



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE EL GIRÓN
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS MEDIANTE
METAGENÓMICA PARA LA DEGRADACIÓN DE DICLOFENACO**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES: DANIELA EDUARDA BAILÓN BARAHONA

MELANIE NICOLE RAMOS MATABAY

TUTOR: GABRIELA INÉS MÉNDEZ SILVA

Quito-Ecuador

2024

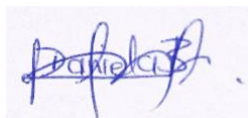
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotras, Daniela Eduarda Bailón Barahona con documento de identificación N° 1753888294 y Melanie Nicole Ramos Matabay con documento de identificación N° 1751184019; manifestamos que:

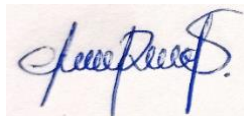
Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, <#día> de <mes> del año 2024

Atentamente,



Daniela Eduarda Bailón Barahona
1753888294



Melanie Nicole Ramos Matabay
1751184019

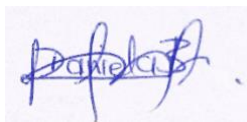
CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Nosotros, Daniela Eduarda Bailón Barahona con documento de identificación No 1753888294 y Melanie Nicole Ramos Matabay con documento de identificación No 1751184019, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Caracterización de consorcios microbianos mediante metagenómica para la degradación de diclofenaco”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, <#día> de <mes> del año 2024

Atentamente,



Daniela Eduarda Bailón Barahona
1753888294



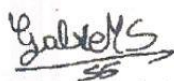
Melanie Nicole Ramos Matabay
1751184019

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Gabriela Inés Méndez Silva con documento de identificación N° 1722305057, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS MEDIANTE METAGENÓMICA PARA LA DEGRADACIÓN DE DICLOFENACO, realizado por Daniela Eduarda Bailón Barahona con documento de identificación N° 1753888294 y por Melanie Nicole Ramos Matabay con documento de identificación N° 1751184019, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, <#día> de <mes> del año 2024

Atentamente,



Ing, Gabriela Inés Méndez Silva, MSc

1722305057

Dedicatoria

Con todo mi cariño y amor, dedico este logro a mi madre, Sayra. Tu amor incondicional y tu fortaleza han sido mi guía y mi apoyo en cada paso de este camino. Gracias por ser mi pilar fundamental, por tu incansable paciencia y por nunca dejarme sola.

A mis hermanos, Bryan, Alberto, Dayana, y a mi pequeña Sophi: su apoyo y compañía han sido esenciales para llegar hasta aquí. Gracias por creer en mí, por animarme en los momentos difíciles y por hacerme sentir siempre acompañada, sin importar la distancia. Este logro es tan suyo como mío, porque sin su amor y aliento, nada de esto hubiera sido posible.

Daniela

Con mucho amor expreso mi dedicación a mi padre Gabriel, por su apoyo constante, sus palabras valiosas y por ser un soporte fundamental en mi vida; a mi madre Ximena, por escucharme en cada momento y por ser una luz inquebrantable en mi camino. A mi hermana Carla, por estar siempre a mi lado, por cuidarme y por sus palabras alentadoras que han sido salvación en momentos difíciles. A mi hermano Gabriel, por su dulce y alegre compañía, por sus ocurrencias que siempre me sacan una sonrisa, y por animarme día tras día a seguir adelante.

No puedo dejar de mencionar a mis abuelitos, Humberto y Beatriz, cuya cálida presencia y sabios consejos han sido un acompañamiento muy valioso en mi vida. A todos ustedes, mi dedicación y gratitud infinita por formar parte de mi historia y por hacerme sentir amada en cada paso que doy.

Nicole

Agradecimiento

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por guiarme por el camino correcto. A mi familia, por nunca dejarme sola y apoyarme siempre que lo necesité, por escucharme y ofrecerme sus valiosos consejos. Estoy profundamente agradecida con mi madre, Sayra, porque sin su perseverancia y paciencia, nada de esto hubiera sido posible. A mis hermanos, que, a pesar de la distancia, siempre están para darme ánimos y no dejar que me rinda fácilmente. A mi princesa Sophi, que, a pesar de su corta edad, siempre está presente para darme fuerza.

A Nicole Ramos, por toda la paciencia que ha tenido conmigo durante este proceso, por su apoyo y amistad incondicionales a lo largo de toda la carrera.

Daniela

Agradezco a Dios, por permitirme culminar esta etapa importante en mi vida; a mi familia por su valioso e incondicional apoyo y a mis padrinos Jorge y Patricia, por siempre estar pendientes de mi.

