



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

“AISLAMIENTO DE BACTERIAS RESISTENTES AL METRONIDAZOL EN AGUA RESIDUAL DE UN EFLUENTE HOSPITALARIO, PARA SU USO EN LA REMOCIÓN DEL ANTIBIÓTICO”

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

**PRESENTA:
MARTHA MANJARREZ OLVERA
NO. CONTROL:
M22280262**

**DIRECTORA DE TESIS:
M. EN C. MARIBEL VERÓNICA ALBITER LÓPEZ**

**CODIRECTORA DE TESIS:
DRA. MA. GUADALUPE MACEDO MIRANDA**

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

AGOSTO DE 2024



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Toluca
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Metepec, Edo. de México, 02/julio/2024
DEPI-3200- 200/2024

**MARTHA MANJARREZ OLVERA
CANDIDATO AL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL
PRESENTE**

De acuerdo con los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México y las disposiciones en este Instituto, habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado "AISLAMIENTO DE BACTERIAS RESISTENTES AL METRONIDAZOL EN AGUA RESIDUAL DE UN EFLUENTE HOSPITALARIO, PARA SU USO EN LA REMOCIÓN DEL ANTIBIÓTICO ", la División de Estudios de Posgrado e Investigación de este Instituto, concede la Autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
"Educación, Integración y Ciencia"

**JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN**



ccp. Archivo
JLGR/EAH



Av. Tecnológico S/N, Col. Agrícola Bellavista, Metepec, Edo. de México, C.P. 52149 Tels.

Dirección:

7222087205, Subd. Académica: 7222087207, Subd. de Planeación: 7222087206, Subd.

Administrativa:

7222087208, correo: 7222087200@itec.mx, 7222087201@itec.mx, 7222087202@itec.mx, 7222087203@itec.mx, 7222087204@itec.mx, 7222087205@itec.mx, 7222087206@itec.mx, 7222087207@itec.mx, 7222087208@itec.mx



2024
Felipe Carrillo
PUERTO
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
TEL: 5624



Metepec, Edo. de México, 24/junio/2024

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
P R E S E N T E

Por este medio comunicamos a usted que la comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada "AISLAMIENTO DE BACTERIAS RESISTENTES AL METRONIDAZOL EN AGUA RESIDUAL DE UN EFLUENTE HOSPITALARIO, PARA SU USO EN LA REMOCIÓN DEL ANTIBIÓTICO", que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Maestro en Ciencias de la Ingeniería Ambiental presenta el C. MARTHA MANJARREZ OLVERA con número de control M22280262 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad para proceder a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E

M. en C. MARIBEL VERÓNICA ALBITER
LÓPEZ
DIRECTOR DE TESIS

Dra. MA. GUADALUPE MACEDO MIRANDA
CODIRECTOR DE TESIS

Dra. MARÍA SONIA MIREYA MARTÍNEZ
GALLEGOS
REVISOR DE TESIS

Dra. SONIA ÁLVAREZ GARCÍA
REVISOR DE TESIS

ccp. Archivo
EAH



Av. Tecnológico 3/N, Col. Agrícola Bellavista, Metepec, Edo. de México, C.P. 52149 Tels.
Dirección: 7222087206, Subd. Académica: 7222087207, Subd. de Planeación: 7222087206, Subd.
Administrativa: 7222087206



2024
Felipe Carrillo
PUERTO
RECONOCIMIENTO A LA CALIDAD
PROCESOS PRODUCTIVOS
INTEGRACIÓN Y DESARROLLO
DE VALOR

AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento otorgado mediante el Proyecto 14052.22_P titulado Determinación de las variables de influencia en la remoción de contaminantes emergentes Metronidazol, utilizando zeolita natural modificada con el surfactante HDTMA-C1, al Laboratorio de Investigación en Ingeniería ambiental del Instituto Tecnológico de Toluca por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A mi comité revisor M en C Maribel Albiter López, Dra. Ma. Guadalupe Macedo Miranda, Dra. María Sonia Martínez Gallegos y Dra. Sonia Álvarez García por todas las enseñanzas, aportaciones y atenciones para lograr materializar este trabajo, mil gracias por compartir sus conocimientos.

A la Dra. Yanin Islas Barrios y al Dr. Carlos Fernández Rendon académicos de la Universidad Autónoma Metropolitana, UAM Iztapalapa, Laboratorio Divisional de Biología Molecular por la atención y colaboración en la prueba para identificación de cepas bacterianas por PCR.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia, amigos y compañeros ya que es fruto del apoyo y respaldo de todos ellos. Para quienes por razones naturales de la vida no se encuentran ya presentes, pero siguen donde se les recuerda en la mente y corazón.

RESUMEN

El metronidazol es uno de los de los fármacos más utilizados, para tratar infecciones causadas por bacterias anaerobias y protozoos, está indicado para uso humano y veterinario. Debido a su alta solubilidad, toxicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad y baja degradabilidad, su acumulación provoca efectos adversos en los seres humanos y el entorno ecológico.

Por lo anterior, en este trabajo se estudió un método de biodegradación para el metronidazol, para ello, se implementó y confirmó una técnica para su cuantificación por UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph). Se empleó un cromatógrafo de líquidos Waters Acquity UPLC y una columna de separación Acquity UPLC BEH C18; las condiciones cromatográficas: fase móvil agua: metanol 95:5, flujo de 0,5 mL/min y volumen de inyección de 8 μ L; el tiempo de retención del metronidazol fue de 1.62 min. La adecuabilidad del sistema cumplió con todos los criterios de aceptación. El sistema en el intervalo de 0.2 a 20 mg/L de metronidazol y el método para el intervalo de 0.5 a 15 mg/L de metronidazol, son lineales, ya que los valores del coeficiente de determinación (R^2) fueron de 0.9999 y 0.9998 respectivamente. Se confirmó la exactitud del método, el porcentaje de recobro para las diferentes concentraciones evaluadas de muestras adicionadas con el antibiótico está dentro de ± 20 %. La precisión se evaluó bajo condiciones de repetibilidad, se cumplió con el criterio de aceptación $CV \leq 2$ % (rango de CV encontrados: 0.04 a 0.22 %). Los límites de detección y cuantificación para el método fueron de 0.005 mg/L y 0.015 mg/L respectivamente.

Se aislaron tres cepas bacterianas de un efluente hospitalario resistentes a Metronidazol, identificándolas por PCR como *Acinetobacter sp*, *Comamonas aquatica* y *Pseudomonas sp*. Se evaluó la capacidad de biodegradación de las tres cepas para la remoción de metronidazol en una matriz acuosa, empleando al fármaco como fuente de carbono.

Los resultados de la biodegradación fueron de 4 a 6 % con *Acinetobacter sp*, *Comamonas aquatica*, *Pseudomonas sp* y en consorcio para una concentración de 250 mg/L de Metronidazol, requiriéndose de periodos largos de tiempo (15 días aproximadamente). En concentraciones de 125 mg/L y 500 mg/L con la cepa *Acinetobacter sp*, se encontraron valores de degradación de 8 % en 8 días con inóculo 0.5 Mc Farland y de 9 % en tres días con el doble de inóculo respectivamente. Para concentraciones de 10 mg/L de metronidazol los valores promedio de degradación disminuyeron a 4 % sin efecto de la cantidad de inóculo. La incorporación de glucosa (5.9 mM) como una fuente adicional de carbono no beneficio el proceso de degradación.

ABSTRACT

Metronidazole is one of the most widely used drugs to treat infections caused by anaerobic bacteria and protozoa and is indicated for human and veterinary use. Due to its high solubility, toxicity, mutagenicity, carcinogenicity and low degradability, its accumulation causes adverse effects on humans and the ecological environment.

Therefore, a biodegradation method for metronidazole was studied in this work, for which a technique for its quantification by UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph) was implemented and confirmed. A Waters Acquity UPLC liquid chromatograph and an Acquity UPLC BEH C18 separation column were used; chromatographic conditions: mobile phase water: methanol 95:5, flow rate of 0.5 mL/min and injection volume of 8 μ L; the retention time of metronidazole was 1.62 min. The suitability of the system met all acceptance criteria. The system in the range of 0.2 to 20 mg/L metronidazole and the method for the range of 0.5 to 15 mg/L metronidazole are linear, since the values of the coefficient of determination (R^2) were 0.9999 and 0.9998, respectively. The accuracy of the method was confirmed, the recovery percent for the different evaluated concentrations of samples spiked with the antibiotic is within ± 20 %. Accuracy was evaluated under repeatability conditions, the acceptance criterion $CV \leq 2\%$ was met (range of CV found: 0.04 to 0.22 %). The detection and quantification limits for the method were 0.005 mg/L and 0.015 mg/L, respectively.

Three bacterial strains resistant to Metronidazole were isolated from a hospital effluent and identified by PCR as *Acinetobacter sp*, *Comamonas aquatica* and *Pseudomonas sp*. The biodegradation capacity of the three strains was evaluated for the removal of Metronidazole in an aqueous matrix, using the drug as a carbon source.

The biodegradation results were 4 to 6 % with *Acinetobacter sp*, *Comamonas aquatica*, *Pseudomonas sp* and in consortium for a concentration of 250 mg/L of Metronidazole, requiring long periods of time (approximately 15 days). At concentrations of 125 mg/L and 500 mg/L with *Acinetobacter sp* strain, degradation values of 8 % were found in 8 days with 0.5 Mc Farland inoculum and 9 % in three days with double the inoculum respectively. For concentrations of 10 mg/L metronidazole, the average degradation values decreased to 4 % with no effect of inoculum amount. The incorporation of glucose (5.9 mM) as an additional carbon source did not benefit the degradation process.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. FUNDAMENTOS	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Marco Teórico	5
1.2.1. Contaminantes emergentes en las aguas residuales	5
1.2.2. Antibióticos	5
1.2.3. Metronidazol	8
1.2.4. Cuantificación de antibióticos por cromatografía de líquidos	9
1.2.5. Confirmación de métodos analíticos	9
1.2.6. Muestreo de aguas residuales	10
1.2.7. Caracterización de aguas residuales hospitalarias	11
1.2.8. Biorremediación	11
1.2.9. Tinción diferencial Gram	12
1.2.10. Medios de cultivo y pruebas bioquímicas	13
1.2.11. Identificación de bacterias por PCR	15
2. MÉTODO	15
2.1. Bosquejo del método	15
2.2. Metodología	16
2.2.1. Implementación del método para la cuantificación de metronidazol por UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph)	16
2.2.2. Confirmación del método para la cuantificación de metronidazol por UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph)	16
2.2.3. Muestreo de agua residual de un efluente hospitalario	18
2.2.4. Determinación de valores de temperatura, pH y conductividad en el agua residual del efluente hospitalario	18
2.2.5. Caracterización fisicoquímica del efluente hospitalario	18
2.2.6. Aislamiento de bacterias del agua residual resistentes al metronidazol	19
2.2.7. Identificación de las bacterias aisladas	19
2.2.8. Ensayos de biodegradación del metronidazol por las bacterias aisladas, en matriz acuosa	20
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
3.1. Implementación de cuantificación de metronidazol por UPLC	20

3.2. Confirmación del método para la cuantificación de metronidazol por UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph)	23
3.3. Muestreo y caracterización de efluente hospitalario	27
3.4. Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes al metronidazol.....	29
3.4.1. Caracterización morfológica	31
3.4.2. Tinción Gram.....	32
3.4.3. Pruebas enzimáticas.....	33
3.4.4. Medios selectivos	34
3.4.5. Pruebas Bioquímicas	35
3.5. Identificación de cepas aisladas por PCR.....	36
3.6. Pruebas de degradación de metronidazol.....	37
4. CONCLUSIONES	44
5. FUENTES CONSULTADAS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de contaminantes emergentes en aguas residuales	6
Tabla 2. Resultados de barrido rango UV VIS para Metronidazol	21
Tabla 3. Adecuabilidad del sistema	22
Tabla 4. Resultados de linealidad del sistema	23
Tabla 5 Resultados de Linealidad del método	24
Tabla 6. Curvas empleadas para límite de detección y cuantificación	25
Tabla 7. Límite de detección y cuantificación teóricos	25
Tabla 8. Límite de detección y cuantificación prácticos	26
Tabla 9. Resultados Exactitud y Precisión	26
Tabla 10. Resultados de repetibilidad	27
Tabla 11. Resultados de caracterización fisicoquímica del efluente hospitalario.....	28
Tabla 12. Etapas para el aislamiento de bacterias de efluente hospitalario resistentes al MTZ	29
Tabla 13. Aislamiento de cepas resistentes a concentración de 500 mg/L.....	31
Tabla 14. Resultado de pruebas enzimáticas	34
Tabla 15. Crecimiento en medios selectivos	35
Tabla 16. Resultados de pruebas bioquímicas	35
Tabla 17. Identificación molecular de cepas aisladas de agua residual hospitalaria resistentes a Metronidazol.....	36
Tabla 18. Degradación de MTZ con <i>Acinetobacter sp</i>	39
Tabla 19. Degradación de MTZ con <i>Comamonas aquatica</i>	39
Tabla 20. Degradación de MTZ con <i>Pseudomonas sp</i>	40
Tabla 21. Degradación de MTZ con el consorcio bacteriano.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas, vías y riesgo de exposición a antibióticos en el ambiente.	7
Figura 2. Ingreso de los medicamentos desde los hogares a los ecosistemas.	8
Figura 3. Diferencia en pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.	13
Figura 4. Bosquejo del método para la biodegradación de Metronidazol por bacterias aisladas de un efluente hospitalario.....	15
Figura 5. Espectros de Barrido en UV-Vis para las soluciones de 5 y 25 mg/L de Metronidazol....	21
Figura 6. Cromatograma de solución de Metronidazol 5 mg/L.....	22
Figura 7. Ubicación del punto de muestreo.....	28
Figura 8. Tinción Gram de las cepas aisladas.....	32
Figura 9. Resultados de tinción Gram.....	33
Figura 10. Densidad óptica para cepas aisladas con 250 mg/L MTZ.....	38
Figura 11 Degradación de MTZ a 250 mg/L por las cepas aisladas.....	41
Figura 12 Experimentos con <i>Acinetobacter sp</i> a diferentes concentraciones de MTZ, SB y Glucosa como fuente adicional de carbono.....	42
Figura 13 Experimentos con <i>Acinetobacter sp</i> ,10 mg/L de MTZ, variando cantidad de inóculo y glucosa como fuente adicional de carbono.....	43

INTRODUCCIÓN

La crisis en el suministro de agua potable es una seria amenaza para la mayoría de las poblaciones humanas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente dos tercios de la población mundial estará en condiciones críticas en términos de suministro de agua potable para 2025.

Los contaminantes emergentes CE son sustancias que pueden causar efectos a la ecología y a la salud humana, a pesar de que sus concentraciones sean bajas ($\mu\text{g/L}$ y ng/L). Se agrupan en diferentes clasificaciones: fármacos, sustancias perfluoroalquiladas, subproductos de desinfección, plaguicidas, productos de cuidado personal, antiespumantes, retardantes de llama, nano partículas, anticorrosivos y plastificantes (Meléndez et al., 2020). La presencia de CE en los recursos hídricos es una amenaza potencial para el medio ambiente. Los productos farmacéuticos son uno de los CE más importantes en recursos hídricos al tratarse de moléculas complejas resistentes que presentan un bajo o nulo rendimiento de remoción en las plantas de tratamiento de aguas residuales con tratamientos convencionales (Martínez et al., 2020).

La presencia de fármacos y sus productos de degradación se ha evidenciado ya en diferentes matrices ambientales, principalmente en agua, provienen de la industria farmacéutica, los hogares y hospitales. Los efluentes hospitalarios pueden contribuir entre un 0.2 a 65 % a la descarga total que llega a las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) municipales (Castro et al., 2021). El metronidazol es uno de los fármacos más utilizados a nivel mundial, aparece en la lista de medicamentos esenciales de la organización mundial de la salud. Es un antibiótico empleado para tratar infecciones causadas por bacterias anaeróbicas, protozoos como tricomoniasis, vaginosis, amebiasis y gingivitis (WHO., 2021). Se ha encontrado en concentraciones residuales de 1 a 10 ng/L en aguas superficiales y aguas residuales, que se originan de la producción del metronidazol y su uso. Debido a su alta solubilidad, baja degradabilidad, toxicidad, mutagenicidad potencial y carcinogenicidad; su acumulación provoca efectos adversos en los seres humanos y el entorno ecológico. Por lo tanto, la eliminación de metronidazol de las aguas residuales es de gran importancia ambiental.

