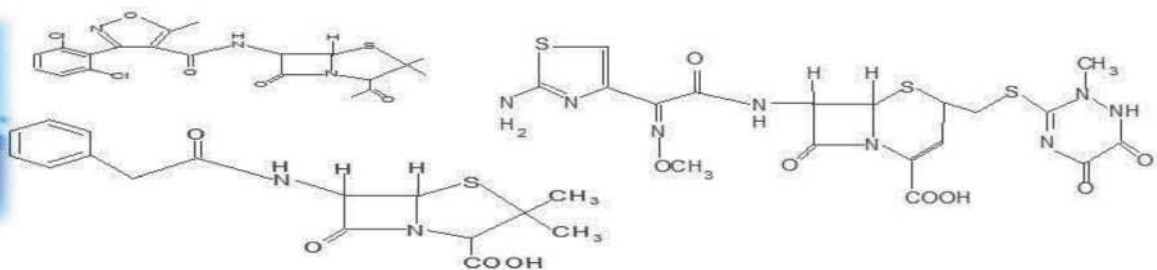
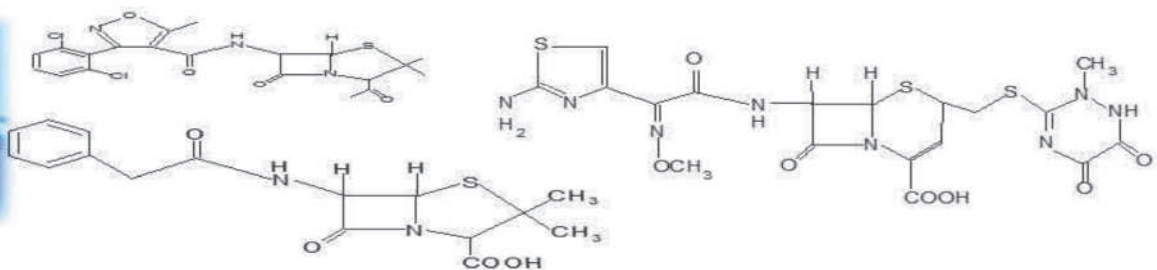


Figura 33: Crecimiento del consorcio bacteriano con respecto a la degradación de penicilina.

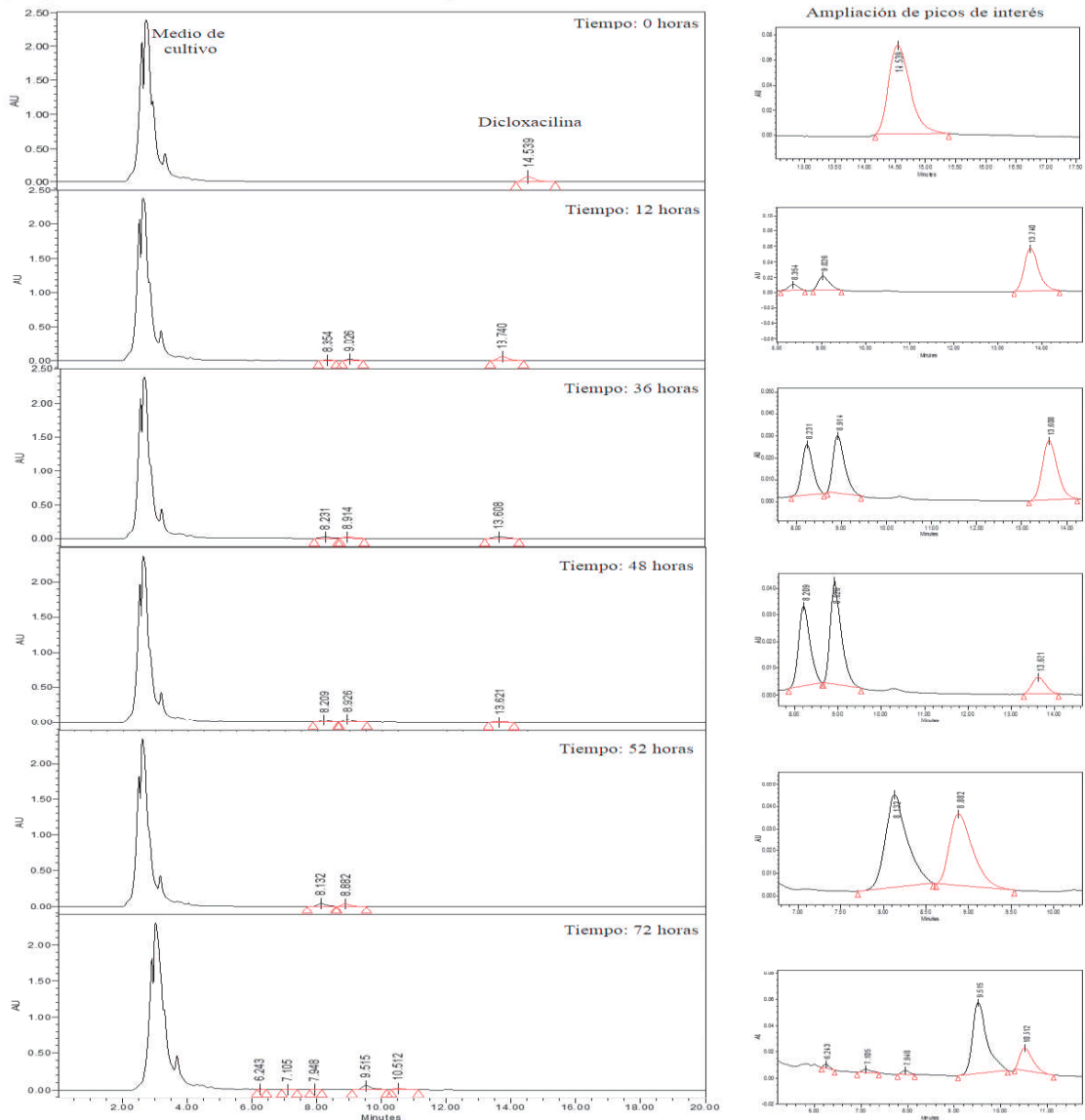


La Figura 35 a) muestra los cromatogramas del comportamiento de la degradación de dicloxacilina con *Pseudomonas aeruginosa*. En el tiempo cero se observa la presencia de dos picos, el primero en el intervalo de 2.0 a 4.0 min y el segundo en un tiempo de retención de 14.5 min, que corresponden a la señal del medio de cultivo y a la dicloxacilina, respectivamente. A las 12 horas, la señal del antibiótico disminuye considerablemente y se forman dos subproductos; los cuales incrementan su área mientras la señal del antibiótico disminuye como se aprecia de las 12 a las 48 horas. Además, a las 52 horas el pico correspondiente a la dicloxacilina ya no se encuentra presente y solo se aprecian los dos subproductos iniciales. A las 72 horas se observa la disminución del pico correspondiente al medio de cultivo debido a que se utiliza como fuente de nutrientes para las bacterias, y no se aprecian los dos subproductos iniciales, pero sí la formación de cinco picos. Al comparar este cromatograma con el de la Figura 35 b) que corresponde al blanco 2 (*Pseudomonas aeruginosa* en el medio de cultivo), cuatro concuerdan con el cromatograma del metabolismo de Figura. 35 b), con tiempos de retención 6.24, 7.10, 7.94 y 9.51. Sin embargo, el área del pico con tiempo de retención de 9.51 min incrementó, lo que indica que se debe a la biodegradación del antibiótico, y el pico con tiempo de retención de 10.51 min corresponde solo al metabolismo del antibiótico.

La tendencia del monitoreo de degradación muestra que este subproducto podría desaparecer si se deja más tiempo en presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.



a) Degradación de dicloxacilina con *Pseudomonas aeruginosa*



b) Blanco de bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*)

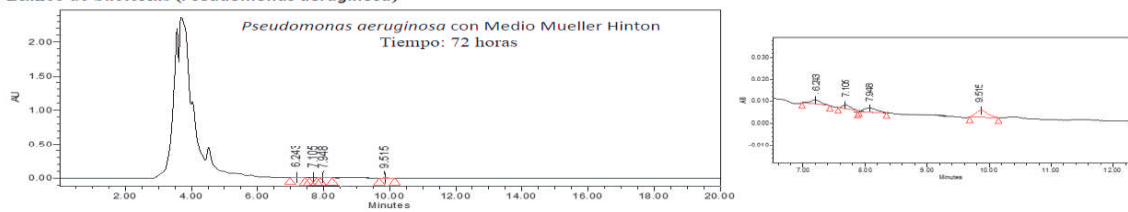
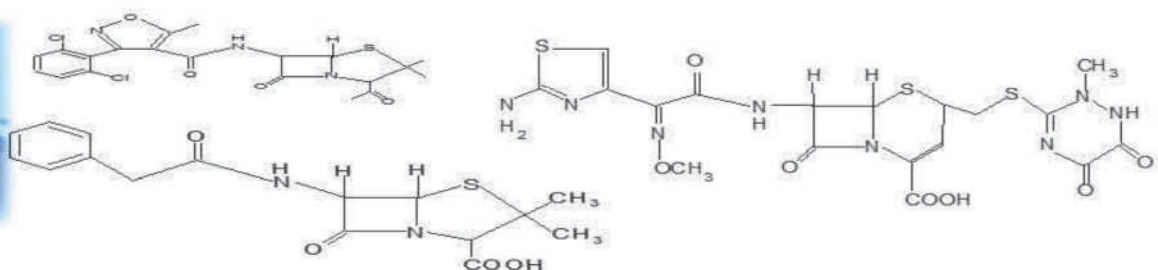
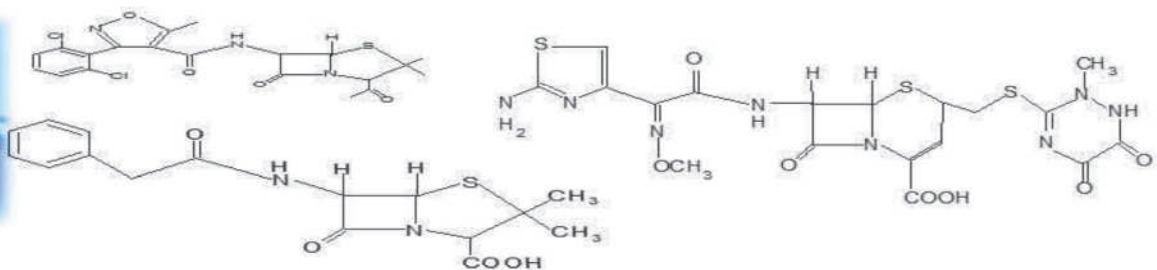


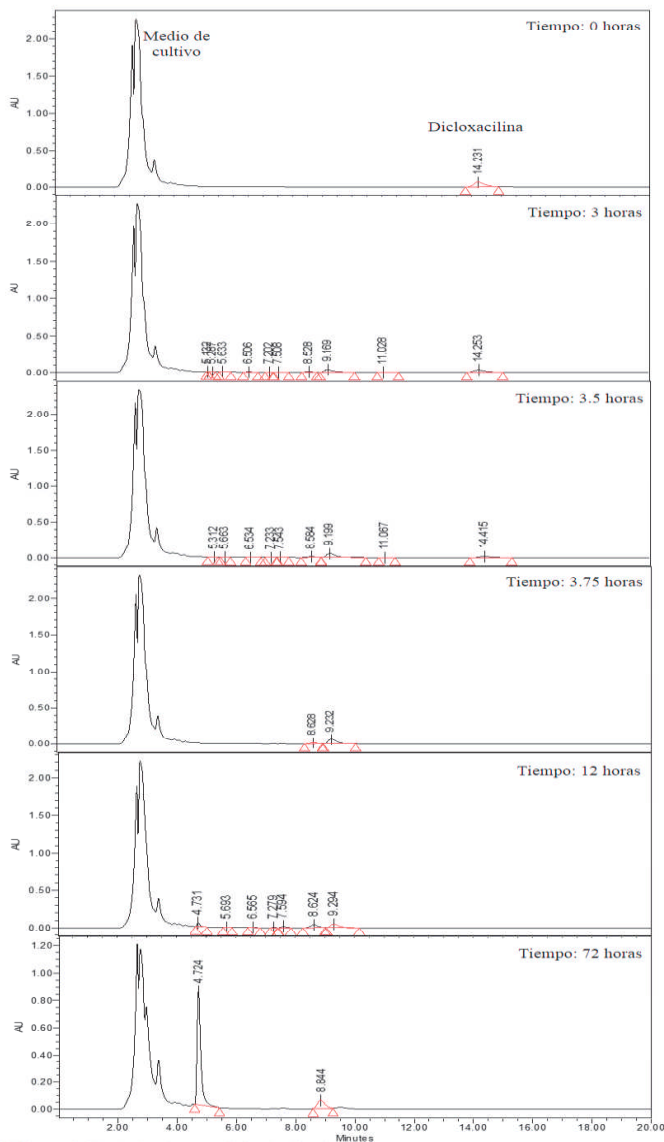
Figura 35: Cromatogramas de degradación de dicloxacilina con *Pseudomonas*.



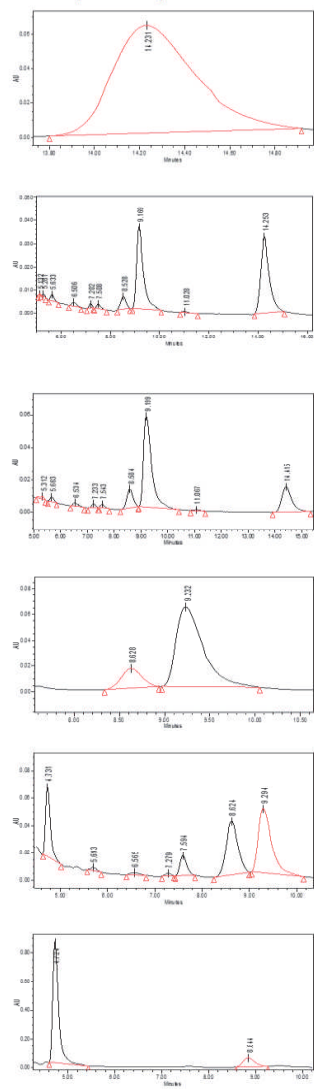
Con respecto a los Cromatogramas de degradación de dicloxacilina con consorcio bacteriano [Figura 36](#), se observa que al tiempo cero se tiene la presencia de dos picos, el primero se encuentra en un intervalo de 2.0 a 4.0 min y el segundo tiene un tiempo de retención de 14.23 min, estos corresponden al medio de cultivo y a la dicloxacilina respectivamente, al cabo de 3 horas el pico del antibiótico comienza a disminuir y se aprecia la presencia de nueve metabolitos, de los cuales 8 son persistentes a las 3.5 horas, mientras que la señal correspondiente a la dicloxacilina ha disminuido considerablemente, hasta que a las 3.75 horas la señal del antibiótico no se observa quedando solo dos metabolitos, los cuales al cabo de 12 horas dan lugar a la formación de cinco metabolitos. Después de 72 horas solo se aprecia la disminución de la señal del medio de cultivo y la formación de dos picos, al comparar estos picos con los del cromatograma de [la Figura 36 b](#)) que corresponde al blanco 2 (consorcio bacteriano en medio de cultivo Mueller Hinton) se observa que el pico con tiempo de retención de 8.84 es por el metabolismo de la dicloxacilina, mientras que el otro pico con tiempo de retención de 4.72 es consecuencia del metabolismo del consorcio bacteriano en el medio de cultivo, evidenciado por el blanco de bacterias con medio de cultivo.



a) Degradación de dicloxacilina con consorcio bacteriano



Ampliación de picos de interés



b) Blanco de Bacterias (consorcio bacteriano)

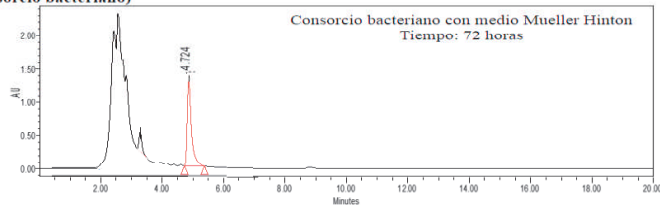
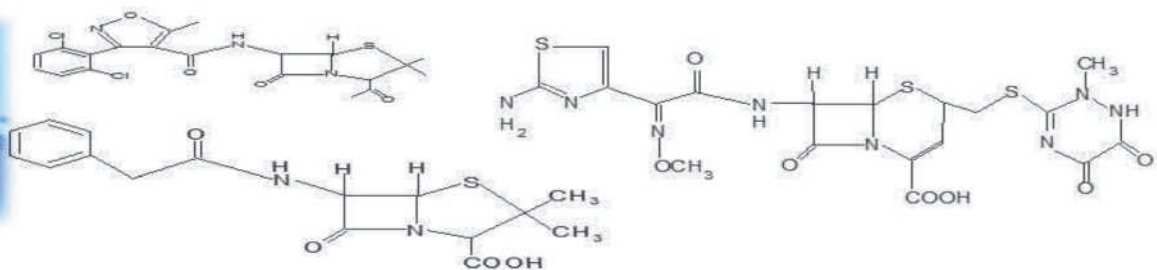


Figura 36: Degradación de dicloxacilina con consorcio bacteriano.

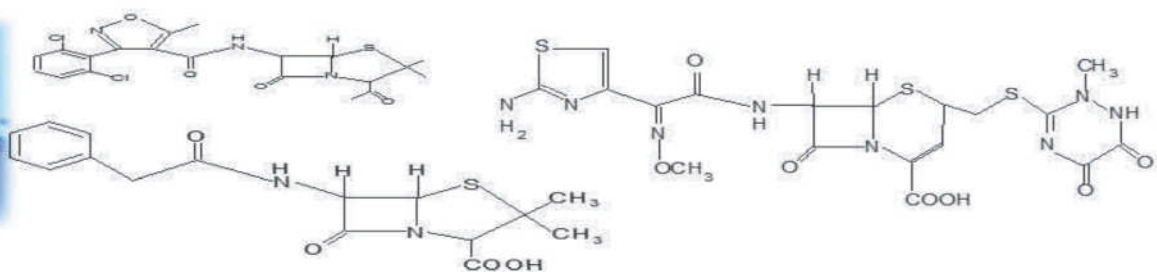


Con base en lo anterior se concluye que la degradación de dicloxacilina es del 100 % para *Pseudomonas aeruginosa* y en consorcio.

