



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina
Departamento de Estudios Avanzados
maestría en Ciencias de la Salud

“TITULO”

“Degradación de antiinflamatorios no
esteroideos por bacterias extremotolerantes”

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

Claudia Soria Camargo

Comité de Tutores

Directora

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Codirector

Dr. Ángel Horacio Sandoval y Trujillo

Asesor

Dr. Ramón Alberto Batista García

Toluca, Estado de México

2024

INDICE GENERAL

	No. página
1. RESUMEN	6
1.1 ABSTRACT	7
2. MARCO TEORICO	8
2.1 Contaminantes emergentes	8
2.1.1 Contaminantes emergentes de origen farmacéutico	10
2.1.1.1 Antinflamatorios no esteroideos como contaminantes emergentes	10
2.1.2 Impacto de los contaminantes emergentes de origen farmacéutico en la salud	12
2.2 Antinflamatorios no esteroideos	14
2.2.1 Diclofenaco	15
2.2.2 Ibuprofeno	16
2.2.3 Paracetamol	16
2.3 Biorremediación	17
2.4 Microorganismos extremófilos	18
2.4.1 Bacterias extremófilas	22
2.4.2 Actinobacterias extremófilas	23
2.5 Ambientes extremos de México	24
Ambientes con temperaturas extremas	24
Ambientes con pH extremo	25
Ambientes con elevadas concentraciones de NaCl	26
2.6 Antecedentes de estudios de biodegradación de antinflamatorios no esteroideos.	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	31
5. JUSTIFICACIÓN	32
6. HIPÓTESIS	34
7. OBJETIVOS	35
7.1 Objetivo General	35
7.2 Objetivos Específicos	35
8. MATERIALES Y MÉTODOS	36

8.1 Diseño de estudio	36
8.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	36
8.3 Procedimientos	37
8.4 Variables de Estudio	50
8.5 Implicaciones Bioéticas	50
8.6 Recolección de Datos	51
8.7 Análisis Estadístico	51
9. OPERALIZACION DE VARIABLES	52
10. RESULTADOS	53
10.1 Comprobante de envío del artículo	53
10.2 Resumen del artículo	53
11. DISUSION	54
12. CONCLUSIONES	56
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	No. página
Figura 1. Clasificación de los contaminantes y otras sustancias de preocupación emergente	7
Figura 2. Distribución geográfica de las investigaciones realizadas en México por entidad federativa, acerca de la ocurrencia de contaminantes emergentes en aguas subterráneas y superficiales.	8
Figura 3. Estructura química del diclofenaco	15
Figura 4. Estructura química del ibuprofeno	16
Figura 5. Estructura química del paracetamol	16
Tabla 1. Clasificación de microorganismos extremófilos	20
Figura 6. Morfología de actinobacterias.	22
Figura 7. Imagen satelital del cráter del volcán Chichonal, Chiapas, México.	25
Figura 8. Imagen satelital de la Laguna Salada, Baja California, México.	25
Figura 9. Ubicación geográfica de los puntos de muestreo: Laguna Salada, Mexicali, Baja California y el Volcán Chichonal Chiapas en México	36
Figura 10. Esquema del procedimiento del aislamiento y purificación de las cepas.	38
Figura 11. Esquema del procedimiento de la tinción de Gram	39
Figura 12. Esquema del procedimiento de la caracterización de NaCl.	40
Figura 13. Esquema del procedimiento de la caracterización de pH.	40
Figura 14. Esquema del procedimiento de la caracterización de temperatura.	40
Figura 15. Esquema del procedimiento de la Pruebas de tolerancia a la presencia de antiinflamatorios no esteroideos en caja Petri.	42
Figura 16. Esquema del procedimiento de la Pruebas de tolerancia a la presencia de antiinflamatorios no	43

esteroideos en espectrofotómetro.

Tabla 2. Condiciones y cebadores empleados para la amplificación del gen rpoβ	45
Figura 17. Esquema del procedimiento de la identificación genética.	49
Tabla 3. Operalización de variables dependientes e independientes	52

1. RESUMEN

Introducción: Los contaminantes emergentes de origen farmacéutico como el diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol; los cuales pertenecen al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), son medicamentos ampliamente prescritos a nivel global, por su alta demanda en el mercado, debido a que comparten la misma acción terapéutica y se emplean como tratamiento para la inflamación con o sin presencia de dolor. Estos AINEs se encuentran dentro de la categoría que más se ha detectado en agua residual en lo que respecta a contaminantes emergentes derivados de productos farmacéuticos. La biorremediación es una técnica la cual consiste en emplear organismos vivos para la degradación o eliminación total de contaminantes presentes en el medio ambiente. La biodegradación de a partir de microorganismos tiene muchas ventajas al utilizarlos para llevar a cabo sus funciones metabólicas; como la reducción de costos y condiciones operativas consideradas más amigables para el ambiente. Esta técnica también se ha implementado en los últimos años, derivado de la búsqueda de microorganismos extremófilos como los halófilos, para ser utilizados en técnicas de pretratamiento, tratamientos fisicoquímicos híbridos y el desarrollo de nuevos biorreactores. Las bacterias halófilas marinas se han aplicado para el tratamiento de aguas residuales farmacéuticas con elevadas concentraciones de sal, demostrando alta eficiencia en la degradación de compuestos recalcitrantes.

Objetivo: identificación de bacterias extremotolerantes con capacidad para degradar AINEs, contaminantes emergentes que pueden afectar la salud humana y ambiental.

Materiales y métodos: Se aislaron 50 cepas, 25 cepas de cada ambiente extremo. Se caracterizaron morfológicamente, se les determinó el espectro fisiológico de crecimiento y se identificaron genéticamente, se sometieron a una prueba de tolerancia a diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol a concentraciones de 1ppm, 10ppm y 100ppm de cada AINE. **Resultados:** Las cepas aisladas del volcán El Chichonal resultaron tener una mejor tolerancia a la presencia de AINEs en comparación con las de la Laguna Salada; siendo las cepas de *Bacillus siamensis*, P3SED2; *Micrococcus luteus*, P9AGU1, P8SUE1 y P5SED5; y *Kocuria rizophila*, P1AGU3; las que toleraron la presencia de diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol en concentraciones de 1ppm, 10ppm y 100ppm. **Conclusiones:** Los resultados obtenidos demostraron la capacidad tolerancia a AINEs, para las especies *Aerococcus urinaequi*, *Bacillus siamensis*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus yunanensis* y *Kocuria rizophila*.

1.1 ABSTRACT

Introduction: Emerging contaminants of pharmaceutical origin such as diclofenac, ibuprofen and paracetamol; which belong to the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), are medications widely prescribed globally, due to their high demand in the market, because they share the same therapeutic action and are used as a treatment for inflammation with or without the presence of pain. These NSAIDs are within the category that has been detected the most in wastewater with regard to emerging contaminants derived from pharmaceutical products. Bioremediation is a technique which consists of using living organisms for the degradation or total elimination of contaminants present in the environment. The biodegradation of microorganisms has many advantages when using them to carry out their metabolic functions; such as cost reduction and operating conditions considered more environmentally friendly. This technique has also been implemented in recent years, derived from the search for extremist microorganisms such as halophiles, to be used in pretreatment techniques, hybrid physicochemical treatments and the development of new bioreactors. Marine halophilic bacteria have been applied for the treatment of pharmaceutical wastewater with high salt concentrations, demonstrating high efficiency in the degradation of recalcitrant compounds. **Objective:** identification of extreme-tolerant bacteria with the capacity to degrade NSAIDs, emerging contaminants that can affect human and environmental health. **Materials and methods:** 50 strains were isolated, 25 strains from each extreme environment. They were morphologically characterized, their physiological growth spectrum was determined and they were genetically identified. They underwent a tolerance test to diclofenac, ibuprofen and paracetamol at concentrations of 1ppm, 10ppm and 100ppm of each NSAID. **Results:** The strains isolated from the El Chichonal volcano turned out to have better tolerance to the presence of NSAIDs compared to those from Laguna Salada; being the strains of *Bacillus siamensis*, P3SED2; *Micrococcus luteus*, P9AGU1, P8SUE1 and P5SED5; and *Kocuria rizophila*, P1AGU3; those that tolerated the presence of diclofenac, ibuprofen and paracetamol at concentrations of 1ppm, 10ppm and 100ppm. **Conclusions:** The results obtained demonstrated the degradation potential of NSAIDs for the species *Aerococcus urinaequi*, *Bacillus siamensis*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus yunnanensis* and *Kocuria rizophila*.

2. MARCO TEORICO

2.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), los contaminantes emergentes no se encuentran regulados adecuadamente e impactan directamente en la calidad del agua, con posibles efectos adversos para la salud humana (1).

Los contaminantes llamados emergentes hacen referencia a todos aquellos contaminantes que no están controlados o regulados por una norma que exija la notificación de su presencia en los suministros de agua o aguas residuales. Este tipo de contaminantes abarcan una gran lista de productos como los pesticidas, drogas lícitas e ilícitas, aditivos alimentarios, conservadores, productos del cuidado personal, hidrocarburos aromáticos policíclicos, productos farmacéuticos como antibióticos, hormonas, y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como el diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol, entre otros, como se indica en la figura 1 (2).

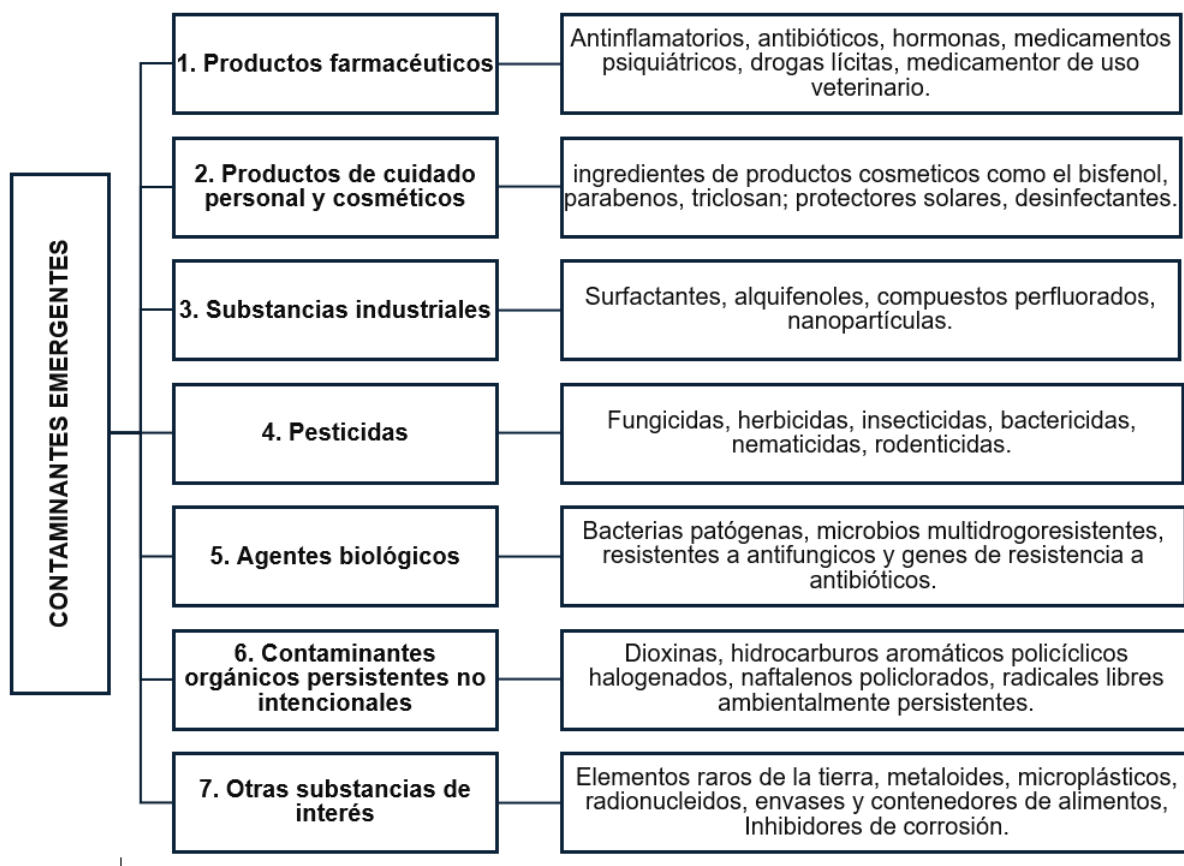


Figura 1. Clasificación de los contaminantes y otras sustancias de preocupación emergente. Modificado de Morin-Crini *et al.*, 2022.

Dada la acumulación de este tipo de contaminantes en el ambiente es notable que las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales son ineficaces para eliminar los compuestos farmacéuticos y que son eco-tóxicos para los sistemas acuáticos y terrestres (3); dado que su diseño está orientado primordialmente en la eliminación de materia orgánica y no en los contaminantes como los de origen farmacéutico. (4).

Aunque las concentraciones de un producto de manera individual pueden estar en el rango de los nanogramos por litro, los contaminantes emergentes normalmente se encuentran en el agua como mezclas más complejas, metabolitos de transformación y pueden tener efectos sinérgicos que aún son desconocidos (5,6).

Es necesario fortalecer la comprensión de los posibles riesgos para la salud y alteración de los ecosistemas que pueden tener los contaminantes emergentes, así como su presencia en los recursos hídricos, agua residual y acumulación en el medio ambiente, ya que la información actual sobre este tema es escasa (1).



Figura 2. Distribución geográfica de las investigaciones realizadas en México por entidad federativa, acerca de la ocurrencia de contaminantes emergentes en aguas subterráneas y superficiales. (Tomado de Vázquez-Tapia, *et al.*, 2022)

En México se han realizado diversas investigaciones sobre los contaminantes emergentes, donde se ha detectado la presencia de diversos compuestos como disruptores endocrinos, pesticidas, metales y contaminantes de origen farmacéutico; de los cuales destacan los antibióticos, reguladores lipídicos, hormonas, psicotrópicos, antiinflamatorios no esteroideos entre muchos otros (7–19).

2.1.1 Contaminantes emergentes de origen farmacéutico

De acuerdo con Azuma *et al.* los contaminantes emergentes que se derivan de compuestos farmacéuticos más ampliamente distribuidos en aguas superficiales a nivel global, se encuentran englobados en 11 grupos terapéuticos: analgésicos, antipiréticos, broncodilatadores, antivirales, antimicrobianos, anticancerígenos, psicotrópicos, antihipertensivos, antipruriginosos, medios de contraste para rayos X, hierbas medicinales y fitoestrógenos; englobando en total 58 fármacos diferentes entre los que destacamos ibuprofeno y paracetamol, pero también encontramos indometacina, losartán, levofloxacino, azitromicina, aciclovir, carbamazepina, y otros más (20).

Actualmente la detección de productos farmacéuticos en aguas superficiales, subterráneas, costeras e incluso en agua potable, información ampliamente documentada. Asimismo, también podemos encontrar productos farmacéuticos distribuidos en medios sólidos como el suelo y los lodos provenientes de las depuradoras (4)

Los productos farmacéuticos se emplean diariamente y de manera global, por lo que su presencia en el medio ambiente representa un problema de salud pública y medioambiental (6). Estos productos pueden llegar al medio ambiente a través de diferentes etapas: durante su ciclo de vida, fases de producción, distribución, adquisición y uso doméstico (5).

2.1.2 Antiinflamatorios no esteroideos como contaminantes emergentes

En Malasia, Modh Hanafiah *et al.*, (2021) concluyeron que la fuente primaria de contaminación por contaminantes emergentes de origen farmacéutico procede de las aguas residuales de las zonas urbanas; donde detectaron concentraciones elevadas

de AINEs en el efluente, afluente y en aguas superficiales provenientes del río Langat, una zona urbana, estas se encuentran en rangos de 5870-71800 ng/L (21).

Un estudio en Grecia (2021), de epidemiología basada en aguas residuales realizado para identificar las modificaciones en el consumo de medicamentos empleados antes de la pandemia por COVID-19 (2019) y durante la misma (2020), mostró un aumento importante en la presencia de paracetamol, ya que, en 2019, los niveles de concentración de este fármaco fueron de 76.044 g/día, mientras que en 2020 se registró un aumento del 198% con una concentración de 226.449 g/día (22).

En California, EUA, Maruya *et al.*, (2022) analizaron tres cuencas hidrográficas en donde se descargan efluentes de aguas de tratamientos residuales municipales, de estas dos se ubican en zonas urbanas y la tercera en una zona rural, los resultados arrojaron que había presencia de contaminación con diferentes compuestos farmacéuticos como estradiol, ibuprofeno y diclofenaco en concentraciones <1 - 190 ng/L (23).