En la mayoría de los casos, los antibióticos consumidos por los humanos van a parar a las aguas residuales. Dichas aguas normalmente se depuran en PTAR, pero las plantas de tratamiento no fueron diseñadas para eliminar antibióticos, por lo que estos compuestos en algunos casos siguen

estando presentes en los efluentes. Esto puede resultar peligroso para el ser humano, los animales y para los ecosistemas. Las concentraciones en las que se pueden encontrar antibióticos en matrices ambientales pueden afectar de manera negativa la vida de especies que las habitan (Martínez et al., 2020).

En este proyecto se propone una alternativa de degradación de metronidazol por medio de bacterias que han desarrollado resistencia al fármaco, aislándolas de un efluente hospitalario, en donde la exposición de las bacterias al antibiótico es frecuente.

1. FUNDAMENTOS

1.1. Antecedentes

Los antibióticos residuales que se encuentran en ambientes acuáticos conducirán a la aparición de resistencia entre cepas objetivo y no objetivo de microorganismos. Además, se expande la variedad de microorganismos resistentes y la transferencia de material genético entre bacterias multirresistentes (Hena et al., 2020).

El impacto negativo de los antibióticos en las comunidades microbianas naturales podría incluir acciones bactericidas y bacteriostáticas, estas acciones provocan la pérdida o destrucción de algunos grupos microbianos involucrados en actividades cruciales del ecosistema (efecto directo). El tratamiento fisicoquímico no es capaz por sí solo de eliminar esos antibióticos por completo, son en consecuencia transferidos a los sistemas de agua receptora. El efecto dañino más significativo de los antibióticos en el medio ambiente es su impacto en organismos acuáticos, lo que lleva a un sistema ecológico desequilibrado (Aboudalle et al., 2021).

Se ha detectado metronidazol en muestras de vertederos, efluentes de hospitales, aguas superficiales y agua potable en todo el mundo. Un estudio realizado en vertederos en Kumasi, Ghana, informó altas concentraciones de hasta $18,25 \pm 7,92$ mg/L para metronidazol, el método de cuantificación reportado para el fármaco estableció en rango lineal de 0.2 – 10 mg/ L, con un límite de detección de 0.0314 mg/L y límite de cuantificación de 0.0952 mg/L (Otoo., 2022).

Pocos estudios se han centrado en la degradación de antibióticos y menos aún han investigado microorganismos que pueden usarlos como fuentes de carbono y energía. El conocimiento actual de la degradación biológica distingue entre organismos capaces de modificar (bio-transformación), escisión (biodegradación) o mineralización de estos microcontaminantes. Se ha examinado la biodegradación y biotransformación de sulfonamidas, trimetoprima, aminoglucósidos, anfenicoles tetraciclinas, betalactámicos, macrólidos, quinolonas, antibióticos (oxazolidinonas, nitroimidazoles y otros) (Reis et al., 2020).

Entre otros estudios consultados se tiene reportado el uso de microalgas como tecnología verde siendo una opción viable para eliminar los antibióticos del agua. Además, los cultivos de microalgas mitigan CO₂ atmosférico, las microalgas son conocidas por eliminar eficientemente compuestos

xenobióticos del agua, incluida una gama de productos farmacéuticos. Se ha investigado la capacidad de eliminación de MTZ por *Chorella vulgaris* y los mecanismos dominantes implicados en la eliminación de este fármaco (Hena et al., 2020).

Una de las novedosas estrategias para mejorar la mineralización de (MTZ), un antibiótico recalcitrante es combinar un proceso de oxidación avanzado con un proceso biológico avanzado, que consiste en el desarrollo de un nuevo proceso combinado de acoplamiento electro-Fenton y un proceso biológico. Para biotratamiento, consideraron diversas estrategias de bioaumento, bioaclimatación y bioestimulación solas o combinadas (Aboudalle et al., 2021).

Se ha encontrado también que la biodegradación co-metabólica domina la eliminación de antibióticos durante el proceso de nitrificación en condiciones aeróbicas, que es asociado con bacterias oxidantes de amoníaco (AOB) y oxidantes de nitrilo (NOB). Se establece que la enzima amoníaco monooxigenasa (AMO) de AOB tiene una amplia gama de sustratos y puede potencialmente degradar los antibióticos durante el proceso de oxidación del amoníaco (Yan et al., 2022).

El análisis de antibióticos en muestras ambientales no es nuevo y, técnicas analíticas como la espectrofotometría UV, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) y espectrometría de masas en tándem (MS) se utilizan para la identificación y cuantificación de antibióticos en aguas superficiales, lodos de depuradora, aguas subterráneas, suelo, estiércol, sedimentos, etc. Todas estas técnicas tienen sus propias ventajas y desventajas y una de las desventajas más comunes es el costo del análisis por muestra. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un método simple que sea una técnica de cromatografía líquida económica, rápida y ecológica (Sharma et al., 2022).

1.2. Marco Teórico

1.2.1. Contaminantes emergentes en las aguas residuales

El aumento de la población, el desarrollo tecnológico y económico conduce a un incremento en la contaminación ambiental como causa de un desarrollo no sustentable. La descarga de aguas residuales contaminadas, la destrucción de áreas verdes y sobreexplotación de recursos hídricos causada por prácticas agrícolas, acuícolas e industriales intensivas, han llevado al deterioro a largo plazo de la calidad de agua de ríos, lagos y mares, causando daños en los ecosistemas e incluso la salud humana (Yang et al., 2022).

Los contaminantes del agua son muy heterogéneos tanto por su diversidad, naturaleza, comportamiento e importancia, así como por sus efectos a los ecosistemas. Los contaminantes orgánicos emergentes (COE) son sustancias químicas antropogénicas (productos farmacéuticos, productos para la higiene y cuidado personal, pesticidas, perfluoroalquilos y polifluoroalquilos) que han sido detectados en el medio ambiente debido a los avances en las técnicas analíticas. El carbono es un elemento que designa muchos compuestos orgánicos contaminantes en el agua; estos contaminantes pueden estar disueltos o dispersos en el agua, provienen de desechos domésticos, agrícolas, industriales y de la erosión del suelo. Los contaminantes orgánicos consumen el oxígeno disuelto en el agua y afectan a la vida acuática (Reberski et al., 2022).

1.2.2. Antibióticos

Los antibióticos son fármacos creados para tratar enfermedades bacterianas, sintetizados a partir del descubrimiento de la penicilina, pudiendo de esta forma hacer frente al tratamiento de enfermedades bacterianas que, en su momento, eran incurables. Además del uso humano, los antibióticos son usados ampliamente en veterinaria para controlar enfermedades causadas por infecciones bacterianas y como estimuladores de crecimiento (Meléndez et al., 2020).

Los antibióticos son compuestos necesarios en las áreas de la medicina, la agricultura, la acuicultura y la cría de animales. Durante las últimas décadas, el consumo de antibióticos prescritos y no prescritos se ha incrementado a nivel mundial. Enormes cantidades de antibióticos y sus metabolitos se liberan en las aguas residuales debido a su absorción incompleta en los organismos vivos. La presencia de antibióticos incluso a niveles de nano o microgramos en ambientes acuáticos

representa un riesgo sustancial para los seres humanos y los organismos acuáticos. La contaminación del agua debido a estos productos puede empeorar por la presencia de bacterias y genes resistentes a los antibióticos (Gul et al., 2022).

Aunque los antibióticos se usan ampliamente en todo el mundo, los datos en sus productos de transformación la estabilidad y el destino es limitado. Hay definitivamente menos información que para los antihistamínicos y opioides. Sin embargo, algunos derivados de metronidazol, sulfametoxazol y tetraciclinas se han investigado. Por ejemplo, se encontró que el hidroximetronidazol era hidrolíticamente estable a pH 4 y 7 a 50 °C durante 5 días, lo que significa que su tiempo de vida media puede estimarse como superior a 1 año a 25 °C (Maculewicz et al., 2022).

Estudios realizados en América Latina reportan concentraciones altas de productos farmacéuticos en aguas residuales, se encontraron un total de 51 contaminantes emergentes. Ecuador fue el país con mayor número de muestras (11), seguido de México (7), Brasil y Colombia (3), Argentina y Venezuela (1). En la Tabla 1 se muestran las concentraciones reportadas para algunos de los contaminantes pertenecientes al grupo de productos farmacéuticos.

Tabla 1. Concentración de contaminantes emergentes en aguas residuales (Peña et al., 2019)

Clase de CE	Contaminante Emergente	Concentración ng/L		
		Mínimo	Máximo	Promedio
Productos	Cafeína	900	5 597 000	910 630.77
Farmacéuticos	Miconazol	2.6	13.9	10.13
	Metroprolol	210	3 100	1 445
	Metronidazol	670	1 980	1 325
	Ciprofoxacino	750	13 550	7 150
	Eritromicina	10	720	128.75
	Ibuprofeno	220	13 000	2 896
	Ketoprofeno	260	480	370
	Naproxeno	500	16 650	5 072.53

La información anterior deja clara la presencia de estos contaminantes en el ambiente y la variada concentración en la que se pueden encontrar aguas residuales confirmando así la necesidad de seguir estudiándolos y trabajar en alternativas para removerlos de los ecosistemas.

Según la molécula, la excreción urinaria de los antibióticos ingeridos como compuesto original o metabolito activo oscila entre el 5 % y más del 70 % (Imwen et al., 2022).

Estos compuestos se liberan en el ambiente a través de los residuos de fabricación, hospitales, PTAR, heces y orina y, el desecho inadecuado de los fármacos no utilizados. Una fuente importante de liberación de fármacos y productos de metabolización de estos, proviene de los residuos producidos por animales de compañía. Los cuerpos de agua superficiales son los más susceptibles a la contaminación, siendo estos superados por su capacidad de resiliencia, alcanzando en ocasiones concentraciones similares a las aguas residuales. Las aguas de los mantos freáticos también se ven afectadas por estos contaminantes y en consecuencia también el suelo, existe un riesgo indirecto a la salud humana debido principalmente a la generación de resistencia bacteriana. Las bacterias, al estar en contacto con los antibióticos continuamente, activan genes de resistencia (ARG) y estos se pueden transferir entre las bacterias ambientales y patógenas estas interacciones se ejemplifican en la figura 1.

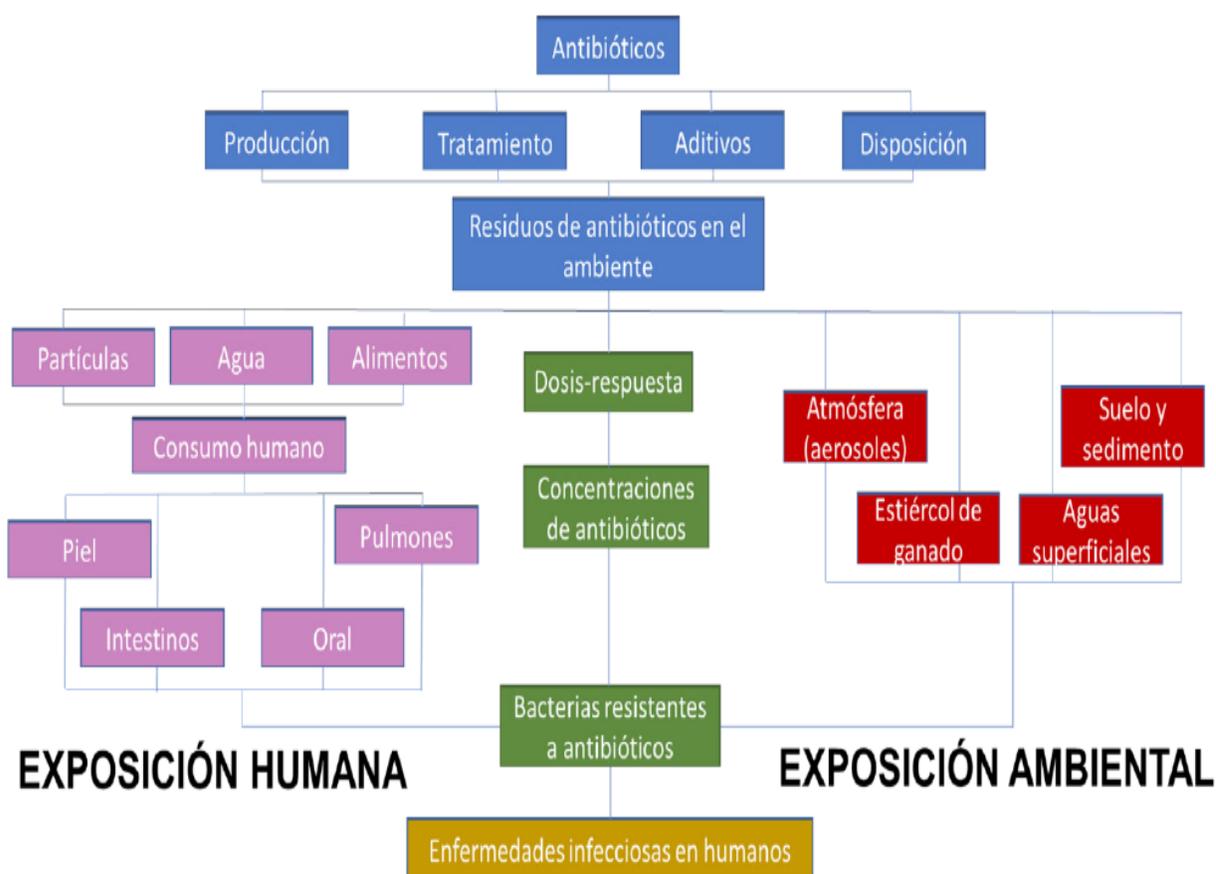


Figura 1 Rutas, vías y riesgo de exposición a antibióticos en el ambiente (Meléndez et al., 2020).

Los hospitales, farmacias y la industria farmacéutica en México cuentan con obligaciones y normativas para el manejo adecuado de sus residuos en el Artículo 28 de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (Última reforma: 22 de mayo de 2015) (Diario Oficial de la Federación, 2003); sin embargo, los medicamentos continúan ingresando a los ecosistemas a

causa del usuario final mediante rutas como la excreción en orina y heces. Una vez consumido, solo un porcentaje del medicamento es utilizado por el cuerpo y posteriormente, es excretado de forma inalterada, conjugado o transformado en otras sustancias (metabolito). También, el medicamento caduco, sobrante o sin uso puede ser desechado junto con residuos domiciliarios o vertiéndolos al drenaje en la figura 2.

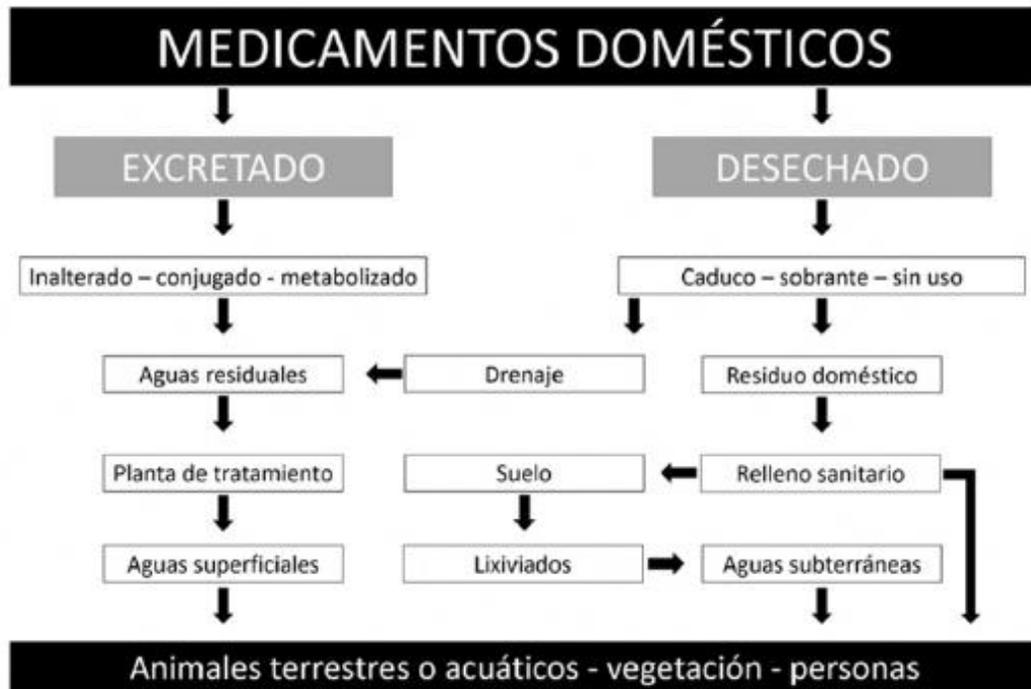


Figura 2 Ingreso de los medicamentos desde los hogares a los ecosistemas (Sanabria et al., 2020).