Al comparar este comportamiento de degradación con la [Tabla 5](#), se observa que es mayor al reportado con los métodos de fotocatálisis y degradación sonoquímica. En el caso de la fotocatálisis con TiO_2 , a pesar de que se alcanzó un 95 % de mineralización en 480 minutos de tratamiento y haber eliminado el antibiótico después de 120 minutos, todavía se detectó una actividad antimicrobiana significativa. Esto sugiere que algunos subproductos de degradación también podrían considerarse un riesgo, en términos de la proliferación de bacterias resistentes, a los antibióticos ([Villegas-Guzman et al., 2015](#)). Lo que indica que esta propuesta de biodegradación es mejor a las anteriores ya que además de eliminar el fármaco, las bacterias también actúan sobre los subproductos como se observa en los cromatogramas de las [Figuras 35 y 36](#).

Con respecto a la Biodegradación con *Leptosphaerulina sp* ([Copete-Pertuz et al., 2018](#)), el hongo eliminó al antibiótico en 8 días, mientras que el método propuesto lo elimina en cuestión de horas e incluso los subproductos se eliminan casi por completo en 72 horas; lo que hace más rentable el uso de bacterias para la biodegradación.

La [Figura 35](#) muestra la degradación de dicloxacilina con respecto al crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, en esta gráfica se aprecia que la concentración inicial de biomasa no cambia mucho en las primeras 4 horas y tampoco es evidente la disminución del antibiótico, esto se debe a que las bacterias se están adaptando al medio. Sin embargo, a partir de las 4 horas inicia la fase exponencial de éstas, pero de las 12 a 16 horas, el crecimiento no es exponencial y además la concentración de antibiótico disminuye, esto podría deberse a que *P. aeruginosa* posee un gen

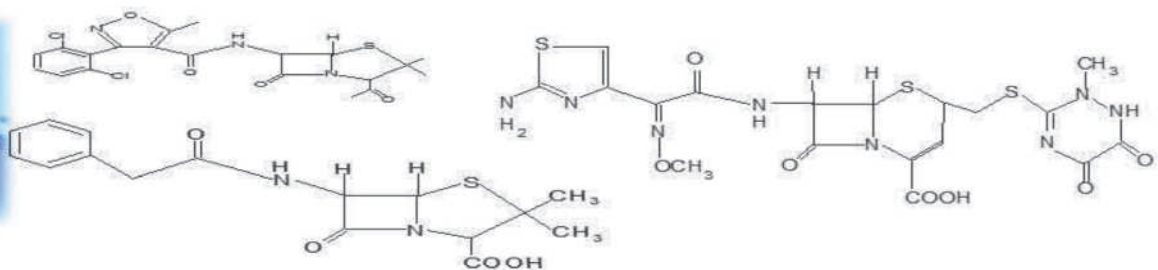


amp C inducible, que codifica la enzima hidrolítica β -lactamasa. Esta enzima es capaz de romper el enlace amida del anillo β -lactámico, lo que lleva a la inactivación de los antibióticos β -lactámicos (Pang *et al.*, 2018), en consecuencia se forman subproductos como se muestran en la Figura 35 donde se aprecia que precisamente a las 12 horas existen dos subproductos que pueden ser los causantes de que las bacterias detuvieran su crecimiento exponencial, afectando la actividad enzimática.

Dado que las enzimas actúan como biocatalizadores específicos involucrados en las reacciones químicas que tienen lugar dentro de la célula, durante el curso de la reacción, estas se unen efectivamente al sustrato, formando un complejo transitorio. Sin embargo, existen factores ambientales que modifican la actividad enzimática como el pH y temperatura. Además de factores metabólicos como la concentración de enzima o sustrato (Arsalan and Younus, 2018). Puesto que la temperatura se mantuvo constante y la cantidad de sustrato es el reactivo limitante, lo más probable es que el pH fue el causante de este estancamiento en el crecimiento exponencial y éste comenzó de nuevo cuando las condiciones fueron favorables.

También se observa que estas curvas se intersectan a las 16 horas, que es cuando se ha degradado aproximadamente el 50 % del antibiótico. Esta información es muy importante ya que indica que para degradar 22.5 $\mu\text{g/mL}$ de dicloxacilina es necesario 11.9 log UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa*, esto permite predecir el comportamiento de la biodegradación cuando se realizan cambios en la concentración del analito o del inóculo (UFC/mL).

En comparación con el gráfico de la penicilina esta caída de concentración es más tardada debido a que la molécula de dicloxacilina es un poco más compleja, por consecuencia la degradación es un poco lenta. Lo mismo sucede en el consorcio



bacteriano.

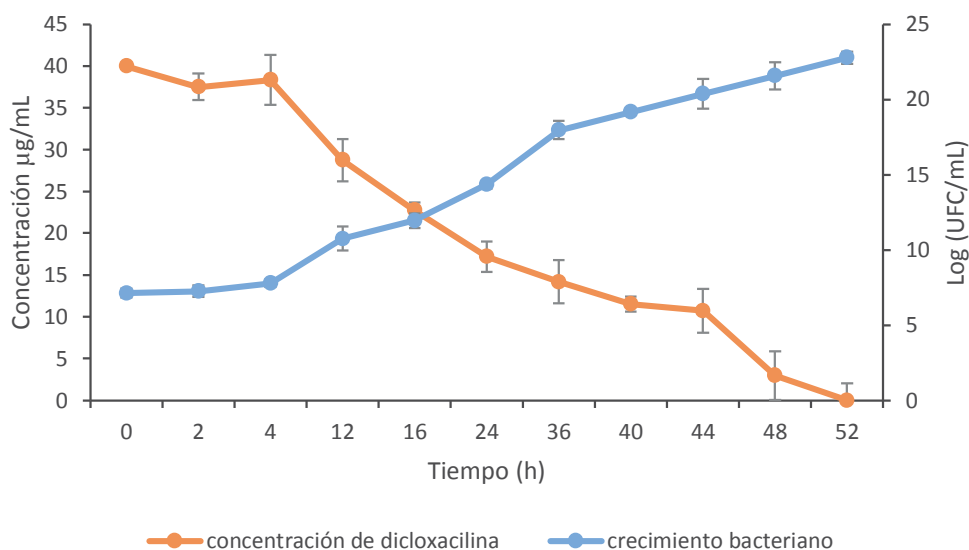


Figura 37: Crecimiento de *Pseudomonas* con respecto a la concentración de dicloxacilina.

Por otro lado en la [Figura 38](#) se observa la degradación de dicloxacilina con respecto al crecimiento del consorcio bacteriano, en esta gráfica se aprecia que la fase de adaptación de las bacterias ocurre en las primeras 2 horas mientras que la fase exponencial comienza a partir de las 2 horas y de las 3 a las 4 horas, existe un ligero estancamiento en el crecimiento de la biomasa, esto ocasionado por una modificación en la actividad enzimática, la cual no afecta significativamente el crecimiento exponencial.

También se observa una intersección de curvas a las 2.6 horas, lo que indica que se necesitan 7.7 log UFC/mL del consorcio para degradar 22 µg/mL de dicloxacilina.

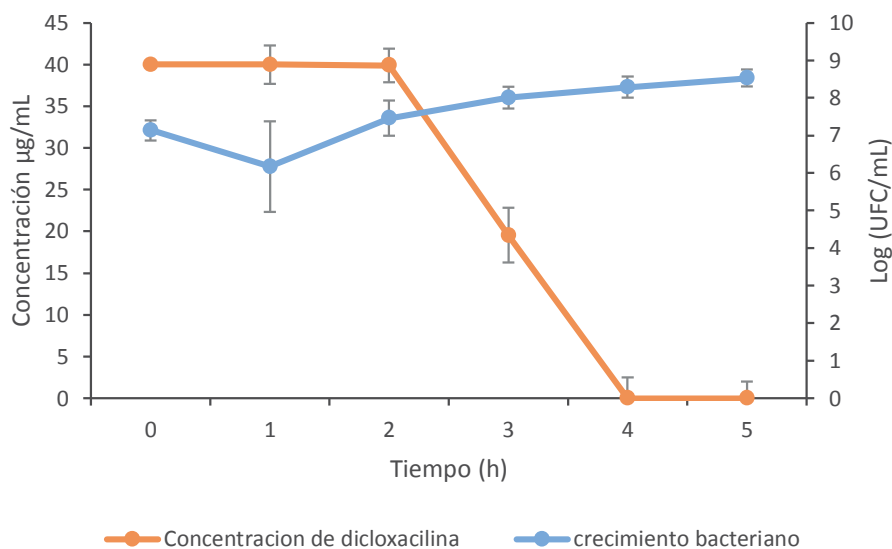
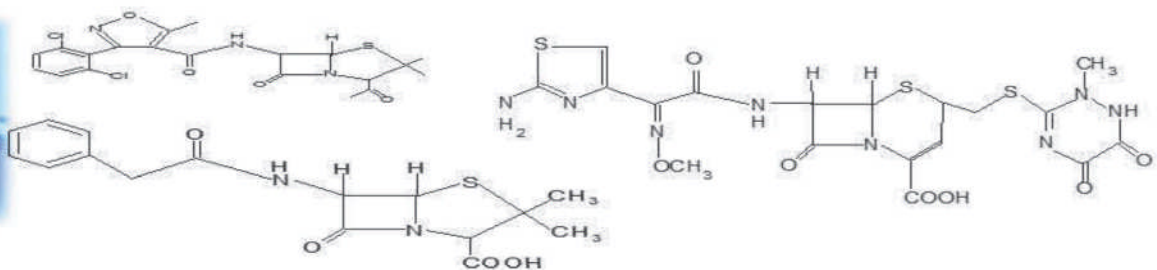


Figura 38: Crecimiento de consorcio bacteriano con respecto a dicloxacilina.

5.3.3 Degradación de ceftriaxona

La ceftriaxona es la molécula más compleja que se evaluó en la degradación, por consiguiente, la degradación fue un poco más tardada en comparación con los otros dos antibióticos, tal como se aprecia en la Figura 39, donde *Pseudomonas* tarda 72 horas en eliminar el antibiótico mientras que el consorcio bacteriano tarda 5 horas; lo cual indica que el consorcio microbiano es más eficiente.

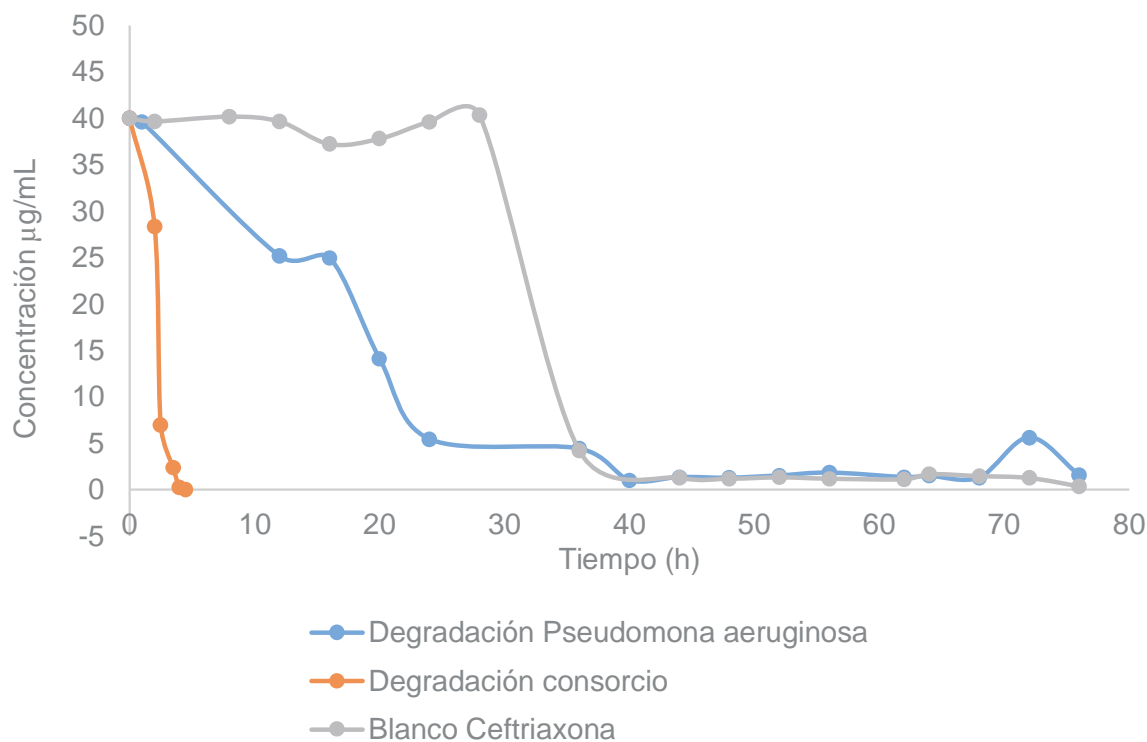
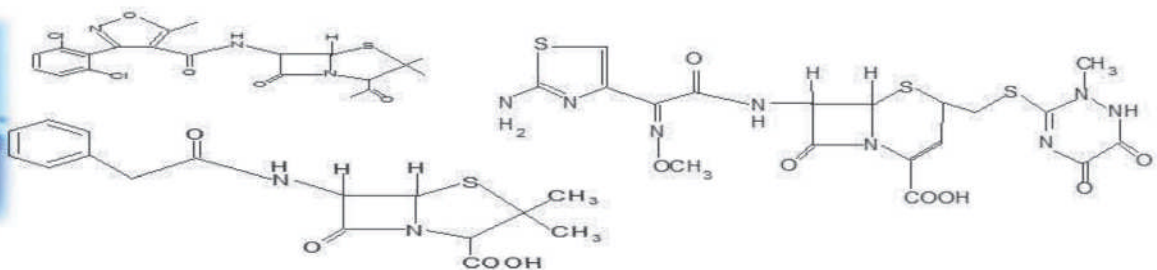
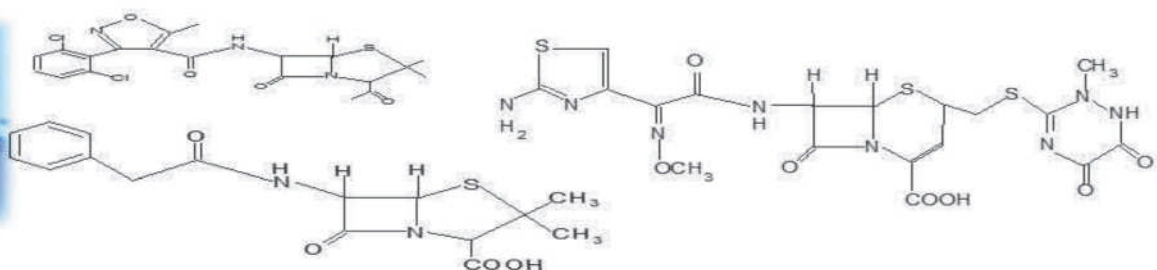


Figura 39: Degradación de ceftriaxona.

En la [Figura 40 a\)](#) se observan los cromatogramas de la degradación de ceftriaxona con *Pseudomonas*. En el tiempo cero se aprecian 4 picos principales, uno en un intervalo de 2 a 4 minutos que corresponde al medio de cultivo, otro a 6.5 que pertenece a la ceftriaxona, y dos más con tiempos de retención de 5.7 y 9.2.

Después de 8 horas de degradación, el pico correspondiente a la ceftriaxona disminuye y se aprecia la formación de tres metabolitos con tiempos de retención de 5.4, 5.7 y 8.8 min. Al cabo de 24 horas el pico correspondiente a la ceftriaxona vuelve a disminuir y se forman 5 metabolitos, Los cuales al cabo de 52 horas dan lugar a la formación de dos metabolitos y se observa que el pico de la ceftriaxona es muy pequeño. Sin embargo, este no desaparece al cabo de 68 horas, pero si se aprecia la formación de un tercer metabolito. Finalmente, a las 72 horas el pico de la ceftriaxona ha desaparecido y se aprecia la formación de 11 picos. Al comparar



este cromatograma con el de la [Figura 40 b](#)) que corresponde al blanco 2 (bacterias con caldo Mueller Hinton) se observa que los picos que no concuerdan con este cromatograma son los que tienen un tiempo de retención de 5.6 y 7.4, lo cual indica que estos picos son ocasionados por el metabolismo de la ceftriaxona.

Por otro lado al analizar los cromatogramas de la degradación de ceftriaxona con el consorcio microbiano en la [Figura 40 c](#)) tenemos que en el tiempo cero están presentes los mismos picos que en el de la degradación con *Pseudomonas*, y después de 4 horas de degradación se observa que el pico correspondiente a ceftriaxona casi desaparece y se forman 6 metabolitos, los cuales se mantienen a las 5 horas mientras que el pico de ceftriaxona desaparece. Al cabo de 24 horas se tiene la presencia de 6 metabolitos los cuales se mantienen hasta las 52 horas solo cambian sus áreas. Finalmente, al cabo de 56 horas de degradación se encuentran presentes 9 metabolitos. Al comparar este cromatograma con el de la [Figura 40 d](#)) que corresponde al blanco 2 (consorcio bacteriano en caldo Mueller Hinton) se observa que seis de estos metabolitos concuerdan y sólo los de tiempo de retención de 6.9, 4.01 y 4.4 son metabolitos de la ceftriaxona.

Al comparar este comportamiento con la [Tabla 3](#), se observa que la biodegradación es mayor al reportado con los métodos fisicoquímicos.

Además, al compararlo con la de degradación electro catalítica que degradó 97.7 % y con la remoción de la clinoptilolita modificada con HDTMA que removió 75.71 %, de 10 mg/L en ambos casos, mientras que la biodegradación de este trabajo fue del 100 % de 40 µg/mL (= 40 mg/L). Lo que indica que esta propuesta de biodegradación es mejor a las anteriores ya que además de eliminar el fármaco, las bacterias también actúan sobre los subproductos como se observa en los cromatogramas de la [Figura 40](#).

Finalmente, este es el primer método de biorremediación reportado para biodegradar la ceftriaxona, lo que evidencia la importancia de estos resultados.