En México los contaminantes emergentes que se han estudiado en aguas superficiales, subterráneas y residuales abarcan principalmente la categoría de compuestos farmacéuticamente activos como ácido salicílico, ácido clofibrico, atenolol, cafeína, carbamazepina, diclofenaco, gemfibrozilo, ketoprofeno, ibuprofeno, naproxeno, paracetamol y sulfametoxazol (10).

En un estudio en 2013, en la Ciudad de México (CDMX) se detectaron contaminadas las principales fuentes de abastecimiento de agua potable con compuestos de origen farmacéutico tales como: diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, ácido salicílico, entre otros. Las concentraciones detectadas en aguas superficiales de estos fármacos van de 15 a 186 ng/L. La principal vía de llegada de estos contaminantes al agua es a través de los sistemas de drenaje de uso doméstico, hospitalario y veterinario, debido al alto depósito de medicamentos como consecuencia del aumento en su consumo (17).

En otro estudio realizado en el estado de Morelos, México, se determinó la presencia de contaminantes de origen farmacéutico en aguas superficiales y subterráneas. En las aguas superficiales los fármacos más abundantes fueron los analgésicos y antiinflamatorios como el naproxeno (732–4880 ng/L), paracetamol (354–4460 ng/L)

y diclofenaco (258–1398 ng/L), y el regulador lipídico bezafibrato (286–2100 ng/L), (18).

Además, la aparición de la enfermedad COVID-19, produjo un aumento en el consumo de AINEs, como por ejemplo diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol (5). Un estudio señaló que los AINEs fueron de los medicamentos más empleados en la práctica de la automedicación derivada de la aparición de esta enfermedad con un 72.5% de incidencia (n=806) (24).

Debido a lo anterior, los AINEs se han detectado con mayor frecuencia en aguas residuales de origen doméstico u hospitalario. Otro de los puntos a considerar es que estos contaminantes no se encuentran únicamente de manera individual, ya que existe la probabilidad de la formación de mezclas con otros xenobióticos que ocasionen la potenciación de su impacto sobre la naturaleza y la salud humana (5).

2.1.3 Impacto de los contaminantes emergentes de origen farmacéutico en la salud

Los medicamentos que forman parte de los contaminantes emergentes son moléculas con actividad biológica y que además se encuentran activos (25). Su presencia en el medio acuático puede conllevar a la modificación de la calidad del agua y la composición de su biota (26).

Realmente es poco el conocimiento que se tiene sobre el impacto que podrían causar estos contaminantes biológicamente activos en una exposición a largo plazo sobre los ecosistemas y la salud humana (27).

Los productos de origen farmacéutico se metabolizan y se transforman en el cuerpo humano o animal tras su absorción. Las modificaciones que sufre la molécula facilitan su eliminación a través de la orina y las heces (25). Dado que se metabolizan de manera parcial en el organismo, estos compuestos o metabolitos se eliminan también parcialmente en concentraciones significativas antes de entrar en las plantas de tratamiento de aguas residuales (27).

Debido a que los productos farmacéuticos se distribuyen y utilizan a nivel mundial cotidianamente, su liberación al medio ambiente representa un grave problema de salud pública y ambiental. Además, los metabolitos secundarios producidos a partir

de los productos farmacéuticos no se degradan en su totalidad y podrían tener efectos adversos o alterar la comunidad de microorganismos que componen el ecosistema (6).

Los efectos que podrían causar este tipo de contaminantes conllevan un riesgo para el medio ambiente, la producción ganadera, la plantación de cultivos, la salud humana como en el desarrollo fetal. Es de suma importancia mantener la vigilancia sobre la persistencia de los productos farmacéuticos de alto riesgo en el medio ambiente para proteger la salud ambiental, la diversidad acuática y la salud humana (21).

Existen diferentes formas en las que los seres humanos pueden exponerse a los productos farmacéuticos que contaminan el medio ambiente acuático, la primera es a través del agua potable y la segunda por el consumo de organismos acuáticos previamente expuestos a estos contaminantes (28). De la misma manera que otros tipos de contaminantes, los de origen farmacéutico también pueden acumularse en seres vivos, y algunas veces las concentraciones que se alcanzan son incluso más altas que las que se pueden encontrar en el ecosistema (4). Por lo tanto, los posibles riesgos de exposición para la salud son motivo de preocupación, especialmente para países que utilizan el agua superficial como una de sus principales fuentes de agua para consumo humano (28).

Los antiinflamatorios como el diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno aumentan la mortalidad del sapo espinoso andino *Rhinella spinulosa* en estadios juveniles, a medida que aumenta la concentración del fármaco, lo cual podría ser un indicador de aguas contaminadas por medicamentos antiinflamatorios (29).

Si bien la presencia de compuestos farmacéuticos en el medio ambiente se considera como limitada, aún se desconoce el riesgo que podría causar para las especies acuáticas y la salud humana, incluso con la exposición en periodos prolongados y en bajas concentraciones (30).

Un estudio realizado en China (2017), demostró que en concentraciones de 5.50 y 500 µg/L, el diclofenaco y el ibuprofeno afectaban de manera importante a partir de las 6 h posteriores a la fertilización, los movimientos locomotores del embrión del *Danio rerio* (pez cebra) y que además son neurotóxicos, lo que indica una amenaza para el desarrollo en fase temprana (31).

En otra investigación, Cuthbert *et al.*, (2007) realizaron encuestas en diferentes partes del mundo acerca del uso de AINEs en la práctica veterinaria, específicamente en especies de aves como las rapaces, búhos, cigüeñas y grullas; y encontraron que algunas variedades de AINEs resultaron ser tóxicas, como el diclofenaco, ketoprofeno e ibuprofeno, fármacos que también se emplean en el tratamiento para la salud humana (32).

2.2 ANTINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

La mayor parte de los AINEs son ácidos orgánicos débiles, estos fármacos ejercen mecanismo de acción al inhibir a las ciclooxigenasas (COX) o enzimas prostaglandina (PG) G/H sintasa. Hay dos formas, COX-1 y COX- 2 (33) . La COX-1, constitutivo en las células del cuerpo humano e involucrada en funciones para mantener el equilibrio homeostático y la COX-2, que se expresa en los procesos de la inflamación de manera inducida por las citocinas y mitógenos (34). La mayoría de las acciones antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias propias de los AINEs está dada por la inhibición de la COX-2 (33).

Se clasifican en función de su selectividad en dos grupos, no selectivos, cuando inhiben tanto la COX-1 como la COX-2, y selectivos cuando solamente actúan sobre la COX-2 (34).

La fuerte inhibición que pueden ejercer los AINEs en moléculas como los prostanoïdes, explica los efectos adversos que ocasionan, como ejemplo es la inhibición de la COX-1, que tiene función citoprotectora en el epitelio gástrico y al realizar su efecto terapéutico produce reacciones gástricas e incluso sangrados; por otro lado, la COX-2 está involucrada en el control de la presión arterial, así que su inhibición puede conllevar a hipertensión o eventos trombóticos (33)

Los AINEs son indicados para el manejo del dolor leve, control de la fiebre, inhibir la formación de trombos y reducir la inflamación (35). Sin embargo, durante las últimas décadas se ha ido disminuyendo su prescripción, debido a la falta de seguridad en su perfil farmacocinético.

Debido a que es un medicamento de venta libre al público en general, ha conducido a un aumento global en su consumo (36), ya que son empleados tanto en medicina

humana como la veterinaria por sus amplias propiedades como antiinflamatorios, analgésicos y algunos incluso antipiréticos (37).

En Europa Occidental, América Latina y el Caribe, fármacos como la carbamazepina y los antiinflamatorios no esteroideos como el diclofenaco, ibuprofeno, son de los contaminantes emergentes de origen farmacéutico más detectados en los ecosistemas de agua dulce (3). La exposición de los organismos en los ecosistemas acuáticos a los AINEs más comunes como el ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y paracetamol es un posible un riesgo para los invertebrados presentes en este tipo de agua (37).

2.2.1 Diclofenaco

Es un fármaco derivado del ácido fenilacético, ampliamente utilizado ya que actúa como analgésico, antipirético y antiinflamatorio, que se comporta como un inhibidor selectivo de la COX-2, este se puede encontrar en diferentes presentaciones como gel tópico, tabletas orales, o solución ocular, suspensión inyectable y solución oftálmica. Está aprobado para el tratamiento de artritis reumatoide, osteoartritis, dolor, espondilitis anquilosante, dismenorrea y migraña. También puede producir efectos secundarios gastrointestinales (33).

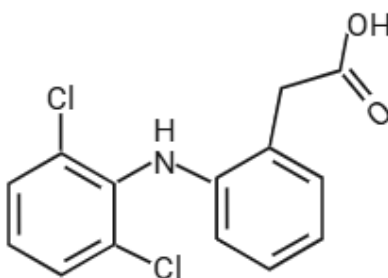


Figura 3. Estructura química del diclofenaco (credo con BioRender).

El diclofenaco es uno de los compuestos incluidos en la primera lista de la Directiva Marco del Agua de la Unión Europea, siendo un contaminante de importancia emergente y con gran relevancia por su uso a nivel mundial por la baja biodegradabilidad que este presenta (38).

2.2.2 Ibuprofeno

Fármaco derivado del ácido propiónico, empleado para el tratamiento de dolor, fiebre, osteoartritis, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias y ductus arterioso persistente en recién nacidos prematuros. Es de venta libre al público, se encuentra en diversas presentaciones farmacéuticas como tabletas masticables, capsulas y capsulas de gelatina blanda, solución, gotas orales y suspensión inyectable. Sin embargo, también se han reportado varios efectos adversos asociados al ibuprofeno como cefalea, efectos gastrointestinales, edema, retención de líquidos, trombocitopenia, visión borrosa y algunos casos de ambliopía toxica (33).

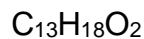
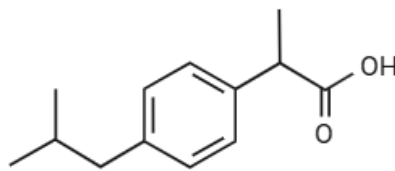
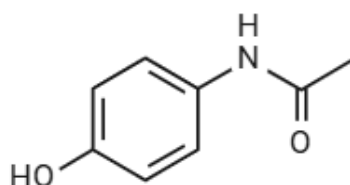


Figura 4. Estructura química del ibuprofeno (creado con BioRender)

El ibuprofeno forma parte de los contaminantes farmacéuticos más detectados en el medio ambiente, sus rutas metabólicas y el efecto tóxico sobre las bacterias en el ambiente no se han estudiado por completo (39)

2.2.3 Paracetamol

El paracetamol es un fármaco inhibidor no selectivo de la COX, metabolito activo de la fenacetina, que se emplea como analgésico y antipirético (antiinflamatorio débil) de uso común para niños y adultos contra a cefalea, odontalgia, fiebre, irritación o inflamación de garganta, se puede comprar sin receta médica, y está disponible solo o combinado con otros compuestos farmacéuticos; este también puede ocasionar algunos efectos secundarios como trastornos gastrointestinales, reacciones de hipersensibilidad y lesión hepática (33).



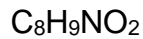


Figura 5. Estructura química del paracetamol (Creado con BioRender).

El paracetamol es un analgésico común y de uso continuo. Este fármaco está contaminando diferentes cuerpos de agua por su liberación al ecosistema.

Debido a la persistencia de este tipo de fármacos en el ambiente es necesario buscar formas para poder eliminarlos; para ello existen métodos como la biorremediación, que se puede emplear para subsanar la presencia de dichos compuestos del medio ambiente (35).

2.3 BIORREMEDIACIÓN

El suelo, los sedimentos y el agua están contaminados por la industria y otras actividades humanas, lo que representa un peligro para la salud humana y ecológica (40). La biorremediación es un proceso que implica el uso de organismos para la eliminación de contaminantes del medio ambiente, este incluye el uso de plantas y hongos, las cuales han demostrado éxito para la eliminación de metales pesados, hidrocarburos, xenobióticos y elementos radioactivos (41), sin embargo, se ha enfocado mayormente en los procesos referentes a las bacterias, ya que tiene diversas aplicaciones en este campo (40).

Los procesos biológicos llevados a cabo por organismos vivos pueden convertir los contaminantes en formas menos tóxicas, mediante mecanismos de adsorción, degradación y/o mineralización. La biorremediación se realiza con el fin de eliminar o reducir los contaminantes ambientales (42).

La biorremediación puede ser: *in situ*, donde se aplica de manera directa en el área contaminada, o bien en desplazarlos a un ambiente particularmente preparado, denominado *ex situ* (42). Este método se considera como fundamental para contribuir en la disminución de la contaminación ambiental (41)

En la biorremediación se tiende a inducir a los microorganismos para que lleven a cabo la eliminación de los contaminantes mediante el uso de nutrientes y otras sustancias químicas (41). Es imprescindible conocer la microbiología de la biodegradación de los contaminantes farmacéuticos para poder desplegar nuevos

enfoques biotecnológicos amigables con el medio ambiente y así poder utilizarlos para mejorar la eficiencia de las plantas de tratamiento de aguas residuales (3).

La biorremediación también ha implementado en los últimos años como una de las principales estrategias de tratamiento de aguas residuales farmacéuticas, el uso de cepas de microorganismos extremófilos, un ejemplo son los halófilos. Algunas bacterias y actinobacterias halófilas marinas se han aplicado para el tratamiento de este tipo de aguas con elevadas concentraciones de sal, demostrando resistencia a fármacos como la penicilina utilizando biorreactores de membrana anaeróbica. Ejemplo de ello son *Oceanimonas* sp., *Vibrio* sp. y *Arthrobacter* sp., halófilas que trataron eficazmente las aguas residuales salinas que contenían concentraciones de 20 mg/L de ampicilina (43).

Un estudio realizado en Malasia (2021), demostró y confirmó que la optimización de la biodegradación del diésel se vio afectada directamente por las condiciones de salinidad, la concentración de nitrógeno y la temperatura. Los datos del estudio indican que la máxima degradación de hidrocarburos se logró a una temperatura de 10-12°C y un pH ligeramente alcalino (pH 8) a partir de un consorcio bacteriano psicotolerante obtenido de la península Antártica (44).

Otro ejemplo de microorganismos extremófilos que participan en la biorremediación de ambientes extremos son las *Archaeas*, capaces de vivir en entornos considerados inhabitables por la mayoría de otros organismos y pueden realizar la eliminación de contaminantes (40).

2.4 MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS

En todos los lugares considerados como extremos que se han estudiado en el planeta, se han encontrado microorganismos. Los microorganismos capaces de desarrollarse bajo condiciones ambientales extremas, aunque crecen mejor en condiciones ambientales normales se denominan extremo tolerantes, pero también existen algunos que incluso necesitan de estas condiciones hostiles de forma obligada para su supervivencia, estos son denominados microorganismos extremófilos (45).

La palabra extremófilo fue acuñada en 1974 por R.D. MacElroy quien los describió como microorganismos que morían bajo condiciones mesófilas y por el contrario

necesitaban de ambientes conocidos como desafiantes u hostiles para su supervivencia óptima (46).

Los extremófilos se distribuyen en ambientes tan radicales como las fuentes termales con agua en ebullición, en el hielo que cubre los lagos, glaciares y mares polares, en aguas de elevada salinidad y en suelos y aguas que tienen un pH que va desde 0 o hasta 12 (47); y abarcan desde hongos, archeas, algas, protozoarios, bacterias hasta algunos organismos pluricelulares (45).

Todas las macromoléculas de los extremófilos o extremotolerantes, como ADN, ARN y/o proteínas, deben mantenerse funcionales y estables para su supervivencia, independientemente del tipo de ambiente al que estén adaptados. La característica más atractiva de estos extremófilos se debe a la variedad de enzimas que secretan. La estabilidad innata de las extremo-enzimas las convierte en candidatas ideales para ser utilizadas en diferentes campos de la industria (48).

Tabla 1.- Clasificación de microorganismos extremófilos.