Y de manera muy especial, mi agradecimiento a Daniela Bailón, por su constancia y paciencia. Gracias a ella, nunca me sentí sola durante este proceso.

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento a nuestra tutora, Gabriela Méndez, por su paciencia, dedicación y orientación a lo largo de todo el proceso. Su apoyo ha sido fundamental para la realización de este trabajo.

Daniela y Nicole

Resumen

En las últimas décadas, los contaminantes emergentes, incluyendo productos farmacéuticos y de cuidado personal, han aumentado alarmantemente en fuentes de agua, representando una creciente amenaza para el ecosistema y la salud humana debido a su alta toxicidad aguda y crónica (Montenegro, 2023). La detección y acumulación de medicamentos como el diclofenaco en el medio ambiente y cuerpos de agua ha generado preocupación, ya que este fármaco persiste en las aguas residuales y desafía los métodos convencionales de tratamiento debido a su alta toxicidad y baja tasa de degradación (Parra, 2023). La biorremediación emerge como una solución efectiva, utilizando comunidades microbianas nativas para degradar estos compuestos (Can, 2021).

La metagenómica, que permite explorar el ADN directamente de muestras ambientales, es una herramienta versátil para caracterizar consorcios microbianos, facilitando la comprensión de la diversidad microbiana y sus capacidades funcionales para degradar contaminantes químicos (Hernández-León et al., 2010). Este análisis se realiza mediante la extracción y secuenciación de ADN de muestras, seguido por el análisis bioinformático utilizando herramientas como Galaxy, que permiten procesar y analizar los datos genómicos de manera accesible y rápida (Ramírez & Rosalvina, 2023; Correa et al., 2022).

En el caso del diclofenaco, se han identificado microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Alcaligenes aquatilis*, que pueden utilizar altas concentraciones de este fármaco como fuente de carbono, logrando degradaciones significativas (Mohamed, 2023). Este estudio se enfoca en la importancia de la metagenómica para la caracterización de consorcios microbianos en la degradación del diclofenaco, proponiendo un protocolo específico para su eliminación utilizando consorcios microbianos tanto de un solo dominio como multidominio.

La solución del caso, incluye, la recopilación bibliográfica de temas de interés como definición de consorcios, tipos de consorcios, metagenómica; así como el planteamiento de metodologías para la recolección de muestras ambientales como fuente de inóculo microbiano, la extracción y secuenciación de ADN, análisis de calidad del ADN extraído, seguido de técnicas de secuenciación y análisis bioinformático. Adicionalmente, la propuesta experimental detalla los ensayos de degradación, especificando las condiciones de cultivo y los consorcios microbianos a utilizar.

Esta investigación contribuye a la búsqueda de soluciones efectivas para la degradación de contaminantes emergentes enfocados en el diclofenaco, destacando el potencial de la biorremediación y el análisis metagenómico en la protección del medio ambiente y la salud pública.

Palabras clave: diclofenaco, contaminación, metagenómica, biorremediación.

Abstract

In recent decades, emerging contaminants, including pharmaceuticals and personal care products, have increased alarmingly, representing a growing threat to the ecosystem and human health due to their high acute and chronic toxicity (Montenegro, 2023). The detection and accumulation of drugs such as diclofenac in the environment and water bodies has raised concern, as this drug persists in wastewater and challenges conventional treatment methods due to its high toxicity and low degradation rate (Parra, 2023). Bioremediation emerges as an effective solution, using native microbial communities to degrade these compounds (Can, 2021). Metagenomics, which allows DNA to be explored directly from environmental samples, is a versatile tool to characterize microbial consortia, facilitating the understanding of microbial diversity and their functional abilities to degrade chemical contaminants (Hernández-León et al., 2010). This analysis is carried out by extracting and sequencing DNA from samples, followed by bioinformatic analysis using tools such as Galaxy and KBase, which allow genomic data to be processed and analyzed in an accessible way (Ramírez & Rosalvina, 2023; Correa et al., 2022). In the case of diclofenac, microorganisms such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Alcaligenes aquatilis* have been identified, which can use high concentrations of this drug as a carbon source, achieving significant degradation (Mohamed, 2023). This study focuses on the importance of metagenomics for the characterization of microbial consortia in the degradation of diclofenac, proposing a specific protocol for its elimination using both single-domain and multi-domain microbial consortia. The methodology includes the collection of environmental samples, DNA extraction and sequencing, and quality analysis of the extracted DNA, followed by sequencing techniques and bioinformatic analysis. The experimental proposal details the degradation tests, specifying the culture conditions and the microbial consortia to be used. This research contributes to the search for effective solutions for the degradation of emerging contaminants, highlighting the potential of bioremediation and metagenomic analysis in protecting the environment and public health.