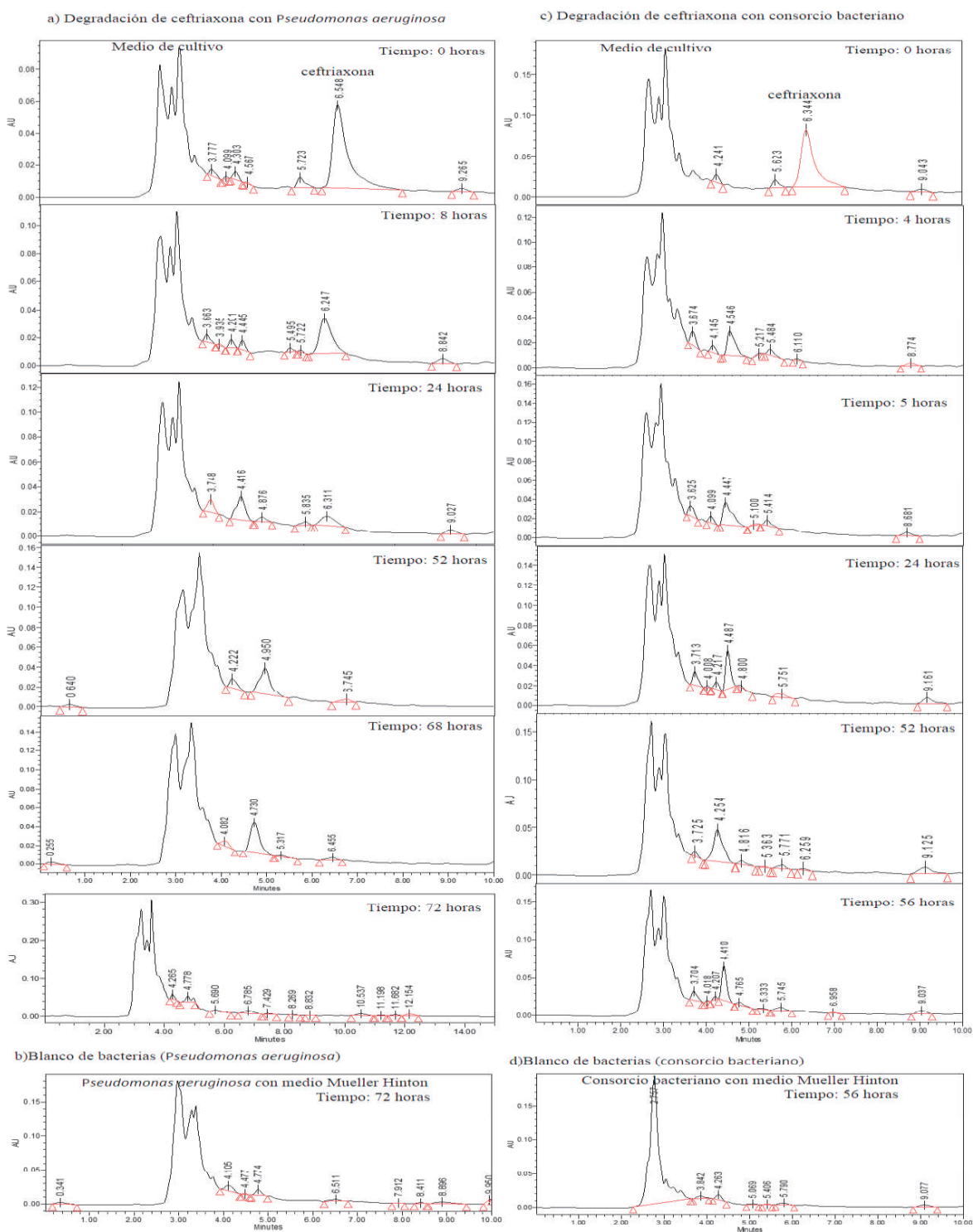
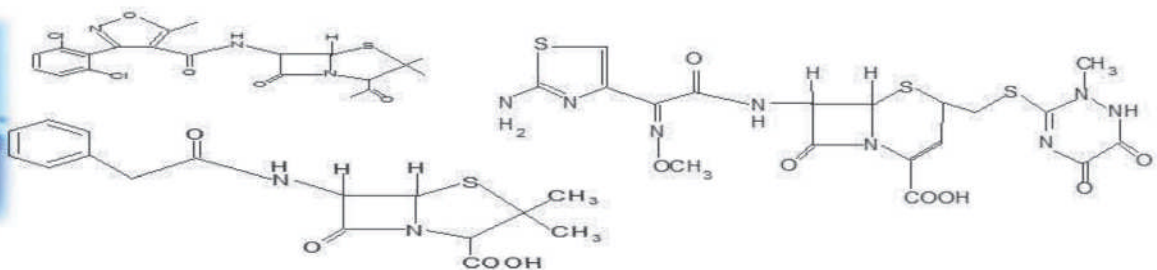
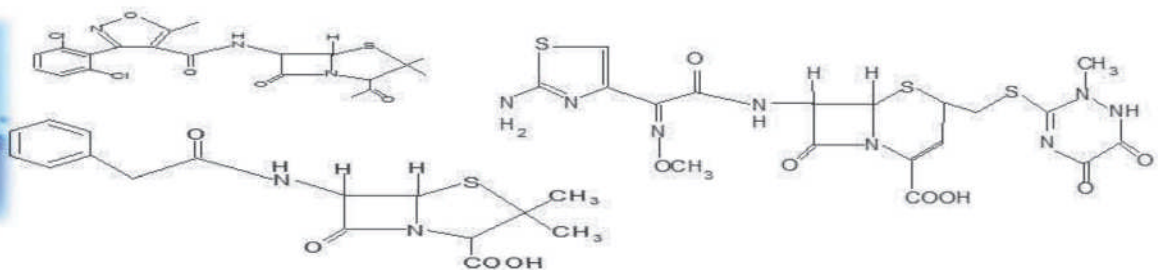
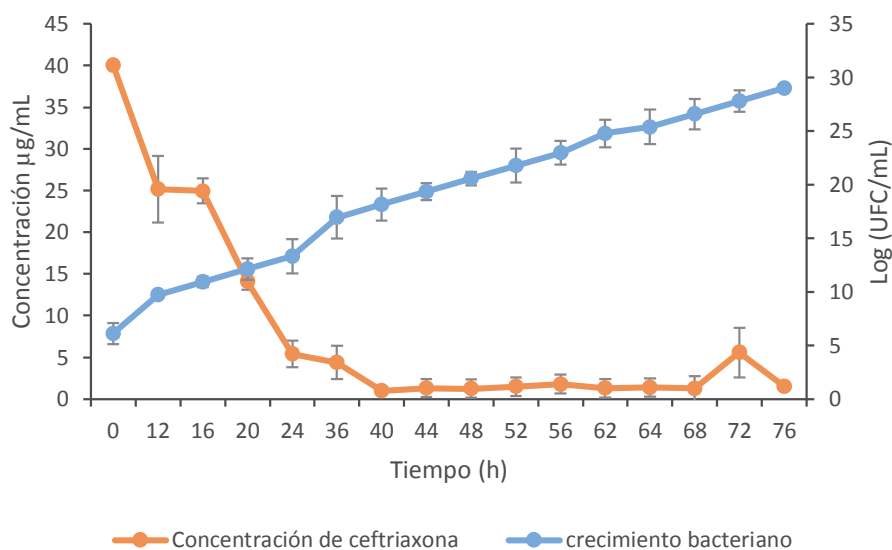


Figura 40: Cromatogramas de la biodegradación de ceftriaxona.



La gráfica de la [Figura 41](#) Con respecto al crecimiento microbiano y la caída de concentración las gráficas también se muestran más largas en cuestión de tiempo, y el crecimiento exponencial no se ve interrumpido y tiene un comportamiento lineal.



[Figura 41](#): Crecimiento de *Pseudomonas* con respecto a la concentración de ceftriaxona.

Por otro lado, en la [Figura 42](#) se observa que en las primeras dos horas existe una ligera caída en la concentración de la biomasa bacteriana, esto debido a que tres cepas son muy sensibles a este antibiótico. Sin embargo, la ligera caída de concentración del antibiótico indica que las bacterias más resistentes al antibiótico actúan sobre él, dándole la oportunidad a las demás bacterias de sobrevivir y de esta manera, comienza la fase exponencial a partir de las 2 horas. Con esto se evidencia que el consorcio bacteriano es mucho más eficaz.

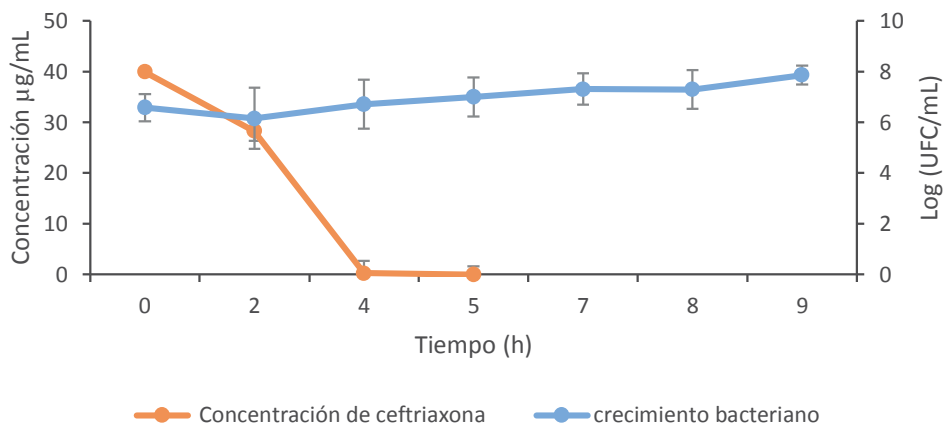
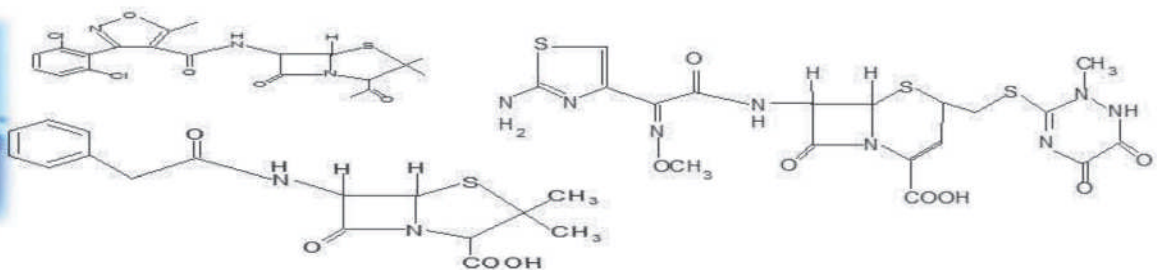


Figura 42: Crecimiento del consorcio bacteriano con respecto a la concentración de ceftriaxona.

5.4 CÁLCULOS PARA EL MODELADO DEL BIORREACTOR

Se calculó el tiempo de generación con los datos obtenidos en la degradación del antibiótico con la fórmula:

$$G = \frac{t}{3.322 \log \frac{N_f}{N_0}}$$

Para la degradación de Penicilina a 30°C se tiene:

$$Pseudomonas aeruginosa \quad G = \frac{120 \text{ minutos}}{3.322 \log \frac{7000000}{1300000}} = 47.41 \text{ min}$$

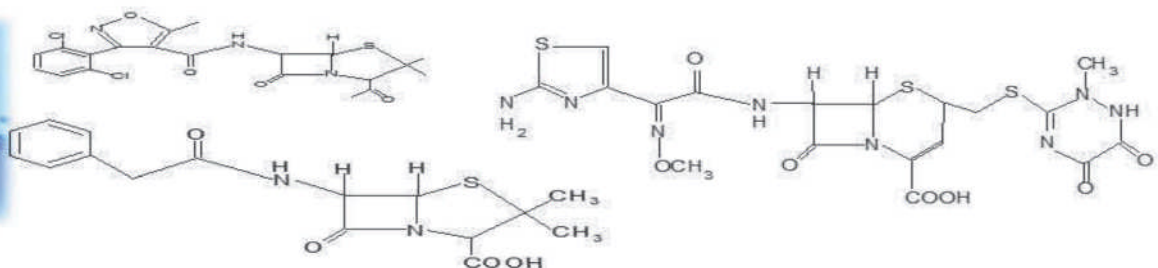
$$\text{Consortio bacteriano} \quad G = \frac{60 \text{ minutos}}{3.322 \log \frac{23500000}{9450000}} = 45.65 \text{ min}$$

Degradación de Dicloxacilina

$$Pseudomonas aeruginosa \quad G = \frac{240 \text{ minutos}}{3.322 \log \frac{61200000}{13400000}} = 109.52 \text{ min}$$

$$\text{Consortio bacteriano} \quad G = \frac{240 \text{ minutos}}{3.322 \log \frac{192000000}{13700000}} = 63 \text{ min}$$

Degradación de Ceftriaxona



$$Pseudomonas\ aeruginosa\ G = \frac{240\ minutos}{3.322 \log \frac{23000000}{1300000}} = 57.90\ min$$

$$\text{Consortio bacteriano } G = \frac{240\ minutos}{3.322 \log \frac{5250000}{3850000}} = 536.35\ min$$

En la Figura 43 se muestran los órdenes de reacción de la degradación con *Pseudomonas aeruginosa* para cada antibiótico. Donde se aprecia que la penicilina a 30 y 34 °C presenta un orden de reacción de cero, al igual que la dicloxacilina, mientras que la ceftriaxona tiene un orden de reacción de 0.5.

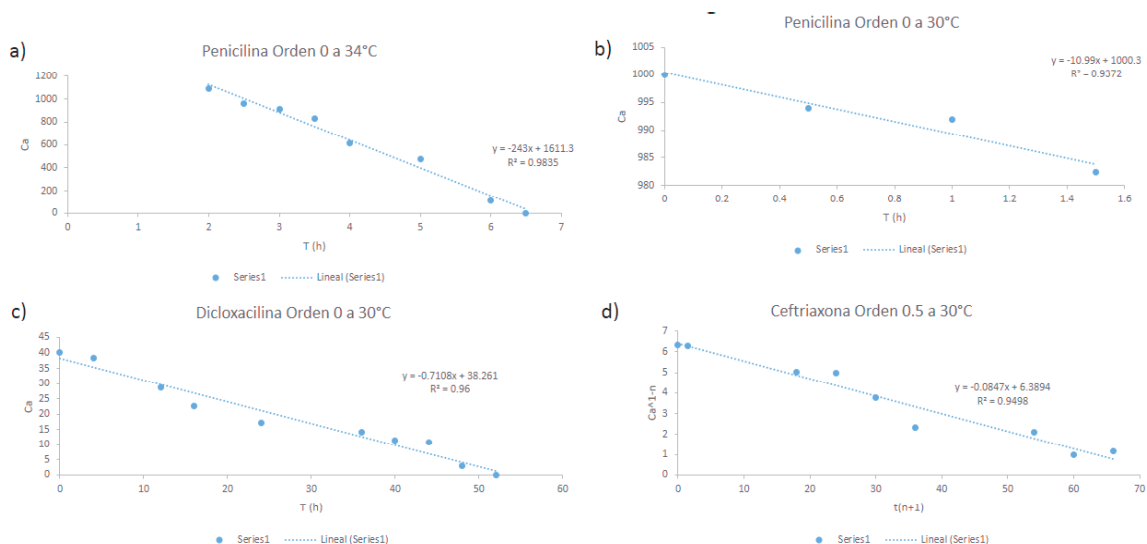
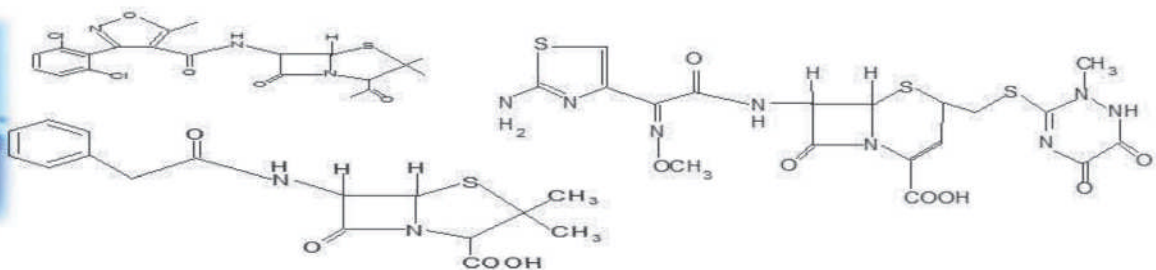


Figura 43: Orden de reacción en la degradación con *Pseudomonas aeruginosa* en: a) Penicilina a 34 °C, b) Penicilina a 30 °C, c) Dicloxacilina a 30 °C, d) Ceftriaxona a 30 °C.

Debido a que la degradación de penicilina fue más rápida y eficiente a 30 °C se decidió hacer los demás experimentos a esta temperatura, además de que se observó la formación de menos metabolitos. Adicionalmente el costo beneficio de usar 30 °C a 34 °C sería evidente.



Al usar un consorcio bacteriano para la degradación modifica el orden de reacción para la penicilina mas no para la dicloxacilina ni la ceftriaxona como se observa en la Figura 44.

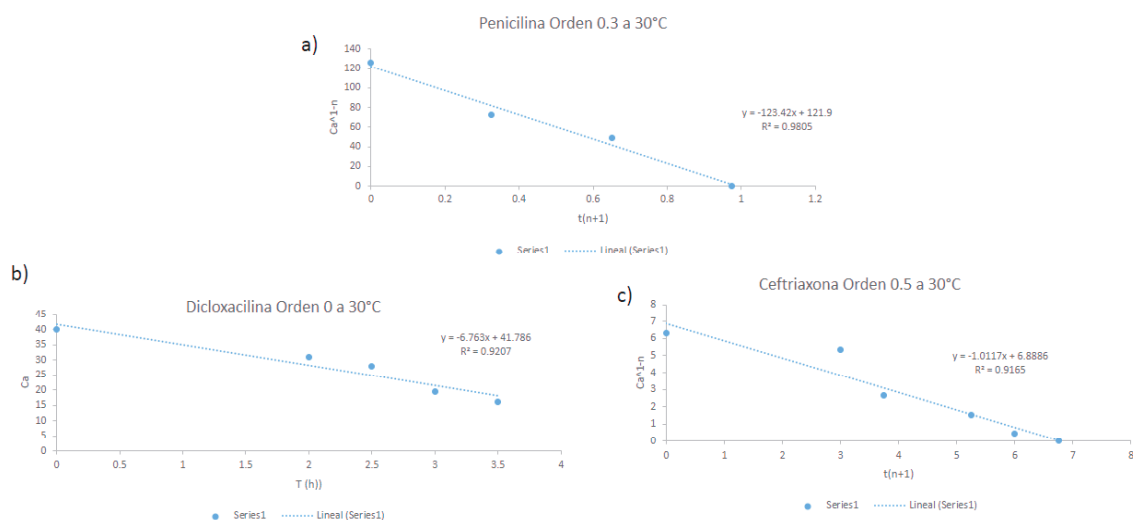


Figura 44: Orden de reacción en la degradación con consorcio bacteriano en: a) Penicilina a 30 °C, b) Dicloxacilina a 30 °C, c) Ceftriaxona a 30 °C.