Tipo de microorganismo	Categoría	Condición extrema	Ambiente extremo Ejemplo	Microorganismo Ejemplo	Referencia bibliográfica
Termófilo	Temperatura	60-80°	Zonas termales	<i>Geobacillus sp</i>	(49)
Hipertermófilo		>80°C	Sistemas hidrotermales.	<i>Methanopyrus kandleri</i>	(45)
Psicrófilo		<15°C	Hielo marino.	<i>Synechococcus lividus</i>	(45,49)
		-15°C-20°C			
Hiperacidófilo	pH	pH <3	Aguas volcánicas y drenajes ácidos de minas.	<i>Clostridium paradoxum</i> <i>Picrophilus oshimae</i>	(50,51)
Acidófilo		pH <5	Áreas volcánicas o con actividad geoquímica.	<i>Acidiphilum cryptum</i>	(50,51).
Alcalófilo		pH >9	Suelos carbonatados, lagos sódicos.	<i>Arthrobacter,</i> <i>Psychrobacter, Vibrio,</i> <i>Natronobacterium,</i>	(45,49)
Piezófilo/Barófilo	Presión	>120 MPa >300 atm	Profundidades de mares y océanos.	<i>Moritella marina</i> <i>C. piezophila</i>	(45,47).
Halófilo	Concentración de NaCl	Débil: 1%-3% NaCl Moderado: 3.1-15% Extremo: >15%	Lagos o lagunas hipersalinos. Agua de mar.	<i>Dunaliella salina</i>	(52)
Halotolerante		Pueden crecer en presencia de NaCl pero no la requieren para sobrevivir.	Agua de mar.	<i>Bacillus licheniformis</i>	(47)
Osmófilos	Concentración de azúcares	En presencia de altas concentraciones de azúcares.	Fermentaciones alimentarias	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(45)

Xerófilos	Disponibilidad de agua	Ambientes sin agua o en desecación.	Desiertos/Antártica	<i>Chroococciopsis</i> sp	(45)
Metalófilos Metalotolerantes	Metales pesados	Tolerantes a altas concentraciones de metales. 130 mM Ni ²⁺ o 5 mM Cu ²⁺ (Cr, Zn, Cd, Co, Pb, Ag, Hg).	Suelos con altas concentraciones de metales como minas o sitios de extracción.	<i>Streptomyces mirabilis</i> <i>Ferroplasma acidarmanus</i>	(45,49)
Toxico tolerantes	Contaminantes químicos	Tolerantes a la presencia de desechos tóxicos o solventes orgánicos.	Agua o suelos contaminados con desechos tóxicos o solventes orgánicos.	<i>Pseudomonas putida</i>	(51).
Radiófilos o radioresistente	Radiación ionizante o ultravioleta	1500-6000 Gy 5000 J/m ² .	Montañas altas con exposición a rayos solares.	<i>Deinococcus radiodurans</i>	(45,53)
Oligotrófico	Medio mínimo inorgánico.	Que crece en un medio basal inorgánico sin fuentes adicionales de carbono, nitrógeno o energía.	Entornos con escasos nutrientes o áridos.	<i>Sphingomonas alaskensis</i> , <i>Caulobacter spp.</i>	(49,54)
Poliextremófilos	Mas de una de categoría	Adaptación a más de una categoría de las antes mencionadas.	Ecosistemas mixtos.	<i>Cyanobacterias</i>	(45)

2.4.1 Bacterias extremófilas

El dominio *Bacteria* está constituido por microorganismos procariotas que pueden ser o no de tipo patógeno para el ser humano; compuesto por una gran variedad de morfologías y fisiologías (47).

Las bacterias extremófilas tienen gran relevancia no solo por su capacidad para tolerar y sobrevivir en ambientes hostiles, sino también por todas aplicaciones en biotecnología, medicina e industrial. Un ejemplo muy importante es el éxito de la PCR debido a las ADN polimerasas termófilas que permiten realizar la técnica en temperaturas muy elevadas, como la de *T. aquaticus* y *P. furiosus* (55).

La capacidad de adaptación a ambientes extremos de estos microorganismos los convierte en potenciales herramientas para la industria y el medioambiente. Como ejemplo, los termófilos que han sido ampliamente empleados en: metalurgia para realizar bio-monitorización y biorremediación, producción de biocombustibles y enzimas hidrolasas con aplicaciones industriales (56).

Además, tienen aplicaciones en el área médica debido a la producción de sustancias antimicrobianas, mientras que, por el lado de la biotecnología, se emplean sus enzimas por ser termoestables y/o estables a diferentes niveles de pH. Los microorganismos litoautótrofos podrían utilizarse para producir una fuente de energía a partir de la recaptación dióxido de carbono atmosférico (57).

Las bacterias extremófilas también tienen participación en la degradación de hidrocarburos como fenol, algunos ejemplos de bacterias que crecen en ambientes de agua saladas, son *Oceanimonas*, *Cobetia*, *Halomonas*, *Vibrio* entre otras (58).

Algunas bacterias halófilas como *Deinococcus* sp. producen pigmentos que funcionan como protección contra el daño oxidativo. *Rubrobacter radiotolerans* produce un pigmento de color rojo que también sirve como un antioxidante eficaz (59).

2.4.2 Actinobacterias extremófilas

Las actinobacterias son Gram positivas, con un alto porcentaje de G-C (guanina-citocina) en su genoma y con la característica peculiar de presentar en su

morfología microscópica un crecimiento ramificado filamentoso, que le da el nombre al filo y a la clase. (60).

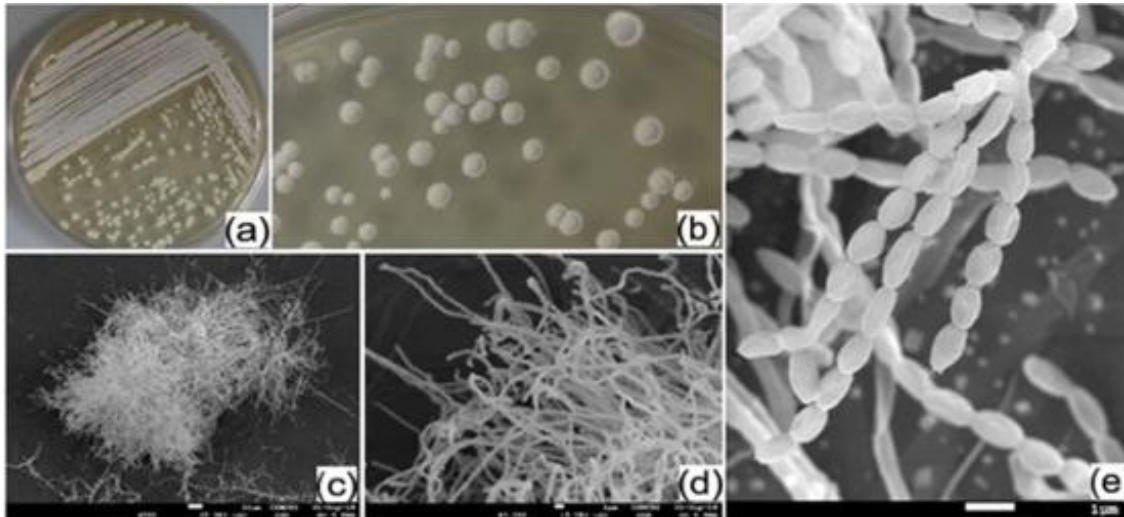


Figura 6. Morfología de actinobacterias: a) Y b) morfología colonial, c) y d) microscopia electrónica de barrido, se observa el crecimiento filamentoso, e) acercamiento en las ramificaciones, mediante microscopia electrónica de barrido. Tomado de José., *et al.*, 2021 (61).

Estas bacterias tienen la capacidad de producir una amplia variedad de compuestos con diferentes aplicaciones tanto en el área médica como de uso industrial (61).

Factores como el rango de temperatura, el pH y la concentración de humedad del suelo influyen sobre el crecimiento de las actinobacterias, la mayoría se clasifican como mesófilas, de acuerdo con la temperatura de crecimiento que va entre los 25 y 30 °C; sin embargo, existen actinobacterias termófilas las cuales pueden crecer en ambientes con temperaturas más elevadas, que van desde los 50°C en adelante. En general las actinobacterias se desarrollan mejor en suelos con un pH cercano al neutro, sin embargo, existen otras que pueden crecer adecuadamente en pH desde 3 o incluso 9, según las condiciones del ambiente (60).

Expandir el repertorio de actinobacterias es una estrategia prioritaria para la obtención de nuevos productos biotecnológicos. Las actinobacterias extremófilas tienen la necesidad y capacidad de producir enzimas con la misma característica de adaptación, “enzimas extremas”, y metabolitos secundarios con inmenso potencial biotecnológico (62). El genoma de las actinobacterias presenta un gran potencial biosintético sin explotar y representa un amplio panorama de futuros descubrimientos (61).

Ambientes extremos como las aguas residuales industriales hipersalinas, hipertérmicas, con presencia de metales y/o con un pH ácido o alcalino necesitan biorremediación (40).

2.5 AMBIENTES EXTREMOS DE MÉXICO

Anteriormente se pensaba que en nuestro ecosistema las características climáticas normales como presión de 1 atm, pH neutro, balance de sal en el agua dulce y el agua de mar, eran las únicas bajo las cuales podía existir la vida; sin embargo, ahora sabemos que la Tierra contiene una inmensa cantidad de ambientes que podrían catalogarse como inhabitables desde el punto de vista humano, esos ambientes se consideran como "extremos" (45).

México tiene una gran diversidad de ambientes, gracias a sus características geográficas, topográficas y climatológicas, que permiten la existencia de diferentes hábitats que albergan un gran número de organismos (51). Lo que lo caracteriza por su gran diversidad de organismos vivos y ambientes extremos, en los cuales se alojan una importante variedad de microorganismos adaptados a esas condiciones extremas de vida, algunos ejemplos son: zonas volcánicas y geotérmicas, desiertos, suelos con altas concentraciones de sal, pozos petroleros y suelos alcalinos y ácidos, entre otras (51).

Algunos ejemplos de ambientes extremos en México:

Ambientes con temperatura extrema

En México se pueden encontrar diversas zonas con temperaturas elevadas como son las áreas volcánicas que aún se encuentran activas, como el Popocatepetl y el Iztaccíhuatl; manantiales termales, suelos muy expuestos a radiación solar, desiertos e incluso zonas cercanas a la industria, varias zonas geotérmicas como: el cinturón volcánico de Los Azufres, Michoacán y Los Hornos en Puebla; el Parícutín (Figura 6, tomado de (63); El Chichonal, Chiapas; Cerro Prieto, Baja California. En estos ambientes a pesar de las altas temperaturas, se presenta el desarrollo de diversos microorganismos termófilos e hipertermófilos (51).

En México también existen ambientes que alcanzan temperaturas extremadamente frías como el Gran Glaciar Norte, el volcán Citlaltépetl o Montaña de la Estrella (náhuatl). Es un estratovolcán y la tercera montaña más alta de Norteamérica, este se localiza en la parte oriental de la Faja Volcánica Transmexicana a 5675 metros sobre el nivel del mar. De este ambiente extremo se han aislado hongos de los géneros *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Pleosporales*, entre otros (64) .

Ambientes con pH extremo

El ámbito acuático de volcanes es considerado un ambiente extremo, y por ello sirven para estudiar las adaptaciones de la vida en dominios adversos. Las poblaciones microbianas y su composición química se asemejan a los sitios de drenaje ácido de minas, aunque existen ciertas diferencias como el origen mayormente abiótico de elementos ácidos y solubles (65).

El Chichonal es un volcán activo; caracterizado por un pH ácido que va entre 5.1 y 6.7. Además, cuenta con la presencia de diversos metales como: Na, K, Ba, Ca, Mg, Sr, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V, y Zn. Además se han aislado otros géneros como *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pantoea*, *Lysinibacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* y *Pandoraea* (66).



Figura 7. Cráter del volcán Chichonal, Chiapas, México. Tomado de Google Earth

- **Ambientes con elevadas concentraciones de NaCl**

El acuífero Laguna Salada, se localiza al norte del estado de Baja California, México y cubre una superficie aproximada de 5,689 km². Este se caracteriza también por presentar tres tipos de climas muy áridos o secos: muy seco-semicálido, muy seco-templado y muy seco cálido (67) que como su nombre lo indica es otro ejemplo de ambiente hipersalino en el país.



Figura 8. Laguna Salada, Baja California, México. Tomado de Google Earth

Otro ejemplo de este tipo de ambientes extremos en México es el lago de Texcoco, ubicado al noroeste del valle del Estado de México, que además de tener suelos con pH alcalino, también presenta altos porcentajes de sodio. En este ambiente se han aislado bacterias actinobacterias haloalcalófilas como *Nocardiopsis salina* y *N. exhalans* (68) y del género *Nesterenkonia* (69).

La Cuenca de Cuatro Ciénegas, ubicada en el Desierto del estado de Coahuila, en el norte de México, es un lugar hipersalino con amplia diversidad de tapetes microbianos y estromatolitos, de donde se han aislado microorganismos de los géneros: *Coleofasciculus*, *Spirochaeta*, *Catalinimonas*, *Desulfovermiculus*, *Halanaerobium*, *Tangfeifania*, *Sungkyunkwania*, *Sediminispirochaeta*, *Imperialibacter*, *Halovivax*, *Halorubrum*, *Halorussus* y *Haloasta* (70).

2.6 ANTECEDENTES DE ESTUDIOS DE BIODEGRADACIÓN DE ANTINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

Diclofenaco

Osorio Lozada *et al.*, (2008) en E.E.U.U., determinaron la capacidad de *Actinoplanes* sp de la familia de Actinomyces, para biotransformar el fármaco diclofenaco, utilizando reactores de cartuchos de fibra hueca. Se demostró que *Actinoplanes* sp. es un microorganismo muy eficiente para metabolizar y transformar el 100% del diclofenaco dentro de 5 h, tolerando la presencia del fármaco en concentraciones de hasta 5Mm y dando como resultado las producciones a escala y caracterización de tres metabolitos: 4 -hidroxi, 5-hidroxi y 4,5-dihidroxi diclofenaco. También se comprobó que se pueden reutilizar varias veces los microorganismos en reactores de cartucho de fibra hueca con diclofenaco como sustrato (71).

En 2018, en Portugal, Moreira *et al.*, evaluaron la capacidad de biodegradación de diclofenaco a partir de *Labrys portucalensis*, aislada de una muestra de sedimento contaminado por industrias en el norte de Portugal. La cepa creció en un rango de temperatura de 16 a 37 °C y un rango de pH de 4,0 a 8,0. En la investigación se obtuvo una biotransformación del 70% a concentraciones de 1.7 y 34 µM, utilizando como única fuente de carbono el fármaco en un lapso de 30 días. Mientras que empleando el co-metabolismo con acetato de sodio 5.9Mm, la degradación completa para 1.7 µM y 34 µM del fármaco, se alcanzó en un periodo de tiempo de 6 y 25 días respectivamente (72).

En 2018 Palyzová *et al.*, en Republica Checa, realizaron un estudio donde determinaron una cepa bacteriana capaz de degradar analgésicos como el ketoprofeno y el diclofenaco. Esta cepa se obtuvo de suelos contaminados con desechos químicos y desechos compostados de una fábrica. Los aislamientos se realizaron en caldo de sales basales y medio LB (Luria-Bertani), la cepa fue identificada como *Raoultella* sp., que degradó el diclofenaco en un 92% en un tiempo de 72h a 28°C (73).

Ivshina *et al.*, (2019) en Rusia realizaron un estudio para analizar la capacidad de *Rhodococcus ruber* de biodegradar el diclofenaco. El resultado indicó que la bacteria es capaz de biodegradar de forma completa del diclofenaco a una

concentración de 50 µg/L, durante 6 días y el 50% en 60 días a una concentración de 50mg/L, ambos mediante la adición de glucosa como cofactor (74).

En Polonia, en el 2020 Sauvêtre *et al.*, realizaron una investigación para determinar como la presencia de contaminantes de origen farmacéutico como el diclofenaco y el sulfametoxazol afectan el crecimiento de un tipo de pasto (*Miscanthus giganteus*) al modificar la composición del microambiente presente en las raíces de este. En este estudio se demostró que las actinobacterias aisladas como *Microbacterium aoyamense* y *Streptomyces curacoï* tienen el potencial de biodegradar ambos fármacos, al mismo tiempo que favorecen el crecimiento de las plantas, principalmente *Streptomyces curacoï* mostró mayor eficacia de degradación de diclofenaco (41%) y sulfametoxazol (33%)(38).

En ese mismo año, 2020, en Francia Grandclement *et al.*, investigaron la capacidad de degradación de diclofenaco en un medio nutritivo por dos bacterias en particular *Bacillus subtilis* y *Brevibacillus laterosporus*, los cuales fueron aislados de muestras de agua con presencia de este contaminante. Se obtuvo una eliminación total del antiinflamatorio en una concentración de 1 mg/L después de 17 h (75).

Żur *et al.* en 2021, aislaron cuatro cepas bacterianas con capacidad de degradar diclofenaco. Las muestras se obtuvieron de dos puntos: lodo activado de una cámara aeróbica del Klimzowiec y suelo contaminado de una fábrica de productos químicos en Polonia. Para el estudio las muestras se prepararon y diluyeron en NaCl al 0,9% y se complementaron con diclofenaco. Se realizaron dos métodos, utilizando el fármaco como única fuente de carbono y energía y en co-metabolismo con glucosa. La cepa identificada como tolerante y con capacidad de degradación del fármaco fue *Enterobacter cloacae* con mejor degradación del fármaco en co-metabolismo. Degradó una concentración de 50 µg/L en 96h (76).