1.2.3. Metronidazol

El metronidazol (1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol) es un fármaco bactericida que se administra sistémica y tópicamente para varios protozoos (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*), contra una amplia variedad de gramnegativos (*Bacteroides* y *Fusobacterium spp.*) y bacterias anaerobias grampositivas (*Peptostreptococcus* y *Clostridia spp.*). Es efectivo en infecciones por *Helicobacter pylori*, prevención de infecciones en heridas postoperatorias y aplicación externa. Desde su introducción en 1959 el uso clínico ha ido aumentando y ahora es una de las drogas más utilizadas y está incluido en la lista básica de medicamentos de la Organización Mundial de la Salud. Dependiendo de su uso, la absorción y metabolismo varían. En humanos, se descompone en condiciones aeróbicas a dos metabolitos principales, 1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol y ácido 1-acético-2-metil-5-nitroimidazol. Es activo contra los organismos anaerobios y se convierte en acetamida y ácido N-(2-hidroxietil) oxámico. El grupo nitro se reduce a

hidroxilamina, varias enzimas diferentes participan en la reducción para formar los metabolitos activos del MTZ. Tanto el MTZ como su metabolito hidroxilado son mutagénicos para las bacterias porque forman sustituciones de pares de bases (Szentmihályi et al., 2021).

1.2.4. Cuantificación de antibióticos por cromatografía de líquidos

El desarrollo de métodos de cuantificación para determinar antibióticos en muestras biológicas, alimentarias y ambientales es fundamental para evaluar el estado actual de la contaminación y el impacto ambiental causada por residuos de antibióticos. Actualmente, la cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa es la técnica analítica más empleada en la identificación y cuantificación de este tipo de compuestos. Estos procedimientos exhiben desempeños analíticos adecuados, como son: selectividad, precisión, linealidad, robustez y sensibilidad (Peris et al., 2022).

1.2.5. Confirmación de métodos analíticos

La confirmación de métodos analíticos involucra varios parámetros que aseguran la medición de los analitos, siendo los siguientes a evaluar:

- a. **Adecuabilidad de sistema:** Verificación de que el sistema opera con base a criterios que permiten asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.
- b. **Exactitud:** Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.
- c. **Intervalo:** Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito para las cuales se ha demostrado que el método es exacto preciso y lineal.
- d. **Límite de cuantificación:** Concentración mínima del analito que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables.
- e. **Límite de detección:** Concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.
- f. **Linealidad:** Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del analito.
- g. **Precisión:** Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea.
- h. **Recobro:** Cantidad del analito determinada en el placebo adicionado, empleando el método analítico.

- i. **Repetibilidad:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos.
- j. **Reproducibilidad:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferente analista, equipo, o en periodos diferentes de tiempo.

1.2.6. Muestreo de aguas residuales

Es el procedimiento mediante el cual se colecta un volumen de agua residual descargado por el responsable de la descarga a un cuerpo receptor propiedad de la Nación necesario para poder realizar los análisis ya sea en campo o en laboratorio (NOM-001-SEMARNAT-2021).

El método de muestreo debe describir:

- a. **Plan de muestreo:** selección de muestras, sitios, tipo de muestreo (simple o compuesto) y frecuencia; así como el método de la recolección de la muestras, número y cantidad de muestras.
- b. **Actividades previas al muestreo:** conjunto de actividades que permitirán realizar de manera fluida y segura la actividad de muestreo
 1. Realizar visita previa al lugar de muestreo.
 2. Evaluar los posibles riesgos al muestrear.
 3. Elaborar plan de muestreo.
 4. Elaborar lista de equipos, materiales y reactivos necesarios.
 5. Limpieza de recipientes.
 6. Verificación del funcionamiento de equipos.
- c. **Preparación y tratamiento de muestras** de una sustancia, material o producto para obtener el ítem requerido.

Las actividades enlistadas se recabaron de las normas NMX-AA-003-1980 Agua residuales Muestreo, NOM-001-SEMARNAT-2021: Que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación, NOM-002-SEMARNAT-1996: Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal y NMX-EC-17025-IMNC-2018: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

1.2.7. Caracterización de aguas residuales hospitalarias

En las aguas residuales hospitalarias hay una amplia variedad de microbios (bacterias, virus, hongos y parásitos). Se han encontrado muchas bacterias resistentes en las aguas residuales de los hospitales, así como la inhibición del crecimiento de bacterias susceptibles a los antibióticos que se descargan en el agua receptora. Se ha demostrado que la toxicidad intrínseca de los efluentes hospitalarios es entre 5 y 15 veces mayor que la de un efluente municipal según su composición (Karungamye et al., 2023).

Si se identifican las sustancias que componen las aguas residuales hospitalarias, se puede saber que tratamiento es aplicable a estas antes de que sean vertidas a las cuencas, que es lo que se hace en muchos casos. Aguilar (2018) indica que los parámetros más representativos por su importancia son:

- a. **DBO₅**: La demanda bioquímica de oxígeno es una variable escala, que se utiliza para determinar qué cantidad de oxígeno requieren los microorganismos para oxidar la materia orgánica que se encuentra en el agua.
- b. **DQO**: La demanda química de oxígeno se emplea para determinar qué cantidad de sustancias son susceptibles a la oxidación por un medio químico.
- c. **Biodegradabilidad**: Esta variable es de tipo categórica, muestra según la relación que hay entre la DBO₅/DQO que tipo de biodegradabilidad tienen las aguas residuales hospitalarias.
- d. **Tipo de tratamiento**: Es una variable de tipo categórica. En este espacio se da a conocer la clase de tratamiento que se debe aplicar a las aguas residuales hospitalarias según el tipo de biodegradabilidad.
- e. **pH**: Esta variable es de tipo continua, afecta el crecimiento bacteriano.
- f. **Temperatura**: Esta variable es de tipo continua y también afecta el metabolismo bacteriano.

1.2.8. Biorremediación

Biorremediación es la palabra utilizada para describir la degradación biológica de desechos orgánicos en circunstancias reguladas. Cada paso del proceso metabólico depende de la actividad de las enzimas. Un aspecto crucial de la tecnología de biorremediación es la biodegradación, que implica transformar contaminantes orgánicos peligrosos en sustancias inorgánicas no tóxicas (dióxido de carbono y agua) de origen natural, adecuadas para el uso de personas, plantas, vida silvestre y acuática. Al aumentar la actividad metabólica de la diversidad bacteriana nativa y acelerar

el proceso de biorremediación para descomponer los contaminantes preexistentes, el carbono es uno de los nutrientes más importantes que ayudan a la biorremediación in situ (Kumar et al., 2023).

Para descomponer, transformar, eliminar o higienizar diferentes contaminantes físicos y químicos del ambiente, la biorremediación emplea microorganismos como bacterias, algas, hongos y plantas. Las vías metabólicas enzimáticas de los microorganismos aceleran los procesos bioquímicos que degradan los contaminantes (Khalid et al., 2021).

1.2.9. Tinción diferencial Gram

La tinción de Gram tiene como objetivo identificar la morfología de las células bacterianas, su agrupación y la reacción al Gram (Gram positiva o Gram negativa). Esta tinción es una de las más comúnmente usadas en microbiología, el mecanismo de reacción de los colorantes de Gram, actúan en la estructura y composición de la pared celular. El organelo responsable de la tinción de Gram es la pared celular. La propiedad de teñirse o no de violeta oscuro según la tinción introducida por Christian Gram (1884) es una característica taxonómica importante con la que se correlacionan también otras propiedades de las bacterias.

Las bacterias **Gram negativas** contienen un **porcentaje más alto de lípidos que las bacterias Gram positivas**, la pared celular de las Gram negativas son también más delgadas que las Gram positivas por lo que no retienen el colorante inicial cuando se les agrega el alcohol acetona, como se ilustra en la Figura 3.

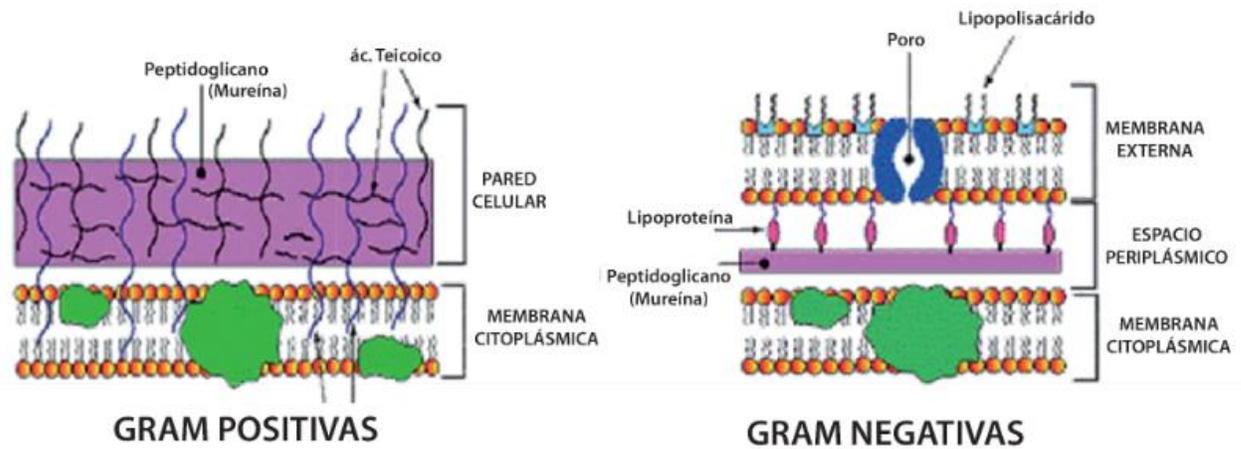


Figura 3 Diferencia en pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Gómez, G. J. y Gómez, J. E., 2011).

Los microorganismos que retienen el colorante de cristal violeta después de la decoloración y se ven de **color violeta** se conocen como **microorganismos Gram positivos**. Los **Gram negativos** no son capaces de retener el cristal violeta después de la decoloración y **se tiñen de rojo** con el colorante de safranina (Luna, 2020).

1.2.10. Medios de cultivo y pruebas bioquímicas

Los medios de cultivos se definen como cualquier preparado, sólido o líquido, que contiene todas las sustancias nutritivas para el desarrollo de los microorganismos. Este debe ser estéril, tener un pH adecuado y estar protegido de la contaminación ambiental. En general contienen los siguientes grupos de nutrientes:

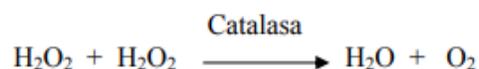
- a. **Fuente de hidrógeno:** constituye la fuente de energía (un azúcar que funciona a la vez como carbono).
- b. **Aceptores de hidrógeno:** Indispensables para aquellos microorganismos que no ocupan el oxígeno en la respiración y para aquellos microorganismos fermentadores que no utilizan sus propios metabolitos como aceptor de hidrógenos.
- c. **Fuente de carbono:** Todos los microorganismos necesitan una fuente de carbono; algunos utilizan el CO₂ del aire (autótrofos), pero la mayoría de las bacterias utiliza compuestos orgánicos carbonados preformados (organótrofos).
- d. **Fuente de nitrógeno:** esencial para todos los organismos (Algunos lo requieren como compuesto orgánico, y otros pueden utilizar compuestos inorgánicos).

- e. **Sales minerales:** aportan elementos tales como azufre, fósforo y algunos activadores enzimáticos presentes en las coenzimas de los citocromos y en las peroxidasas (oligoelementos: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , etc.). Todos los microorganismos necesitan aporte de sales minerales para su desarrollo (Luna, 2020).

La identificación taxonómica de las bacterias se basa fundamentalmente en sus características, morfológicas, tintoriales, fisiológicas y bioquímicas. Para estas dos últimas se dispone de numerosas técnicas de laboratorio. El microorganismo en estudio se cultiva en presencia de sustancias nutritivas específicas y después se detectan mediante reactivos los productos generados por la acción de dicho microorganismo entre ellas están: Pruebas de fermentación de azúcares, pruebas enzimáticas, pruebas con sustratos específicos como citrato, indol y rojo de metilo, producción de amoníaco a partir de urea (Luna, 2020).

Dentro de las pruebas para identificación de bacterias de tipo enzimático encontramos las siguientes:

- f. **Oxidasa.** Los microorganismos que poseen citocromooxidasa en su cadena respiratoria son considerados como microorganismo oxidasa positivos. Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro, actúan como el último vínculo en la cadena de la respiración aerobia, transfiriendo electrones (hidrógeno) al oxígeno con la formación de agua. Todos los microorganismos que son oxidasa positivos son aerobios o anaerobios facultativos. En esta prueba se utilizan algunos colorantes reactivos como el clorhidrato de p-fenilendiamina que sustituyen al oxígeno como aceptores de electrones. El colorante es incoloro, pero en presencia de citocromooxidasa y oxígeno atmosférico la p-fenilendiamina es oxidada y forma azul de indofenol. Esta prueba es utilizada principalmente para la diferenciación de las Pseudomonas y Neisserias (oxidasa positiva) de Enterobacterias (oxidasa negativa).
- g. **Prueba de la catalasa.** Esta prueba se utiliza para observar la producción de la enzima catalasa. La catalasa es una enzima que se encuentra en el grupo HEM y que se puede localizar en los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos. Su función es descomponer el peróxido de hidrógeno formado durante la oxidación de los azúcares ya que este puede ser tóxico para la célula si se acumula. En la descomposición del peróxido de hidrógeno, una molécula actúa como sustrato y la otra como donador; el sustrato reducido por los átomos de hidrógeno suministrados por el donador da como resultado un sustrato reducido y un donador oxidado (Ramírez et al., 2020).



1.2.11. Identificación de bacterias por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la metodología de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* más popular (Dorado et al., 2019), es una poderosa herramienta que se ha utilizado para evaluar las reacciones celulares a la estimulación/estrés a nivel transcripcional. También se ha utilizado como herramienta analítica para el establecimiento de la identidad (Godbey, 2022) y en el diagnóstico clínico para la detección e identificación microbiana genética, resultando rápida y eficaz para identificar especies bacterianas o genes de resistencia a los antibióticos, los métodos más comunes son PCR en tiempo real dirigida a genes específicos (RT-PCR) y la secuenciación del gen 16S rRNA que utiliza oligonucleótidos de amplio rango de especies que se dirigen a regiones conservadas dentro del gen para permitir una identificación simple y rentable a nivel de género/especie (Pedlar et al., 2024).

2. MÉTODO

2.1. Bosquejo del método

En la Figura 4 se presenta el bosquejo del método empleado para el desarrollo de este trabajo.

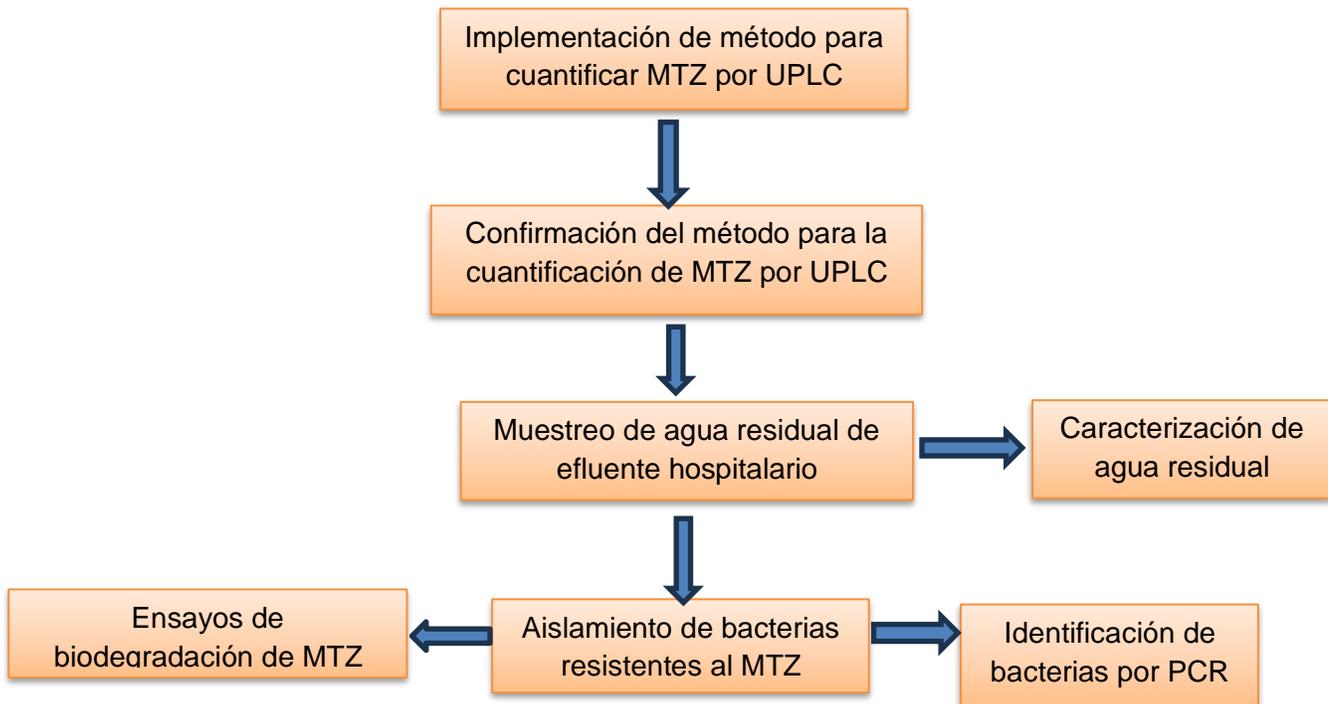


Figura 4 Bosquejo del método para la biodegradación de Metronidazol por bacterias aisladas de un efluente hospitalario

2.2. Metodología

2.2.1. Implementación del método para la cuantificación de metronidazol por UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph)

Se empleó un equipo de cromatografía de líquidos UPLC ACQUITY WATERS con Software Empower 3 y una columna ACQUITY UPLC CSH C18 1.7 mm. Para la preparación de las soluciones de metronidazol se utilizó una presentación farmacéutica comercial de 500 mg en 100 mL. Otros reactivos utilizados fueron agua ultrapura, metanol y acetonitrilo grado HPLC.