Influencia de la temperatura en las constantes de velocidad de reacción.

Para determinar la dependencia de la velocidad de degradación con respecto a la temperatura se empleó la ecuación de Arrhenius en la reacción de penicilina con *Pseudomonas aeruginosa*.

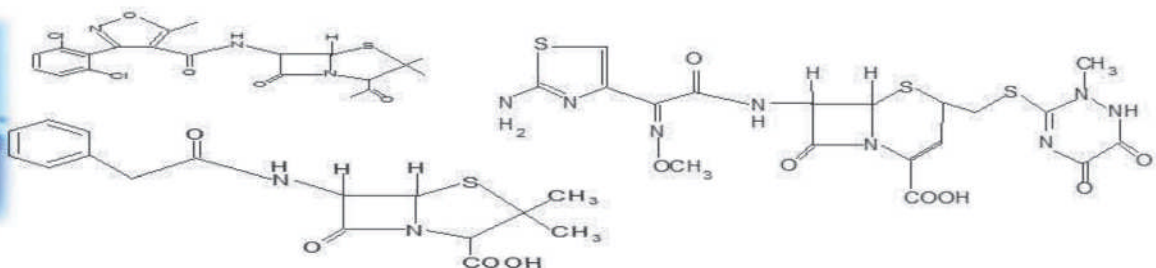
Partiendo de la ecuación de Arrhenius se puede determinar la Energía de activación de una reacción.

$$K = Ae^{-E/RT}$$

Linealizando

$$\ln K = \ln A - \frac{E}{RT}$$

Despejando A



$$\ln A = \ln K + \frac{E}{RT}$$

Igualando el factor de frecuencia a 30°C y 35°C y despejando la energía de activación:

$$\ln K_1 + \frac{E}{RT_1} = \ln K_2 + \frac{E}{RT_2}$$

$$\ln K_2 - \ln K_1 = \frac{E}{RT_1} - \frac{E}{RT_2}$$

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{E}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

$$\frac{E}{R} = \frac{\ln \frac{K_2}{K_1}}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)}$$

$$E = R \frac{\left(\ln \frac{K_2}{K_1} \right)}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)}$$

Sustituyendo los valores:

$$T_1 = 30^\circ\text{C} = 303.16^\circ\text{K}$$

$$T_2 = 35^\circ\text{C} = 307.16^\circ\text{K}$$

De la pendiente de la gráfica de la [Figura 34](#) inciso a y b obtenemos K, ya que se graficó la Ecuación $\ln C = -Kt + \ln C_0$

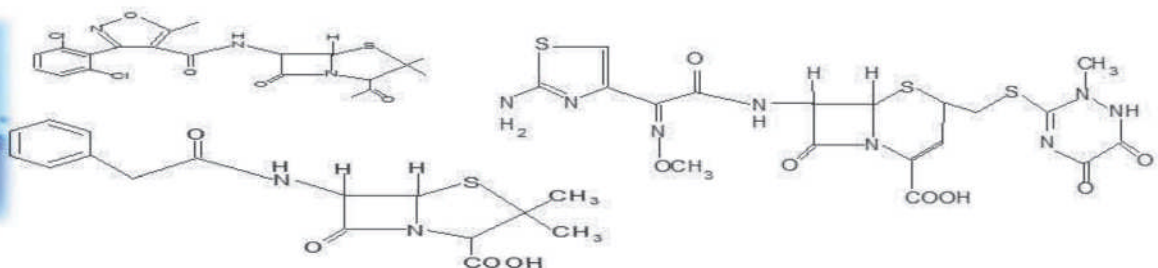
$$K_{30^\circ\text{C}} = 10.99$$

$$K_{34^\circ\text{C}} = 243$$

$$R = 8.314 \text{ J/molK}$$

$$E = 8.314 \frac{\text{J}}{\text{molK}} \frac{\left(\ln \frac{243}{10.99} \right)}{\left(\frac{1}{303.16} - \frac{1}{307.16} \right)} = 599236.3546 \frac{\text{J}}{\text{mol}}$$

$$E = 143.214 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}}$$



El valor de E es una medida de la sensibilidad de la reacción a la temperatura, es decir cuanto menor sea la E, menor es la sensibilidad a la biodegradación.

Por lo que es evidente que la biodegradación de penicilina es sensible a estas temperaturas, ya que las bacterias crecen bien en este rango de temperatura y son condiciones ideales para la producción de betalactamasas que son las causantes del rompimiento del anillo betalactámico y la inactivación de penicilina, esto se corrobora con la gráfica de la [Figura 29](#) donde es evidente que la penicilina se elimina por completo y además el blanco del antibiótico permanece estable durante la biodegradación, por lo que la penicilina por si sola es estable a estas condiciones de temperatura durante este periodo de tiempo y la biodegradación es causada por las bacterias.

5.4.1 Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod.

Las deducciones de las ecuaciones utilizadas se muestran en el [anexo 5](#).

En la [Tabla 14](#) y [15](#) se muestran los resultados de la evaluación de los parámetros de la ecuación de Monod.

Tabla 14: Valores de los parámetros de la ecuación de Monod con *Pseudomonas aeruginosa*

PARÁMETRO	DEGRADACIÓN CON <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>			
	Penicilina 34 °C	Penicilina 30 °C	Dicloxacilina 30 °C	Ceftriaxona a 30 °C
Factor de rendimiento del sustrato en producto Y_x/s (UFC/mg de sustrato)	2×10^7	5×10^6	3	2×10^9
Velocidad específica máxima de crecimiento μ_m (1/h)	0.059	-0.0105	-0.0504	-0.0696
Concentración del sustrato a una velocidad específica de crecimiento k_s (mg de sustrato/L de medio)	-702.62	-1274.88	-44.25	-44.67

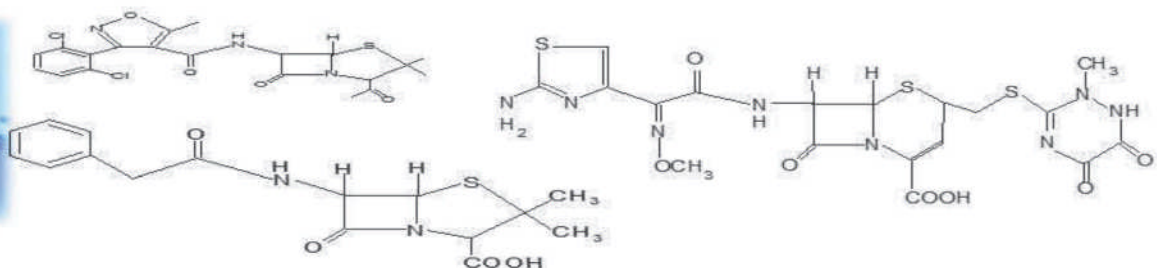


Tabla 15: Valores de los parámetros de la ecuación de Monod con consorcio bacteriano.

PARÁMETRO	DEGRADACIÓN CON CONSORCIO A 30 °C		
	Penicilina	Dicloxacilina	Ceftriaxona
Factor de rendimiento del sustrato en producto $Y_{x/s}$ (UFC/mg de sustrato)	6×10^6	5×10^9	1×10^8
Velocidad específica máxima de crecimiento μ_m (1/h)	-0.122	0.011	0.00054
Concentración del sustrato a una velocidad específica de crecimiento K_s (mg de sustrato/L de medio)	-3118.38	-29.80	-2120.18

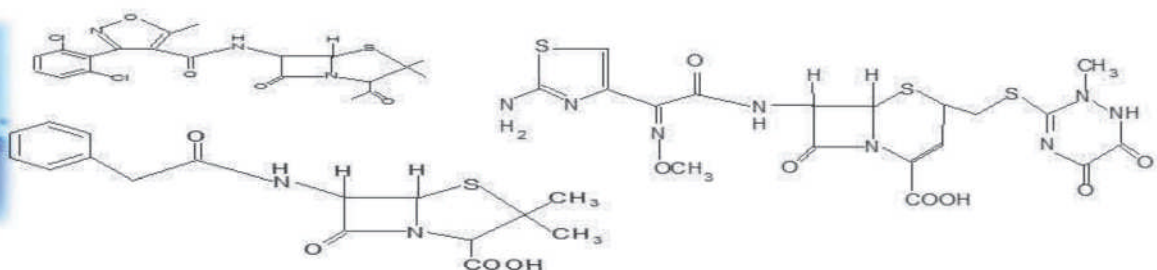
El factor de rendimiento del sustrato con respecto al producto ($Y_{x/s}$) varía dependiendo de si se utiliza una cepa pura o un consorcio y del antibiótico utilizado. En todos los casos este factor nos indica que las bacterias consumen el sustrato y lo transforman, lo cual se corrobora con los cromatogramas donde se evidencia que el antibiótico (sustrato) es consumido en su totalidad.

Velocidad específica máxima de crecimiento μ_m :

Es la velocidad máxima de multiplicación que puede alcanzar el microorganismo, en las condiciones en las que está creciendo (Bello, 2014), por ejemplo, en la degradación con *Pseudomonas aeruginosa* de penicilina a 34 °C el valor obtenido es de 0.059 h^{-1} el cual evidencia que existe un crecimiento y se puede corroborar con la gráfica de la Figura 32, mientras que la degradación de penicilina a 30 °C es de -0.105 h^{-1} , se podría pensar que no existe un crecimiento y las bacterias mueren. Sin embargo, al observar la gráfica de la Figura 31 se observa que no existe muerte de las bacterias, pero tampoco hay un crecimiento significativo debido a que, en este sistema, el metabolito que se forma inhibe temporalmente el crecimiento bacteriano. Este metabolito no mata a la bacteria, pero la obliga a adaptarse a estas condiciones y se prepara para poder metabolizarlo y posteriormente duplicarse, este metabolito se evidencia en el cromatograma de la Figura 30.

Concentración del sustrato a una velocidad específica de crecimiento K_s :

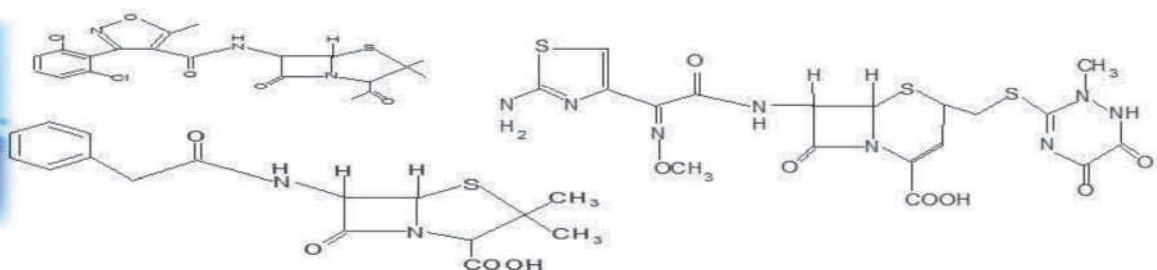
Es la constante de utilización del sustrato limitante y representa la afinidad de los microorganismos por este sustrato. Esta constante muestra la concentración del



sustrato a la que se producen microorganismos con una velocidad igual a la mitad de la velocidad específica de crecimiento máximo (Bello, 2014).

Los resultados del experimento muestran valores negativos, por lo que se pensaría que no existe afinidad por el sustrato, lo que no es así ya que los cromatogramas de las Figuras 30,35 y 36 evidencian que el antibiótico es eliminado en su totalidad debido a que las bacterias poseen betalactamasas, sin embargo también se evidencia la presencia de metabolitos, los cuales también son degradados, sin embargo las bacterias tienen que adaptarse a ellos y producir las enzimas necesarias para su degradación. Por lo que la afinidad hacia el sustrato puede estar enmascarado por los metabolitos.

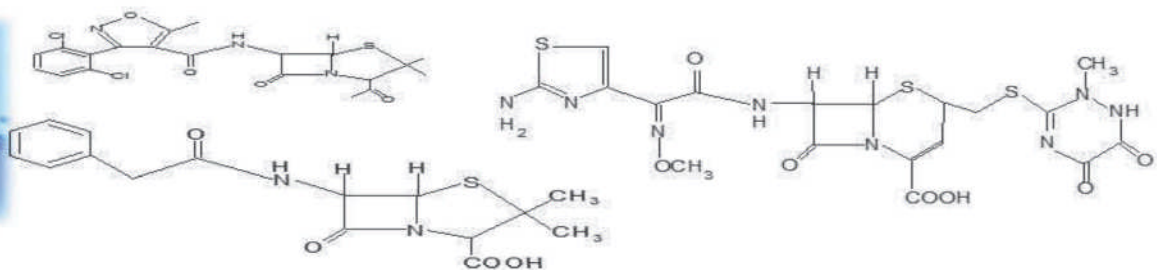
Con base a lo anteriormente explicado llegamos a la conclusión de que tenemos un crecimiento **diauxico** el cual tiene lugar cuando hay presentes dos diferentes sustratos (el antibiótico y los metabolitos) que pueden ser utilizados como fuente de carbono. El metabolismo del organismo es selectivo para uno de los sustratos (se usa la fuente de carbono que permite un crecimiento más rápido) y cuando la agota, comienza a metabolizar el otro, lo cual sucedió durante la biodegradación por eso al analizar como un todo los datos nos dieron valores negativos, y al compararlos con las gráficas complementarias y los cromatogramas, se observa que el comportamiento se justifica por la presencia de uno o varios metabolitos, esto se debe a que la ecuación de Monod solo contempla un reactivo limitante y considera un crecimiento exponencial.



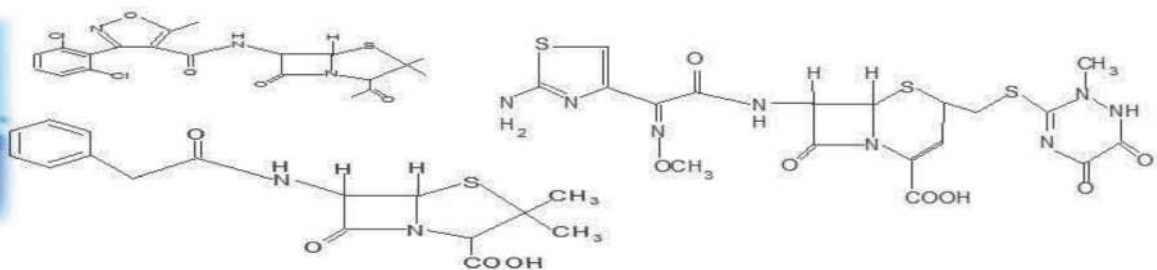
CONCLUSIONES

Después de haber analizado los resultados y considerando la parte analítica como la biológica se concluye que:

- Las bacterias de vida libre aisladas del agua residual de un hospital demostraron ser altamente eficientes en la degradación de antibióticos betalactámicos.
- El método analítico para la cuantificación por HPLC es preciso, exacto y lineal en las concentraciones utilizadas, generando resultados confiables.
- Las cepas utilizadas corresponden a *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, dos *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.
- Las bacterias son capaces de degradar al 100 % tanto a penicilina como a dicloxacilina y ceftriaxona y los tiempos de eliminación varían de acuerdo con la complejidad de la molécula.
- La penicilina aun cuando sea de dos orígenes diferentes y esto implica un proceso de elaboración y purificación distinto, se degrada en su totalidad, sin embargo, su comportamiento en cuanto a metabolitos de la degradación es diferente.
- La degradación de los metabolitos del estándar de china es del 100 % tanto en consorcio como para *Pseudomonas aeruginosa* en 24 horas, mientras que para los metabolitos del estándar de Israel es del 42 % para *Pseudomonas aeruginosa* en 54 horas y del 83.3 % para el consorcio bacteriano.
- La degradación de la dicloxacilina empleando *Pseudomonas aeruginosa* y el consorcio bacteriano como bacterias de vida libre es eficiente al 100 %.
- *Pseudomonas aeruginosa* eliminó a la dicloxacilina en 52 horas y a las 72 horas el 71.4 % de los subproductos.

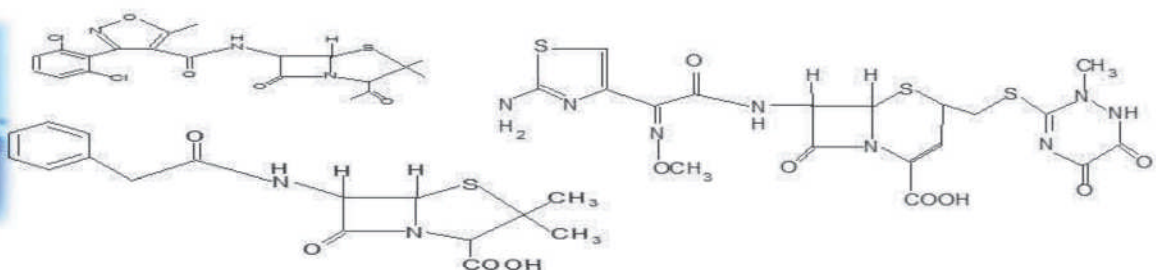


- Con relación al consorcio bacteriano, la dicloxacilina se eliminó en 3.5 horas y en 72 horas el 90 % de los subproductos.
- Para el caso de la ceftriaxona *Pseudomonas aeruginosa* elimino el 100 % del antibiótico en 72 horas y al 84.6 % de los metabolitos.
- Por otro lado, el consorcio bacteriano eliminó el 100 % de ceftriaxona en 5 horas y al 77.7 % de los subproductos en 72 horas.
- El método biológico para la eliminación de dicloxacilina y ceftriaxona es más eficiente comparado con los métodos fisicoquímicos.