En Egipto, Mohamed *et al.*, 2023, seleccionaron cuatro aislados bacterianos en función de su capacidad para utilizar una alta concentración de diclofenaco (40 mg/L) como única fuente de carbono. Los cuales se identificaron como *Pseudomonas aeruginosa* (S1), *Alcaligenes aquatilis* (S2), *Achromobacter*

spanius (S11) y *Achromobacter piechaudii* (S18). Estos obtuvieron una tasa de degradación de $75.20 \pm 0.71\%$ (S1), S2 de $38.99 \pm 0.90\%$, S11 de $97.79 \pm 0.84\%$ y S18 de $88.72 \pm 0.89\%$ en un periodo de 6 días (77).

Ibuprofeno

De acuerdo con Ivshina *et al.*, en 2021 en Rusia, determinaron que no todas las cepas bacterianas que presentan tolerancia a la presencia de antiinflamatorios esteroideos como el ibuprofeno tienen capacidad para degradarlo. Sin embargo, demostraron que actinobacterias como *Agromyces mediolanus*, *Nocardioides albus*, *Rhodococcus cerastii* y *Corynebacterium variabile*, presentan capacidad para biodegradar ibuprofeno, aunque no pueden metabolizarlo como única fuente de carbono y energía. Siendo *R. cerastii* capaz de transformar ibuprofeno de manera completa en concentraciones de 100 µg/L y 100 mg/L y en presencia de n-hexadecano, en un tiempo entre 30h y 144 h respectivamente (39).

Benedek *et al.* (2022), identificaron en Hungría, una nueva cepa denominada *Nocardioides carbamazepini*. La cual presenta un crecimiento adecuado en un rango de temperatura de 15 a 37 °C con una óptima de 28 °C, pH 6 a 9, con crecimiento óptimo a pH 8 y en presencia de NaCl hasta un 3%. Esta cepa demostró capacidad de biodegradación de una concentración de 1.5 mg/L de ibuprofeno y glucosa (3 g/L) como cosustrato, eliminando el 70% de ibuprofeno de las soluciones de ensayo posterior a 7 semanas de incubación a 27°C con agitación a 145 rpm (78).

En la india Chopra & Kumar (2022) aislaron dos cepas con capacidad de degradación de ibuprofeno en cultivo por lotes a partir de muestras de aguas residuales industriales: *Citrobacter freundii* cepa PYI-2 (MT039504) y *Citrobacter portucalensis* cepa YPI-2 (MN744335). En su investigación indican que las condiciones de crecimiento óptimas para la degradación del fármaco (8mg/L) fueron de pH de 6.9 para de la cepa PYI2 y 5.8 para la cepa YPI2, mientras que las temperaturas óptimas fueron 42 ° C y 32 ° C, respectivamente (79).

Paracetamol

En el 2021 en Túnez, Rouibah *et al.*, realizaron una investigación para observar la biodegradación de paracetamol. Los resultados indicaron que *Pseudomonas*

pútida degradó el 92% del fármaco en medio mínimo de sales (MSM), suplementado con 400mg/L del AINE después de 32 h de incubación (80).

En ese mismo año (2021) Palma *et al.*, en Portugal realizaron una investigación para probar la biodegradabilidad de paracetamol mediante aislados bacterianos, empleando muestras de lodo activado de una estación depuradora de aguas residuales del Noroeste de Faro. Los experimentos de biodegradación de paracetamol se realizaron en medio mínimo de sales (MSM) suplementado con 200 mg/L de AINE. Las bacterias aisladas *Brevibacterium frigoritolerans*, *Corynebacterium nuruki* y *Enterococcus faecium*, lograron la eliminación de aproximadamente 97±4%, 97±6% y 86.9±0.8% respectivamente, después de 144 h de incubación. Mientras que *Bacillus cereus* lo degradó hasta la mineralización (81).

Chopra & Kumar (2023) realizaron un estudio en la India que reporta la capacidad de degradación de paracetamol a partir de una cepa de *Bacillus licheniformis*, aislada a partir de muestras de aguas residuales industriales. Los metabolitos generados fueron el ácido oxálico, 2-isopropil-5-metil ciclohexanona y fenotiazina. El estudio reporta que la cepa de *B. licheniformis* demuestra potencial metabólico para la biodegradación del paracetamol y lo cual podría implementarse en la biorremediación (35).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los contaminantes emergentes son moléculas de naturaleza química que se encuentran presentes en el medio ambiente en concentraciones de nanogramos (ng) y microgramos (μg). Se distribuyen ampliamente en el ciclo del agua, incluidos los afluentes y efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, agua superficial e incluso en los sistemas de tratamiento de agua potable.

Estos contaminantes representan un riesgo potencial para la salud humana debido a la diversidad de su naturaleza química y a que su presencia en el medio ambiente no se considera significativa, pero a pesar de que pasan inadvertidos, existe una creciente bioacumulación en ecosistemas acuáticos.

Los contaminantes emergentes farmacéuticos han adquirido mayor atención global en la última década, por su creciente acumulación en el medio ambiente y específicamente en la calidad del agua, ya que están en los efluentes de aguas residuales. Además, al regar los cultivos con aguas recuperadas de estos efluentes pueden absorberse y encontrarse en alimentos de consumo humano.

La bioacumulación en animales acuáticos como los peces que también forman parte de la cadena trófica; representando así un riesgo potencial para el medio ambiente y la salud humana.

El aumento de los contaminantes de preocupación emergente en el ambiente ha dado lugar a estudios para comprender mejor todo el proceso desde su destino, transporte hasta su eliminación, sin embargo, a pesar de esta información, en la actualidad este tipo de contaminantes no se encuentran estrictamente regulados en el país, y las plantas de tratamiento de agua convencionales no están diseñadas para eliminarlos completamente. En México existen pocos estudios que analicen el potencial biotecnológico de bacterias extremotolerantes aisladas de ambientes extremos mexicanos para remediar la contaminación por AINEs, por lo que se plantea la siguiente pregunta de investigación.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las bacterias extremotolerantes son capaces de degradar antiinflamatorios no esteroideos?

4. JUSTIFICACIÓN

La importancia de las moléculas derivadas de productos farmacéuticos radica en su actividad biológica, ya que están diseñados para ejercer su función fisiológica en los organismos y evitar la inactivación hasta que hayan alcanzado su diana. Los antiinflamatorios no esteroideos son ampliamente utilizados en medicina y veterinaria, y el hecho de ser de venta libre los vuelve más accesibles al público en general, resultando en una mala utilización, además de que eventos inesperados con la pandemia por infección de COVID 19 generaron un aumento en su consumo por sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

La UNESCO ha establecido que es necesario fortalecer la comprensión de los posibles efectos de los contaminantes emergentes en la salud humana al alterar los ecosistemas, por lo que hay que estudiar herramientas que contribuyan a disminuir su impacto.

Existen métodos tradicionales de eliminación de estos contaminantes, mediante procesos de tratamiento que incluyen ozonización, carbón activado y luz ultravioleta; pero algunas limitaciones de estos procesos de tratamiento son la formación de subproductos por una oxidación incompleta y los excesivos requerimientos de energía para realizar estos procedimientos.

Por lo anterior, la biodegradación es una alternativa para la disminuir la presencia de contaminantes emergentes como paracetamol, diclofenaco e ibuprofeno, empleando bacterias de dos ambientes extremos diferentes de México, ya que en diversos estudios se ha comprobado que las bacterias extremófilas o extremotolerantes tienen esta capacidad y además pueden desarrollarse en ambientes donde otros microorganismos no podrían.

Algunos ejemplos de estas bacterias extremotolerantes son *Nocardioides carbamazepini*, *Citrobacter freundii*, y *Labrys portucalensis*, que han demostrado tener la capacidad de biotransformar o degradar antiinflamatorios no esteroideos, por lo que una alternativa para la degradación diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol, es utilizar bacterias extremotolerantes.

Los ambientes contaminados usualmente no presentan condiciones mesófilas, sino que sus condiciones fisicoquímicas también se ven alteradas, algunos

ambientes contaminados pueden ser ligeramente ácidos, alcalinos, salinos o incluso hipersalinos (19,82,83). En este tipo de ambientes con características extremas, que resultan letales para las bacterias mesófilas es mejor emplear bacterias que estén previamente adaptadas a estas condiciones adversas.

La eliminación de este tipo de contaminantes empleando bacterias extremotolerantes contribuye a remediar el medio ambiente y de esta manera proteger la salud humana.

5. HIPÓTESIS

6.1 Hipótesis Alternativa: Las bacterias extremotolerantes son capaces de degradar antiinflamatorios no esteroideos.

6.2 Hipótesis Nula: Las bacterias extremotolerantes no son capaces de degradar antiinflamatorios no esteroideos.

6. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General: Determinar la capacidad de degradación de antiinflamatorios no esteroideos de bacterias extremotolerantes.

7.2 Objetivos Específicos:

1. Aislar y purificar cepas bacterianas a partir de dos ambientes extremos de México: Laguna Salada de Mexicali, Baja California y del cráter del volcán Chichonal en Chiapas, México.
2. Caracterizar fisiológicamente a las bacterias aisladas de acuerdo con sus requerimientos de NaCl, pH y temperatura.
3. Determinar la tolerancia de las bacterias aisladas a la presencia de antiinflamatorios no esteroideos: diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol.
4. Identificar genéticamente por análisis de secuenciación del gen ARNr 16S y rpoB las bacterias utilizadas en este estudio
5. Realizar una comparación de la capacidad para degradar AINEs entre las bacterias identificadas de cada ambiente extremo incluido en este proyecto.

7. METODOLOGÍA

8.1 Diseño de Estudio: Se realizó una investigación de tipo experimental.

Universo: Microbiota de la Laguna Salada de Mexicali, Baja California y microbiota del cráter del volcán Chichonal de Chiapas, México

Muestra: 25 Bacterias extremotolerantes de la Laguna Salada de Mexicali, Baja California y 25 Bacterias extremotolerantes cráter del volcán Chichonal de Chiapas, México.

Muestreo: Método de muestreo aleatorio por conveniencia.

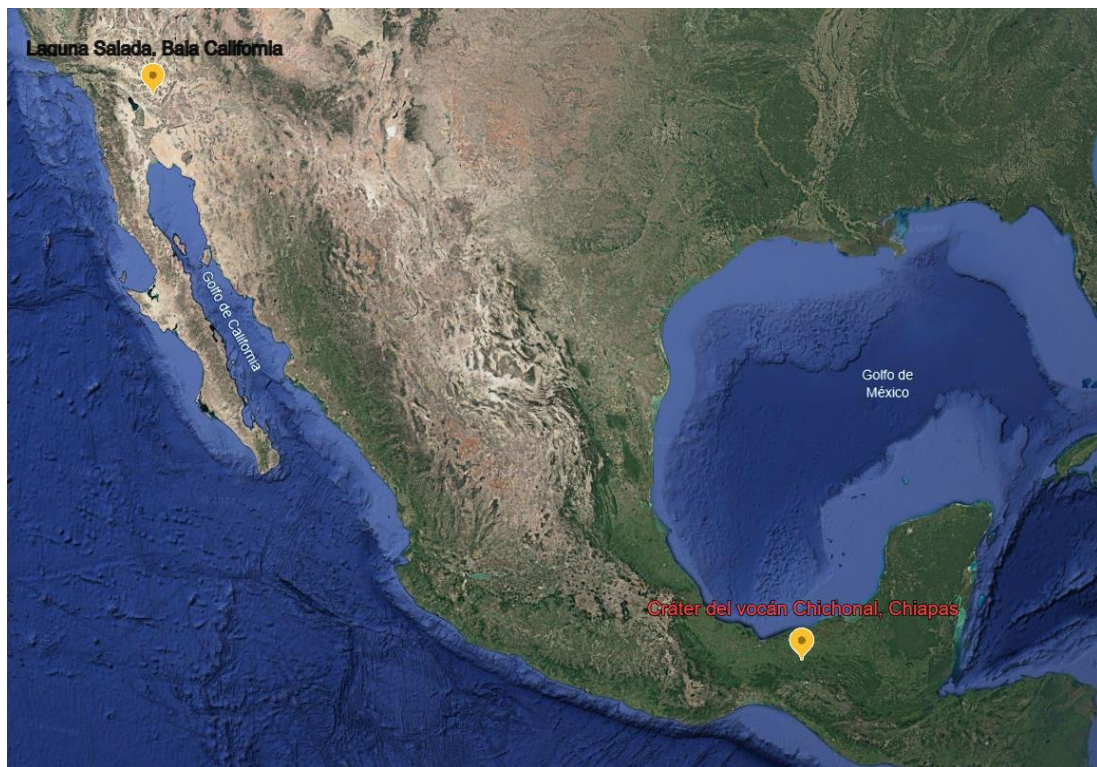


Figura 9. Ubicación geográfica de los puntos de muestreo: Laguna Salada, Mexicali, Baja California y el Volcán Chichonal Chiapas en México. Tomado de Google earth.

8.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Inclusión: Bacterias extremotolerantes o extremófilas con capacidad para degradar antiinflamatorios no esteroideos: diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol.

Exclusión: Eucariotas y bacterias no extremotolerantes o extremófilas.

Eliminación: Bacterias extremotolerantes o extremófilas que no sobrevivan, que se contaminen o que no demuestren capacidad para degradar diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol.

8.3 Procedimientos

Tratamiento de las muestras

A cada una de las muestras se les midió el pH con apoyo de un potenciómetro digital (Condustronic modelo pH10).

A partir de las muestras suelo y sedimento, se realizaron concentraciones de 1.0 g en 9 mL en agua destilada, mientras que para las muestras de agua fue de 0 mL de la muestra en 9 mL de agua destilada. Finalmente se dejaron filtrar las soluciones durante 12 horas.

8.3.1 Aislamiento y purificación

Para el aislamiento de bacterias extremotolerantes se emplearon los medios de cultivo que se describen a continuación:

- Medio para halófilos moderados MH (84): Extracto de levadura 10 g, peptona proteosa 5 g, dextrosa 1 g y agar 18 g, para un litro.
- Medio Czapek BD Bioxon, Cat. 211776.
- Medio papa dextrosa BD Bioxon, Cat. 211900.
- Medio soya tripticaseína BD Bioxon, Cat. 210800.
- Agar dextrosa Sabouraud BD Bioxon, Cat. 210700.
- Agar nutritivo BD Bioxon, Cat. 210400.

Los medios de cultivo se prepararon y esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 PSI durante 15 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se vertieron en cajas Petri estériles.

De las soluciones filtradas de las muestras se realizaron diluciones hasta 1:1000 a partir de las cuales se llevó a cabo la siembra en las cajas Petri. Se tomaron alícuotas de 200 µL de cada muestra con micropipeta y se distribuyeron de forma radial a través de toda la caja petri con una varilla de vidrio.

Se repitió este procedimiento por cada muestra y en cada uno de los medios preparados. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 7 a 15 días para la revisión periódica del crecimiento bacteriano cada 48h.

Conforme fueron apareciendo las colonias correspondientes de bacterias se fueron transfiriendo a otra caja Petri para realizar el aislamiento. Finalmente se realizó una resiembra de cada uno de los aislamientos obtenidos para la purificación de cada cepa aislada en el medio en el que mejor se desarrollaron.

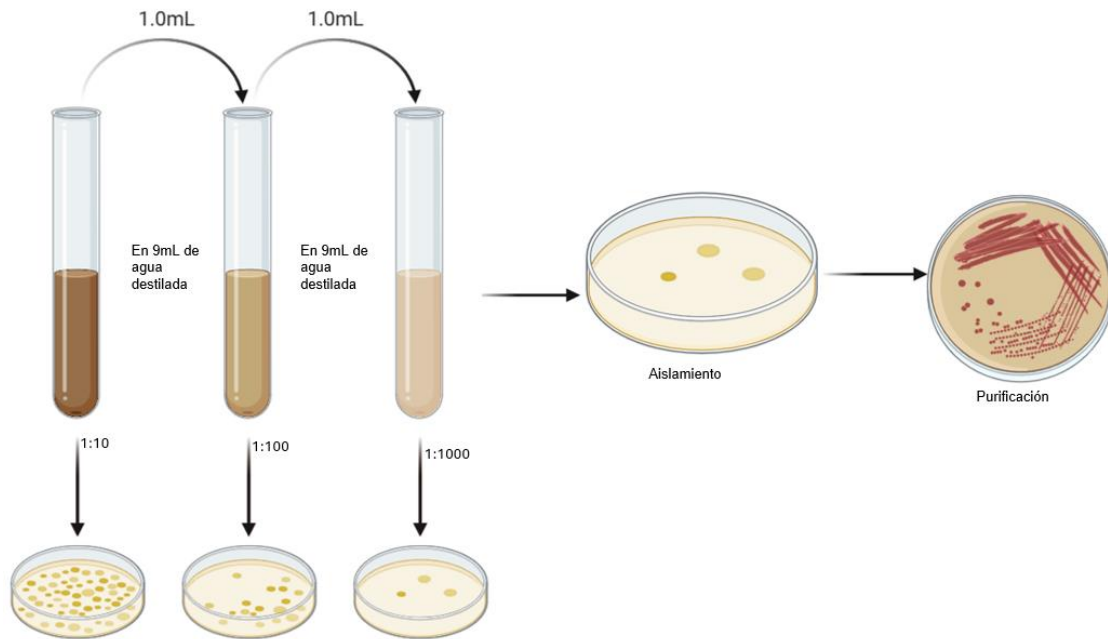


Figura 10. Esquema del procedimiento del aislamiento y purificación de las cepas. Creado con BioRender.