Para la implementación del método, primero se determinó la longitud de onda en la que el metronidazol presentó mayor absorción en el rango UV-Vis, para ello se realizó un barrido por espectrofotometría UV-Vis empleando soluciones de 25 mg/L y de 5 mg/L de MTZ.

Una vez encontrada la longitud de onda de mayor absorción, se continuó con la implementación de método por UPLC en busca de las mejores condiciones cromatográficas para la identificación y cuantificación de metronidazol. Las condiciones por establecer fueron: composición de la fase móvil, flujo de la fase móvil, volumen de inyección, temperatura de columna y muestra. Una vez encontradas las mejores condiciones cromatográficas para la identificación del analito se evaluó la adecuabilidad del sistema.

Para evaluar la adecuabilidad del sistema, se empleó una serie de 5 disoluciones de 5 mg/L de MTZ preparadas a partir de una solución patrón. Se determinaron los parámetros K' (factor de capacidad), número de platos teóricos (N) y factor de coe (T). Los criterios de aceptación para cada parámetro se muestran a continuación:

Factor de capacidad K' ; $K' > 2$
Factor de coe T; $T < 2$;
Numero de platos teóricos N; $N > 2000$
 $CV \leq 2\%$ para la respuesta analítica

2.2.2. Confirmación del método para la cuantificación de metronidazol por UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph)

Una vez implementado el método de identificación y cuantificación de metronidazol por UPLC y cumpliendo los criterios de adecuabilidad del sistema, se realizó la confirmación del método para

asegurar que los resultados sean exactos y precisos. Los parámetros para evaluar en esta fase son los siguientes:

a. Linealidad del sistema

Para linealidad del sistema se prepararon cinco niveles de concentración de la solución de referencia (intervalo) por dilución, se midió la respuesta analítica bajo las condiciones óptimas encontradas para el método.

Criterio de aceptación $R^2 \geq 0.98$

b. Linealidad del método

Se prepararon por triplicado cinco soluciones adicionadas del analito (intervalo de concentraciones dentro del intervalo de linealidad del sistema) y se midió la respuesta analítica.

Criterios de aceptación:

- Coeficiente $R^2 \geq 0.98$
- Coeficiente de variación $CV \leq 2\%$
- Porcentaje de recobro $\pm 20\%$

c. Límite de detección y cuantificación

Con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen.

Se prepararon tres concentraciones del analito por dilución y se midió la respuesta analítica, se calculó b_1 , R^2 y S_{bo} .

$$LD = \frac{3.3 \times S_{bo}}{b_1}$$

$$LC = \frac{10 \times S_{bo}}{b_1}$$

Criterio de aceptación: Coeficiente $R^2 \geq 0.98$

d. Exactitud y Repetibilidad

Se prepararon soluciones adicionadas a diferentes niveles de concentración de MTZ (que estén dentro del intervalo lineal). Se analizaron en condiciones de repetibilidad, determinando

la concentración recuperada del analito y calculando el porcentaje de recobro de cada muestra adicionada.

Criterio de aceptación:

- Porcentaje de recobro $\pm 20\%$
- Coeficiente de variación $\leq 2\%$

e. Reproducibilidad

Se obtuvo evaluando la variación en días diferentes de prueba.

Criterio de aceptación: Coeficiente de variación $\leq 2\%$

2.2.3. Muestreo de agua residual de un efluente hospitalario

La muestra de agua residual se tomó de un efluente hospitalario, conforme la norma NMX-003-AA-1980, que establece el muestreo en aguas residuales. El muestreo fue simple y puntual.

2.2.4. Determinación de valores de temperatura, pH y conductividad en el agua residual del efluente hospitalario

In situ, se midieron los valores de temperatura, pH y conductividad en el agua residual del efluente hospitalario, con base en lo indicado en las normas NMX-AA-007-SCFI-2013 (Medición de la temperatura en aguas naturales, residuales y residuales tratadas), NMX-AA-008-SCFI-2016 (Medición del pH en aguas naturales, residuales y residuales tratadas) y NMX-AA-093-SCFI-2000 (determinación de la conductividad electrolítica).

2.2.5. Caracterización fisicoquímica del efluente hospitalario

Esta caracterización se realizó con base a lo indicado en las normas oficiales de los parámetros seleccionados, con la finalidad de conocer las principales características fisicoquímicas del efluente estudiado; en ellas se detallan las condiciones de recolección preservación y análisis para cada parámetro: DBO₅ NMX-AA-028-SCFI-2001, DQO NMX-AA-030/1-SCFI-2012, Turbiedad NMX-AA-038-SCFI-2001, Grasas y aceites NMX-AA-005-SCFI-2013, Sólidos suspendidos totales NMX-AA-034-SCFI-2015, Nitrógeno total, Nitrógeno NTK NMX-AA-026-SCFI-2010, Nitritos (N-NO₂⁻) NMX-

AA-079-SCFI-2001, Nitratos (N-NO_3^-) NMX-AA-154-SCFI-2001, Fosforo total NMX-AA-029-SCFI-2001.

2.2.6. Aislamiento de bacterias del agua residual resistentes al metronidazol

Las bacterias con resistencia al metronidazol se aislaron del agua residual del efluente hospitalario, empleando un medio mineral enriquecido con incrementos graduales en las concentraciones de metronidazol, hasta su total adaptación. Se seleccionaron las cepas en base a su morfología, crecimiento y capacidad de adaptación.

El aislamiento se realizó como lo reporta Tahrani (2015), se empleó una alícuota de agua residual del efluente hospitalario recolectado en bolsas estériles y preservadas a 4°C; la cual, bajo condiciones estériles se transfirió a una solución de caldo TSB (Caldo de Soya Trypticaseína) incubándose a 35°C \pm 1°C por 24 horas. Con el crecimiento bacteriano, se inició el contacto con metronidazol, aumentando la concentración de manera gradual (a 2, 4, 8, 16, 32, 64, 120, 250 y 500 mg/L) en medio mineral (KH_2PO_4 85 mg/L, K_2HPO_4 208 mg/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 334 mg/L, NH_4Cl 5 mg/L, CaCl_2 27.5 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.5 mg/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg/L). Las soluciones de MTZ y medio mineral se inocularon con 1 mL de suspensión bacteriana, incubando a 35°C \pm 1°C, monitoreando el aumento de turbiedad y crecimiento bacteriano en placa a las 24 horas.

Las cepas que resultaron resistentes a la mayor concentración del metronidazol (500 mg/L) se aislaron por estría en placa de Agar de Soya Trypticaseína enriquecido con la misma concentración del antibiótico e incubadas a 35°C \pm 1°C por 24 horas. Estas cepas se emplearon en los ensayos de degradación.

2.2.7. Identificación de las bacterias aisladas

La identificación preliminar de las cepas resistentes a 500 mg/L de Metronidazol se realizó empleando los resultados de la tinción de Gram (Kwasi et al., 2023), el crecimiento en medios selectivos (Cetrimida, Eosina y Azul de Metileno, Mac Conkey, Sal y manitol), pruebas enzimáticas (oxidasa y catalasa) y pruebas bioquímicas (TSI, MIO, OF, Citrato y Urea) para conocer las principales características morfológicas y metabólicas de las cepas aisladas.

Para la identificación completa se recurrió a la prueba PCR realizada en colaboración con la UAM, Iztapalapa. El ADN de las bacterias se extrajo de un cultivo bacteriano puro utilizando el kit para

bacterias Jena Bioscience cat # 206L (Löebstedter, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR de 16s rRNA se realizó en termociclador (BIO–RAD T100), empleando los marcadores FW 27-B y FR 1492. La reacción en cadena de polimerasa se realizó con 1 µL de ADN extraído combinándolo con la mezcla de reacción PCR (3,125 µL Master Mix TAq Master 5x (Jena Bioscience) junto con 0.35 µL de cada cebador directo e inverso completando a 11.5 µL con agua grado PCR). La amplificación se inició a 94°C durante 5.0 min 30s para la desnaturalización, seguida de otra etapa a 51°C por 1.0 min para el alineamiento, después a 72°C por 1.3 min para la extensión, replicando por 34 ciclos, continuando con la elongación a 72°C por 5 min más, antes de finalizar con un enfriamiento a 12 °C para concluir proceso. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% empleando un marcador de 100 pb (Bioline) teñidos con Gel Red (BIOTUM) al 0.3 µM y visualizados en trasluminador (MINILUMI 2.0). Los productos amplificados fueron purificados con EXOSAP (Jena Bioscience, Löebstedter, Alemania) y secuenciados (3500 xl Life Technology). Las secuencias se ensamblaron con el software Secuencer, la identidad de la cepa se determinó utilizando la herramienta BLASTN comparando las secuencias del gen bacteriano 16SARNr con la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

2.2.8. Ensayos de biodegradación del metronidazol por las bacterias aisladas, en matriz acuosa

La biodegradación del metronidazol se evaluó en medio mineral y con el antibiótico como única fuente de carbono. Para ello, se adiciono la suspensión bacteriana y cada cierto intervalo de tiempo se determinó la concentración residual del fármaco; el crecimiento bacteriano se monitoreó espectrofotométricamente a 600 nm. La degradación se estudió con diferentes concentraciones del MTZ y finalmente, con glucosa como una fuente adicional de carbono. Para todos los estudios se incluyó un blanco control del MTZ, el cual no se inoculo con las cepas bacterias a evaluar.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Implementación de cuantificación de metronidazol por UPLC

Para determinar la longitud de onda de máxima absorción del metronidazol, se empleó un espectrofotómetro UV- Vis con arreglo de diodos, Evolution Array, Thermo Scientific con intervalo de 190 a 1100 nm. Se hicieron barridos de soluciones de 5 y 25 mg/L del fármaco, los cuales se muestran en la figura 5.

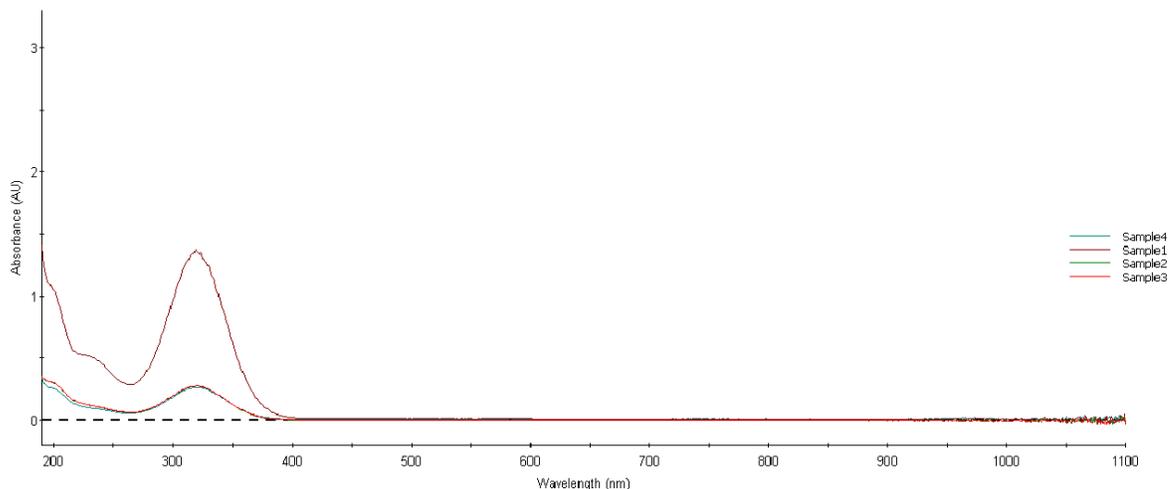


Figura 5 Espectros de Barrido en UV-Vis para las soluciones de 5 y 25 mg/L de Metronidazol I

En esta figura se puede apreciar el incremento en la señal de absorbancia entre 300 y 330 nm para las dos concentraciones empleadas. Se analizaron los valores de absorbancia en un rango más puntual para identificar la longitud de onda a la que el compuesto tiene la mayor señal, los resultados se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de barrido rango UV VIS para Metronidazol

Solución	AU 315 nm	AU 317 nm	AU 318 nm	AU 319 nm	AU 320 nm	AU 321 nm	AU 323 nm
25 mg/L	1.3273	1.3464	1.3529	1.3768	1.3631	1.3423	1.3565
5 mg/L	0.2689	0.2706	0.2736	0.2767	0.2759	0.2757	0.2704

Los datos encontrados muestran que a **319 nm** se presenta la máxima señal de absorbancia para metronidazol, comportamiento que se mantienen para las dos concentraciones ensayadas. Esta longitud se empleó para la implementación del método de cuantificación de metronidazol por UPLC.

La implementación del método para cuantificación de Metronidazol por UPLC, involucro varias pruebas para encontrar las mejores condiciones cromatográficas que permiten la separación e identificación del pico cromatográfico de interés. Se probaron flujos de fase móvil desde 0.25 a 0.5 mL/min, composiciones de Fase móvil agua/metanol en proporciones de 50:50; 60:40; 80:40; 90:10; y 95:5, el volumen de inyección de muestra de 4 a 9 µL, la temperatura de columna y muestra a 25 y 30 °C. Estas pruebas se realizaron con solución de metronidazol de concentración de 5 mg/L.

Las mejores condiciones de método encontradas fueron:

Fase móvil agua/metanol 95:5, flujo de fase móvil 0.5 mL/min, volumen de inyección de la muestra 8 μ L, temperatura de 30 °C para muestra y columna.

Con estas condiciones de cromatográficas, el pico de metronidazol tiene un tiempo de retención de 1.62 min, en la figura 6 se muestra el cromatograma obtenido, en el cual observa un pico simétrico y bien definido.