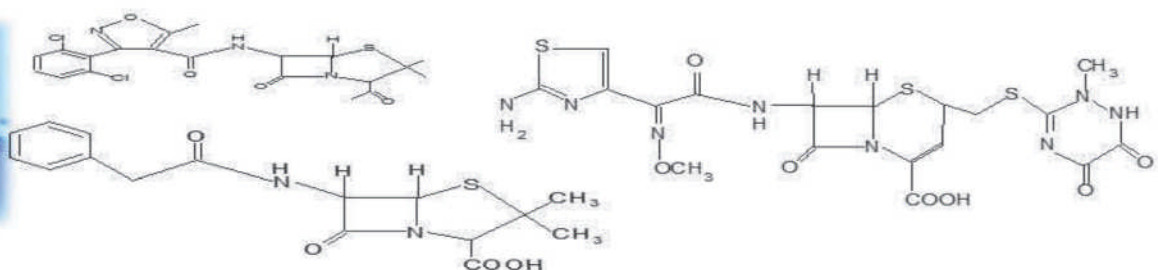
RECOMENDACIONES

- 1.- Probar las condiciones óptimas de simulación del biorreactor en la degradación experimental de los antibióticos.
- 2.- Monitorear el pH durante la degradación.
- 3.- Realizar una degradación de la mezcla de los antibióticos y comparar los resultados con los obtenidos en esta tesis.



REFERENCIAS.

- Ahmed, M. B. *et al.* (2015) 'Adsorptive removal of antibiotics from water and wastewater: Progress and challenges', *Science of the Total Environment*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.05.130.
- Alvarez García, S. (2015) *Evaluación de la remoción de dicloxacilina en medio acuoso con una zeolita natural modificada con hexadeciltrimetilamonio (HDTMA)*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Arsalan, A. and Younus, H. (2018) 'Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., pp. 1833–1847. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.030.
- Azubuiké, C. C., Chikere, C. B. and Okpokwasili, G. C. (2016) 'Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer Netherlands. doi: 10.1007/s11274-016-2137-x.
- Bailón Pérez, M. I. (2009) *Uso de técnicas separativas miniaturizadas como alternativa a la determinación de antibióticos betalactámicos en farmacos, aguas y alimentos*., Universidad de Granada Facultad de Ciencias Departamento de Química Analítica. Universidad de granada facultad de ciencias.
- Bello, A. T. (2014) *Modelos de crecimiento en biología, su significado biológico y selección del modelo por su ajuste*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Benito Peña, M. E. (2006) *Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos basados en Nuevos Elementos para reconocimiento molecular para la determinación de Antibióticos β -lactámicos en muestras de interés Agroalimentario y Medioambiental*.
- Bottari, F., Blust, R. and De Wael, K. (2018) 'Bio(inspired) strategies for the electro-sensing of β -lactam antibiotics', *Current Opinion in Electrochemistry*. doi:



10.1016/j.coelec.2018.05.015.

Campo, L. N. and Cohen Rodriguez, J. D. (2012) *APLICACIÓN DE LA FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA SOLAR PARA LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS FARMACÉUTICOS EN EFLUENTES LÍQUIDOS*.

Colina-Márquez, J. Á. and Castilla-Caballero, D. R. (2013) 'Mineralización fotocatalítica de agua residual contaminada con dicloxacilina comercial en un reactor solar CPC a escala piloto Photocatalytic mineralization of wastewater polluted with commercial dicloxacillin in a pilot-scale solar CPC reactor', *redalyc*, 15, pp. 161–169. doi: <https://doi.org/10.25100/iyc.v15i1.2629>.

Copete-Pertuz, L. S. *et al.* (2018) 'Elimination of Isoxazolyl-Penicillins antibiotics in waters by the ligninolytic native Colombian strain *Leptosphaerulina* sp. considerations on biodegradation process and antimicrobial activity removal', *Science of the Total Environment*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.244.

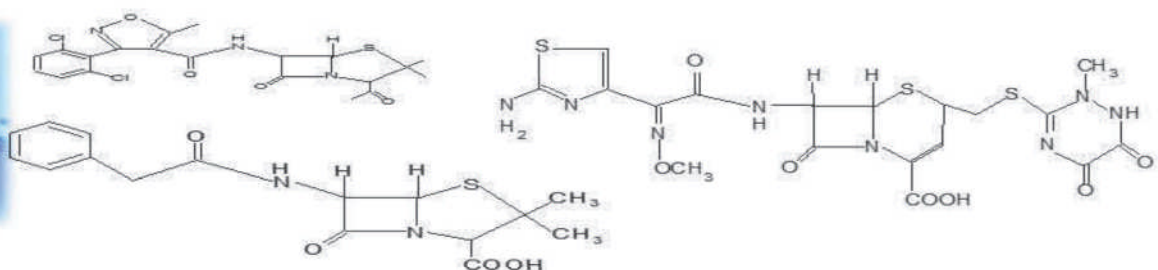
Dávalos Moscol, M. (1998) *Cefalosporinas*, *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna - Vol. 11 N.º1 - 1998*.

Dávila Estrada, A. M. (2018) *Identificación y cuantificación de fármacos por HPLC presentes en aguas residuales provenientes de un hospital y evaluación de su remoción con una clinoptilolita modificada con HDTMA*, Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.

Flesia, M. M. (2011) 'PENICILINA', in *Trabajo presentado durante el curso de Toxicología y Química Forense-2011 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales -Universidad de Belgrano*.

Flores Tatiana, V. and Vargas Alvin, K. (2014) 'Morfología bacteriana', *Revista de Actualización Clínica*, 49, pp. 2594–2598.

Furlan, J. P. R. and Stehling, E. G. (2017) 'High-level of resistance to β -lactam and presence of β -lactamases encoding genes in *Ochrobactrum* sp. and *Achromobacter* sp. isolated from soil', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. doi:



10.1016/j.jgar.2017.10.014.

Gartiser, S. *et al.* (2007) 'Ultimate biodegradation and elimination of antibiotics in inherent tests', *Chemosphere*, 67(3), pp. 604–613. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.08.038.

Guía de Validación de Métodos Analíticos (2009) Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. Available at: https://www.academia.edu/4513278/Guia_de_Validacion_de_metodos_analiticos_editada_por_QFB_de_Mexico .

Guo, X. *et al.* (2015) 'Preparation and electrochemical property of TiO₂/Nano-graphite composite anode for electro-catalytic degradation of ceftriaxone sodium', *Electrochimica Acta*, 180, pp. 957–964. doi: 10.1016/j.electacta.2015.09.055.

Hammarstrom, S. and Strominger, J. L. (1975) 'Degradation of penicillin G to phenylacetylglycine by D alanine carboxypeptidase from *Bacillus stearothermophilus*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(9), pp. 3463–3467. doi: 10.1073/pnas.72.9.3463.

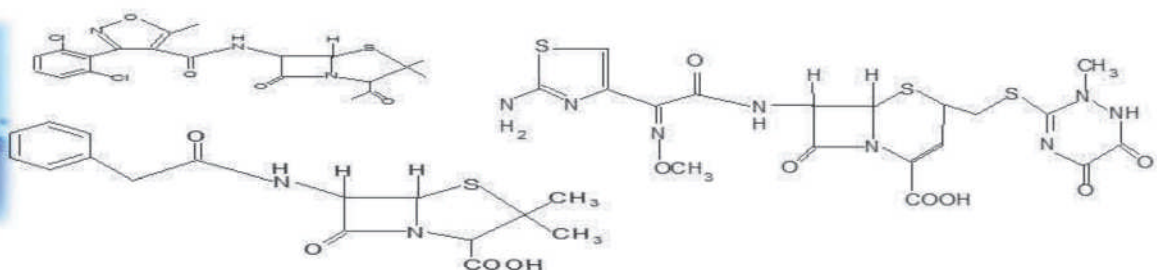
[Http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO 8, cap 8 pdf](http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO_8_cap_8.pdf) (no date) *Introducción a biorreactores*. Available at: [http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO 8.pdf](http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO_8.pdf).

Huang, B. *et al.* (2018) 'Treatment of pharmaceutical wastewater containing B-lactams antibiotics by a pilot-scale anaerobic membrane bioreactor (AnMBR)', *Chemical Engineering Journal*. doi: 10.1016/j.cej.2018.01.149.

Jena Bioscience (2016) *Animal and Fungi DNA Preparation Kit Description : Kit contents : Animal and Fungi DNA Preparation Kit*. Available at: <https://www.jenabioscience.com/images/PDF/PP-208.0002.pdf> .

Karkman, A. *et al.* (2017) 'Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water', *Trends in Microbiology*. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.005.

Lamba, M. and Ahammad, S. Z. (2017) 'Sewage treatment effluents in Delhi: A key contributor of B-lactam resistant bacteria and genes to the environment', *Chemosphere*. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.133.



Lastre Acosta, A. M., Silva Costa Texeira, A. C. and Jáuregui Haza, U. J. (2012) *Procesos de Oxidación Avanzada para el tratamiento de Sistemas Acuáticos Contaminados Con Antibióticos*.

Lekunberri, I. *et al.* (2017) 'Contribution of bacteriophage and plasmid DNA to the mobilization of antibiotic resistance genes in a river receiving treated wastewater discharges', *Science of the Total Environment*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.174.

Li, D. *et al.* (2008) 'Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river', *Water Research*, 42(1–2), pp. 307–317. doi: 10.1016/j.watres.2007.07.016.

Lirio, S. *et al.* (2016) 'Aluminum based metal-organic framework-polymer monolith in solid-phase microextraction of penicillins in river water and milk samples', *Journal of Chromatography A*. doi: 10.1016/j.chroma.2015.05.043.

López, S. Y., Ponce de León, S. and Novales, G. M. (2019) *Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA), Universidad Nacional Autónoma de México. Segundo Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y consumo de antimicrobianos. Ciudad de México*. doi: : www.puis.unam.mx.

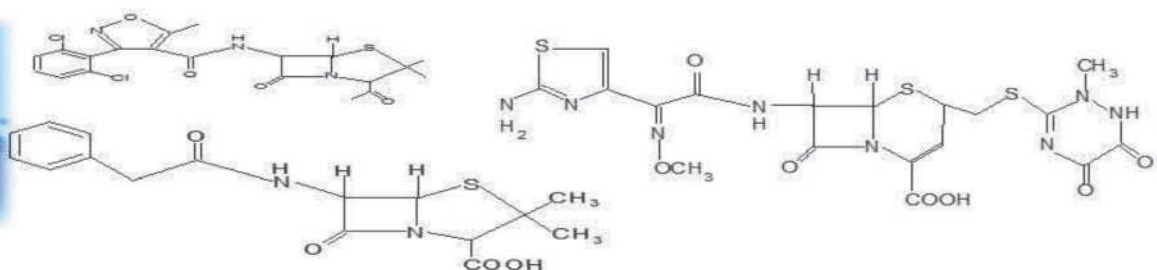
Lucas, D. *et al.* (2016) 'Fungal treatment for the removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in veterinary hospital wastewater', *Chemosphere*. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.02.113.

M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th edn (2017). Clinical and Laboratory Standards Institute. Available at: www.clsi.org.

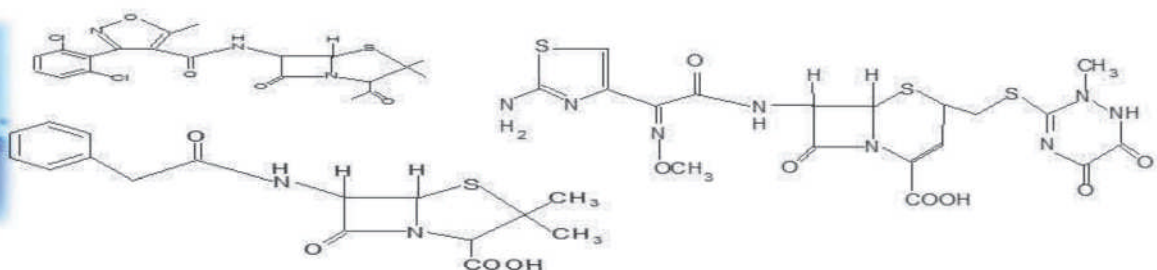
Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2003) *Biología de los Microorganismos - Brock 10ed*. 10th edn. Pearson Educación.

Malgor-Valsecia (1928) 'Sección V : Capitulo 30 ':, in *Antibióticos Betalactámicos*, pp. 5–26.

Marín, M. and Gudiol, F. (2003) 'Antibióticos betalactámicos', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1), pp. 42–55. doi: 10.1016/s0213-005x(03)72873-0.



- Miceli-Montesinos, A. S. *et al.* (2014) 'Revisión de Tecnologías para el tratamiento de aguas residuales incluyendo algunos fármacos', *Revista Espacio I+D Innovación más Desarrollo*, 3(5), pp. 73–95. doi: 10.31644/imasd.5.2014.a04.
- Mullai, P. *et al.* (2011) 'Experiments and ANFIS modelling for the biodegradation of penicillin-G wastewater using anaerobic hybrid reactor', *Bioresource Technology*, 102(9), pp. 5492–5497. doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.085.
- Ortiz-Hernández, M. L. *et al.* (2013) 'Mechanisms and strategies for pesticide biodegradation: Opportunity for waste, soils and water cleaning', *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(SPEC.ISSUE), pp. 85–104.
- Pang, Z. *et al.* (2018) 'Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies', *Biotechnology Advances*. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
- Rahim Pouran, S., Abdul Aziz, A. R. and Wan Daud, W. M. A. (2015) 'Review on the main advances in photo-Fenton oxidation system for recalcitrant wastewaters', *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. doi: 10.1016/j.jiec.2014.05.005.
- Rivera Gutiérrez, E. (2016) *Biodegradación bacteriana de la penicilina G en agua residual proveniente de un hospital y su cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Rodríguez-Ganen, O. and Asbun-Bojalil, J. (2012) 'Vigilancia del consumo de antimicrobianos en hospitales de México: situación actual y guía práctica para su implementación', *Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health*, 32(5), pp. 381–386. doi: 10.1590/S1020-49892012001100009.
- Rodríguez-Narvaez, O. M. *et al.* (2017) 'Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review', *Chemical Engineering Journal*. doi: 10.1016/j.cej.2017.04.106.
- Serrat, M. and Méndez, A. (2015) 'Construcción y Validación Experimental de un Biorreactor Artesanal Tipo Tanque Agitado para Fermentaciones Sumergidas a Escala de Laboratorio Construction and Experimental Validation of a Homemade



Stirred Tank Bioreactor for Lab-scale Submerged', *Tecnología Química*, 31(2), pp. 362–375. Available at: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852015000300010%0Ahttp://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852011000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v35n3/rtq10315.pdf.

Sharma, B., Dangi, A. K. and Shukla, P. (2018) 'Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review', *Journal of Environmental Management*. Academic Press, pp. 10–22. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.12.075.

Shrestha, B., Bhuyan, N. R. and Sinha, B. N. (2013) 'Simultaneous determination of Ceftriaxone and Tazobactam in injectables by UHPLC method', *Pharmaceutical Methods*, 4(2), pp. 46–51. doi: 10.1016/j.phme.2013.12.001.

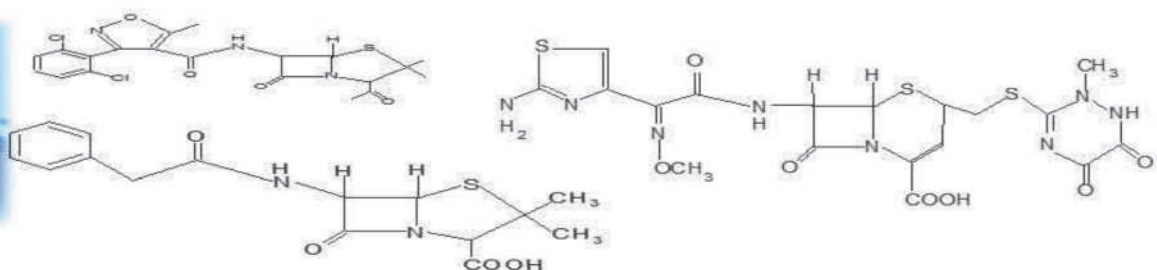
Silvia Noemy S, F. S. G. E. and Paredes Castillo (2010) *Inertización por medio del método de hidólisis a los antibióticos vencidos de los subgrupos: Betalactámicos, quinolas, macrolidos y tetraciclinas*. Universidad de el salvador facultad de química y farmacia 1.

Torres, A. D. (1996) *Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod*. doi: <https://doi.org/10.15446/inginvestig.v0n33.20908>.

Villa Morán, D. A. (2014) *Validación del método analítico para determinar dicloxacilina en medio acuoso*. Tesis de Licenciatura, Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.

Villegas-Guzman, P. *et al.* (2015) 'Evaluation of water matrix effects, experimental parameters, and the degradation pathway during the TiO₂ photocatalytical treatment of the antibiotic dicloxacillin', *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. doi: 10.1080/10934529.2015.964606.

Villegas Guzman, P. *et al.* (2015) 'Enhancement and inhibition effects of water matrices during the sonochemical degradation of the antibiotic dicloxacillin', *Ultrasonics*



Sonochemistry. doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.07.006.

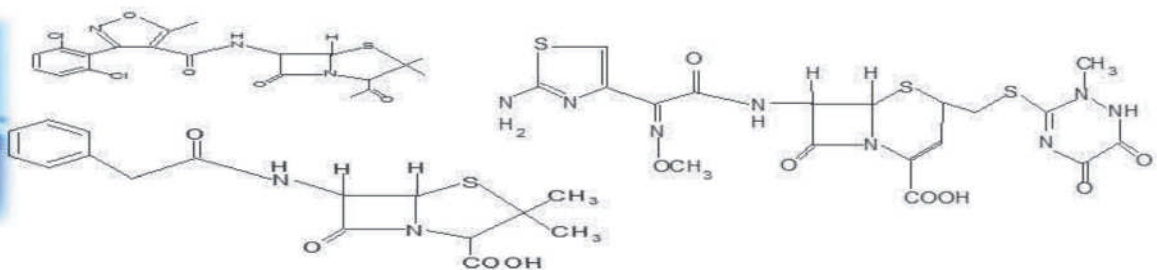
Wang, P. *et al.* (2015) 'Characterization and mechanism analysis of penicillin G biodegradation with *Klebsiella pneumoniae* Z1 isolated from waste penicillin bacterial residue', *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. doi: 10.1016/j.jiec.2014.12.018.

Wang, P. and Lim, T. T. (2012) 'Membrane vis-LED photoreactor for simultaneous penicillin G degradation and TiO₂ separation', *Water Research*, 46(6), pp. 1825–1837. doi: 10.1016/j.watres.2011.12.057.