Keywords: diclofenac, contamination, metagenomics, bioremediation.

Índice de contenidos

Tabla de contenido

1	Introducción	14
2	Fundamentación teórica	16
2.1	Los contaminantes emergentes	16
2.2	Diclofenaco.....	16
2.2.1	Fuentes del contaminante diclofenaco	17
2.2.2	Concentraciones de diclofenaco en diferentes fuentes de agua	18
2.3	Métodos de degradación de diclofenaco	19
2.3.1	Tipos de microorganismos utilizados para la biorremediación del diclofenaco	20
2.4	Análisis bioinformáticos-metagenómicos para identificación de microorganismo ...	21
3	Materiales y métodos	23
3.1	Alcance de la investigación	23
3.2	Análisis metagenómico.....	23
3.3	Propuesta protocolo para la degradación de diclofenaco	24
4	Resultados y discusión	25
4.1	Consortios microbianos en biorremediación	25
4.2	Tipos de consorcios	25
4.2.1	Según su origen	25
4.2.2	Según su composición.....	26
4.3	Ventajas de consorcios microbianos en procesos de biorremediación.....	29
4.4	Ejemplos de consorcios más utilizados para la degradación de diclofenaco	30

4.5	Metodología caracterización consorcio para ensayos de degradación	31
4.5.1	Extracción de ADN de la muestra aclimatada	31
4.5.2	Técnica de secuenciación (Illumina).....	33
4.5.3	Metodología para secuenciación de ADN de humedal	34
4.5.4	Pipeline de análisis metagenómico	35
4.6	Análisis bioinformático en el servidor Galaxy Australia	35
4.6.1	Iniciar sesión en Galaxy Australia	36
4.6.2	Creación de la historia.....	36
4.6.3	Cargar datos	37
4.7	Identificación de las especies microbianas.....	46
4.8	Metodología ensayo de degradación diclofenaco.....	50
4.8.1	Hipótesis	50
4.8.2	Selección y Preparación de Muestras	50
4.8.3	Preparación de inóculos	50
4.8.4	Diseño Experimental.....	51
4.8.5	Procedimiento	51
4.8.6	Resultados Esperados.....	52
5	Conclusiones y recomendaciones	53
6	Bibliografías.....	54

Índice de figuras

Figura 1. Fuentes de contaminación del medio ambiente con diclofenaco	18
Figura 2 Interacciones de las cepas microbianas en el consorcio	30
Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa al 1%	33
Figura 4 Secuenciación	35
Figura 5 Iniciar sesión.....	36
Figura 6 Pantalla principal	36
Figura 7 Creación de la historia	37
Figura 8 Cargar datos.....	37
Figura 9 Estadísticas básicas.....	38
Figura 10 Calidad por secuencia base.....	39
Figura 11 Calidad de secuencias por celda de flujo.....	40
Figura 12 Puntuaciones de calidad por secuencia.....	41
Figura 13 Contenido de secuencias por base	42
Figura 14 Contenido de GC por secuencia	43
Figura 15 Contenido de bases N	43
Figura 16 Distribución del tamaño de las secuencias	44
Figura 17 Nivel de duplicación de las secuencias.....	45
Figura 18 Secuencias sobrerrepresentadas.....	45
Figura 19 Contenido de adaptadores.....	46
Figura 20 Herramienta MetaPhlan2.....	47
Figura 21 Herramienta Format MetaPhlan2 output for Krona	47
Figura 22 Herramienta Krona pie chart	48
Figura 23 Resultados herramienta Krona.....	49

Índice de tablas

Tabla 1 Concentraciones de diclofenaco presentes en los ríos de Ecuador	19
Tabla 2 Composición del medio LB	50

1 Introducción

En las últimas décadas, los contaminantes emergentes han aumentado de forma alarmante, e incluyen una amplia gama de compuestos como los productos farmacéuticos y de cuidado personal, que representan una amenaza creciente para el ecosistema y la salud humana debido a su alta toxicidad aguda y crónica (Montenegro, 2023). La disponibilidad generalizada y el consumo creciente de medicamentos, tanto de venta libre como recetados, ha despertado una mayor preocupación en los últimos tiempos debido a su detección y acumulación en el medio ambiente y cuerpos de agua (Montenegro, 2023).

La presencia creciente de contaminantes como el diclofenaco, plantea desafíos significativos para la preservación del medio ambiente y la salud humana. El diclofenaco, un compuesto farmacéutico persistente, se ha vuelto omnipresente en las aguas residuales, desafiando los métodos convencionales de tratamiento debido a su elevada toxicidad y baja tasa de degradación (Parra, 2023).