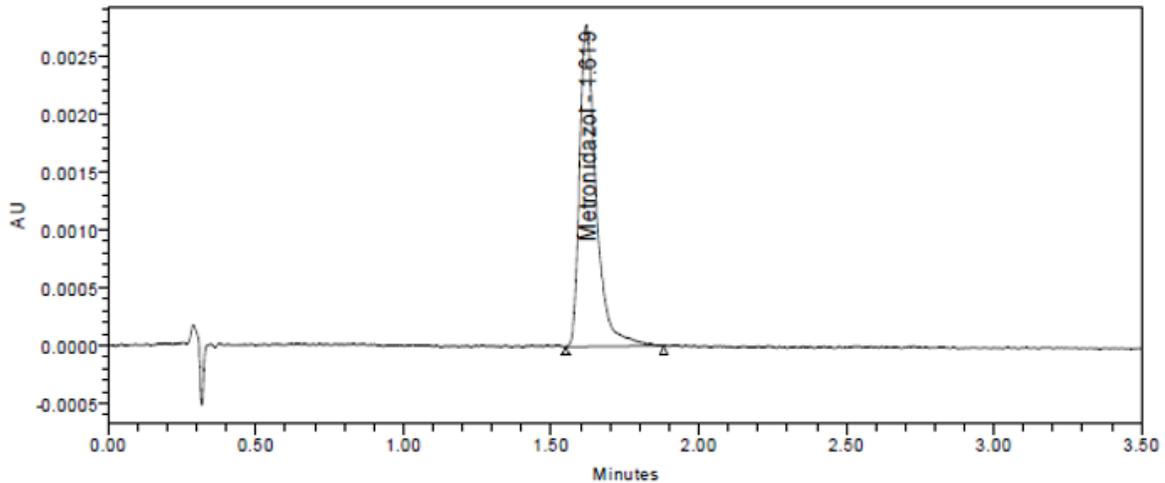


Figura 6 Cromatograma de solución de Metronidazol 5 mg/L

La etapa siguiente fue la evaluación de adecuabilidad del sistema, empleando 5 soluciones de concentración de 5 mg/L, la inyección de muestra se realizó por triplicado, los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Adecuabilidad del sistema

Número de muestra	Número de Inyección	Área	Coficiente de variación CV \leq 2%	T T<2	K' K'>2	N N>2 000
1	1	266938	1.34186	1.100	3.061	10 059
	2	266532				
	3	260593				
2	1	267224	0.06205	1.101	3.064	10 034
	2	267127				
	3	266901				
3	1	261156	1.22964	1.102	3.069	9 966
	2	266957				
	3	266625				
4	1	260719	1.25903	1.104	3.072	9 941
	2	266454				
	3	260734				

5	1	260833	1.25710	1.106	3.073	9 962
	2	266520				
	3	260767				

La adecuabilidad del sistema bajo las condiciones cromatográficas indicadas previamente, cumplen satisfactoriamente con los criterios de aceptación $CV \leq 2\%$; $K' > 2$; $T < 2$; y $N > 2\ 000$ con esto se confirma que el método es adecuado para la identificación y cuantificación del metronidazol.

3.2. Confirmación del método para la cuantificación de metronidazol por UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph)

Las concentraciones de metronidazol empleadas para determinar la linealidad del sistema fueron de 0.2, 1.0, 5.0 10.0 y 20 mg/L. Se evaluó el coeficiente de determinación de tres curvas de calibración, siendo $R^2 \geq 0.98$, siendo el criterio aceptable para el rango de soluciones analizadas, los resultados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de linealidad del sistema

Curva	Concentración [mg/L]	Área promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Ecuación de recta	Coefficiente de determinación (R^2)
A	0.2	9833.2183	2.4319	0.0247	$y = 53981x - 155.11$	0.9999
	1	51202.9350	67.7366	0.1323		
	5	270729.023	573.0772	0.2117		
	10	544895.762	128.0406	0.0235		
	20	1076798.55	722.8986	0.0671		
B	0.2	10752.0267	70.8060	0.6585	$y = 54533x - 173.31$	0.9999
	1	53327.5867	16.6277	0.0312		
	5	273952.514	64.7172	0.0236		
	10	544895.762	128.0406	0.0235		
	20	1090311.89	134.9015	0.0124		
C	0.2	10929.7300	28.6755	0.2624	$y = 54841x - 773.9$	0.9999
	1	53780.7283	45.5980	0.0848		
	5	274311.381	88.5211	0.0323		
	10	545410.666	282.3986	0.0518		
	20	1096955.03	583.1946	0.0532		

El coeficiente de determinación fue > 0.98 así que se cumple con criterio de linealidad del sistema para cada curva preparada de manera independiente. Por lo que se confirma que hay linealidad en el intervalo de concentración de 0.2 a 20 mg/L de metronidazol.

Para la linealidad del método se prepararon soluciones a concentración de 0.5, 1.5, 3, 7 y 15 mg/L, las curvas se prepararon por triplicado de forma independiente. Los resultados se presentan en la tabla 5. Como se observa, también se cumple con el criterio de aceptación de $R^2 \geq 0.98$ para el rango de concentraciones analizado. Adicionalmente, las soluciones se evaluaron en días distintos, los resultados no variaron, lo que confirma la linealidad del método en el intervalo de 0.5 a 15 mg/L.

Tabla 5 Resultados de Linealidad del método

Día	Curva	Conc. [mg/L]	Área promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Ecuación de recta	Coefficiente de determinación (R ²)
1	A	0.5	29575.8100	69.5838	0.2353	$y = 53586x + 2037.6$	0.9998
		1.5	85260.5137	26.8908	0.0315		
		3	162662.9170	23.6480	0.0145		
		7	371189.0077	101.8116	0.0274		
		15	808322.1220	153.4753	0.0190		
	B	0.5	29074.5967	82.0391	0.2822	$y = 52525x + 4490.1$	0.9998
		1.5	86467.0283	81.7079	0.0945		
		3	164501.9867	55.1120	0.0335		
		7	366164.9570	121.0680	0.0331		
		15	794409.5490	378.7102	0.0477		
	C	0.5	29766.7850	58.9927	0.1982	$y = 53956x + 2771.1$	0.9999
		1.5	86355.1017	113.4454	0.1314		
		3	163392.8817	148.8823	0.0911		
		7	377835.2663	160.6577	0.0425		
		15	813329.5333	227.8913	0.0280		
2	A	0.5	29095.7983	67.6447	0.2325	$y = 53421x + 1125.1$	0.9998
		1.5	84108.8243	31.5255	0.0368		
		3	160669.3787	102.5865	0.0638		
		7	369049.5820	531.5161	0.1461		
		15	805062.8367	508.2452	0.0631		
	B	0.5	28652.8067	26.0820	0.0910	$y = 52218x + 3935.4$	0.9998
		1.5	85364.6807	35.5534	0.0416		
		3	162590.9457	65.4759	0.0403		
		7	363751.8447	531.5161	0.1461		
		15	789212.9483	748.9055	0.0949		
	C	0.5	29547.7067	29.2721	0.0991	$y = 53756x + 2523$	0.9999
		1.5	85678.5637	31.5255	0.0368		
		3	162412.7753	27.1358	0.0167		
		7	376366.7693	418.9939	0.1113		
		15	810031.3127	343.9024	0.0425		

Para los límites de detección y cuantificación se prepararon soluciones por duplicado de 0.01, 0.02, 0.05 y 0.01 mg/L a partir de una solución patrón intermedia de concentración de 1 mg/L, con los datos de la respuesta analítica se calculó el valor de los límites. Los resultados de presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Curvas empleadas para límite de detección y cuantificación

Curva	Conc. [mg/L]	Área promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Ecuación	R ²
1	0.01	614.443	29.14801466	4.74380843	y = 54215x – 16.072	0.9987
	0.02	1018.961	34.39713881	3.37570489		
	0.05	2614.463	80.01686377	3.0605468		
	0.1	5446.575	120.7733558	2.21741839		
2	0.01	605.0166	13.62916114	2.25269185	y = 54075x – 19.78	0.9985
	0.02	1032.7566	16.41053422	1.589002981		
	0.05	2579.0533	15.50629012	0.601239607		
	0.1	5437.6016	10.14599716	0.186589562		

Se tiene linealidad para el rango de concentraciones propuestas; con estos datos se determinó el valor teórico de los límites de detección y cuantificación los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Límite de detección y cuantificación teóricos

Curva	Parámetros de ajuste	LD [mg/L]	LC [mg/L]	LD [mg/L] Promedio	LC [mg/L] Promedio
1	b ₁ = 54215.17993	0.0047500	0.0143939	0.004945	0.0149861
	b ₀ = -16.07234694				
	S _{y/x} = 95.8204706				
	S _{bl} = 1368.863866				
	S _{bo} = 78.037247				
2	b ₁ = 54075.27721	0.0051408	0.0155783		
	b ₀ = -19.78039116				
	S _{y/x} = 103.4369458				
	S _{bl} = 1477.670654				
	S _{bo} = 84.24018831				

De este análisis se encuentra como valores teóricos promedio: LD de 0.004 mg/L y LC de 0.015 mg/L para el método cromatográfico de metronidazol. La comprobación de estos límites se realizó con soluciones de 0.004, 0.006, 0.008, 0.012, 0.018 y 0.015 mg/L preparadas por dilución a partir de solución patrón intermedia de 1 mg/L evaluando la respuesta analítica para este intervalo los resultados se concentran en la tabla 8.

Tabla 8. Límite de detección y cuantificación prácticos

Concentración [mg/L]	Área promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	R ²
0.004	235.905	19.2582612	8.16356636	0.9999
0.006	332.03	21.6640809	6.52473598	
0.008	445.318	8.23348245	1.84889816	
0.012	701.823	16.9359155	2.41313087	
0.018	1271.813	24.3654804	1.91580633	
0.025	1734.198	14.164131	0.81675382	

Estos resultados deben verificarse para evaluar la exactitud y determinar cuáles cumplen con el criterio de aceptación.

La exactitud (% Recobro) y precisión (Coficiente de variación) se determinaron con tres series de soluciones preparadas, a diferentes niveles de concentración del metronidazol (0.5, 1.5, 3, 7 y 15 mg/L). Se calculo el % de recobro, relacionando la concentración experimental y la concentración teórica. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados Exactitud y Precisión

Serie	Muestra	Concentración Teórica [mg/L]	Área promedio	Concentración experimental promedio [mg/L]	Desviación estándar	Coficiente de variación	% Recobro
A	1A	0.50	29502.020	0.5534	0.00126	0.229	110.682
	2A	1.50	85229.475	1.5687	0.00049	0.031	104.586
	3A	3.00	162690.06	2.9801	0.00043	0.014	99.339
	4A	7.00	371103.00	6.7825	0.00185	0.027	96.893
	5 ^a	15.00	808414.85	14.7534	0.00279	0.019	98.356
B	1B	0.50	29155.920	0.5442	0.00149	0.275	108.854
	2B	1.50	86551.360	1.5907	0.00148	0.094	106.053
	3B	3.00	164539.719	3.0137	0.00100	0.033	100.457
	4B	7.00	366071.781	6.6909	0.00220	0.033	95.5851
	5B	15.00	794090.483	14.4997	0.00690	0.048	96.6653
C	1C	0.50	29827.570	0.55689	0.00107	0.193	111.379
	2C	1.50	86440.610	1.58875	0.00206	0.130	105.917
	3C	3.00	163532.544	2.99350	0.00271	0.091	99.7834
	4C	7.00	377965.515	6.90376	0.00292	0.042	98.6251
	5C	15.00	813239.232	14.8447	0.00415	0.028	98.9653

Los resultados presentan exactitud al cumplir con el criterio de % de recobro dentro de 80 al 120%.

La repetibilidad se evaluó comparando cada rango de concentración analizados en dos ocasiones bajo condiciones de repetibilidad el mismo día, los resultados se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de repetibilidad

Concentración teórica [mg/L]		Lectura 1			Lectura 2			CV promedio
		Concentración experimental [mg/L]	Desviación estándar	CV promedio	Concentración experimental [mg/L]	Desviación estándar	CV promedio	
0.5	A	0.557	0.001	0.222	0.553	0.001	0.229	0.226
	B	0.549	0.000	0.068	0.544	0.001	0.275	0.171
	C	0.565	0.000	0.072	0.557	0.001	0.193	0.132
1.5	A	1.566	0.002	0.100	1.569	0.000	0.031	0.066
	B	1.587	0.000	0.010	1.591	0.001	0.094	0.052
	C	1.594	0.001	0.069	1.589	0.002	0.130	0.100
3	A	2.969	0.002	0.063	2.980	0.000	0.014	0.039
	B	3.004	0.004	0.117	3.014	0.001	0.033	0.075
	C	3.000	0.000	0.016	2.994	0.003	0.091	0.053
7	A	6.790	0.005	0.078	6.783	0.002	0.027	0.053
	B	6.698	0.008	0.122	6.691	0.002	0.033	0.078
	C	6.929	0.003	0.050	6.904	0.003	0.042	0.046
15	A	14.784	0.009	0.063	14.753	0.003	0.019	0.041
	B	14.497	0.007	0.050	14.500	0.007	0.048	0.049
	C	14.879	0.008	0.056	14.845	0.004	0.028	0.042

Los resultados cumplen con el criterio de aceptación ($CV \leq 2\%$) para todos los niveles de concentración, por lo tanto, se concluye que existe repetibilidad para la cuantificación de metronidazol por este método en el rango de medición de 0.5 a 15 mg/L.

3.3. Muestreo y caracterización de efluente hospitalario

El muestreo se realizó en un Hospital de tercer nivel (área de consulta de especialidades y hospitalización), provisto con un sistema de recolección de agua residual en forma de herradura para todos los servicios y áreas del hospital que no incluye drenaje pluvial y previo a la entrada del sistema de tratamiento siendo un efluente crudo. En la figura 7 se ubica el sitio de toma de muestra.

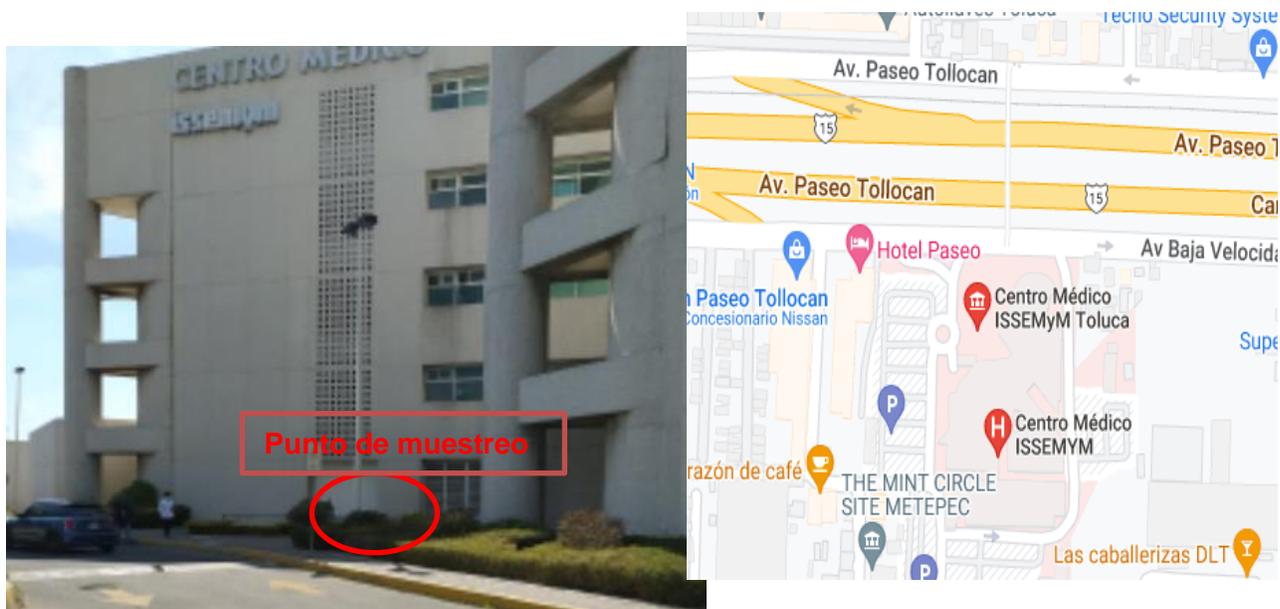


Figura 7 Ubicación del punto de muestreo

La toma de muestras se realizó de manera puntual para caracterización del efluente y para el aislamiento de bacterias en el pozo previo a la entrada de la planta de tratamiento. Se realizaron las mediciones in situ, los parámetros de caracterización fisicoquímica se efectuaron en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Ingeniería ambiental. Los resultados se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados de caracterización fisicoquímica del efluente hospitalario

Parámetro	Valor	Norma de referencia	Límites NOM-001	Límites NOM-002
Temperatura (°C)	18.6	NMX-AA-007-SCFI-2013	35 °C	40 °C
pH	8.36	NMX-AA-008-SCFI-2016	6-9	5.5-10
Conductividad eléctrica (µS/cm)	886.42	NMX-AA-093-SCFI-2000	---	---
DBO ₅ mg/L	586.33	NMX-AA-028-SCFI-2001	---	---
DQO mg/L	1 862.56	NMX-AA-030/1-SCFI-2012	210 mg/L	---
Turbiedad (NTU)	510.67	NMX-AA-038-SCFI-2001	---	---
Grasas y aceites (mg/L)	1 612.24	NMX-AA-005-SCFI-2013	21 mg/L	50 mg/L
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	252.00	NMX-AA-034-SCFI-2015	---	---
Nitrógeno NTK (mg/L)	105.50	NMX-AA-026-SCFI-2010	35 mg/L	---
Nitritos N ₂ O ₃ ⁻ (mg/L)	276.5	NMX-AA-079-SCFI-2001	---	---
Nitratos N ₃ O ₃ ⁻ (mg/L)	17.10	NMX-AA-154-SCFI-2001	---	---
Nitrógeno total (mg/L)	122.87	NTK+ N ₂ O ₃ ⁻ + N ₃ O ₃ ⁻	---	---
Fosforo total (mg/L)	25.97	NMX-AA-029-SCFI-2001	21	---

Los resultados de esta caracterización indican de manera general que se trata de un efluente con alta carga orgánica; el pH y temperatura se encuentran dentro de las especificaciones de las NOM-001-SEMARNAT-2021 y NOM-002-ECOL-1999, en el que pueden sobrevivir bacterias. Los valores de Demanda Química de Oxígeno, Nitrógeno Total Kjeldahl, Fosforo total, Grasas y Aceites sobrepasan los límites indicados. Se observa adicionalmente, que el efluente hospitalario contiene nutrientes como fósforo y nitrógeno, indispensables para el desarrollo de microorganismos. La biodegradabilidad es de 0.31 (Saravanathamizhan & Perarasu, 2021) correspondiente a un efluente medianamente biodegradable.