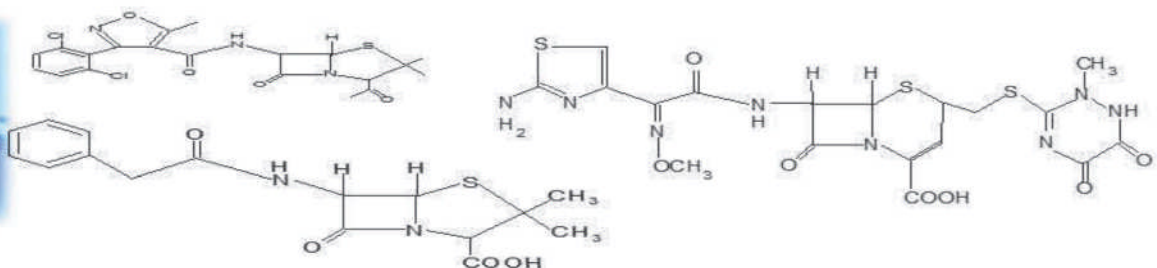
Yang, Y. *et al.* (2018) 'Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis', *Environment International*. doi: 10.1016/j.envint.2018.04.011.

Yurchenco, J. A., Hopper, M. W. and Warren, G. H. (1966) 'Degradation of penicillin G and three semisynthetic penicillins by *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* penicillinase.', *Canadian journal of microbiology*, 12(1), pp. 35–42. doi: 10.1139/m66-006.

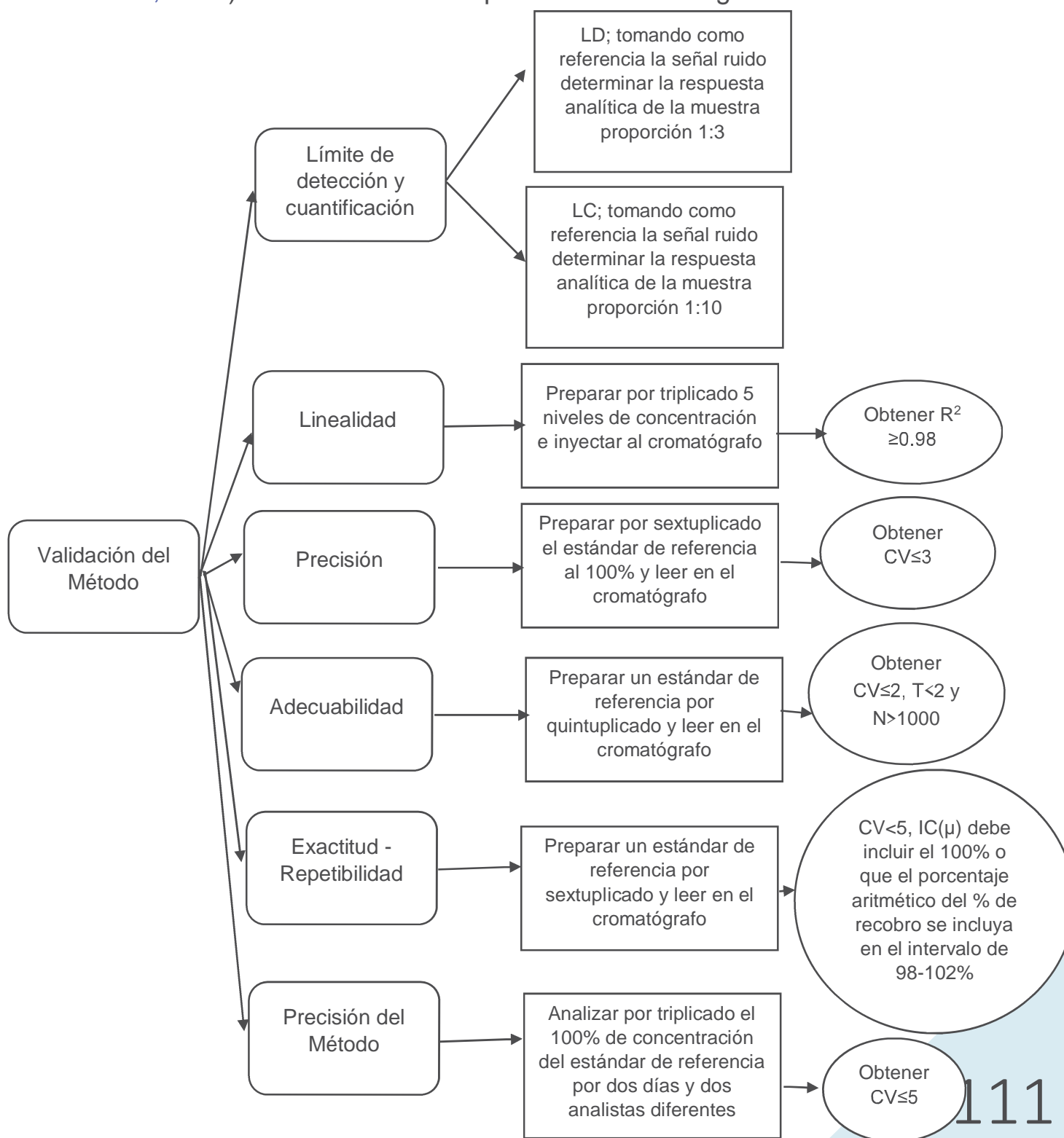
Zavala, M. A. and Santana, R. (2014) 'Calidad de prescripción de antibióticos en el servicio de pediatría de un Hospital -general de Cárdenas ,Tabasco, Mexico 2010', *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, pp. 37–42. Available at: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57932294005>.

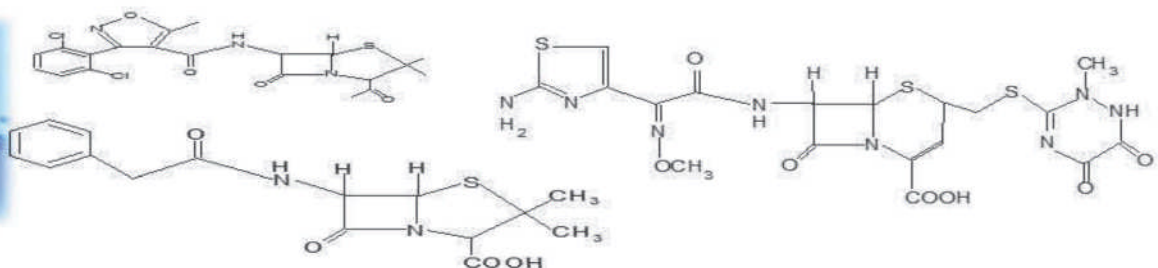


ANEXOS



ANEXO 1: Diagrama de la validación del Método Analítico (Dávila Estrada, 2018) con modificaciones para métodos biológicos.





ANEXO 2: Extracción de ADN con el kit Jena Bioscience

DATA SHEET



Animal and Fungi DNA Preparation - Solution Kit

Solution based genomic DNA purification from animal tissue and fungi

Buffer	PP-20RS 100 preps	PP-20RL 500 preps
Cell Lysis Solution	32 ml	160 ml
Cell Resuspension Solution	32 ml	160 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	4 mg	5x 4 mg
Protein Precipitation Solution	11 ml	55 ml
Washing Buffer	add 48 ml Ethanol (final volume 60 ml)	add 120 ml Ethanol (final volume 150 ml each)
DNA Hydration Solution	11 ml	55 ml
RNase A (4 mg/ml)	0.8 mg	5x 0.8 mg

pellet that ranges in color from off white to light green.

- Discard the supernatant and drain tube briefly on clean absorbent paper.
- Add 500 µl Washing Buffer and invert tube several times to wash the DNA pellet.
- Centrifuge at 15,000 g for 1 min. Discard the ethanol carefully.
- Air dry at room temperature for 10-15 min.

4 DNA Hydration:

- Add 50-100 µl of DNA Hydration Solution to the dried DNA pellet.
- Add 1.5 µl of RNase A to the cell lysate.
- Mix the sample by inverting the tube and incubate at 37 °C for 30-60 min.
- Hydrate the DNA by incubating sample at 65 °C for 60 min.
- Store DNA at 4 °C. For long time storage, place sample at -20 °C or -80 °C.

1a Cell Lysis for Animal Tissue:

- Transfer 5-10 mg of fresh or frozen tissue to a 1.5 ml microtube.
- Add 300 µl Cell Lysis Solution to the tissue.
- Add 1.5 µl Proteinase K Solution to the lysate and mix by inverting several times.
- Incubate at 55 °C overnight or until tissue has dissolved.

1b Cell Lysis for Fungi:

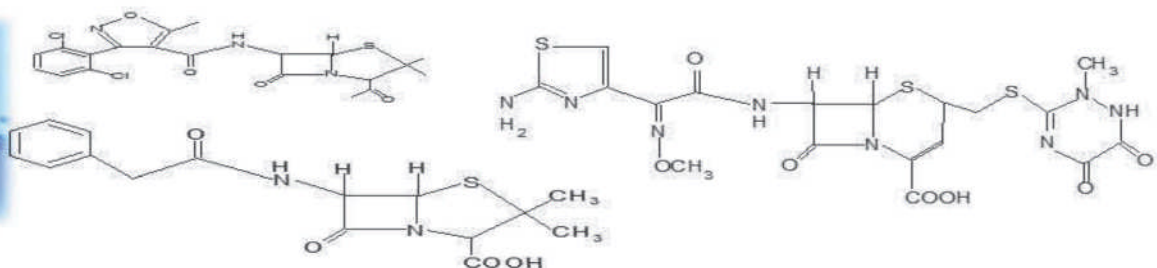
- Transfer 1 ml of the cultured cells to a 1.5 ml microtube.
- Harvest the cells by centrifuging at 15,000 g for 1 min and discard supernatant.
- Resuspend the cell pellet in 300 µl Cell Resuspension Solution.
- Add 1.5 µl Proteinase K Solution and mix by inverting several times.
- Incubate at 55 °C for 60 min.
- Centrifuging at 15,000 g for 1 min and discard supernatant.
- Resuspend the pellet in 300 µl Cell Lysis Solution.

2 Protein Precipitation:

- Add 100 µl of Protein Precipitation Solution to the cell lysate.
- Mix the solution well by vortexing for 20 sec.
- Centrifuge at 15,000 g for 3 min. (The precipitated protein will be a tight pellet. If the pellet is not tight, repeat mixing, incubate on ice for 10 minutes, and then centrifuge again.)

3 DNA Precipitation:

- Transfer the supernatant to a clean 1.5 ml microtube containing 300 µl of Isopropanol >99 %.
- Mix the sample by inverting gently 50 times.
- Centrifuge at 15,000 g for 1 min. The DNA will be visible as a



ANEXO 5: Deducción de las ecuaciones para evaluar los parámetros de Monod por el método integral

$$\int_{S_0}^S \frac{(Ks + S)ds}{S \left[X_0 + Y_{x/s}(S_0 - S) * \frac{X_0}{X_0} \right]} = -\frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \int_0^t dt$$

$$a = \frac{Y_{x/s}}{X_0} \quad d = S_0 - S$$

$$\int_{S_0}^S \frac{(Ks + S)ds}{S \left[X_0 + \frac{Y_{x/s}}{X_0} (S_0 - S)X_0 \right]} = -\frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \int_0^t dt$$

$$\int_{S_0}^S \frac{(Ks + S)ds}{SX_0[1 + a(S_0 - S)]} = -\frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \int_0^t dt$$



$$\frac{A}{X_0S} + \frac{B}{1 + a(S_0 - S)} = \frac{Ks + S}{SX_0[1 + a(S_0 - S)]}$$

$$\frac{A[1 + a(S_0 - S)] + BX_0S}{X_0S[1 + a(S_0 - S)]} = \frac{Ks + S}{SX_0[1 + a(S_0 - S)]}$$

$$A[1 + a(S_0 - S)] + BX_0S = Ks + S$$

$$A + aAS_0 - aAS + BX_0S = Ks + S$$

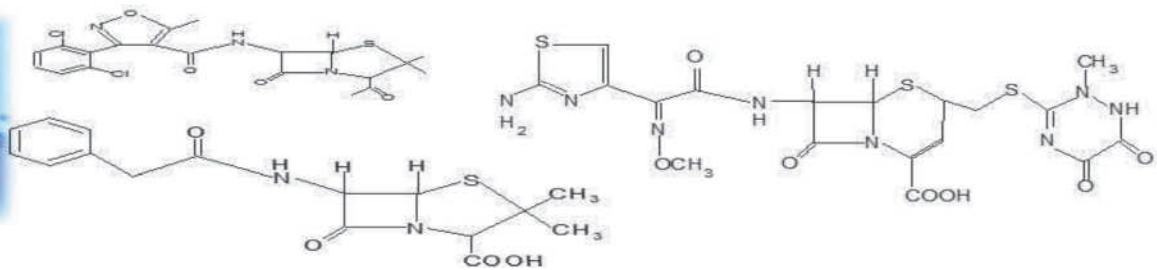
$$A + aAS_0 + S(-aA + BX_0) = Ks + S$$

$$A + aAS_0 = Ks \quad y \quad -aA + BX_0 = 1$$

$$A = \frac{Ks}{1 + aS_0} \quad B = \frac{1 + aA}{X_0} = \frac{1}{X_0} \left[1 + a \left(\frac{Ks}{1 + aS_0} \right) \right]$$

$$B = \frac{1}{X_0} \left[\frac{1 + aS_0 + aKs}{1 + aS_0} \right] = \frac{1}{X_0} \left[\frac{1 + a(S_0 + Ks)}{1 + aS_0} \right]$$





$$\frac{A}{X_0} \int_{S_0}^S \frac{ds}{S} + B \int_{S_0}^S \frac{ds}{1 + a(S_0 - S)} = -\frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \int_0^t dt$$

$$= \frac{-B}{a} \int \frac{du}{u} = \frac{-B}{a} \ln(1 + a(S_0 - S))$$

$$u = 1 + a(S_0 - S) = 1 + aS_0 - aS$$

$$du = -ads$$

$$= \frac{-B}{a} \ln(1 + a(S_0 - S)) = \frac{-B}{a} \ln(1 + ad)$$

$$d = S_0 - S$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{X_0} \frac{K_s}{1 + aS_0} \ln \frac{S}{S_0} - \frac{1}{aX_0} \left[1 + a \frac{K_s}{1 + aS_0} \right] * \ln(1 + ad) \\ = -\frac{\mu_m}{Y_{x/s}} t * \left(\frac{1 + aS_0}{K_s} * \frac{1}{t} \right) X_0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{t} \ln \frac{S}{S_0} - \frac{(1 + aS_0)X_0}{K_s aX_0} \left[1 + a \frac{K_s}{1 + aS_0} \right] * \frac{1}{t} \ln(1 + ad) \\ = -\frac{\mu_m}{Y_{x/s}} * \frac{1 + aS_0}{K_s} X_0 \end{aligned}$$

$$b = \frac{(1 + aS_0)}{K_s a} \left[\frac{1 + aS_0 + aK_s}{1 + aS_0} \right]$$

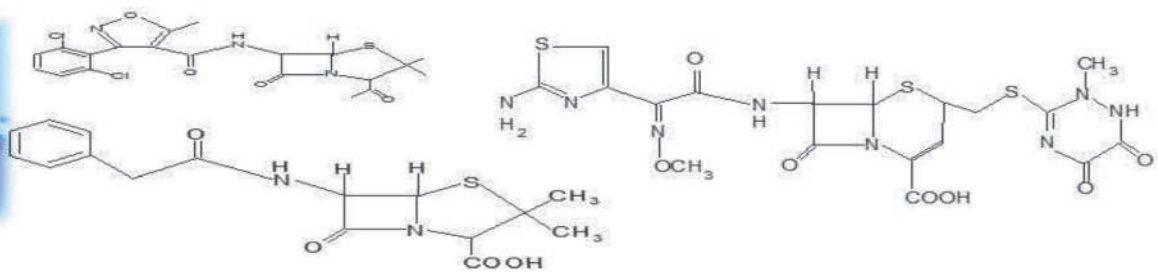
$$c = \frac{\mu_m}{Y_{x/s} K_s} \left(1 + \frac{S_0 Y_{x/s}}{X_0} \right) X_0$$

$$b = \frac{1}{K_s a} [1 + aS_0 + aK_s]$$

$$c = \frac{\mu_m}{Y_{x/s} K_s} \left(\frac{X_0 + S_0 Y_{x/s}}{X_0} \right) X_0$$

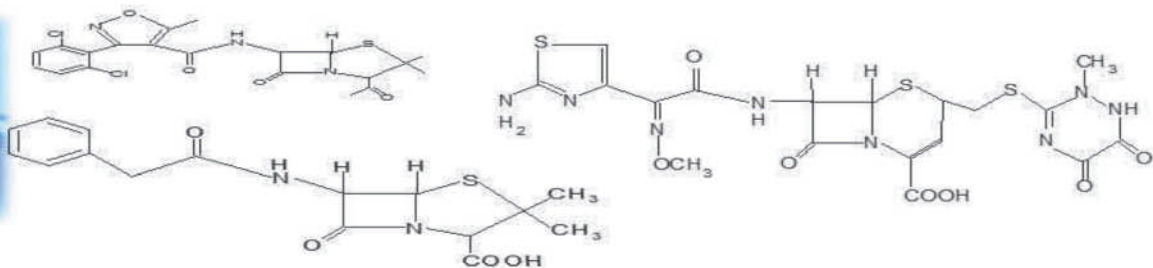
$$b = \frac{1}{K_s a} + \frac{aS_0}{K_s a} + 1 = \frac{1}{K_s \frac{Y_{x/s}}{X_0}} + \frac{S_0}{K_s} + 1 = \frac{X_0}{K_s Y_{x/s}} + \frac{S_0}{K_s} + 1$$

$$b = 1 + \frac{1}{K_s Y_{x/s}} [X_0 + Y_{x/s} S_0]$$



$$\frac{1}{t} \ln \frac{S}{S_0} - b \frac{1}{t} \ln(1 + ad) = -c$$

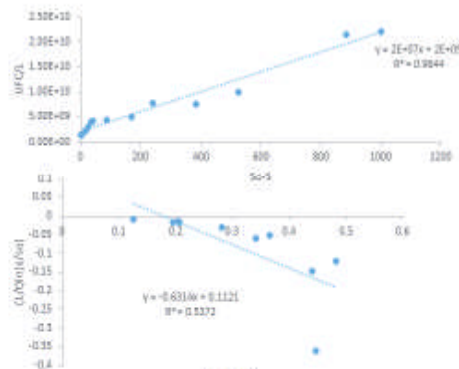
$$\frac{1}{t} \ln \frac{S}{S_0} = b \frac{1}{t} \ln(1 + ad) - c$$