Este fármaco, junto con otros como el ibuprofeno y la carbamazepina, han sido detectados en aguas superficiales, subterráneas y potables en todo el mundo, proceden principalmente de los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, hospitales, industrias farmacéuticas y la disposición inadecuada de medicamentos. La presencia de estos compuestos en el agua potable plantea serios problemas de salud humana y efectos adversos en organismos acuáticos, subrayando la importancia de entender su distribución y destino ambiental, así como de desarrollar enfoques biotecnológicos para su eliminación (Pápai et al., 2023).

La biorremediación se destaca como una de las opciones más efectivas para abordar el problema de los contaminantes emergentes, al mismo tiempo que contribuye a reducir la incidencia de efectos tóxicos (Can, 2021). La búsqueda de soluciones efectivas para la degradación de este compuesto se ha vuelto imperativa, y la biorremediación se posiciona como una estrategia prominente en este sentido.

En el ámbito de la biorremediación de fármacos, las estrategias que aprovechan las comunidades microbianas nativas emergentes son opciones sostenibles y prometedoras. Por lo tanto, la exploración de microorganismos con la capacidad de degradar el diclofenaco representa el primer paso crítico hacia la mitigación de los impactos ambientales y la protección de la salud pública. A través de la formación de consorcios microbianos, se ha observado una mayor eficacia en la degradación de este compuesto.

Esto se debe a que la diversidad de microorganismos presentes en un consorcio puede desencadenar efectos cooperativos o sinérgicos que potencian la degradación del fármaco (Ordóñez & Arenas, 2019), destacando la importancia de comprender las interacciones entre diversas especies microbianas (Can, 2021).

Para el estudio de los consorcios microbianos, la aplicación de la metagenómica ha revolucionado la manera en que se aborda el estudio del microbiota ambiental, dado que permite explorar el ADN extraído directamente de una muestra sin necesidad de cultivar los microorganismos, proporcionando una visión más completa de la diversidad biológica y funcional (Castañeda-Chávez et al., 2022).

En general, la metagenómica emerge como una herramienta versátil para la caracterización de consorcios microbianos. Lo que permite el análisis exhaustivo de la diversidad microbiana presente en un entorno natural, y el potencial de descubrimiento de nuevas enzimas asociadas a sus capacidades funcionales, lo que permite buscar soluciones innovadoras para la degradación de contaminantes químicos (Hernández-León et al., 2010).

El presente análisis de caso aborda la importancia de la metagenómica en la caracterización de consorcios microbianos para la degradación del diclofenaco, explorando su relevancia en el contexto de la biorremediación y resaltando su potencial para avanzar hacia un tratamiento más efectivo de cuerpos de aguas contaminados con este fármaco.

De igual manera, el estudio se enfoca en la recopilación bibliográfica de información relacionada con la exploración de consorcios microbianos tanto de un solo dominio como multidominio, los cuales desempeñan un papel crucial en la degradación del diclofenaco. Además, busca identificar investigaciones previas que hayan abordado la caracterización de estos consorcios microbianos, relacionados con la degradación de diclofenaco mediante técnicas de metagenómica. Por último, se planteará un flujo de trabajo para el análisis metagenómico, para evaluar la diversidad microbiana en consorcios multidominio, así como se propone el diseño de un protocolo específico para la degradación de diclofenaco utilizando tanto consorcios de un solo dominio como multidominio.

2 Fundamentación teórica

2.1 Los contaminantes emergentes

Son compuestos de origen y naturaleza química cuya presencia e impacto en el medio ambiente han sido pasados por alto hasta tiempos recientes. Entre ellos se encuentran residuos de medicamentos, plaguicidas, hormonas y productos de cuidado personal. Estas sustancias, al ser bioacumulables y tóxicas, han logrado penetrar en vertientes residuales y aguas subterráneas (Jaimes & Vera, 2020).

De todos los contaminantes emergentes, los que posiblemente suscitan mayor preocupación son los residuos de medicamentos, que incluyen efectos nocivos como la feminización y hermafroditismo en especies de peces, lo que puede llevar a su eliminación del medio ambiente, como en la trucha que causa lesiones renales o alteraciones en las escamas, en cambio en el buitre causa efectos tóxicos letales (Ibarra, 2021) (Campos et al., 2020).