3.4. Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes al metronidazol

En la Tabla 12 se ilustran las etapas de aislamiento de las bacterias resistentes al metronidazol del efluente hospitalario. Para las diferentes concentraciones de prueba en medio mineral, se inocularon con 1 mL de la muestra y sucesivamente 1 mL de las suspensiones bacterianas.

Tabla 12. Etapas para el aislamiento de bacterias de efluente hospitalario resistentes al MTZ

Etapa de aislamiento	
A.1) Muestra de efluente en medio TSB	A.2) Después de incubación a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
	

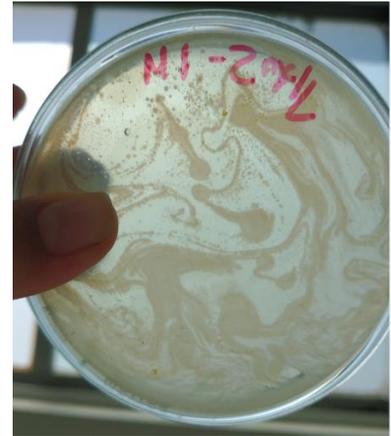
B.1) Medio mineral, 2 mg/L de MTZ y suspensión bacteriana de medio TSB



B.2) Después de incubación a 35 °C ± 1 °C por 24 horas



B.3) Control de crecimiento en placa TSA y 2 mg/L de MTZ



C.1) Medio mineral, 4 mg/L de MTZ y suspensión bacteriana de contacto con 2 mg/L



C.2) Después de incubación a 35 °C ± 1 °C por 24 horas



C.3) Control de crecimiento en placa TSA y 4 mg/L de MTZ



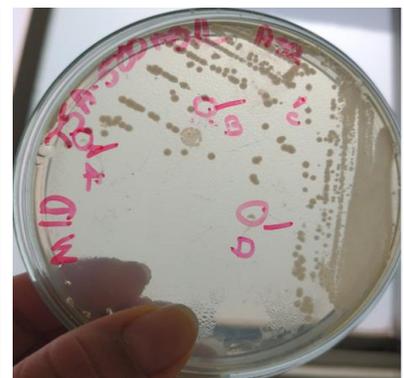
D.1) Medio mineral, 500 mg/L MTZ, suspensión bacteriana de 250 mg/L



D.2) Después de incubación a 35 °C ± 1 °C por 24 horas



D.3) Control de crecimiento en placa TSA y 500 mg/L de MTZ

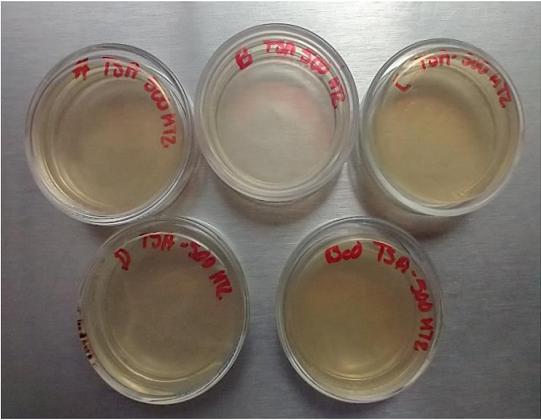
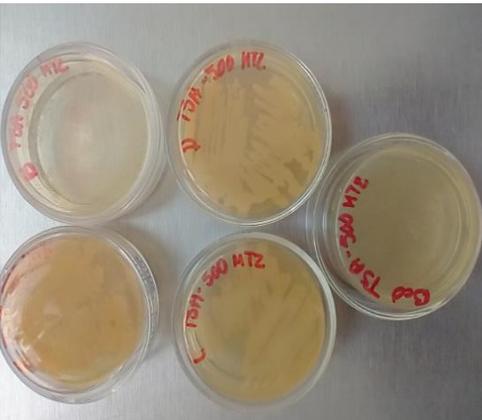


Las concentraciones de metronidazol para del aislamiento fueron de 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L, 16 mg/L, 32 mg/L, 64 mg/L, 120 mg/L, 250 mg/L y 500 mg/L en 50 mL de medio mineral. La turbiedad se observó a las 24 horas para la mayoría de las concentraciones ensayadas, a excepción de: 8 mg/L, la turbiedad se presentó después de 72 horas y para 120 mg/L se requirió un tiempo de 67 horas; lo que es indicio de lapsos de adaptación mayores para estas concentraciones.

3.4.1. Caracterización morfológica

De las colonias aisladas a una concentración de 500 mg/L de metronidazol, se seleccionaron las cepas que presentaban características coloniales diferentes.

Tabla 13. Aislamiento de cepas resistentes a concentración de 500 mg/L

a) Cepas seleccionadas aisladas con características diferentes	b) Crecimiento en TSA y 500 mg/L incubacion a 35°C ± 1°C por 24 horas
	
c) Cepa A opaca, textura lisa, mucoide crecimiento plano	d) Cepa B traslucida con brillo, textura lisa, elevacion, consistencia mucoide
	

e) Cepa C opaca, textura lisa, mucoide crecimiento elevado.



f) Cepa D opaca, textura lisa, mucoide crecimiento plano



Por las características coloniales diferentes, se observan tres tipos de cepas que se identificaron como A, B, C; la cepa D tiene morfología colonial similar a la A.

3.4.2. Tinción Gram

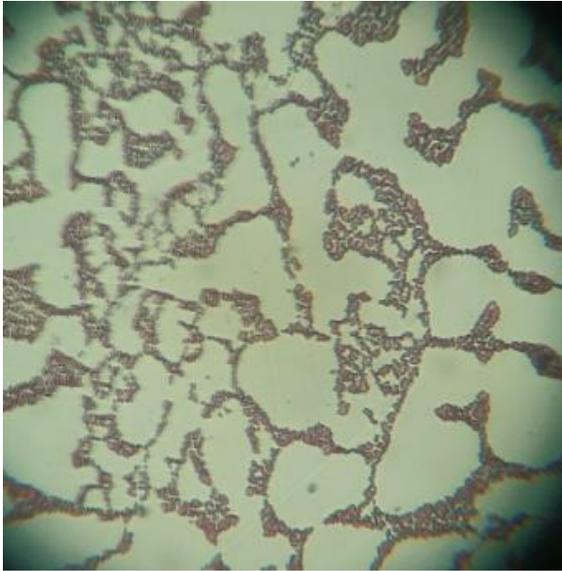
Se realizó la tinción de Gram para determinar la morfología microscópica de las bacterias aisladas. La figura 8 muestra los frotis teñidos de las cepas para ser observadas al microscopio óptico en busca de identificar tipo de bacteria y agrupamientos, aspectos que son la pauta para su clasificación inicial e identificación.



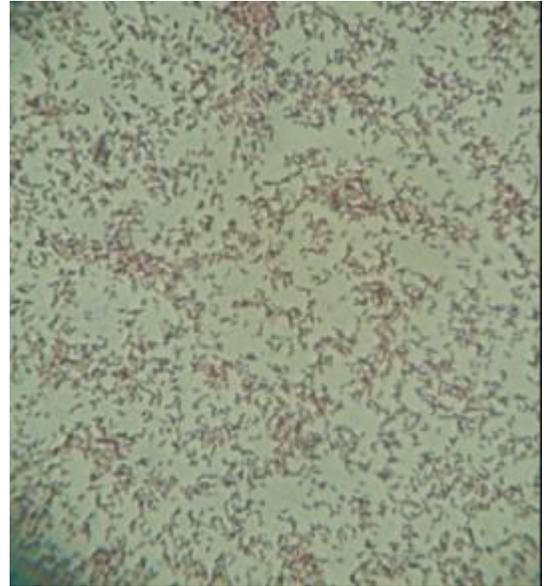
Figura 8 Tinción Gram de las cepas aisladas

En la figura 9 se puede observar la morfología celular que corresponden a bacilos Gram negativos para las 4 cepas aisladas.

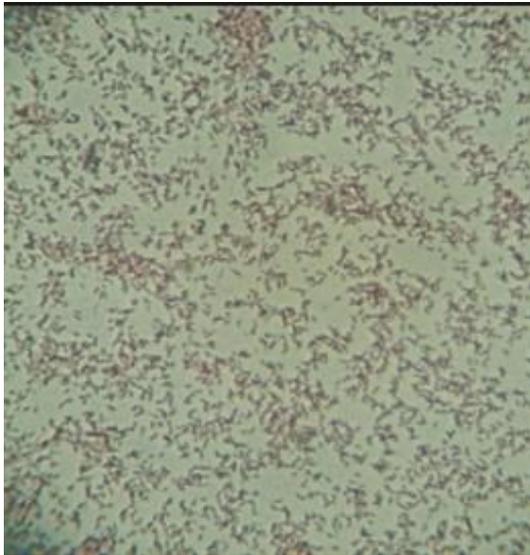
Cepa A



Cepa B



Cepa C



Cepa D

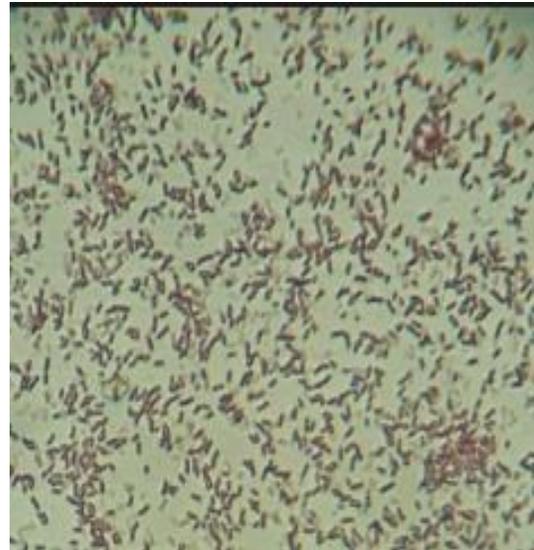


Figura 9 Resultados de tinción Gram Cepas A, B, C y D

3.4.3. Pruebas enzimáticas

Las cepas aisladas de sometieron a las pruebas enzimáticas de oxidasa y catalasa los resultados de presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultado de pruebas enzimáticas

		Cepas			
Enzima	A	B	C	D	
Oxidasa	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	



Catalasa	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
-----------------	----------	----------	----------	----------



Se tiene resultados positivos para las dos enzimas, lo que significa que las cepas aisladas corresponden a organismos aerobios o anaerobios facultativos; la prueba de oxidasa diferencia al género *Pseudomona* (positivas) de las enterobacterias (negativas).

3.4.4. Medios selectivos

Los medios selectivos son otra etapa para la clasificación de las cepas aisladas, con ellos se puede identificar el género al que pertenecen algunas bacterias, por el vire al utilizar algún componente específico que contiene el medio o bien, por la inhibición del crecimiento, los resultados se resumen en la tabla 15.

Tabla 15. Crecimiento en medios selectivos

Medio	Uso	Cepas			
		A	B	C	D
CET	Para el aislamiento selectivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	-	-	+	-
DSX	Aislamiento y diferenciación de bacilos entéricos Gram (-) medio de diferenciación débilmente selectivo.	+	+	+	+
EAM	Identificación y diferenciación de enterobacterias, medio selectivo para bacilos Gram (-).	+	+	+	+
MC	Selectivo y diferencial para la detección y aislamiento de Gram (-). incluyendo coliformes totales.	+	+	+	+
SM	Para crecimiento Gram (+), inhibe el crecimiento de Gram (-).	-	-	-	-
BG	Aislamiento e identificación de levaduras del género <i>Cándida</i>	-	-	-	-

Sin crecimiento (-), crecimiento (+). CET (Cetrimida, DSX (Desoxicolato), AEM (Eosina y azul de metileno), MC (MacConkey), SM (Sal y manitol) y BG (Biggy).

En esta etapa de identificación se confirma lo encontrado en las tinciones, las cepas aisladas corresponden al grupo Gram negativos teniendo crecimiento en el medio para bacilos entéricos (cepas A, B y D), crecimiento presuntivo de pseudomona que también se correlaciona con los resultados de oxidasa positiva (C).

3.4.5. Pruebas Bioquímicas

El resultado de las pruebas bioquímicas efectuadas a las cepas aisladas se presenta en la tabla 16.

Tabla 16. Resultados de pruebas bioquímicas

CEPA	TSI					MIO		OF		Citrato	Urea	
	No fermenta azúcares	Fermenta glucosa	Fermenta lactosa y	Produce gas	Produce H ₂ S	Motilidad	Indol	Ornitina	Oxidativo			Fermentativo
A	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Las bioquímicas indican que se trata de microorganismos no fermentadores de azúcares. Tres de las cuatro cepas aisladas presentaron características diferentes, A es similar a D.

3.5. Identificación de cepas aisladas por PCR

El resultado de PCR con una cobertura de consulta > 90 % y el porcentaje de identidad más alto A a nivel de género (Al-Marri et al., 2023) se presentan en la tabla 17.

Tabla 17. Identificación molecular de cepas aisladas de agua residual hospitalaria resistentes a Metronidazol

Cepa	Identidad bacteriana	Similitud (%)	Cobertura (%)
A	<i>Acinetobacter sp</i>	99.63	98
B	<i>Comamonas aquatica</i>	96.88	89
C	<i>Pseudomonas sp</i>	95.58	100

El género *Acinetobacter* fue identificado por primera vez en 1911, son bacterias estrictamente aeróbicas, cortas, con forma de bastón, a menudo encapsuladas, inmóviles y clasificadas como Gram negativas se asocian cada vez más con infecciones nosocomiales (Percival et al, 2014). Las especies de *Acinetobacter* pueden volverse resistentes a muchos antibióticos activando mecanismos celulares o adquiriendo genes de resistencia mediante transferencia horizontal de genes (Hubeny et al., 2022). Las *Comamonas aquatica* pertenece al género *Comamonas* (descrito en 1985 por primera vez) y a la familia Comamonadaceae, estos bacilos gramnegativos son estrictamente aeróbicos, no forman esporas, móviles, oxidasa y catalasa positivos (Kaeuffer et al., 2018). Por su parte, las *Pseudomonas* son proteobacterias Gram negativas con forma de bastón, pueden reaccionar rápidamente a las perturbaciones ambientales, participan en importantes actividades metabólicas como la degradación de compuestos biogénicos, aromáticos y contaminantes xenobióticos (Ramasamy et al., 2023). Estas características respaldan los resultados obtenidos durante el proceso de identificación con las bioquímicas, medios selectivos y morfología microscópica.

3.6. Pruebas de degradación de metronidazol

Los ensayos para evaluar degradación del metronidazol se realizaron con las tres cepas aisladas que presentaron resistencia al antibiótico: *Acinetobacter sp*, *Comamonas aquatica* y *Pseudomona sp*. Se estudio una concentración inicial teórica de 250 mg/L de MTZ para cada cepa, preparando la disolución en medio mineral, adicionando la suspensión bacteriana igualada a un estándar Mc Farland de 0.5, dosificando en tubos independientes. Todas las pruebas se incubaron a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a diferentes días para evaluar la densidad óptica a 600 nm y la cuantificación de activo por espectrofotometría de UV-Vis. Los resultados se presentan en la figura 10.

Con la cepa *Acinetobacter sp* se observa una densidad óptica (DO) de 0.13 UA a partir del primer día de incubación que se mantiene casi sin cambio hasta el día 16, donde se presenta un decaimiento, lo que indica que se requiere un tiempo de degradación extenso con la concentración de 250 mg/L de MTZ. Por otro lado, *Comamonas aquatica* presentó un valor bajo de DO (0.033 UA) al igual que la *Pseudomona sp* (0.035 UA) y las tres cepas bacterianas en consorcio (0.038 UA) para el primer día y cambios importantes el resto del tiempo monitoreado. Con lo anterior, se concluye que *Acinetobacter sp* tiene un mayor crecimiento bajo las condiciones de prueba, por lo que se decide continuar con los estudios de biodegradación empleando solo esta cepa.