8.3.2 Caracterización morfológica

Una vez purificadas las cepas seleccionadas, se observaron las características macroscópicas de cada una, tamaño, color, opacidad, aspecto o consistencia, forma, textura, borde, elevación, presencia de crecimiento radial, presencia o ausencia de micelio aéreo y producción de pigmento.

Se realizó tinción de Gram para confirmar la pureza de las cepas y la identificación de bacterias Gram positivas o Gram negativas. Se observó la morfología microscópica y se determinó si tenían forma de bacilos, cocos, o si eran pleomórficos, la producción de cápsula o esporas, agrupación, así como la presencia del crecimiento de filamentos ramificados característicos de las actinobacterias.

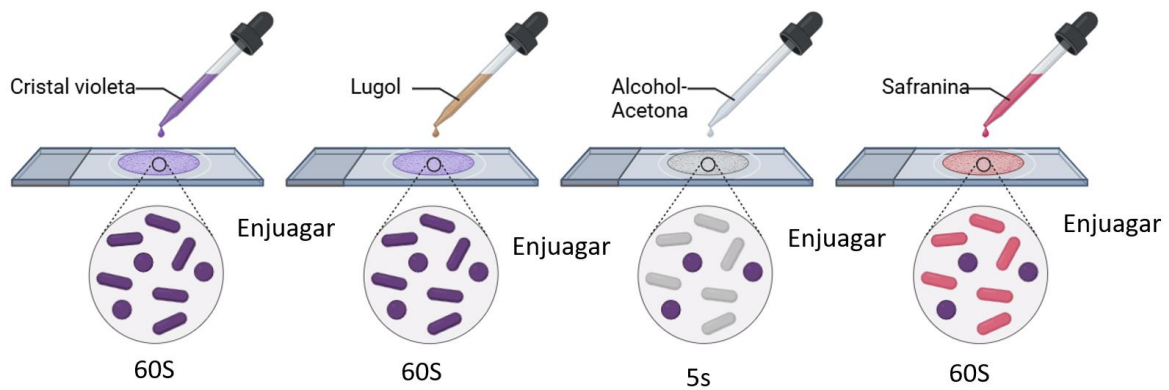


Figura 11. Esquema del procedimiento de la tinción de Gram. Creado con BioRender.

8.3.3 Caracterización fisiológica

8.3.3.1 Concentración de NaCl

Para la caracterización del espectro fisiológico de cada cepa se determinó la concentración de NaCl adecuada para el crecimiento y desarrollo de las cepas aisladas. Para este procedimiento se preparó el medio de cultivo soya tripticaseína, adicionando NaCl a las siguientes concentraciones: 0, 0.5, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 %; el pH se ajustó a 7.

Se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 PSI, durante 15 minutos, finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió en cajas Petri, en las que se inocularon cada una de las cepas obtenidas, y se incubaron a 37°C.



Figura 12. Esquema del procedimiento de la caracterización de NaCl. Creado con BioRender

8.3.3.2 Determinación de pH

La determinación de pH óptimo de crecimiento se realizó también en el medio soya tripticaseína, ajustando el pH a 5, 6, 7, 8, 9, y 10, con la concentración de NaCl óptima de crecimiento para cada cepa.

Se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 PSI, durante 15 minutos, finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió en cajas Petri, en las cuales se inocularon cada una de las cepas y se incubaron a 37°C.

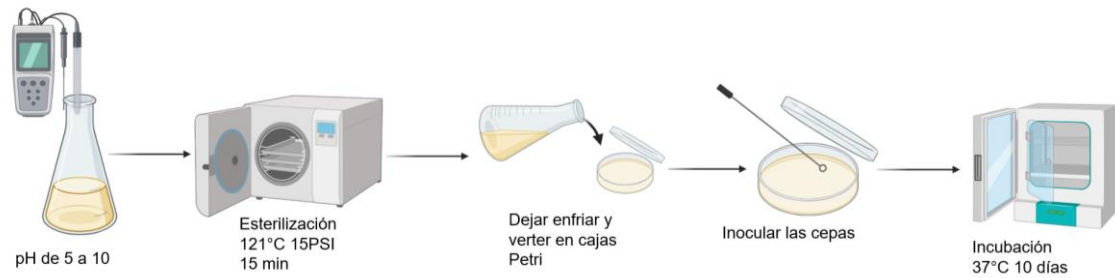


Figura 13. Esquema del procedimiento de la caracterización de pH. Creado con BioRender.

8.3.3.3 Temperatura

La caracterización de la temperatura óptima de crecimiento se determinó de igual manera en medio soya tripticaseína ajustando el pH y la concentración de NaCl establecidos como óptimos para cada cepa.

El medio de cultivo se esterilizó, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió en cajas Petri, en los cuales se inocularon cada una de las cepas obtenidas. Las cajas se incubaron a diferentes temperaturas: 25, 30, 35, 40, 45 y 50°C para identificar el rango de temperatura de crecimiento y el óptimo.



Figura 14. Esquema del procedimiento de la caracterización de Ta. Creado con BioRender.

Interpretación de resultados de la caracterización fisiológica

La caracterización fisiológica de concentración de NaCl, pH y temperatura se realizó observando el crecimiento cada 24 horas por un periodo de 10 días. Se registró el resultado por número de cruces: + crecimiento escaso, ++ regular, +++ suficiente y ++++ óptimo; la ausencia de cruces indica la ausencia de crecimiento.

8.3.4 Pruebas de tolerancia a la presencia de antiinflamatorios no esteroideos en caja Petri

Se preparó una solución madre de cada AINE, diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol (Sigma aldrich, CAT D6899-25G, 14883-5G, A7085-100G) de 1000 ppm en etanol absoluto, a partir de la cual se obtuvieron soluciones con las siguientes concentraciones: 1, 10 y 100 ppm**. Se preparó medio de cultivo soya triptocaseína, se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 PSI, durante 15 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente para poder añadir cada una de las soluciones de AINEs con ayuda de una micropipeta para finalmente verterlo en cajas de Petri y dejar solidificar.

Para la inoculación de las cajas se dividieron en 5 partes iguales y se realizó la siembra de cada cepa por estría simple con ayuda de un asa bacteriológica.

***Fórmula empleada para la preparación de todas las soluciones de diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol:*

$$V1 * C1 = V2 * C2$$

$$V1 = (V2 * C2) / C1$$

Interpretación de resultados de la tolerancia en caja Petri

Se realizó observando el crecimiento cada 24h por 10 días. Se registró el resultado por número de cruces: + crecimiento escaso, ++ regular, +++ suficiente y ++++ optimo; la ausencia de cruces indicó la ausencia de crecimiento.

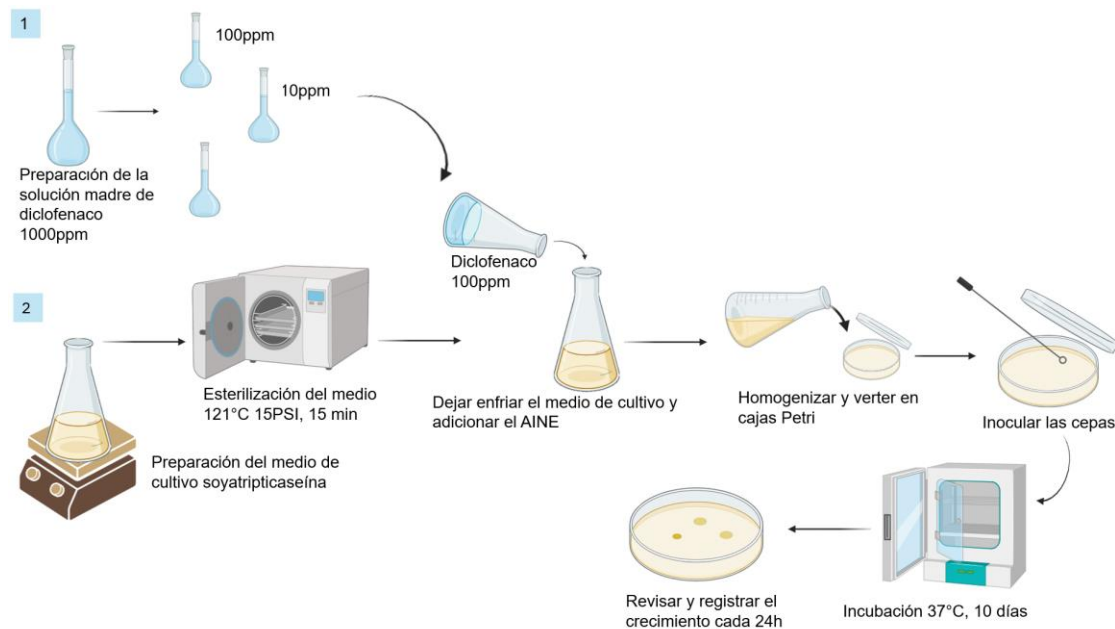


Figura 15. Esquema del procedimiento de la Pruebas de tolerancia a la presencia de antiinflamatorios no esteroideos en caja Petri. 1) Preparación de las soluciones de AINEs. 2) Prueba de tolerancia a la presencia de antiinflamatorios no esteroideos en caja Petri. Creado con BioRender.

8.3.4.1 Pruebas de tolerancia a la presencia de antiinflamatorios no esteroideos en espectrofotómetro

Se preparó medio de cultivo líquido soya tripticaseína para verterlo en tubos de ensayo. Los tubos se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 PSI, durante 15 minutos, y se enfriaron a temperatura ambiente. Se añadió una colonia de cada cepa a un tubo y se dejaron incubar durante 72 horas para posteriormente tomar los inóculos.

Se preparó una solución madre de cada AINE, diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol (Sigma aldrich, CAT D6899-25G, 14883-5G, A7085-100G) de 1000 ppm, a partir de la cual se prepararon soluciones con las siguientes concentraciones: 1, 10 y 100 ppm. Y una vez esterilizados los matraces con el medio de cultivo se les añadió a cada uno la solución del AINE correspondiente (diclofenaco, ibuprofeno o paracetamol) con ayuda de una micropipeta.

Se vertieron 3mL del medio de cultivo con la solución de AINE directamente en placas de 12 pocillos estériles en la campana de flujo laminar. El inóculo bacteriano se añadió en un equivalente a una concentración de 3×10^8 células (1

de la escala McFarland), se preparó un control biótico (medio de cultivo con inóculo), un control abiótico (medio de cultivo con la solución de AINE) y cada una de las concentraciones. Todo se realizó por triplicado.

Se sellaron las placas de plástico con Parafilm por el exterior y se incubaron durante 10 días a 37°C. Cada 24 horas se sacaron las placas de incubación para medir el crecimiento por densidad óptica mediante espectrofotometría (espectrofotómetro BioTek modelo EPOCHTM) a una longitud de onda de 600nm, y poder registrar el crecimiento bacteriano en presencia de diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol mediante el aumento en la densidad óptica.

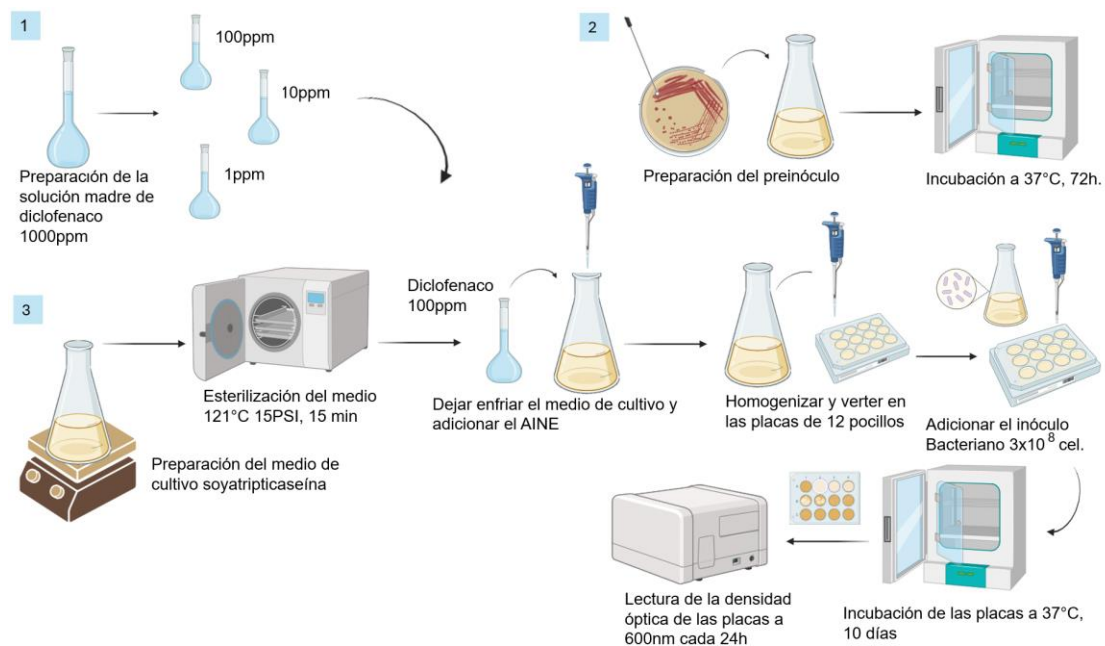


Figura 16. Esquema del procedimiento de la Pruebas de tolerancia a la presencia de antiinflamatorios no esteroideos en espectrofotómetro. 1) Preparación de las soluciones de AINEs. 2) Preparación del pre-inóculo. 3) Prueba de tolerancia en espectrofotómetro. Creado con BioRender.

8.3.5 Identificación genética

8.3.5.1 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se utilizó el kit comercial Promega Wizard Genomic (Cat: A1120) siguiendo las indicaciones del fabricante Para la visualización del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con un tiempo de corrida de 40 minutos a 120 volts, 50w y 300mA. Se utilizó bromuro de etidio

para su revelado. Lo anterior para comprobar la presencia y calidad del material genético.

8.3.5.2.1 PCR Gen ARNr 16S

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo usando los cebadores universales para la amplificación del gen 16S RNAr 8F: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' y 1492R: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3', utilizando enzima Taq. Polimerasa comercial (Meridian, Cat: Bio-21105).

Las condiciones del ciclo térmico fueron: un ciclo de pre-desnaturalización de 5 minutos a una temperatura de 94°C, desnaturalización durante 60 segundos a 94°C, alineamiento durante 30 segundos a 59°C, elongación por 60 segundos a una temperatura de 72°C. El proceso se repitió durante 30 ciclos.

8.3.5.2.2 PCR Gen rpoβ

La amplificación del gen rpoβ se llevó a cabo posterior a la obtención de los resultados con la identificación del gen 16S ARNr, para aumentar el tamaño de la secuencia de cada cepa y poder obtener una mejor identificación. Se emplearon varios pares de cebadores para la identificación del gen rpoβ, dependiendo del género de cada cepa como se enlistan a continuación (Tabla 2), así mismo se indican las condiciones del termociclador empleadas para cada reacción.

Tabla 2. Condiciones y cebadores empleados para la amplificación del gen rpoβ

Genero de bacterias	Primer	Secuencia	pb	Referencia	Condiciones de termociclador
<i>Micrococcus</i> <i>Citricoccus</i>	MicrpoBF MicrpoBR	5'ATGAACGCGACGAGGAGGTT3' 5'GTTCTTCGGCACCTCSC	743	(85)	Ciclos: 40 Desnaturalización inicial: 94°C, 90 s. Desnaturalización: 94°C, 10 s. Alineamiento: 55°C, 20 s. Elongación: 72 °C, 50s. Extensión final: 72°C, 5min.
<i>Streptomyces</i> <i>Nocardiopsis</i> <i>Cellulosimicrobium</i> <i>Curtobacterium</i> <i>Kocuria</i>	RpoB_MF RpoB_R	5'CGACCACTTCGGCAACCG3' 5'TCGATCGGGCACATCCGG3'	342	(86)	Ciclos: 30 Desnaturalización: 95 °C, 1 min. Alineamiento: 55 °C, 1 min. Extensión final: 72 °C, 1.5 min.
<i>Enterobacter</i>	CM7 CM31b	5'AACCAGTTCCGCGTTGGCCTGG3' 5'CCTGAACAACACGCTCGGA3'	512	(87,88)	Ciclos: 35 Desnaturalización: 92 °C, 2 min. Alineamiento: 55 °C, 1 min. Extensión: 72 °C, 1 min. Extensión final: 72 °C, 10 min.
<i>Ornithinibacillus</i> <i>Bacillus</i>	rpoB- 2292f	5'GACGTGGGATGGCTACAAC3' 5'ATTGTCGCCTTTAACGATGG3'	1,010	(89)	Ciclos: 35 Desnaturalización: 92 °C, 2 min.