ANEXO 6: Cálculo de los parámetros de Monod por el método integral

Degradación de Penicilina con *Pseudomonas aeruginosa* a 34°C

A	B	C		y	x
Tiempo (h)	Biomasa (UFC/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) X	Sustrato (penicilina mg/L) S	d-So-S	(1/t)ln(s/so)	ln(1+ad)/t
0	1.30E+09	1000	0	-0.0085428	0.126411
0.5	1.40E+09	995.7377	4.2623	-0.0149297	0.204443
1	2.10E+09	985.1812	14.8188	-0.0160454	0.206961
1.5	3.03E+09	976.2193	23.7807	-0.0169341	0.205976
2	4.00E+09	966.699	33.301	-0.0168015	0.195349
2.5	4.10E+09	958.8662	41.1338	-0.0301633	0.281149
3	4.30E+09	913.4835	86.5165	-0.0531282	0.36578
3.5	5.00E+09	830.3162	169.6838	-0.1216513	0.482804
4	7.50E+09	614.7096	385.2904	-0.0607434	0.342058
4.5	7.80E+09	760.8301	239.1699	-0.1490946	0.440421
5	9.99E+09	474.5098	525.4902	-0.3610036	0.446299
6	2.15E+10	114.6328	885.3672	0	0.429482
6.5	2.21E+10	0	1000		



a=(Yx/s)/Xo	1.53E-02
b= pendiente	-0.5162126
C= intersección	-0.08957963
Yx/sKs=(Xo+Yx/s*So)/(b-1)	-1.3982E+10
Ks=((1/a)+So)/(b-1)	-702.623556
mM=	0.05908118

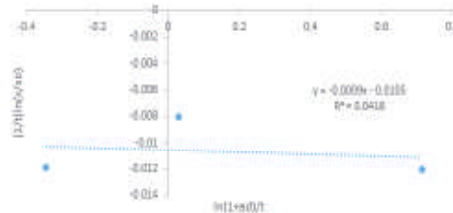
Factor de rendimiento del sustrato en producto $Yx/s = 2 \times 10^7$ UFC/mg de Penicilina

Velocidad específica máxima de crecimiento $\mu_m = 0.059$ (1/h)

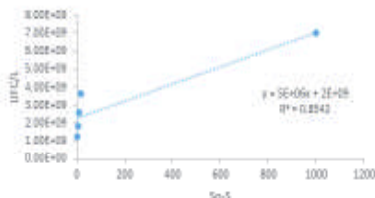
Concentración del sustrato a una velocidad específica de crecimiento $K_s = 702.62$ (mg de penicilina/L de medio)

Degradación de Penicilina con *Pseudomonas aeruginosa* a 30°C

A	B	C		y	x
Tiempo (h)	Biomasa (UFC/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) X	Sustrato (penicilina y medio de cultivo mg/L) S	d-So-S	(1/t)ln(s/so)	ln(1+ad)/t
0	1.30E+09	1000	0	-0.0120361	0.714655
0.5	1.84E+09	994	6	-0.0080322	0.028575
1	2.60E+09	992	8	-0.0118717	-0.34347
1.5	3.68E+09	982.35	17.65		
2	7.00E+09	0	1000		



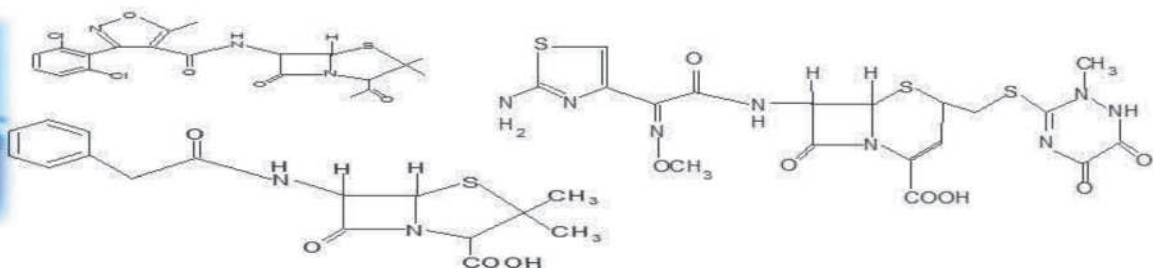
a=(Yx/s)/Xo	3.62E-03
b=	-0.00086333
C=	0.01053165
Yx/sKs=(Xo+Yx/s*So)/(b-1)	FALSO
Ks=((1/a)+So)/(b-1)	-1274.88056
mM=	-0.01052256



Factor de rendimiento del sustrato en producto $Yx/s = 5 \times 10^6$ UFC/mg de Penicilina

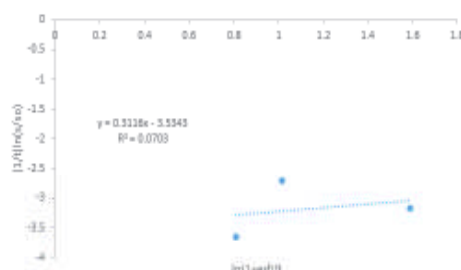
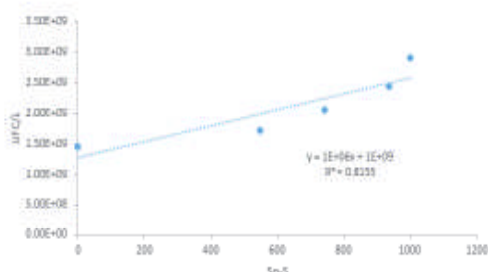
Velocidad específica máxima de crecimiento $\mu_m = 0.0105$ (1/h)

Concentración del sustrato a una velocidad específica de crecimiento $K_s = 1274.88$ (mg de penicilina/L de medio)



Degradación de Penicilina con consorcio a 30°C

Tiempo (h)	Biomasa (UFC/L de consorcio)	Sustrato (penicilina mg/L)	d=So-S	Y	X
				(1/t)ln(s/so)	ln(1+ad)/t
0	1.45E+09	1000	0		
0.25	1.72E+09	452.269	547.731	-3.1739126	1.589282
0.5	2.05E+09	258.297	741.703	-2.7072904	1.014349
0.75	2.44E+09	64.32	935.68	-3.6585129	0.808198
1	2.90E+09	0	1000		



a=(Yx/s)/Xo	8.91E-04
b=	-0.81161127
C=	1.88403336
Yx/sKs=(Xo+Yx/s*So)/(b-1)	1513256310
Ks=-(1/a)+So/(b-1)	-1171.76599
mM=	-1.03997662

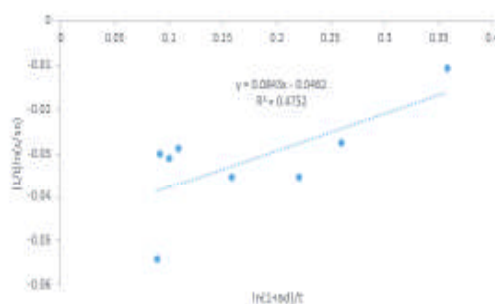
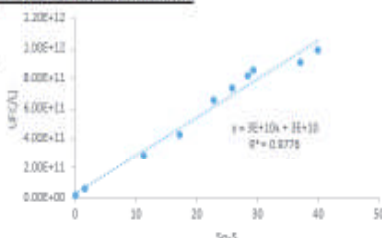
Factor de rendimiento del sustrato en producto Yx/s = 6x10⁶ UFC/mg de Penicilina

Velocidad específica máxima de crecimiento μ_m = 0.122(1/h)

Concentración del sustrato a una velocidad específica de crecimiento K_s = 3118.38 (mg de penicilina/L de medio)

Degradación de Dicloxacilina con *Pseudomonas aeruginosa* a 30°C

A	B	C		Y	X
Tiempo (h)	Biomasa (UFC/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Sustrato (dicloxacilina mg/L)	d=So-S	(1/t)ln(s/so)	ln(1+ad)/t
0	1.34E+10	40	0	-0.01058143	0.35771226
4	6.12E+10	38.3423	1.6577	-0.02753927	0.25986247
12	2.82E+11	28.7434	11.2566	-0.03525591	0.22058994
16	4.25E+11	22.755	17.245	-0.0351659	0.15839652
24	6.58E+11	17.1998	22.8002	-0.02881724	0.10898561
36	7.36E+11	14.1747	25.8253	-0.03112421	0.10048884
40	8.19E+11	11.518	28.482	-0.02993461	0.09197327
44	8.56E+11	10.7162	29.2838	-0.05416066	0.08912098
48	9.10E+11	2.9718	37.0282		
52	9.92E+11	0	40		

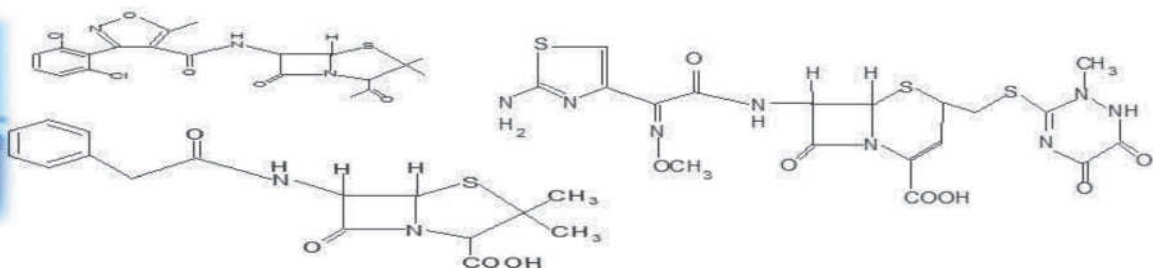


a=(Yx/s)/Xo	1.92E+00
b=	0.084323895
C=	0.046193429
Yx/sKs=(Xo+Yx/s*So)/(b-1)	-1.13834E+12
Ks=-(1/a)+So/(b-1)	-44.25246079
mM=	-0.050447346

Factor de rendimiento del sustrato en producto Yx/s = 3 UFC/mg de dicloxacilina

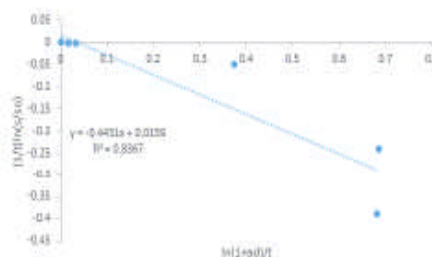
Velocidad específica máxima de crecimiento μ_m = 0.0504(1/h)

Concentración del sustrato a una velocidad específica de crecimiento K_s = 44.25 (mg de dicloxacilina/L de medio)

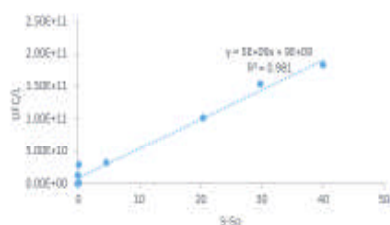


Degradación de Dicloxacilina con consorcio a 30°C

A	B	C	d=So-S	y	x
Tiempo (h)	Biomasa (UFC/L de consorcio) X	Sustrato (dicloxacilina) mg/L) S		(1/t)ln(s/so)	ln(1+ad)/t
0	1.37E+10	40	0	0	0
0.25	1.00E-04	40	0	0	0
0.75	1.30E-03	40	0	0	0
1	1.50E+09	39.9	0.1	-0.00250313	0.03272765
2	2.87E+10	39.9	0.1	-0.00125157	0.01636383
2.5	3.20E+10	35.36	4.64	-0.04931929	0.37344565
3	1.02E+11	19.53	20.47	-0.2389759	0.68514279
3.5	1.55E+11	10.221	29.779	-0.38983858	0.68269238
3.75	1.84E+11	0	40		



a=(Yx/s)/Xo	3.33E-01
b=	-0.443080292
C=	-0.015912888
Yx/sKs=(Xo+Yx/s*So)/(b-1)	-1.35831E+11
Ks=((1/a)+So)/(b-1)	-29.80138615
mM=	0.011027029



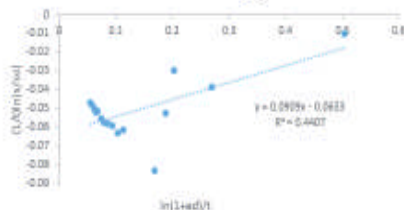
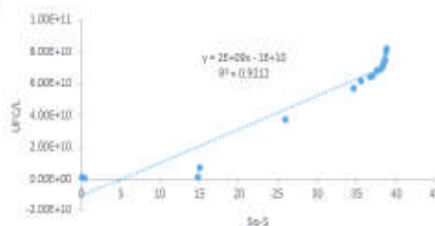
Factor de rendimiento del sustrato en producto $Yx/s = 5 \times 10^9$ UFC/mg de dicloxacilina

Velocidad específica máxima de crecimiento $\mu_m = 0.011(1/h)$

Concentración del sustrato a una velocidad específica de crecimiento $K_s = 29.80$ (mg de dicloxacilina/L de medio)

Degradación de Ceftriaxona con *Pseudomonas aeruginosa* a 30°C

A	B	C	d=So-S	y	x
Tiempo (h)	Biomasa (UFC/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Sustrato (ceftriaxon) a mg/L)		(1/t)ln(s/so)	ln(1+ad)/t
0	1.30E+09	40	0	-0.01005034	0.5026812
1	9.86E+08	39.6	0.4	-0.03863534	0.2690087
12	1.45E+09	25.16	14.84	-0.02947531	0.20256027
16	7.43E+09	24.96	15.04	-0.05213098	0.18839534
20	3.75E+10	14.1012	25.8988	-0.08319971	0.16878594
24	5.73E+10	5.4308	34.5692	-0.06129804	0.1133243
36	6.20E+10	4.4024	35.5976	-0.06267881	0.10276841
40	6.44E+10	3.26	36.74	-0.05902173	0.09359556
44	6.53E+10	2.98	37.02	-0.05776227	0.08605998
48	6.83E+10	2.5	37.5	-0.05761024	0.07969063
52	6.92E+10	2	38	-0.05516855	0.07408099
56	7.02E+10	1.8211	38.1789	-0.05142103	0.06698285
62	7.24E+10	1.65	38.35	-0.05162752	0.06496197
64	7.43E+10	1.4692	38.5308	-0.04951171	0.06117415
68	7.52E+10	1.38	38.62	-0.04802455	0.057818
72	8.04E+10	1.26	38.74	-0.04687167	0.05481668
76	8.22E+10	1.135	38.865		

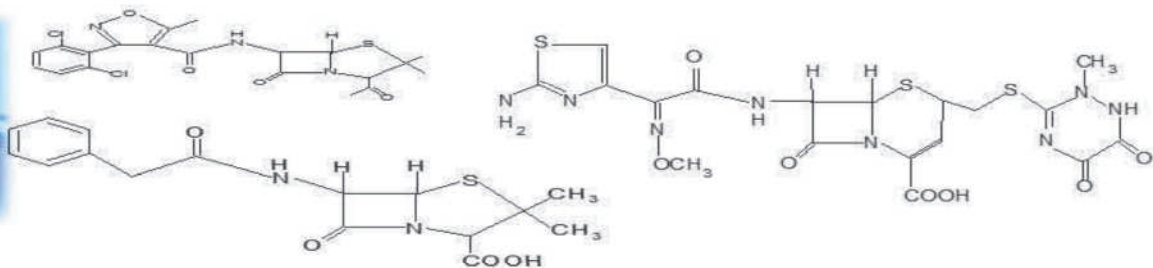


a=(Yx/s)/Xo	1.63E+00
b=	0.090861845
C=	0.063323489
Yx/sKs=(Xo+Yx/s*So)/(b-1)	-94825200941
Ks=((1/a)+So)/(b-1)	-44.67133916
mM=	-0.069652218

Factor de rendimiento del sustrato en producto $Yx/s = 2 \times 10^9$ UFC/mg de ceftriaxona

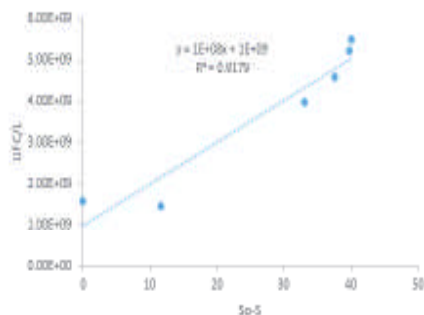
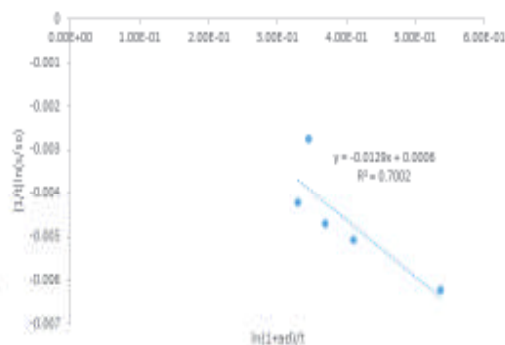
Velocidad específica máxima de crecimiento $\mu_m = 0.0696(1/h)$

Concentración del sustrato a una velocidad específica de crecimiento $K_s = 44.67$ (mg de ceftriaxona/L de medio)



Degradación de Ceftriaxona con consorcio a 30°C

A	B	C	y	x	
Tiempo (h)	Biomasa (UFC/L de consorcio)	Sustrato (ceftriaxon a mg/L)	d=So-S	(1/t)ln(s/so)	ln(1+ad)/t
0	1.58E+09	2140	0	-0.00273645	3.45E-01
2	1.45E+09	2128.32	11.68	-0.00622577	5.36E-01
2.5	3.98E+09	2106.95	33.05	-0.00507145	4.11E-01
3.5	4.59E+09	2102.35	37.65	-0.00469	3.70E-01
4	5.25E+09	2100.2278	39.7722	-0.004193	3.30E-01
4.5	5.52E+09	2100	40		