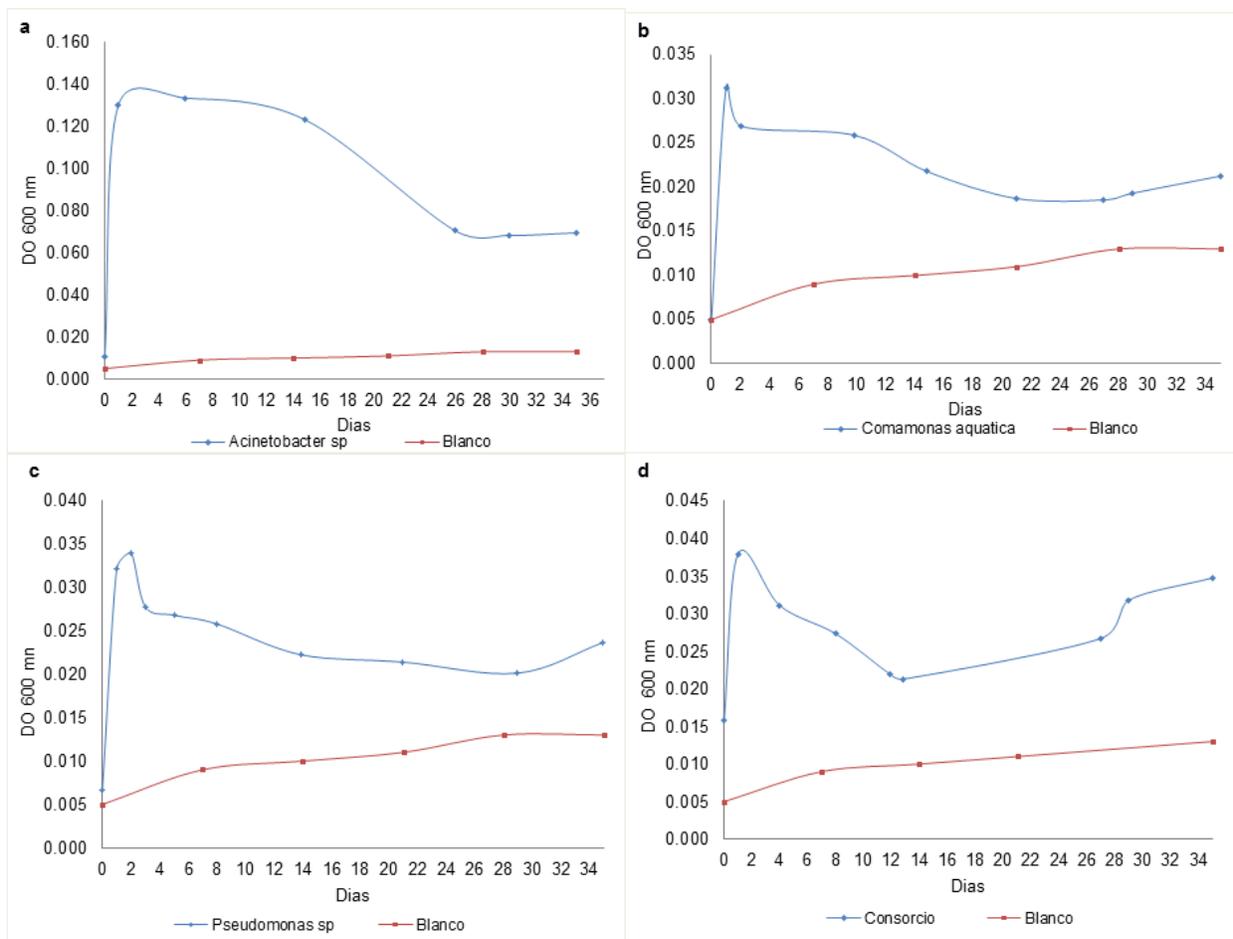


Figura 10 Densidad óptica para cepas aisladas con 250 mg/L MTZ: a *Acinetobacter sp*, b *Comamonas aquatica*, c *Pseudomonas sp* y d consorcio

La cuantificación del metronidazol residual se realizó por espectrofotometría UV-Vis empleando curva estándar de MTZ con concentraciones de 2, 5, 10, 15 y 20 mg/L, la ecuación de línea recta resultante fue: $Y = 5.30E-02X + 8.06E-03$ con un coeficiente de determinación (R) igual a 0.99984.

Los resultados de degradación se presentan en las tablas 18, 19 y 20, ilustrándose de forma gráfica en la figura 11.

Los resultados de degradación arrojan bajos porcentajes en promedio se tiene una degradación para la cepa *Acinetobacter sp* en promedio de 5 % a los 15 días de incubación.

Tabla 18. Degradación de MTZ con *Acinetobacter sp*

Días	Concentración mg/L	Desviación estándar	% Degradación
0	257.29	3.573	0.00
1	245.35	2.002	4.64
2	248.71	0.812	3.34
4	250.86	0.956	2.50
7	246.30	1.686	4.27
10	248.46	0.580	3.43
14	251.24	0.937	2.35
15	244.28	1.401	5.06
21	251.50	1.046	2.25
26	247.19	0.760	3.93
33	244.78	1.046	4.86
35	236.80	0.956	7.96
37	244.15	0.871	5.11

La cepa *Comamonas aquatica* también presenta porcentajes bajos de degradación, de 5 % a los 15 días de incubación y con tendencia similar hasta el día 35, lo que indica, que ese podría ser el valor máximo de degradación.

Tabla 19. Degradación de MTZ con *Comamonas aquatica*

Días	Concentración mg/L	Desviación estándar	% Degradación
0	259.98	2.7235	0.00
1	249.03	1.6159	4.21
2	244.34	0.3399	6.02
7	248.58	0.9436	4.38
8	243.64	1.5041	6.29
10	244.94	1.1041	5.79
12	246.59	1.1799	5.15
13	244.59	1.2352	5.92
14	245.29	1.5482	5.65
15	246.20	1.2121	5.30
21	243.64	1.6159	6.29
29	239.27	1.1609	7.97
35	239.84	0.7910	7.75

Pseudomonas sp fue la cepa que presentó los porcentajes más bajos de degradación (en promedio de 4 % entre los días 14 y 16) y con tendencia similar hasta el día 35, el último día de estudio.

Tabla 20. Degradación de MTZ con *Pseudomonas sp*

Días	Concentración mg/L	Desviación estándar	% Degradación
0	252.42	1.321	0.00
1	238.36	0.622	5.57
2	249.61	1.245	1.11
3	247.84	0.743	1.81
5	249.53	0.880	1.14
8	247.10	0.905	2.11
9	243.36	1.245	3.59
11	241.30	1.850	4.40
14	241.08	1.378	4.49
16	242.63	1.255	3.88
17	245.62	1.165	2.69
21	232.56	1.005	7.87
29	227.81	0.503	9.75
35	230.41	1.476	8.72

El consorcio bacteriano el porcentaje de degradación es de 6 % entre los días 14 y 16, esta variante es la que ligeramente mayor degradación presenta en comparación a las otras pruebas de manera independiente.

Tabla 21. Degradación de MTZ con el consorcio bacteriano

Días	Concentración mg/L	Desviación estándar	% Degradación
0	251.23	0.4997	0.00
1	244.77	0.8827	2.57
2	237.50	0.9836	5.46
4	242.31	1.3363	3.55
6	234.78	1.0859	6.55
7	238.83	1.3218	4.93
8	233.54	2.1663	7.04
12	235.47	1.0030	6.27
13	238.48	1.0709	5.07
14	238.89	0.9513	4.91
16	235.03	1.3789	6.45
21	232.50	0.7679	7.46
27	233.45	0.3955	7.08
35	231.36	1.0464	7.91
44	223.31	0.7679	11.11

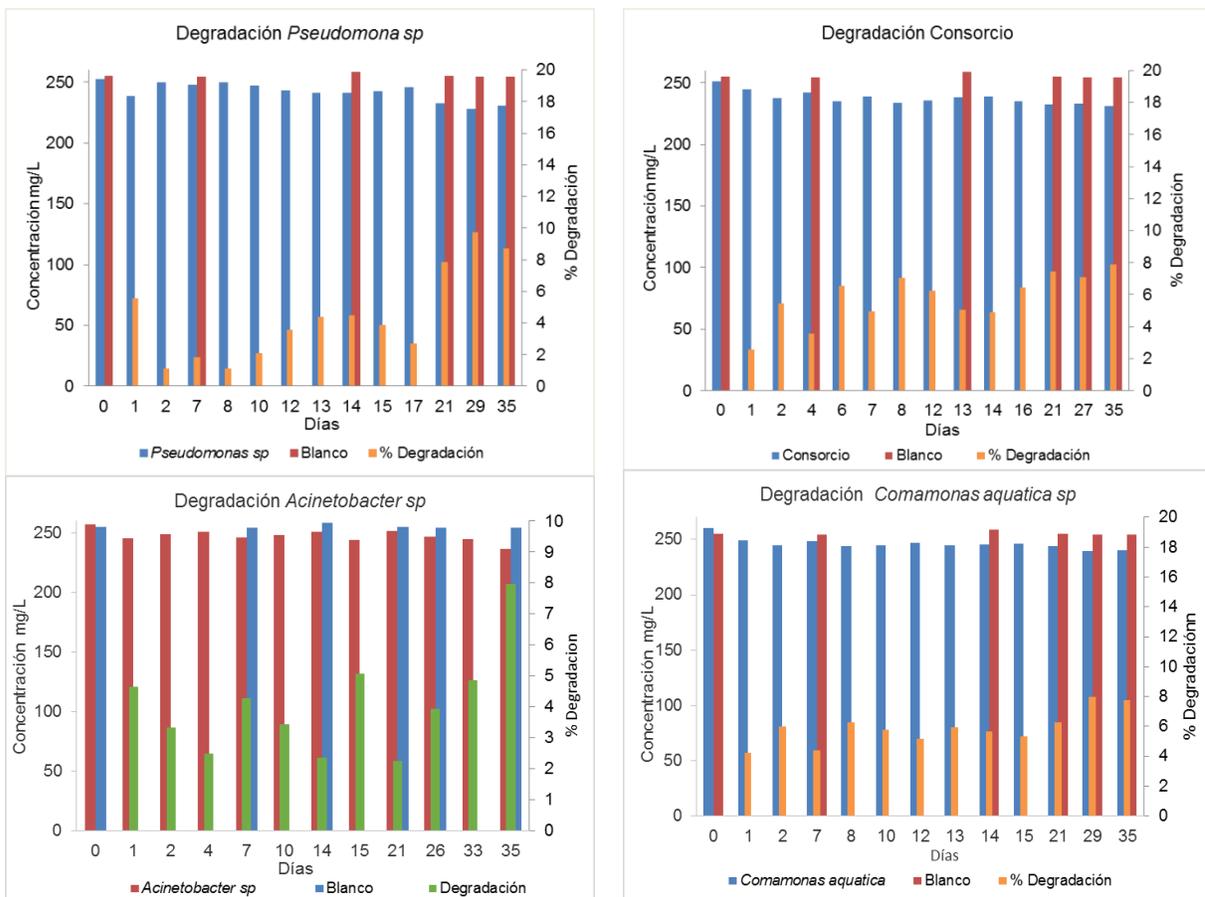
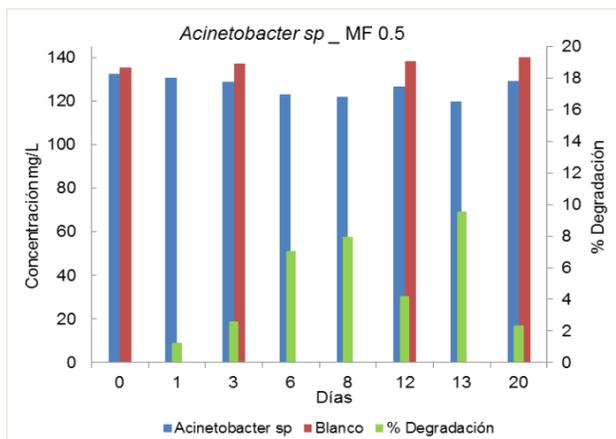
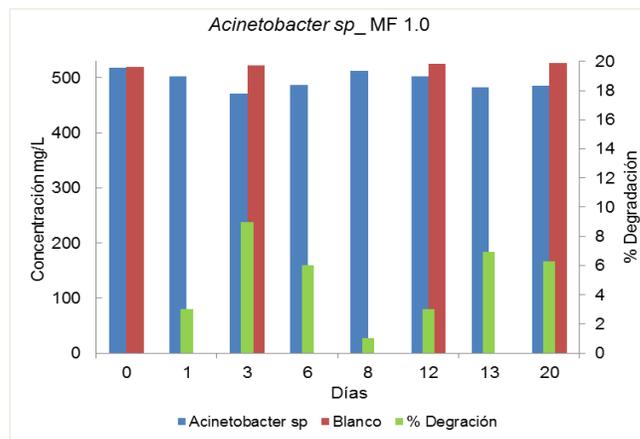


Figura 11 Degradación de MTZ a 250 mg/L por las cepas aisladas

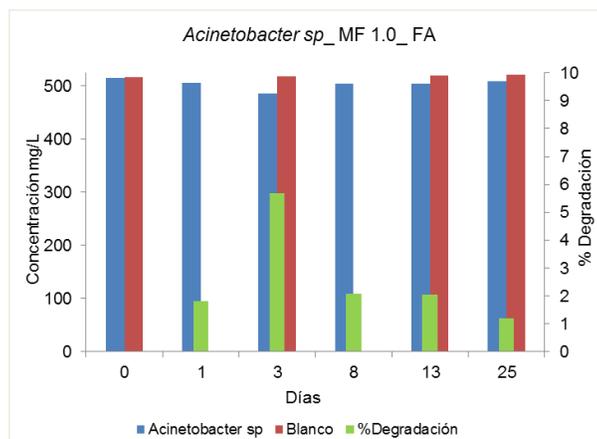
Con base a los resultados obtenidos en el experimento inicial, se realizaron ajustes en busca de condiciones óptimas para favorecer la degradación del fármaco. Se continuó trabajando con la cepa *Acinetobacter sp*, que de manera preliminar presentó la mayor densidad óptica en el medio mineral. Estas modificaciones fueron: experimento 1 (E1) MTZ 125 mg/L, solución bacteriana (SB) a Mc Farland 0.5; experimento 2 (E2) MTZ 500 mg/L, solución bacteriana a Mc Farland 1.0; experimento 3 (E3) MTZ 500 mg/L, solución bacteriana a Mc Farland 0.5 con la incorporación de una fuente adicional de carbono (Glucosa 5.9 mM) Figura 12.



a) E1: MTZ de 132 mg/L, SB a McF 0.5



b) E2: MTZ de 500 mg/L, SB a McF 1.0

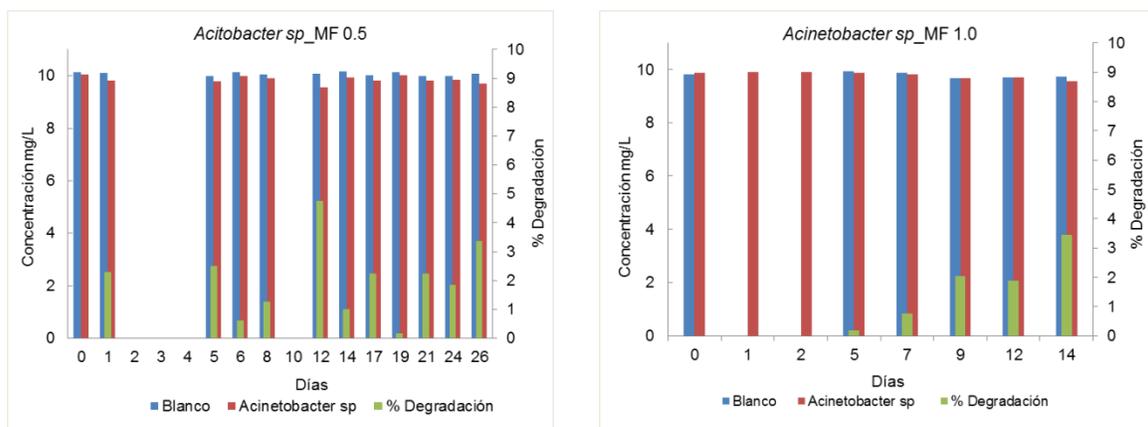


c) E3: MTZ de 500 mg/L, SB a Mc F 0.5, Glucosa 5.9 mM

Figura 12 Experimentos con *Acinetobacter sp* a diferentes concentraciones de MTZ, SB y Glucosa como fuente adicional de carbono

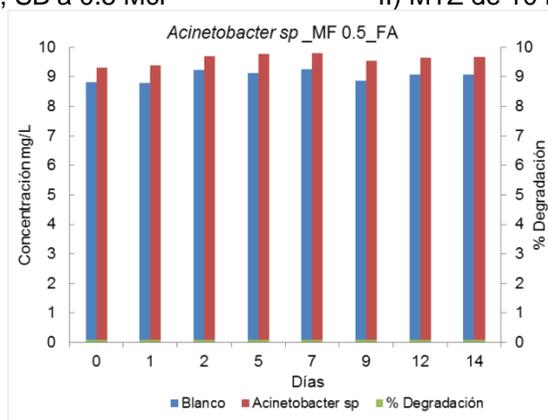
Para E1 se tiene una disminución del fármaco de 8 % en 8 días y hasta de 9.5% en el día 13, E2 de 9 % al día 3 de inoculación esto puede ser atribuido al uso de una cantidad mayor de células en la suspensión bacteriana, E3 presenta un 5.6 % también al tercer día, este resultado denota que el uso de una fuente adicional de carbono en este caso la glucosa, no favorece la disminución del fármaco. Sin embargo, el incremento de número de células acorta el tiempo de degradación, aunque no hay un aumento en el porcentaje de degradación.