<i>Salinibacillus</i> <i>Gracilibacillus</i>	rpoB-3354r				Alineamiento: 55 °C, 1 min. Extensión: 72 °C, 1 min. Extensión final: 72 °C, 10 min.
<i>Pseudarthrobacter</i>	rpoB2269f rpoB3119r	5'GAAATCACYCGYGAYATCCC3' 5'CCRCCGAACTGTNCCTTACC3'	729	(90)	Ciclos: 40 Desnaturalización inicial: 94°C, 90 s. Desnaturalización: 94°C, 10 s. Alineamiento: 55°C, 20 s. Elongación: 72 °C, 50s. Extensión final: 72°C, 5min.
<i>Aerococcus</i>	Estrepto-F Strepto-R	5'AARYTIGGMCCTGAAGAAAT3' 5'TGIARTTTRTCATCAACCATGTG3'	860	(91)	Ciclos: 35 Desnaturalización: 92 °C, 2 min. Alineamiento: 55 °C, 1 min. Extensión: 72 °C, 1 min. Extensión final: 72 °C, 10 min.
<i>Microbacterium</i>	rpoB-2Fa rpoB-5R	5'ACBGTSaTTYATGGGYGAYTT 3' 5'CGATGAANCCGAASGVGTTG 3'	832	(92)	Ciclos: 40 Desnaturalización inicial: 94°C, 90 s. Desnaturalización: 94 °C, 10 s. Alineamiento: 55°C, 20 s. Elongación: 72 °C, 50s. Extensión final: 72 °C, 5min.

8.3.6.3 Electroforesis

Se preparó gel de agarosa al 1% con 3 μ L de amplicon, 3 μ L de buffer de carga, marcador de peso molecular de 1Kb, y se introdujo en la cámara de electroforesis con un voltaje de 120 volts, 50W y 300mA durante 30 minutos y se revela con bromuro de etidio, lo anterior para comprobar la presencia de las bandas de ADN mediante el fotodocumentador.

8.3.7 Secuenciación

Los productos amplificados de los genes ARNr 16S y rpoB se enviaron al servicio de secuenciación de Humanizing Genomics Macrogen, Seúl, Corea

8.3.8 Identificación de cepas bacterianas

Las secuencias obtenidas se corrigieron utilizando la herramienta bioinformática, Chromas pro (V1.5)(93) , una vez corregidas se utilizó el programa BioEdit (v7.09)(94) para obtener la secuencia consenso y se compararon con las secuencias ya depositadas en las bases de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología-NCBI (GenBank) (95) BLAST (96) y EzBiocloud (97), para determinar la especie mediante el porcentaje de semejanza.

8.3.9 Secuenciación genómica de la cepa

Posterior a la identificación genética de las cepas mediante la amplificación de los dos genes rpoB y 16S ARNr, se seleccionó una cepa con capacidad para tolerar diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol en las concentraciones de 10ppm y 100ppm, además debido al porcentaje de identidad que se obtuvo en la identificación con ambos genes ya que fue menor al 98%.

8.3.8.1 Obtención de biomasa

Una vez seleccionada la cepa se procedió a realizar la recolección de la biomasa. A partir de un cultivo puro y con ayuda de palillo de madera estéril, se transfirió la biomasa de la cepa a un tubo de vidrio con 5 ml de solución salina al 0.85%, hasta que el inóculo obtuvo una turbidez semejante al tubo 4 de la escala McFarland. Se homogenizó el inóculo invirtiendo el tubo suavemente.

8.3.8.2 Extracción de DNA de alta pureza de la cepa P9AGU-1

El DNA se extrajo siguiendo las indicaciones y especificaciones del kit de extracción MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification Kit (LGC Biosearch Technologies, MV89010):

- Diluir 25 µl de proteinasa K (kit RNA and DNA Purification Kit Spin Column DaAn Gene) en 300 µl de solución de lisis.
- Centrifugar 500 µl de inóculo bacteriano con patrón 0.5 McFarland y desechar el sobrenadante, dejando 25 µl de líquido.
- Resuspender el pellet.
- Añadir a cada muestra los 300 µl de solución de lisis con 25 µl de proteinasa K. Mezclar suavemente por inversión.
- Incubar a 65°C durante 15 minutos en agitación a 120 rpm.
- Enfriar las muestras en la incubadora durante 10 minutos para que alcancen los 37°C. Posteriormente, adicionar 3 µl de RNAsa A (5 mg/ml) a cada muestra y mezclar por inversión.
- Incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Colocar las muestras en una hielera con gel refrigerante durante 5 minutos.
- Añadir 150 µl de reactivo de precipitación de proteína MPC a la muestra (328 µl) que se encuentra lisada en ese momento. Mezclar bien por inversión durante 10 segundos.
- Centrifugar a 4°C durante 10 minutos a 11,000 rpm. Si el sedimento resultante es transparente, pequeño o suelto, agregar 25 µl adicionales de reactivo de precipitación de proteínas MPC, mezclar y centrifugar nuevamente.
- Transferir el sobrenadante a tubo Eppendorf de microcentrífuga de 1.5 ml limpio y estéril. Desechar sedimento.
- Agregar 500 µl de isopropanol frío al sobrenadante recuperado en el tubo nuevo. Mezclar por inversión de 30 a 40 veces.
- Centrifugar a 4°C durante 10 minutos a 11,000 rpm.
- Desechar cuidadosamente el isopropanol, teniendo cuidado de no desprender el pellet de DNA.
- Enjuagar dos veces con 100 µl de etanol al 70% por inversión.

- Centrifugar 2 minutos a 14,000 rpm para su precipitación en el tubo. Retirar todo el etanol con una pipeta y dejar secar brevemente.
- Re suspender el DNA en 35 µl de Buffer TE. Conservar a temperatura ambiente.

8.3.8.3 Secuenciación y ensamblaje del genoma de la cepa P9AGU-1

La secuenciación se realizó empleando un enfoque híbrido entre Illumina y Nanopore. Se eliminaron el 5 % de las lecturas de menor calidad utilizando Filtrlong (v0.2.1)(98), empleando los parámetros predeterminados. Se realizó un preensamblaje con Miniasm (v0.3)(99), tras lo cual se ajustó la cobertura a un mínimo de 100x. Con las secuencias filtradas, se procedió al ensamblaje final y pulido mediante Flye (v2.9.1), utilizando parámetros específicos para lecturas ONT de alta calidad. La anotación del genoma se llevó a cabo con Bakta (v1.6.1)(100).

El análisis de los contigs se realizó utilizando Bandage (v0.8.1) (101). La integridad y contaminación del genoma se evaluaron con CheckM (v1.2.2) (102). La identificación de especies se efectuó con RapdTool (v2.1.0) (103).

Los programas CGView (V.2.0) (104,105) y RAST (V33A22a) (106) se emplearon para elaborar un mapa del genoma y para poder realizar un análisis de los subsistemas que lo conforman, y así lograr identificar los posibles genes implicados en el proceso de degradación de los AINEs como parte de los compuestos aromáticos.

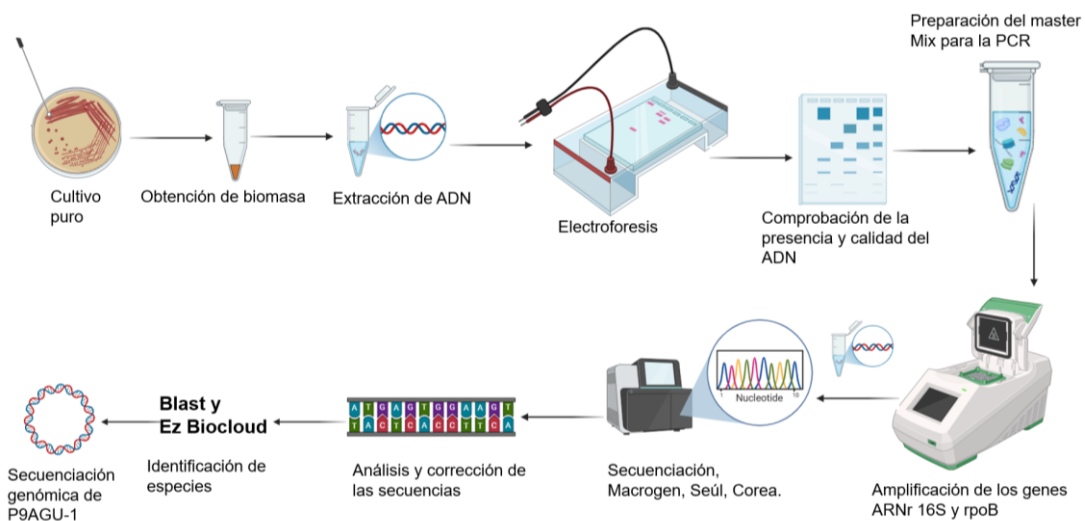


Figura 17. Esquema del procedimiento de la identificación genética. Creado con BioRender.

8.3.9 Comparación de la capacidad para degradar AINEs entre las bacterias identificadas de cada ambiente extremo.

Se realizó el cálculo de porcentaje de bacterias que toleraron uno, dos o los tres AINEs por cada ambiente extremo.

8.4 Variables de Estudio

Independientes:

Bacterias extremotolerantes y extremófilas.

Dependientes:

Potencial degradación de antiinflamatorios no esteroideos: diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol.

8.6 Implicaciones Bioéticas

La investigación se realizó siguiendo los acuerdos establecidos en el Convenio de las Naciones Unidas suscrito en Río de Janeiro sobre la diversidad biológica (107); el cual habla acerca del medio ambiente y su desarrollo, con fecha de junio de 1992. El cual remarca lo importante que es prevenir y atacar las causas que conllevan a la reducción o pérdida de la diversidad biológica.

Estableciendo que un requerimiento esencial para lograr conservar la diversidad es de igual forma mediante la preservación in situ de los ecosistemas y/o hábitats naturales.

En seguimiento a lo que se establece dentro del Protocolo de Cartagena firmado en junio de 2000 (108), el cual trata acerca de la seguridad de la biotecnología. Se asegura a la biotecnología y a su transferencia para que sean oportunas para la conservación y utilización razonable de la diversidad biológica, tal y como lo menciona en el Artículo 16 y 19.

Además, siguiendo lo que se establece dentro de los Artículos 8 y 19, se garantizará el desarrollo de procedimientos para mejorar la seguridad de la biotecnología a fin de poder minimizar todas las posibles amenazas hacia la biodiversidad.

El manejo de los desechos originados dentro del laboratorio de microbiología médica y ambiental derivados del presente proyecto se hará siguiendo lo estipulado dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (109), dirigida a la utilización de residuos peligrosos biológico-infecciosos, la cual es de observancia obligatoria a nivel nacional.

Además, todos los procesos se realizaron bajo las recomendaciones éticas del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

8.7 Recolección de Datos

Los datos experimentales se registraron en una bitácora de laboratorio.

El número de cepas aisladas, así como de cepas con capacidad de degradación de contaminantes emergentes como antiinflamatorios no esteroideos, los resultados de las pruebas que emplearon como medición la espectrofotometría se registró en bases de datos en un documento Excel.

8.8 Análisis Estadísticos

Se calcularon medidas de tendencia central de las cepas que presentaron capacidad para degradar antiinflamatorios no esteroideos para graficar y hacer un comparativo de las cepas con mayor potencial de degradación de antiinflamatorios no esteroideos.

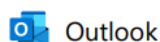
9. OPERALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 3. Operalización de variables dependientes e independiente.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS
Bacterias Extremotolerantes	Bacterias con capacidad de tolerar condiciones extremas de concentraciones de NaCl, rangos de pH y temperatura.	[NaCl] Temperatura de crecimiento pH de crecimiento	Independiente Cualitativa	[NaCl] Temperatura 25-50°C pH 5-10	Frecuencias y porcentajes
Bacterias Extremófilas	Bacterias con requerimientos extremos de concentraciones de NaCl, rangos de pH y temperatura para su crecimiento óptimo.	[NaCl] Temperatura de crecimiento pH de crecimiento	Independiente Cualitativa	[NaCl] Temperatura 25-50°C pH 5-10	Frecuencias y porcentajes
Capacidad De Degradación De Antinflamatorios No Esteroides.	Capacidad de las bacterias extremófilas de degradar antinflamatorios no esteroideos.	Degradación del antinflamatorio no esteroideo.	Dependiente Cuantitativa	Concentración del antinflamatorio no esteroideo.	Frecuencias y porcentajes

10. RESULTADOS

10.1 Comprobante de envío del artículo a la revista *Journal of Basic Microbiology*



Manuscript submitted to *Journal of Basic Microbiology*

Desde *Journal of Basic Microbiology* <no-reply@atyponrex.com>

Fecha Mar 12/11/2024 17:37

Para Ninfa Ramírez Durán <nramirez@uaemex.mx>

Dear Ninfa Ramírez-Durán,

Your manuscript "Degradation potential of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by extremotolerant actinobacteria" has been successfully submitted and is being delivered to the Editorial Office of *Journal of Basic Microbiology* for consideration.

You will receive a follow-up email with further instructions from the journal editorial office, typically within one business day. That message will confirm that the editorial office has received your submission and will provide your manuscript ID.

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Basic Microbiology*.

Sincerely,
The Editorial Staff at *Journal of Basic Microbiology*

10.2 Resumen del artículo

Los antiinflamatorios no esteroides (AINE) forman parte de los llamados contaminantes emergentes, que suponen un riesgo para la salud por su persistencia en el medio ambiente y en los suministros de agua, por lo que es imprescindible la búsqueda de bacterias adaptadas a condiciones ambientales extremas que toleren la presencia de estos contaminantes, para proponerlas como potenciales degradadoras de estos y así contribuir a la reducción de esta problemática. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el potencial de degradación de los AINE por actinobacterias extremotolerantes. Se aislaron e identificaron genéticamente dieciséis actinobacterias de un ambiente extremo, el cráter del volcán Chichonal en Chiapas, México. *Micrococcus luteus* P8SUE1, *Micrococcus yunnanensis* P9AGU1 y *Kocuria rhizophila* P1AGU3 toleraron la presencia de diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol en concentraciones de 1ppm, 10ppm y 100ppm respectivamente. La secuenciación genómica de la cepa P9AGU1 demostró el potencial de degradación de AINE de *M. yunnanensis*

11. DISCUSION DE RESULTADOS

Se aislaron 25 cepas extremotolerantes del volcán Chichonal y 25 cepas de la Laguna Salada. En investigaciones previas ya se han aislado bacterias tolerantes a condiciones extremas de ambos ambientes (66,110–114).

A partir del volcán Chichonal, se aislaron 20 cepas de actinobacterias y 5 eubacterias pertenecientes al filo Firmicutes o Bacillota. De acuerdo con la bibliografía ya se han reportado aislamientos de estos filos Actinobacteria y Firmicutes a partir de este ambiente extremo (66,111,112,115).

Por otra parte, de La Laguna Salada, se aislaron 9 cepas de actinobacterias y 16 cepas de eubacterias. De acuerdo con estudios previos, este ambiente cuenta con la presencia de ambos tipos de bacterias (110,113,114).

Con base en los resultados de la prueba de tolerancia a NaCl, de las cepas del volcán 23 son halotolerantes y 2 son mesófilas. Las cepas de la laguna salada son 20 halotolerantes y 5 halófilas (51). En otros estudios ya se ha reportado el aislamiento de bacterias con tolerancia a condiciones extremas de NaCl de la Laguna Salada (110).

Referente a la prueba de tolerancia a pH, tanto las cepas del volcán como las de la Laguna Salada toleraron un amplio espectro de pH, el cual va desde pH 5 hasta pH 10. Lo cual coincide con lo reportado en la literatura sobre los aislados de la Laguna Salada (110).

Con respecto a la prueba de tolerancia a la temperatura, las cepas del volcán Chichonal son 17 mesófilas y 8 termotolerantes. Las cepas de la Laguna son 14 termotolerantes y 11 mesófilas.

Se identificaron 12 géneros bacterianos del volcán Chichonal, 8 géneros corresponden a actinobacterias, *Cellulosimicrobium*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Streptomyces*, *Streptoverticillium* y *Pseudarthrobacter*.; y 4 géneros de eubacterias: *Aerococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Exiguobacterium*. Los géneros *Bacillus*, *Kocuria* y *Micrococcus* ya fueron reportados en otros estudios de diversidad bacteriana del volcán Chichonal (66,111)

De la Laguna Salada se identificaron 9 géneros, 3 corresponden a actinobacterias: *Citricoccus*, *Micrococcus* y *Nocardiopsis* y 6 géneros de eubacterias: *Bacillus*, *Gracilibacillus*, *Oceanobacillus*, *Ornithinibacillus*, *Salinicoccus* y *Salirhabdus*. Los géneros *Micrococcus* y *Bacillus* se comparten en ambos ambientes. Otros estudios realizados sobre aislados bacterianos de este ambiente ya han reportado la identificación del género *Bacillus*, pero además han reportado la identificación de diferentes géneros como *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Streptomyces*, entre otros (110,113,114).