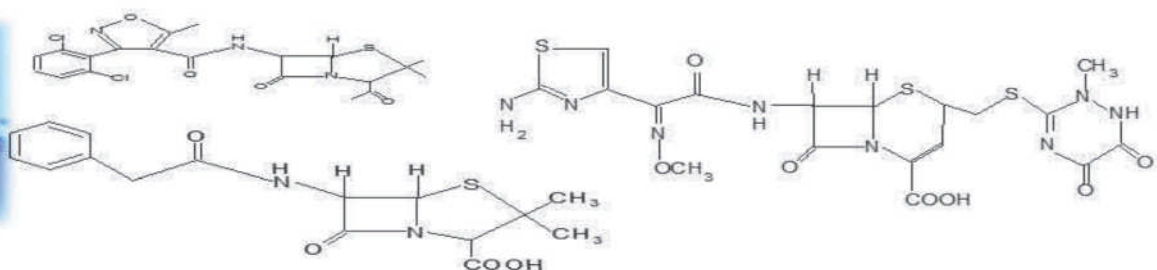


a=(Yx/s)/Xo	8.52E-02
b=	-0.014881099
C=	-0.00055757
Yx/sKs=(Xo+Yx/s*So)/(b-1)	-2.85529E+11
Ks=((1/a)+So)/(b-1)	-2120.181585
mM=	0.000549394

Factor de rendimiento del sustrato en producto $Yx/s = 1 \times 10^8$ UFC/mg de ceftriaxona

Velocidad específica máxima de crecimiento $\mu_m = 0.00054$ (1/h)

Concentración del sustrato a una velocidad específica de crecimiento $K_s = 2120.18$ (mg de ceftriaxona/L de medio)



ANEXO 7: Artículo publicado en una versión impresa

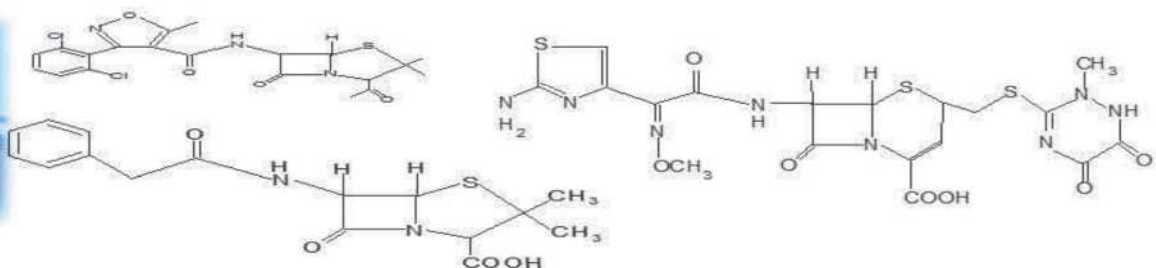
Dicloxacillin Degradation with Free-Living Bacteria

E. Rivera-Gutiérrez, J. J. Ramírez-García, Sergio H. Pavón Romero, Macario Morales Rodríguez, A. Ramírez-Serrano, et al.

Water, Air, & Soil Pollution
An International Journal of
Environmental Pollution

ISSN 0049-6979
Volume 231
Number 2

Water Air Soil Pollut (2020) 231:1-13
DOI 10.1007/s11270-020-4456-7



Water Air Soil Pollut (2020) 231: 87
<https://doi.org/10.1007/s11270-020-4456-7>

Dicloxacillin Degradation with Free-Living Bacteria

E. Rivera-Gutiérrez · J. J. Ramírez-García · Sergio H. Pavón Romero ·
Macario Morales Rodríguez · A. Ramírez-Serrano · A. Jiménez-Marín



Received: 20 September 2019 / Accepted: 5 February 2020 / Published online: 14 February 2020
© Springer Nature Switzerland AG 2020

Abstract Environmental problems such as bacterial resistance have been generated by indiscriminate use of antibiotics, because free-living bacteria have a great ability to adapt to unfavorable environmental, since they develop several defense mechanisms such as genetic resistance, in response of being in contact with this contaminant present in its environment, which is why they acquire special importance due to its biodegradation capacity. In this study, the biodegradation of 40 µg/

mL of dicloxacillin with free-living bacteria was evaluated. Wastewater samples were collected from a hospital, from which five resistant strains were isolated, characterized, and identified: *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, and two different strains of *Escherichia coli*, being the last one, the most resistant according to the determination of the minimum inhibitory concentration, so degradation was carried out with this strain and in bacterial consortium. Biodegradation was quantified by high-resolution liquid chromatography (HPLC) and the results showed that both the consortium and *Pseudomonas aeruginosa* are highly efficient because the degradation of the antibiotic was 100%, in a time of 3.5 h and 52 h, respectively, and even metabolize the degradation products.

E. Rivera-Gutiérrez · J. J. Ramírez-García (✉) ·
S. H. Pavón Romero · M. M. Rodríguez ·
A. Ramírez-Serrano
Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón esquina paseo Toluca S/N, Colonia Residencial Colón, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México
e-mail: jjramirezg@uaemex.mx

E. Rivera-Gutiérrez
e-mail: esmerg0915@yahoo.com.mx

S. H. Pavón Romero
e-mail: shpavonr@uaemex.mx

M. M. Rodríguez
e-mail: mmmoralesr@uaemex.mx

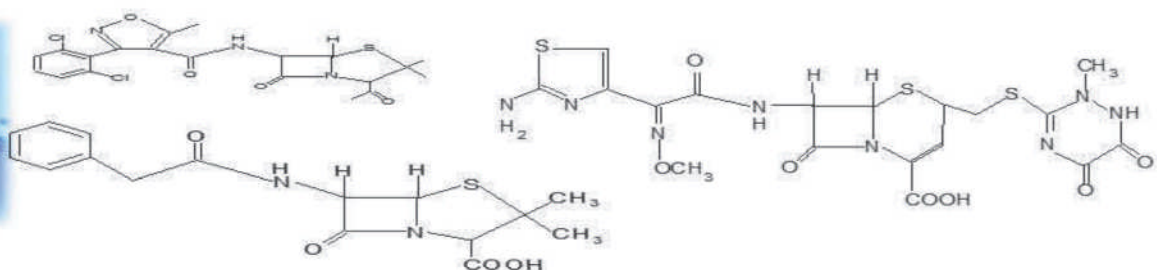
A. Ramírez-Serrano
e-mail: aramirez75@hotmail.com

A. Jiménez-Marín
Laboratorio Nacional de Biodiversidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria, C.P. 04510 Ciudad de México, México
e-mail: andrea.jimenez@ib.unam.mx

Keywords Biodegradation · Dicloxacillin · *Pseudomonas aeruginosa* · Bacterium · Bacterial consortium

1 Introduction

Today, there is a great awareness about environmental problems caused by different chemical compounds such as antibiotics, which have provided expectations to deal with several bacterial infections; however, these are governed by criteria of biological evolution and immediately show resistance. An example of this is dicloxacillin (Fig. 1), a beta-lactam antibiotic, derived from penicillin, used for the treatment of infections caused by staphylococci resistant to benzyl-penicillins.



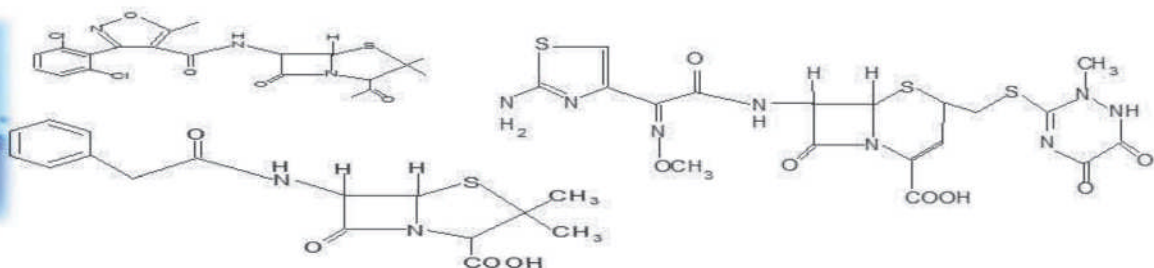
ANEXO 8: Carta de envío del segundo artículo

Water, Air, & Soil Pollution Dicloxacillin degradation with free-living bacteria

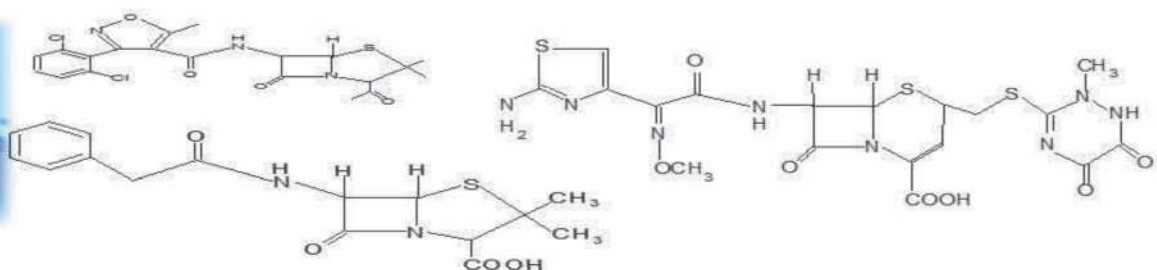
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	WATE-D-20-02145	
Full Title:	Degradation of penicillin G with a bacterial consortium	
Article Type:	Full research paper	
Keywords:	Biodegradation; Penicillin G; Pseudomonas aeruginosa; Bacterium; Bacterial consortium	
Corresponding Author:	Jorge Ramirez, Dr. Universidad Autonoma del Estado de Mexico Toluca, Estado de México MEXICO	
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autonoma del Estado de Mexico	
First Author:	Esmeralda Rivera	
Order of Authors:	Esmeralda Rivera	
	Jorge Ramirez, Dr.	
	Sergio H. Pavón	
	Macario Morales	
	Armando Ramirez	
Funding Information:	CONACYT (215997)	Dr. Jorge Ramirez
	CONACYT (429367)	M. en C. Esmeralda Rivera
Abstract:	<p>Free-living bacteria have developed various defense mechanisms against pollutants in their habitat, in order to survive and proliferate in a hostile environment, making them ideal candidates for the bioremediation of their environment. Microbial communities play an important role in biodegradation due to their metabolic diversity and if they are also native bacteria, they show superiority in the fight against toxicity. It is for this reason that this work evaluated the degradation of 1000 µg/mL of penicillin G with free-living bacteria. A bacterial consortium consisting of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i> and two strains of <i>Escherichia coli</i> was used. For this, the minimum inhibitory concentration was first determined to each strain, which showed that the most penicillin resistant strain is <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p> <p>Penicillin biodegradation is monitored and quantified by High Resolution Liquid Chromatography (CLAR). Results showed that the microbial consortium degraded 100% of the antibiotic in 45 minutes. In addition, it was observed that these bacteria also act on the metabolites formed, as they eliminate 83.3% of these in 72 hours, demonstrating their high efficiency.</p>	
Additional information:		
Question	Response	
<p>“PLEASE READ THIS ALERT BEFORE YOU BEGIN”</p> <p>Water, Air and Soil Pollution will not tolerate unethical submission and/or attempted publication practices. This applies to all authors listed on the articles. We have both plagiarism-detection software and other methods to detect</p>	Yes	

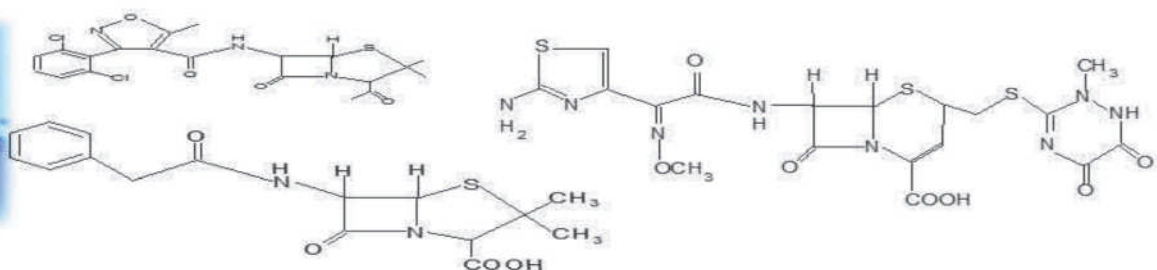
Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation



<p>such practices to ensure the highest publication standards. Serious consequences, including Informing the author's institution, may result from unethical behaviour. If you require more information about what constitutes unethical behaviour, including what constitutes plagiarism, please see the journal's author instructions on the journal's homepage before you submit to the journal. If you have read and understood this alert, please indicate YES in the response box.</p>	
<p>Have you read the 'Letter from the Editor-in-Chief' and the full journal author instructions, located at the journal homepage www.springer.com/11270?</p>	Yes
<p>Has this material (or data) been literally or substantially submitted (or will it be) for simultaneous consideration in another publication in English or another language? If Yes, do not continue with the submission.</p>	No
<p>Has this material (or data) been literally or substantially published elsewhere in English or another language? If Yes, do not continue with the submission.</p>	No
<p>Once the article is submitted for review, no changes in authorship, the order of authors, or designation of the corresponding author will be permitted.</p> <p>Have all authors been actively involved in making a substantial scholarly contribution to the design and completion of this research, interpretation of data and conclusions, assisted in drafting and revising the manuscript, and read and approved this submission? (YES/NO). If NO, please do not submit your manuscript. Please review the authorship guidelines on the journal's homepage for guidance.</p>	yes
<p>Does the article report existing science applied to a local situation?</p>	No
<p>If yes, how is this research significant to furthering worldwide knowledge on this topic</p>	N/A
<p>Is the article of local, national or</p>	International



international value? (Choose one.)	
Please provide the name, affiliation and address, and e-mail address of three potential reviewers who do not pose a conflict of interest. Note that this information will be checked to ensure it is credible.	<p>Dra. Adela I. Ortiz López Department of Processes and Technologies Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa irmene@correo.cua.uam.mx Her research line is Environmental Biotechnology.</p> <p>Dra. Katy Juárez Department of Cellular Engineering and Biocatalysis Universidad Nacional Autónoma de México. katy@ibt.unam.mx Her line of research is bioremediation of sites contaminated by heavy metals and hydrocarbons</p> <p>Dra. Floria Roa Gutiérrez Department of Chemistry Instituto Tecnológico de Costa Rica froa@tec.ac.cr Expert in Emerging Organic Pollutants Monitoring, Passive water sampling, Project management, Environmental policy development, Solid waste and hazardous waste management. Greenhouse gases (GHG) emissions estimation and mitigation. Environmental monitoring. Organic synthesis hands-on experience, including spectroscopic analysis.</p>



1 **Degradation of penicillin G with a bacterial consortium**

2 E.-Rivera Gutiérrez, J.J.-Ramírez-García*, Sergio H. Pavón Romero, Macario Morales Rodríguez,
3 A. Ramírez-Serrano

4 *Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química, Paseo Colón esquina paseo Tolloca S/N,*
5 *Colonia Residencial Colón, C.P.50120. Toluca, Estado de México. Tel/Fax: +52 (722) 2173890, Ext.113.*

6 *E-mail: esmerg0915@yahoo.com.mx, jramirez@uaemex.mx*, shpavonr@uaemex.mx*

7 *mmoralesr@uaemex.mx, aramirez75@hotmail.com*

8 **Abstract**

9 Free-living bacteria have developed various defense mechanisms against pollutants in their habitat, in order to
10 survive and proliferate in a hostile environment, making them ideal candidates for the bioremediation of their
11 environment. Microbial communities play an important role in biodegradation due to their metabolic diversity and
12 if they are also native bacteria, they show superiority in the fight against toxicity. It is for this reason that this
13 work evaluated the degradation of 1000 µg/mL of penicillin G with free-living bacteria. A bacterial consortium
14 consisting of *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* and two strains of *Escherichia*
15 *coli* was used. For this, the minimum inhibitory concentration was first determined to each strain, which showed
16 that the most penicillin resistant strain is *Pseudomonas aeruginosa*.
17 Penicillin biodegradation is monitored and quantified by High Resolution Liquid Chromatography (CLAR).
18 Results showed that the microbial consortium degraded 100% of the antibiotic in 45 minutes. In addition, it was
19 observed that these bacteria also act on the metabolites formed, as they eliminate 83.3% of these in 72 hours,
20 demonstrating their high efficiency.

21

22 **Keywords:** Biodegradation; Dicloxacillin; *Pseudomonas aeruginosa*; Bacterium; Bacterial consortium

23

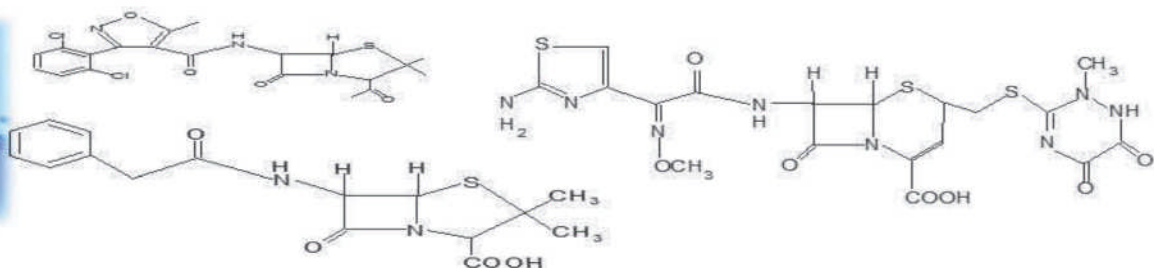
24 * *correspondence autor, Email: jramirez@uaemex.mx*

25

26

27

28



ANEXO 9: Constancia de congreso



ciencias de la tierra, u.a.z.
ciencias y tecnología - geología - ciencias ambientales

**La Academia Nacional de Ciencias Ambientales
y la Universidad Autónoma de Zacatecas
Francisco García Salinas
a través de
la Unidad Académica de Ciencias de la Tierra
y la Licenciatura en Ciencias Ambientales**

Otorgan la presente

CONSTANCIA

A: *Rivera Gutiérrez Esmeralda, Ramírez García Jorge Javier, Pavón Romero Sergio Humberto, Morales Rodríguez Macario y Armando Ramírez Serrano.*

Por: Su participación como Ponente con el trabajo: **"BIODEGRADACIÓN DE PENICILINA EN AGUA RESIDUAL DE UN HOSPITAL CON BACTERIAS DE VIDA LIBRE."** en el marco del XVII Congreso Internacional, XXVIII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, celebrado en la ciudad de Zacatecas, Zac., del 11 al 15 de junio de 2018

Zacatecas, Zac., 15 de junio 2018

Dr. Alberto Pereira Corona
Presidente ANCA

Dr. Santiago Valle Rodríguez
Secretario ANCA
Coordinador General Congreso 2018