Finalmente, se monitoreo la degradación con la cepa *Acitobacter sp* en concentraciones bajas del activo E4 10 mg/L, I) McF 0.5, II) McF 1.0, III) McF 0.5 + Glucosa 5.9 mM. Los resultados se muestran en la figura 13.



I) MTZ de 10 mg/L, SB a 0.5 McF

II) MTZ de 10 mg/L, SB a 1.0 McF



III) MTZ de 10 mg/L, SB a McF 0.5, Glucosa 5.9 mM

Figura 13 Experimentos con *Acinetobacter sp*, 10 mg/L de MTZ, variando cantidad de inculo y glucosa como fuente adicional de carbono

El porcentaje de degradación en E4-I) al día 12 es de 4.7 % el resto del periodo monitoreado presentó un comportamiento fluctuante; E4-II) presenta una tendencia que enmarca una lenta y baja degradación, aumentar la cantidad de células no favorece el proceso ya que se tiene un 3.44% en 14 días; en E4-III) No se observa una disminución del activo, la incorporación de la fuente adicional de carbono no refleja un efecto positivo en el proceso para este rango de concentración. En concentraciones en el orden de 10 mg/L las bacterias presentaron poca actividad de degradación.

4. CONCLUSIONES

Las mejores condiciones cromatográficas para la cuantificación de metronidazol por UPLC de las evaluadas son: fase móvil agua: metanol 95:5, flujo de 0,5 mL/min, volumen de inyección 8 μ L, temperatura de horno y columna 30°C. Bajo estas condiciones el tiempo de retención del metronidazol fue de 1.62 min. La adecuabilidad del sistema cumplió con todos los criterios de aceptación: CV promedio 1.03 ($CV \leq 2\%$); K' promedio de 3 ($K' > 2$); T promedio de 1.0 ($T < 2$) y N de 9 990 a 10 000 ($N > 2 000$).

El sistema en el intervalo de 0.2 a 20 mg/L de metronidazol y el método para el intervalo de 0.5 a 15 mg/L de metronidazol, son lineales, ya que los valores del coeficiente de determinación (r^2) fueron de 0.9999 y 0.9998 respectivamente, los cuales cumplen con el criterio de aceptación ($r^2 \geq 0.98$). Se confirmó la exactitud del método, el porcentaje de recobro para las diferentes concentraciones evaluadas de muestras adicionadas con el antibiótico está dentro de $\pm 20\%$. La precisión se evaluó bajo condiciones de repetibilidad, se cumplió con el criterio de aceptación $CV \leq 2\%$ (rango de CV encontrados: 0.04 a 0.22 %). Los límites de detección y cuantificación para el método fueron de 0.005 mg/L y 0.015 mg/L respectivamente.

Las cepas aisladas del efluente residual presentaron resistencia a la presencia de metronidazol en concentraciones de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 250 y 500 mg/L, la tinción Gram permitió ubicarlas en el grupo de las Gram negativas, la morfología corresponde a bacilos cortos.

Las pruebas enzimáticas y bioquímicas realizadas junto con el crecimiento en medios selectivos proporcionaron información en cuanto al tipo de bacteria y las principales características metabólicas respiración aerobia o facultativa, no fermentadoras de azúcares, se identificó a una de ellas presuntamente como *Pseudomonas*.

Las cepas aisladas se identificaron por PCR como *Acinetobacter sp*, *Comamonas aquatica* y *Pseudomonas sp*, las tres se emplearon en ensayos de degradación para evaluar su potencial en la reducción de metronidazol. Las tres cepas con una concentración de *Acinetobacter sp* presentaron un mayor crecimiento bacteriano por lo que se empleó en diferentes estudios, variando la concentración del activo, inóculo y con una fuente adicional de carbono.

Los ensayos de degradación para las tres cepas y en consorcio, reportan remoción baja en el rango de 4 a 6 % para la concentración de 250 mg/L de metronidazol en un tiempo de 15 días

aproximadamente. Al reducir la concentración del antibiótico a 125 mg/L con la cepa *Acinetobacter sp*, se observó un porcentaje de degradación aproximado del 8 % con inóculo ajustado a 0.5 del Mac Farland y de 9 % en tres días con 500 mg/L y 1,0 del Mac Farland. En concentraciones de 10 mg/L de metronidazol, las bacterias presentaron poca actividad de degradación (4 %). La incorporación de glucosa en una concentración de 5.9 mM como fuente adicional de carbono no benefició el proceso de degradación.

5. FUENTES CONSULTADAS

Aboudalle, A., Djelal, H., Domergue. L., Fourcad, F., Amrane, A. (2021), A novel system coupling an electro-Fenton process and an advanced biological process to remove a pharmaceutical compound, metronidazole, *Journal of Hazardous Materials*, 415, 125705. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125705>

Aguilar-Cepeda S., (2018), CARACTERIZACIÓN DE AGUAS RESIDUALES HOSPITALARIAS, *Dimamica ambiental, Universidad Libre*.

Al-Marri S., Eldos H.I., Ashfaq M.Y., Saeed S., Skariah S., Varghese L., Mohamoud Y.A., Sultan A.A., Raja M.M.,(2023), Isolation, identification, and screening of biosurfactant-producing and hydrocarbon-degrading bacteria from oil and gas industrial waste, *Biotechnology Reports*, Volume 39, e00804. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00804>

Castro-Pastrana, L., Cerro-López, M., Toledo-Wall, M., Gómez-Oliván, L., & Saldívar-Santiago, M. (2021). Análisis de fármacos en aguas residuales de tres hospitales de la ciudad de Puebla, México. *Ingeniería Del Agua*, 25(1), 59–73. <https://doi.org/10.4995/ia.2021.13660>.

Dorado G., Besnard, G., Unver, T., Hernández, P. (2019), Polymerase Chain Reaction (PCR), *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, Elsevier, Editor(s): Roger Narayan, Pages 473-492, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.08997-2>.

Godbey, W. T. (2022), Chapter 10 - The polymerase chain reaction (PCR), *Biotechnology and its Applications*, (Second Edition), Academic Press, Pages 219-246, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817726-6.00010-1>.

Gómez, G. J. y Gómez, J. E. Laboratorio de microbiología. 1. ed. Bogotá D.C: Universidad de La Salle - Ediciones Unisalle, 2011. 125 p.

Guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C, colegioqfb.org.mx.

Gul, S., Hussain, S., Khan, H., Khan, K.I., Khan, S., Ullah, S., Clasen, B., (2022), Chapter 4 - Advances in bioremediation of antibiotic pollution in the environment, In *Advances in Pollution*

Research, *Biological Approaches to Controlling Pollutants*, Pages 49-78, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824316-9.00015-X>.

Hena, H., Gutierrez, L., Crouéa, J. (2020), Removal of metronidazole from aqueous media by *C. vulgaris*, *Journal of Hazardous Materials*, 348, 121400. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121400>.

Hubeny J., Korzeniewska E., Buta-Hubeny M., Zieliński W., Rolbiecki D., Harnisz M., (2022) Characterization of carbapenem resistance in environmental samples and *Acinetobacter* spp. isolates from wastewater and river water in Poland, *Science of The Total Environment*, Volume 822, 153437, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153437>

Imwene K.O., Ngumba E., Kairigo P.K., (2022) Emerging technologies for enhanced removal of residual antibiotics from source-separated urine and wastewaters: A review, *Journal of Environmental Managemen.* <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116065>.

Kaeuffer C., Schramm F., Meyer A., Hansmann Y., Guffroy A Argemi., X., (2018), First case of *Comamonas aquatica* bacteremia complicated by septic shock, *Médecine et Maladies Infectieuses*, Volume 48, Issue 8, Pages 540-542, <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.08.004>

Karungameye, P., Rugaika, A., Mtei, K., Machunda, R. (2023), Physicochemical and microbiological characterization and of hospital wastewater in Tanzania, *Total Environment Research Themes*, Volume 8, 100075, ISSN 2772-8099, <https://doi.org/10.1016/j.totert.2023.100075>.

Khalid, F., Hashmi, M.Z., Jamil, N., Qadir A., Ali M.I., (2021), Microbial and enzymatic degradation of PCBs from e-waste-contaminated sites: a review. *Environ Sci Pollut Res* 28, pp. 10474-10487. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11996-2>

Kumar, R., Samyukthalakshmi, S., Misra, Y., Dwivedi N., (2023), Emerging pollutants of severe environmental concern in water and wastewater: A comprehensive review on current developments and future research, *Water-Energy Nexus*, Volume 6, Pages 74-95, ISSN 2588-9125. <https://doi.org/10.1016/j.wen.2023.08.002>

Kwasi M., Fosu S., Tierayangn A., Bright A- Mohktar Q., Sarkodie A., Serfor-Armah Y., (2023), Isolation and characterization of crude-oil-dependent bacteria from the coast of Ghana using oxford

nanopore sequencing, *Heliyon*, Volume 9, Issue 2, e13075, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13075>

Luna Fontalvo, J. A. (2020). Métodos analíticos de microbiología general y aplicada. Santa Marta, Editorial Unimagdalena. Recuperado de <https://elibro.net/es/ereader/ittoluca/128443?page=32>.

Maculewicz, J., Kowalska, D., Świacka K., Toński, M., Stepnowski, P., Biak-Bielińska, A., Dołzonek J. (2022), Transformation products of pharmaceuticals in the environment: their fate, (eco)toxicity and bioaccumulation potential, *Science of The Total Environment*, 802, 149916. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149916>.

Martínez-Alcalá, I., Soto, J., Lahora, A. 2020. Antibióticos como contaminantes emergentes. Riesgo ecotoxicológico y control en aguas residuales y depuradas. *Ecosistemas* 29(3):2070. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2070>.

Meléndez, J., García, Y., Galván, V., Díaz de León, L., Vargas, K., Mejía, J., Flores, R. (2020), Contaminantes emergentes. Problemática ambiental asociada al uso de antibióticos. Nuevas técnicas de detección, remediación y perspectivas de legislación en América Latina, *Revista de Salud Ambiental*. 20(1):53-61.

Otoo, B.A, Amoabeng I.A, Darko G., Borquaye L.S., (2022), Antibiotic and analgesic residues in the environment – Occurrence and ecological risk study from the Sunyani municipality, Ghana, *Toxicology Reports*, Volume 9, Pages 1491-1500, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.07.003>.

Pariente M.I., Segura Y., Alvarez-Torrellas S., Casas J.A. (et., al), (2022), Critical review of technologies for the on-site treatment of hospital wastewater: From conventional to combined advanced processes, *Journal of Environmental Management*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115769>.

Pedlar M., Emery M.J., Warburton P. J., (2024), Amplifying PCR productivity and environmental sustainability through shortened cycling protocols, *Biochimie*, Volume 221, Pages 60-64, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.01.013>.

Peña, C., Ulloa S., Mora, K., Helena, R., López, E., Álvarez, J., Rodríguez, M. (2019), Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature, *Journal of Environmental Management*, 237, 408-423. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>.

Peris, J., Peris, E., Albiol, J., Durgbanshi, A., Ochoa, E., Carda, S., Bose, D., Esteve, J. (2022), Liquid chromatography, a valuable tool in the determination of antibiotics in biological, food and environmental samples, *Microchemical Journal*, 117, 107309. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107309>

Percival S. L., Williams D. W., (2014), Chapter Two - Acinetobacter, *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)*, Academic Press, Editor(s): Steven L. Percival, Marylynn V. Yates, David W. Williams, Rachel M. Chalmers, Nicholas F. Gray, Pages 35-48, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00002-0>

Ramirez, J. Medina, Y, Uscanga, M (2020). Manual de laboratorio de microbiología. Universidad Veracruzana. Facultad de Química Farmacéutica Biológica recuperado de: <https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Guia-de-Microbiologia.pdf>.

Ramasamy K. P., Brugel S., Eriksson K. I. A., Andersson A., (2023), Pseudomonas ability to utilize different carbon substrates and adaptation influenced by protozoan grazing, *Environmental Research*, Volume 232, 116419, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116419>.

Reberski, J.L., Terzc, J., Maurice, L.D., Dan, J., Lapworth, D.L. (2022), Emerging organic contaminants in karst groundwater: A global level assessment, *Journal of Hydrology*, 664,127242. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2021.127242>.

Reis, A. C., Kolvenbacha, B. A., Nunesb, O. C., Corvinia, P. F.X. (2020), Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part I, *New BIOTECHNOLOGY*, 54, 34–51. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.08.002>.

Sanabria-Perez, F. J., Alanis Mendez, J. L., Pech-Canche, J. M., & Solis-Maldonado, C. (2020). Principales residuos de medicamentos generados en los hogares y su potencial ecotoxicológico en Tuxpan, Veracruz. *Acta Universitaria* 29, e2398. doi. <http://doi.org/10.15174.au.2019.2398>.

Sharma, G., Pahade, P., Durgbanshi, A., Carda-Broch, S., Peris-Vicente, J., Bose, D., (2022), Application of micellar liquid chromatographic method for rapid screening of ceftriaxone, metronidazole, amoxicillin, amikacin and ciprofloxacin in hospital wastewater from Sagar District, India, *Total Environment Research Themes*, Volumes 1–2, 100003, <https://doi.org/10.1016/j.totert.2022.100003>.

Szentmihályi, K., Süle, K., Anna Egresi, A., Blázovics, A., May, Z. (2021), Metronidazole does not show direct antioxidant activity in vitro global systems, *Heliyon*, 7, e06902. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06902>

Tahrani L., Soufi L., Mehri I., Najjari A., Hassan A., Van J., Reyns T., Cherif A., Mansour H. B., (2015) Isolation and characterization of antibiotic-resistant bacteria from pharmaceutical industrial wastewaters, *Microbial Pathogenesis*, Vol. 89. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.09.001>

World Health Organization Model List of Essential Medicines – 22nd List, 2021. Geneva: World Health Organization; 2021 (WHO/MHP/HPS/EML/2021.02). Recuperada de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/345533/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02-eng.pdf>.

Yan, R., Wang, Y., Li, V., Wang, X., Wang, Y. (2022), Determination of the lower limits of antibiotic biodegradation and the fate of antibiotic resistant genes in activated sludge: Both nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria matter, *Journal of Hazardous Material*, 425, 127764. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127764>.

Yang, Z., Zou, L., Xia, J., Qiao, Y., Bai, F., Wang, Q., Cai, D. (2022), Spatiotemporal variation characteristics and source identification of water pollution: Insights from urban water system, *Ecological Indicator*, 139, 108892. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108892>.

Metepec, Estado de México a 5 de agosto de 2024.

DR. FRANCISCO JAVIER ILLESCAS MARTÍNEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE

Anteponiendo un cordial saludo, los abajo firmantes **DAMOS FE** que el archivo Tesis_Martha_Manjarrez_Olvera.PDF es la versión final de la tesis de la I.Q Martha Manjarrez Olvera con número de control M22280262 que desarrollo como proyecto de investigación en la Maestría en Ciencias de la Ingeniería Ambiental.

Quedo atenta a cualquier comentario.

Atentamente



Maribel Verónica Albiter López
Directora de Tesis



Martha Manjarrez Olvera
Tesisista