Las especies del volcán Chichonal que toleraron en mayor concentración los AINEs fueron identificadas como *Bacillus siamensis*, 1 cepa (DCF, IBU y PCM 100ppm), *Micrococcus luteus* 1 cepa y, *Micrococcus yunanensis* 3 cepas (DCF 10ppm, IBU y PCM 100ppm) y *Aerococcus urinaequi*, 1 cepa (DCF, IBU y PCM 100ppm) del volcán chichonal. En investigaciones previas ya se ha reportado la capacidad de *Micrococcus yunanensis* (116,117) y *Bacillus* (35,75,81) para la degradación de AINEs

La única especie de la Laguna Salada que toleró los 3 AINEs fue *Oceanobacillus oncorhynchi*, 2 cepas (DCF, IBU 10ppm y PCM 100ppm). Dos estudios han reportado sobre la capacidad de *Oceanobacillus oncorhynchi* para eliminar cromo (Cr VI)(118,119), sin embargo, no hay investigaciones sobre su tolerancia a diclofenaco, ibuprofeno o paracetamol.

La secuenciación del genoma de P9AGU-1, cepa proveniente del volcán Chichonal e identificada como *Micrococcus yunanensis*, señaló que la cepa tiene en su genoma la presencia de 7 genes implicados en la producción de enzimas que participan en el metabolismo de compuestos aromáticos como los AINEs, lo que le brinda mayores posibilidades de poder degradar. A partir de este ambiente extremo se han secuenciado previamente los genomas de *Paenibacillus sp.* (120) y *Candidatus Aramenus sp* (121); pero no de *Micrococcus yunanensis*.

12. CONCLUSIONES

1. Las especies *Bacillus siamensis*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus yunanensis*, *Kocuria rhizophila* y *Aerococcus urinaequi*; provenientes del volcán Chichonal fueron tolerantes a diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol. Por otro lado, *Oceanobacillus oncorhynchi* aislada de la Laguna Salada presentó la misma tolerancia para los antiinflamatorios probados.
2. *Micrococcus yunanensis*, P9AGU-1, demostró tener el potencial biotecnológico para degradar AINEs, debido a que en su genoma cuenta con 7 genes implicados en la producción de enzimas que participan en el metabolismo de compuestos aromáticos, tales como el diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol.
3. Las cepas provenientes del volcán Chichonal tuvieron una mejor tolerancia a la presencia de los tres antiinflamatorios probados en este estudio siendo las actinobacterias el grupo predominante, en cuanto a la Laguna Salada, se identificó mayor diversidad de Eubacterias y menor tolerancia a AINES.
4. Las cepas tolerantes a condiciones extremas incluidas en este estudio mostraron potencial degradador para antiinflamatorios no esteroideos como el diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol, lo que permite considerarlas como una alternativa en procesos de biorremediación.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. UNESCO. Contaminantes emergentes en el agua y las aguas residuales [Internet]. [citado 11 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://en.unesco.org/emergingpollutantsinwaterandwastewater>
2. Morin-Crini N, Lichtfouse E, Liu G, Balaram V, Ribeiro ARL, Lu Z, et al. Worldwide cases of water pollution by emerging contaminants: a review. *Environ Chem Lett.* 1 de agosto de 2022;20(4):2311-38.
3. Pápai M, Benedek T, Táncsics A, Bornemann TLV, Plewka J, Probst AJ, et al. Selective enrichment, identification, and isolation of diclofenac, ibuprofen, and carbamazepine degrading bacteria from a groundwater biofilm. *Environ Sci Pollut Res.* 1 de marzo de 2023;30(15):44518-35.
4. Alzola-Andrés M, Domingo-Echaburu S, Nogales-Garcia M, Palacios-Zabalza I, Urrutia-Losada A, Arteche-Elguizabal L, et al. [Translated article] Pharmaceuticals in the environment: A hospital pharmacy perspective. *Farm Hosp.* 1 de julio de 2024;48:TS13-20.
5. Ferreira BL, Ferreira DP, Borges SF, Ferreira AM, Holanda FH, Ucella-Filho JGM, et al. Diclofenac, ibuprofen, and paracetamol biodegradation: overconsumed non-steroidal anti-inflammatory drugs at COVID-19 pandemic. *Front Microbiol.* 30 de octubre de 2023;14:1207664.
6. Porter AW, Wolfson SJ, Häggblom M, Young LY. Microbial transformation of widely used pharmaceutical and personal care product compounds. *F1000Research.* 2020;9:F1000 Faculty Rev-130.
7. Lesser LE, Mora A, Moreau C, Mahlknecht J, Hernández-Antonio A, Ramírez AI, et al. Survey of 218 organic contaminants in groundwater derived from the world's largest untreated wastewater irrigation system: Mezquital Valley, Mexico. *Chemosphere.* 1 de mayo de 2018;198:510-21.
8. González-Acevedo ZI, García-Zarate MA, Flores-Lugo IP. Emerging contaminants and nutrients in a saline aquifer of a complex environment. *Environ Pollut.* 1 de enero de 2019;244:885-97.

9. Leal-Bautista RM, Hernández-Zárate G. Pathogens And Pharmaceuticals Pollutants As Indicators Of Contamination At The Northeastern Aquifer Of Quintana Roo. 2011; *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13 (2011): 211-219.
10. Vázquez-Tapia I, Salazar-Martínez T, Acosta-Castro M, Meléndez-Castolo KA, Mahlkecht J, Cervantes-Avilés P, et al. Occurrence of emerging organic contaminants and endocrine disruptors in different water compartments in Mexico – A review. *Chemosphere*. 1 de diciembre de 2022;308:136285.
11. Martínez-Orgániz Á, Bravo JEB, Llompert M, Dagnac T, Pablo Lamas J, Vázquez L, et al. Emerging pollutants and antibiotics removed by conventional activated sludge followed by ultraviolet radiation in a municipal wastewater treatment plant in Mexico. *Water Qual Res J*. 4 de agosto de 2021;56(3):167-79.
12. Mora A, García-Gamboa M, Sánchez-Luna MS, Gloria-García L, Cervantes-Avilés P, Mahlkecht J. A review of the current environmental status and human health implications of one of the most polluted rivers of Mexico: The Atoyac River, Puebla. *Sci Total Environ*. 15 de agosto de 2021;782:146788.
13. Pérez-Alvarez I, Islas-Flores H, Gómez-Oliván LM, Barceló D, López De Alda M, Pérez Solsona S, et al. Determination of metals and pharmaceutical compounds released in hospital wastewater from Toluca, Mexico, and evaluation of their toxic impact. *Environ Pollut*. 1 de septiembre de 2018;240:330-41.
14. Zacarías VHR, Machuca MAV, Soto JLM, Equihua JLP, Cardona AAV, Calvillo MDL, et al. Hidroquímica Y Contaminantes Emergentes En Aguas Residuales Urbano Industriales De Morelia, Michoacán, México. *Rev Int Contam Ambient*. 27 de abril de 2017;33(2):221-35.
15. Arguello-Pérez MÁ, Mendoza-Pérez JA, Tintos-Gómez A, Ramírez-Ayala E, Godínez-Domínguez E, Silva-Bátiz F de A. Ecotoxicological Analysis of Emerging Contaminants from Wastewater Discharges in the Coastal Zone of Cihuatlán (Jalisco, Mexico). *Water*. julio de 2019;11(7):1386.

16. Chávez-Mejía AC, Navarro-González I, Magaña-López R, Uscanga-Roldán D, Zaragoza-Sánchez PI, Jiménez-Cisneros BE. Presence and Natural Treatment of Organic Micropollutants and their Risks after 100 Years of Incidental Water Reuse in Agricultural Irrigation. *Water*. octubre de 2019;11(10):2148.
17. Félix-Cañedo TE, Durán-Álvarez JC, Jiménez-Cisneros B. The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Sci Total Environ*. 1 de junio de 2013;454-455:109-18.
18. Rivera-Jaimes JA, Postigo C, Melgoza-Alemán RM, Aceña J, Barceló D, López de Alda M. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci Total Environ*. 1 de febrero de 2018;613-614:1263-74.
19. Luján-Mondragón, M, Gómez-Oliván, L.M., San Juan Reyes, N, et. al., Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes. *Science of the Total Environment*. 8 de enero de 2019; 660 (2019) 751–764
20. Azuma T, Otomo K, Kunitou M, Shimizu M, Hosomaru K, Mikata S, et al. Environmental fate of pharmaceutical compounds and antimicrobial-resistant bacteria in hospital effluents, and contributions to pollutant loads in the surface waters in Japan. *Sci Total Environ*. 20 de marzo de 2019;657:476-84.
21. Mohd Hanafiah Z, Wan Mohtar WHM, Abd Manan TS, Bachi NA, Abu Tahrim N, Abd Hamid HH, et al. Determination and risk assessment of pharmaceutical residues in the urban water cycle in Selangor Darul Ehsan, Malaysia. *PeerJ*. 2023;11:e14719.
22. Galani A, Alygizakis N, Aalizadeh R, Kastritis E, Dimopoulos MA, Thomaidis NS. Patterns of pharmaceuticals use during the first wave of COVID-19 pandemic in Athens, Greece as revealed by wastewater-based epidemiology. *Sci Total Environ*. 1 de diciembre de 2021;798:149014.

23. Maruya KA, Lao W, Vandervort DR, Fadness R, Lyons M, Mehinto AC. Bioanalytical and chemical-specific screening of contaminants of concern in three California (USA) watersheds. *Heliyon*. mayo de 2022;8(5):e09534.
24. Sciannameo S, Zalazar V, Aristegui I, Parera D, Sued O, Sciannameo S, et al. Encuesta sobre el impacto de la pandemia COVID-19 en el consumo de medicamentos, drogas recreativas y bebidas alcohólicas en Argentina. *Rev OFIL*. diciembre de 2022;32(4):347-53.
25. Zind H, Mondamert L, Remaury QB, Cleon A, Leitner NKV, Labanowski J. Occurrence of carbamazepine, diclofenac, and their related metabolites and transformation products in a French aquatic environment and preliminary risk assessment. *Water Res*. 15 de mayo de 2021;196:117052.
26. Duarte JAP, Ribeiro AKN, de Carvalho P, Bortolini JC, Ostroski IC. Emerging contaminants in the aquatic environment: phytoplankton structure in the presence of sulfamethoxazole and diclofenac. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2023;30(16):46604-17.
27. Suleiman M, Demaria F, Zimmardi C, Kolvenbach BA, Corvini PFX. Analyzing microbial communities and their biodegradation of multiple pharmaceuticals in membrane bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1 de septiembre de 2023;107(17):5545-54.
28. Ngqwala NP, Muchesa P. Occurrence of pharmaceuticals in aquatic environments: A review and potential impacts in South Africa. *South Afr J Sci*. agosto de 2020;116(7-8):1-7.
29. Rayme-Chalco M, Tenorio-Bautista SM. Mortalidad en estadios juveniles del Sapo Espinoso Andino *Rhinella spinulosa* (Wiegman 1843): un indicador de aguas contaminadas por medicamentos antiinflamatorios. *J Selva Andina Res Soc*. 2020;11(2):114-29.
30. Alobaidi RAK, Ulucan-Altuntas K, Mhemid RKS, Manav-Demir N, Cinar O. Biodegradation of Emerging Pharmaceuticals from Domestic Wastewater by Membrane Bioreactor: The Effect of Solid Retention Time. *Int J Environ Res Public Health*. 25 de marzo de 2021;18(7):3395.

31. Xia L, Zheng L, Zhou JL. Efectos del ibuprofeno, diclofenaco y paracetamol sobre la eclosión y el comportamiento motor en el desarrollo del pez cebra (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 1 de septiembre de 2017;182:416-25.
32. Cuthbert R, Parry-Jones J, Green RE, Pain DJ. NSAIDs and scavenging birds: potential impacts beyond Asia's critically endangered vultures. *Biol Lett*. 7 de noviembre de 2006;3(1):91-4.
33. Brunton LL et al. Las bases farmacológicas de La Terapéutica [Internet]. 13a ed. [citado 11 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.academia.edu/45029460/Las_bases_farmacol%C3%B3gicas_de_La_Terap%C3%A9utica_Brunton_13Ed
34. Capuano A, Scavone C, Racagni G, Scaglione F, Italian Society of Pharmacology. NSAIDs in patients with viral infections, including Covid-19: Victims or perpetrators? *Pharmacol Res*. julio de 2020;157:104849.
35. Chopra S, Kumar D. Characterization and biodegradation of paracetamol by biomass of *Bacillus licheniformis* strain PPY-2 isolated from wastewater. *Rendiconti Lincei Sci Fis E Nat*. 2023;34(2):491-501.
36. Micallef J, Soeiro T, Jonville-Béra AP, French Society of Pharmacology, Therapeutics (SFPT). Non-steroidal anti-inflammatory drugs, pharmacology, and COVID-19 infection. *Therapie*. 2020;75(4):355-62.
37. Parolini M. Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. *Sci Total Environ*. 20 de octubre de 2020;740:140043.
38. Sauvêtre A, Węgrzyn A, Yang L, Vestergaard G, Miksch K, Schröder P, et al. Enrichment of endophytic Actinobacteria in roots and rhizomes of *Miscanthus x giganteus* plants exposed to diclofenac and sulfamethoxazole. *Environ Sci Pollut Res Int*. abril de 2020;27(11):11892-904.

39. Ivshina IB, Tyumina EA, Bazhutin GA, Vikhareva EV. Response of *Rhodococcus cerastii* IEGM 1278 to toxic effects of ibuprofen. *PloS One*. 2021;16(11):e0260032.
40. Krzmarzick MJ, Taylor DK, Fu X, McCutchan AL. Diversity and Niche of Archaea in Bioremediation. *Archaea Vanc BC*. 2018;2018:3194108.
41. Cota Ruiz K, Núñez-Gastélum JA, Delgado Rios M, Martinez-Martinez A. BIORREMEDIACIÓN: ACTUALIDAD DE CONCEPTOS Y APLICACIONES. *Biocencia*. 23 de diciembre de 2018;21:37-44.
42. Riseh RS, Vazvani MG, Hajabdollahi N, Thakur VK. Bioremediation of Heavy Metals by Rhizobacteria. *Appl Biochem Biotechnol*. 1 de agosto de 2023;195(8):4689-711.
43. Zhang H, Zhou W, Zhan X, Chi Z, Li W, He B, et al. Biodegradation performance and biofouling control of a halophilic biocarriers-MBR in saline pharmaceutical (ampicillin-containing) wastewater treatment. *Chemosphere*. enero de 2021;263:127949.
44. Zakaria NN, Gomez-Fuentes C, Khalil KA, Convey P, Roslee AFA, Zulkharnain A, et al. Statistical Optimisation of Diesel Biodegradation at Low Temperatures by an Antarctic Marine Bacterial Consortium Isolated from Non-Contaminated Seawater. *Microorganisms*. 3 de junio de 2021;9(6):1213.
45. Singh P, Jain K, Desai C, Tiwari O, Madamwar D. Chapter 18 - Microbial Community Dynamics of Extremophiles/Extreme Environment. En: Das S, Dash HR, editores. *Microbial Diversity in the Genomic Era* [Internet]. Academic Press; 2019 [citado 11 de febrero de 2024]. p. 323-32. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128148495000186>
46. MacElroy RD. Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*. 1 de julio de 1974;6(1):74-5.

47. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock. Biología de los microorganismos. 12a Edición. Madrid, España.: Pearson educación, S.A.; 2009.
48. Kohli I, Joshi NC, Mohapatra S, Varma A. Extremophile - An Adaptive Strategy for Extreme Conditions and Applications. *Curr Genomics*. febrero de 2020;21(2):96-110.
49. Hays LE. NASA Astrobiology Strategy 2015. 2015; [internet]. [citado 13 de noviembre de 2023]. Disponible en: https://astrobiology.nasa.gov/nai/media/medialibrary/2015/10/NASA_Astrobiology_Strategy_2015_151008.pdf.
50. Johnson DB, Quatrini R. Acidophile Microbiology in Space and Time. *Curr Issues Mol Biol*. 2020;63-76.
51. Ramirez Durán N, Sandoval Trujillo H, Batista García RA, et al. *Microorganismos. La vida en ambientes extremos*. Primera edición. México, México.: Alfaomega Grupo Editor S.A. de C.V; 2021.
52. Delgado-García M, Valdivia-Urdiales B, Aguilar-González CN, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *J Sci Food Agric*. 2012;92(13):2575-80.
53. Martínez-Espinosa RM. Microorganisms and Their Metabolic Capabilities in the Context of the Biogeochemical Nitrogen Cycle at Extreme Environments. *Int J Mol Sci*. 13 de junio de 2020;21(12):4228.
54. Ikeda Y, Kishimoto M, Shintani M, Yoshida N. Oligotrophic Gene Expression in *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 under Various Nutrient Conditions. *Microorganisms*. 27 de agosto de 2022;10(9):1725.
55. Kaur A, Capalash N, Sharma P. Communication mechanisms in extremophiles: Exploring their existence and industrial applications. *Microbiol Res*. abril de 2019;221:15-27.
56. Gallo G, Puopolo R, Carbonaro M, Maresca E, Fiorentino G. Extremophiles, a Nifty Tool to Face Environmental Pollution: From Exploitation of Metabolism

- to Genome Engineering. *Int J Environ Res Public Health*. 14 de mayo de 2021;18(10):5228.
57. Zgonik V, Mulec J, Eleršek T, Ogrinc N, Jamnik P, Ulrih NP. Extremophilic Microorganisms in Central Europe. *Microorganisms*. 10 de noviembre de 2021;9(11):2326.
58. Li H, Meng F, Duan W, Lin Y, Zheng Y. Biodegradation of phenol in saline or hypersaline environments by bacteria: A review. *Ecotoxicol Environ Saf*. 30 de noviembre de 2019;184:109658.
59. Dutta B, Bandopadhyay R. Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci*. 2022;11(1):75.
60. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Meier-Kolthoff JP, et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. marzo de 2016;80(1):1-43.
61. Jose PA, Maharshi A, Jha B. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiol Res*. mayo de 2021;246:126708.
62. Hui MLY, Tan LTH, Letchumanan V, He YW, Fang CM, Chan KG, et al. The Extremophilic Actinobacteria: From Microbes to Medicine. *Antibiot Basel Switz*. 8 de junio de 2021;10(6):682.
63. Google Earth [Internet]. [citado 1 de septiembre de 2024]. Introducción – Google Earth. Disponible en: <https://www.google.com/intl/es/earth/>
64. Calvillo-Medina RP, Gunde-Cimerman N, Escudero-Leyva E, Barba-Escoto L, Fernández-Tellez EI, Medina-Tellez AA, et al. Richness and metallo-tolerance of cultivable fungi recovered from three high altitude glaciers from Citlaltépetl and Iztaccíhuatl volcanoes (Mexico). *Extremophiles*. 1 de julio de 2020;24(4):625-36.
65. Rojas-Gätjens D, Arce-Rodríguez A, Puente-Sánchez F, Avendaño R, Libby E, Mora-Amador R, et al. Temperature and elemental sulfur shape microbial

- communities in two extremely acidic aquatic volcanic environments. *Extrem Life Extreme Cond.* enero de 2021;25(1):85-99.
66. Rincón-Molina CI, Martínez-Romero E, Aguirre-Noyola JL, Manzano-Gómez LA, Zenteno-Rojas A, Rogel MA, et al. Bacterial Community with Plant Growth-Promoting Potential Associated to Pioneer Plants from an Active Mexican Volcanic Complex. *Microorganisms.* 4 de agosto de 2022;10(8):1568.
67. CONAGUA / Acuíferos Baja California [Internet]. [citado 11 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://sigagis.conagua.gob.mx/gas1/sections/Edos/BajaCalifornia/bc.html>
68. Lara-Severino RDC, Gómez Oliván LM, Sandoval Trujillo ÁH, et al. Búsqueda De Capacidad Productora De Biosurfactantes En Actinobacterias Haloalcalófilas Y Haloalcalotolerantes. *Rev Int Contam Ambient.* 1 de agosto de 2017;33(3):529-39.
69. Soto-Padilla MY, Gortáres-Moroyoqui P, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI. Biochemical and Molecular Characterization of a Native Haloalkalophilic Tolerant Strain from the Texcoco Lake. *Pol J Microbiol.* 2018;67(3):377-82.
70. Espinosa-Asuar L, Monroy-Guzmán C, Madrigal-Trejo D, Navarro-Miranda M, Sánchez-Pérez J, Buenrostro Muñoz J, et al. Diversity of an uncommon elastic hypersaline microbial mat along a small-scale transect. *PeerJ.* 2022;10:e13579.
71. Osorio-Lozada A, Surapaneni S, Skiles GL, Subramanian R. Biosynthesis of drug metabolites using microbes in hollow fiber cartridge reactors: case study of diclofenac metabolism by *Actinoplanes* species. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* febrero de 2008;36(2):234-40.
72. Moreira IS, Bessa VS, Murgolo S, Piccirillo C, Mascolo G, Castro PML. Biodegradation of Diclofenac by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11. *Ecotoxicol Environ Saf.* 15 de mayo de 2018;152:104-13.

73. Palyzová A, Zahradník J, Marešová H, Sokolová L, Kyslíková E, Grulich M, et al. Potential of the strain *Raoultella* sp. KDF8 for removal of analgesics. *Folia Microbiol (Praha)*. mayo de 2018;63(3):273-82.
74. Ivshina IB, Tyumina EA, Kuzmina MV, Vikhareva EV. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346. *Sci Rep*. 24 de junio de 2019;9(1):9159.
75. Grandclément C, Piram A, Petit ME, Seyssiecq I, Laffont-Schwob I, Vanot G, et al. Biological Removal and Fate Assessment of Diclofenac Using *Bacillus subtilis* and *Brevibacillus laterosporus* Strains and Ecotoxicological Effects of Diclofenac and 4'-Hydroxy-diclofenac. *J Chem [Internet]*. 1 de enero de 2020 [citado 11 de febrero de 2024];2020. Disponible en: <https://doaj.org/article/fabc68b081e248d1a81328305c5d9bf4>
76. Żur J, Piński A, Wojcieszńska D, Smulek W, Guzik U. Diclofenac Degradation-Enzymes, Genetic Background and Cellular Alterations Triggered in Diclofenac-Metabolizing Strain *Pseudomonas moorei* KB4. *Int J Mol Sci*. 16 de septiembre de 2020;21(18):6786.
77. Mohamed MSM, Asair AA, Fetyan NAH, Elnagdy SM. Complete Biodegradation of Diclofenac by New Bacterial Strains: Postulated Pathways and Degrading Enzymes. *Microorganisms*. junio de 2023;11(6):1445.
78. Benedek T, Pápai M, Gharieb K, Bedics A, Táncsics A, Tóth E, et al. *Nocardioides carbamazepini* sp. nov., an ibuprofen degrader isolated from a biofilm bacterial community enriched on carbamazepine. *Syst Appl Microbiol*. julio de 2022;45(4):126339.
79. Chopra S, Kumar D. Characteristics and growth kinetics of biomass of *Citrobacter freundii* strains PYI-2 and *Citrobacter portucalensis* strain YPI-2 during the biodegradation of Ibuprofen. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol*. agosto de 2022;25(3):615-28.
80. Rouibah I, Hassen W, Sallem OF, Khellaf N, Hassen A, Mansour HB. Photocatalytic and biodegradation treatments of paracetamol: investigation of

- the in vivo toxicity. *Environ Sci Pollut Res Int.* marzo de 2021;28(12):14530-45.
81. Palma TL, Magno G, Costa MC. Biodegradation of Paracetamol by Some Gram-Positive Bacterial Isolates. *Curr Microbiol.* 1 de julio de 2021;78(7):2774-86.
 82. Gao Y, Yuan L, Du J, Wang H, Yang X, Duan L, et al. Bacterial community profile of the crude oil-contaminated saline soil in the Yellow River Delta Natural Reserve, China. *Chemosphere.* 1 de febrero de 2022;289:133207.
 83. Brito EMS, Piñón-Castillo HA, Guyoneaud R, Caretta CA, Gutiérrez-Corona JF, Duran R, et al. Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1 de enero de 2013;97(1):369-78.
 84. Quesada E, Ventosa A, Rodríguez-Valera F, Megias L, Ramos-Cormenzana A. Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Bacteria from Hypersaline Soils. *Microbiology.* 1983;129(8):2649-57.
 85. Huang CH, Wang CL, Liou JS, Lee AY, Blom J, Huang L, et al. Reclassification of *Micrococcus aloeverae* and *Micrococcus yunnanensis* as later heterotypic synonyms of *Micrococcus luteus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* noviembre de 2019;69(11):3512-8.
 86. Carrasco G, Valdezate S, Garrido N, Villalón P, Medina-Pascual MJ, Sáez-Nieto JA. Identification, Typing, and Phylogenetic Relationships of the Main Clinical *Nocardia* Species in Spain According to Their *gyrB* and *rpoB* Genes. *J Clin Microbiol.* 21 de diciembre de 2020;51(11):3602-8.
 87. El-Sokkary MMA. Genotyping of New and Old *Proteus mirabilis* Isolates from Mansoura Hospitals in Egypt by *rpoB* Sequence Analysis. *Adv Microbiol.* 3 de julio de 2015;5(7):549-54.
 88. Mollet C, Drancourt M, Raoult D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol.* 1997;26(5):1005-11.

89. Chen T, Zhang Z, Li W, Chen J, Chen X, Wang B, et al. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* CTXW 7-6-2 against kiwifruit soft rot pathogens revealed by whole-genome sequencing and biochemical characterisation. *Front Microbiol* [Internet]. 1 de diciembre de 2022 [citado 21 de mayo de 2024];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.1069109/full>
90. Liu Q, Xin YH, Zhou YG, Chen WX. Análisis de secuencia multilocus de recombinación homóloga y diversidad en especies nombradas de *Arthrobacter sensu lato* y cepas que habitan en glaciares. *Syst Appl Microbiol*. 1 de enero de 2018;41(1):23-9.
91. Kosecka-Strojek M, Wolska M, Żabicka D, Sadowy E, Międzobrodzki J. Identification of Clinically Relevant *Streptococcus* and *Enterococcus* Species Based on Biochemical Methods and 16S rRNA, *sodA*, *tuf*, *rpoB*, and *recA* Gene Sequencing. *Pathogens*. noviembre de 2020;9(11):939.
92. Stackebrandt E, Brambilla E, Richert K. Gene Sequence Phylogenies of the Family Microbacteriaceae. *Curr Microbiol*. 1 de julio de 2007;55(1):42-6.
93. ChromasPro | Technelysium Pty Ltd [Internet]. [citado 1 de abril de 2024]. Disponible en: <https://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>
94. Software Informer [Internet]. 2024 [citado 1 de abril de 2024]. BioEdit. Get the software safely and easily. Disponible en: <https://bioedit.software.informer.com/7.2/>
95. Descripción general de GenBank [Internet]. [citado 1 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
96. BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local [Internet]. [citado 1 de abril de 2024]. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
97. Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences

- and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1 de mayo de 2017;67(5):1613-7.
98. Wick R. rrwick/Filtlong [Internet]. 2024 [citado 10 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://github.com/rrwick/Filtlong>
99. Li H. Minimap and miniasm: fast mapping and de novo assembly for noisy long sequences. *Bioinformatics*. 15 de julio de 2016;32(14):2103-10.
100. Schwengers O, Jelonek L, Dieckmann MA, Beyvers S, Blom J, Goesmann A. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microb Genomics*. 5 de noviembre de 2021;7(11):000685.
101. Wick RR, Schultz MB, Zobel J, Holt KE. Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics*. 15 de octubre de 2015;31(20):3350-2.
102. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*. julio de 2015;25(7):1043-55.
103. GitHub - ayixon/RaPDTTool: Rapid Profiling and Deconvolution Tool for Metagenomes [Internet]. [citado 12 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://github.com/ayixon/RaPDTTool>
104. Stothard P, Wishart DS. Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinforma Oxf Engl*. 15 de febrero de 2005;21(4):537-9.
105. Grant JR, Enns E, Marinier E, Mandal A, Herman EK, Chen CY, et al. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 5 de julio de 2023;51(W1):W484-92.
106. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 8 de febrero de 2008;9:75.

107. Declaración de Río sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo [Internet]. [citado 23 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.un.org/spanish/esa/sustdev/documents/declaracionrio.htm>
108. DOF - Diario Oficial de la Federación. Protocolo De Cartagena Sobre Seguridad De La Biotecnología Del Convenio Sobre La Diversidad Biológica [Internet]. [citado 30 de mayo de 2024]. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=689353&fecha=28/10/2003#gsc.tab=0.
109. DOF - Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. [internet]. [citado el 23 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/680173/NOM-087-ECOL-SSA1-2002.pdf>. Fernandez L. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.
110. Valenzuela Aviles JA. Sustancias bioactivas (biosurfactantes y sideróforos) producidos por microorganismos de suelo árido. 2017. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma De Baja California. [citado 2 de octubre de 2024]; Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12930/4629>
111. Velázquez-Ríos IO, Rincón-Rosales R, Gutiérrez-Miceli FA, Alcántara-Hernández RJ, Ruíz-Valdiviezo VM. Prokaryotic diversity across a pH gradient in the “El Chichón” crater-lake: a naturally thermo-acidic environment. *Extremophiles*. 20 de enero de 2022;26(1):8.
112. Ortiz-Cortés LY, Ventura-Canseco LMC, Abud-Archila M, Ruíz-Valdiviezo VM, Velázquez-Ríos IO, Alvarez-Gutiérrez PE. Evaluation of temperature, pH and nutrient conditions in bacterial growth and extracellular hydrolytic activities of two *Alicyclobacillus* spp. strains. *Arch Microbiol*. 1 de septiembre de 2021;203(7):4557-70.
113. Oregón Díaz LA. Identificación de aislados microbianos rizosféricos de un ambiente extremo. 2018. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California [citado 2 de octubre de 2024]; Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12930/4572>

114. Reséndiz Bracamontes AL. Bacterias de un ambiente extremo, fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato de calcio, tolerantes a elementos potencialmente tóxicos y radiación U.V. 2018. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California. [citado 2 de octubre de 2024]; Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12930/4624>
115. Peña-Ocaña BA, Ovando-Ovando CI, Puente-Sánchez F, et al. Metagenomic and metabolic analyses of poly-extreme microbiome from an active crater volcano lake. *Environ Res.* 1 de enero de 2022;203:111862.
116. Palma T, Valentine J, Gomes V, Faleiro M, Costa M. Batch Studies on the Biodegradation Potential of Paracetamol, Fluoxetine and 17 α -Ethinylestradiol by the *Micrococcus yunnanensis* Strain TJPT4 Recovered from Marine Organisms. *Water.* enero de 2022;14(21):3365.
117. Sharma K, Kaushik G, Thotakura N, Raza K, Sharma N, Nimesh S. Enhancement effects of process optimization technique while elucidating the degradation pathways of drugs present in pharmaceutical industry wastewater using *Micrococcus yunnanensis*. *Chemosphere.* enero de 2020;238:124689.
118. Zeng Q, Hu Y, Yang Y, Hu L, Zhong H, He Z. Cell envelop is the key site for Cr(VI) reduction by *Oceanobacillus oncorhynchi* W4, a newly isolated Cr(VI) reducing bacterium. *J Hazard Mater.* 15 de abril de 2019;368:149-55.
119. Loganathan P, Sun W, He Z. Optimization and Production of Exopolysaccharides (EPS) and Indole-3-Acetic Acid (IAA) Under Chromium by Halophilic Bacteria *Oceanobacillus oncorhynchi* W4. *Mol Biotechnol.* julio de 2024;66(7):1727-37.
120. Martínez-López NA, Peña-Ocaña BA, García-Contreras R, Maeda T, Rincón-Rosales R, Cazares A, et al. Complete genome sequence of *Paenibacillus* sp. VCA1 isolated from crater lake of the El Chichón Volcano. *Microbiol Resour Announc.* 26 de octubre de 2023;12(11):e00583.
121. Marín-Paredes R, Peña-Ocaña BA, Martínez-Romero E, Gutiérrez-Sarmiento W, Ruíz-Valdiviezo V, Jasso-Chávez R, Servín-Garcidueñas LE.

2024. Metagenome-Assembled Genome of “Candidatus Aramenus sp. CH1” from the Chichon volcano, Mexico. *Microbiol Resour Announc.* 22 de julio de 2024;13:e00526-24.
122. Ivshina IB, Tyumina EA, Bazhutin GA, Polygalov MA, Krivoruchko AV. Draft Genome Sequence of a Ketoprofen Degradar, *Rhodococcus erythropolis* IEGM 746. *Microbiol Resour Announc.* 15 de diciembre de 2022;11(12):e0107022.
123. Palma TL, Donaldben MN, Costa MC, Carlier JD. Putative Role of *Flavobacterium*, *Dokdonella* and *Methylophilus* Strains in Paracetamol Biodegradation. *Water Air Soil Pollut.* 7 de junio de 2018;229(6):200.