En cuanto a los plaguicidas los efectos en el medio ambiente incluyen la alteración inmediata y temporal del ecosistema, la mortandad de aves y peces, y la muerte de algunos tipos de plantas, microorganismos del suelo, hongos, etc. Por otra parte las hormonas y productos de cuidado personal han mostrado efectos reproductivos adversos en animales y su efecto como disruptores endócrinos (Rodríguez, 2021; Ramos, 2023).

2.2 Diclofenaco

El diclofenaco, es un fármaco reconocido por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, se emplea tanto por vía oral como intramuscular para tratar diversas afecciones, incluyendo enfermedades reumáticas agudas, artritis reumatoidea, artrosis, lumbalgia, gota en fase aguda, inflamación postraumática y postoperatoria, cólicos renales y biliares, migraña aguda, así como en la prevención del dolor postoperatorio y el tratamiento de la dismenorrea. Este medicamento también está siendo objeto de estudio para su posible aplicación en la prevención y tratamiento de ciertos tipos de cáncer de piel, ya que se ha observado que puede bloquear sustancias inflamatorias y participar en la inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para el crecimiento tumoral. Además, se clasifica como un inhibidor de la ciclooxigenasa, un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y un antiangiogénico, y es conocido comúnmente como Voltaren (Campos et al., 2020).

2.2.1 Fuentes del contaminante diclofenaco

El diclofenaco es un medicamento que, una vez administrado, es procesado en el cuerpo a través del metabolismo y luego eliminado por vía urinaria y biliar en forma de glucurónico y conjugados de sulfato de los metabolitos. Aproximadamente el 60% de la dosis se excreta principalmente a través de la orina y heces, mientras que menos del 1% es excretado en su forma original sin cambios (Zapata, 2023).

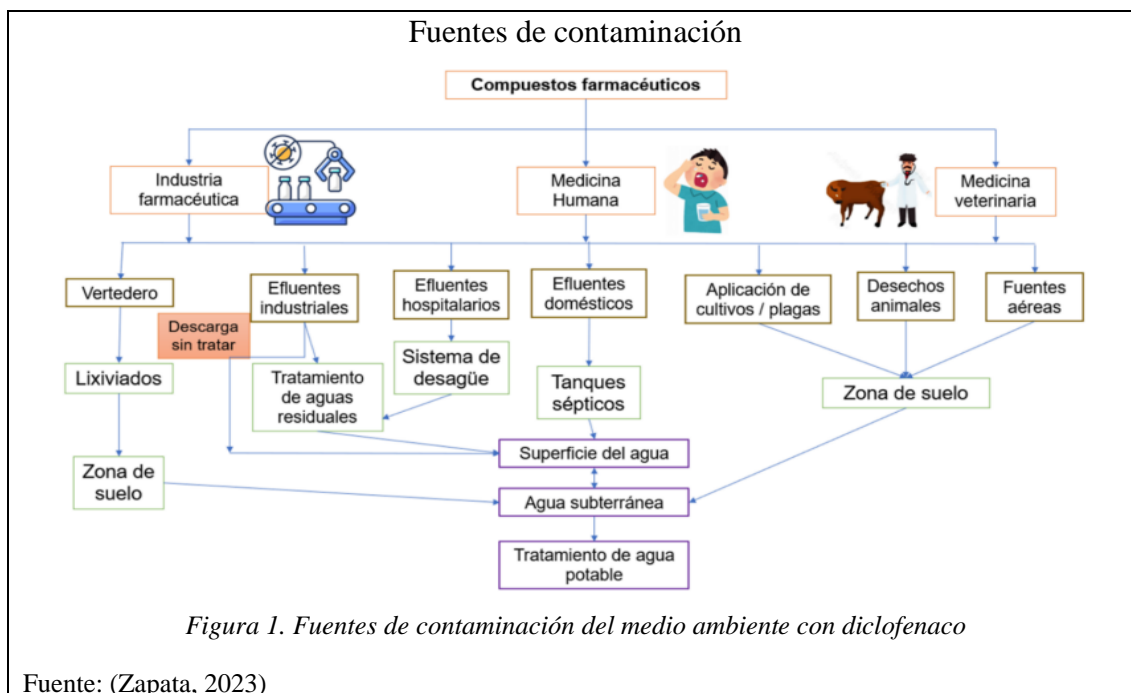
Por lo tanto, el resto de la dosis es eliminado como metabolitos a través de la bilis, principalmente como conjugados de diclofenaco. Estos metabolitos pueden liberarse en cuerpos de agua y suelos, lo que lo convierte en uno de los medicamentos que más contribuyen a la contaminación ambiental. Esto genera preocupaciones sobre su impacto en los ecosistemas y la salud humana (Zapata, 2023).

Además, el fármaco llega a los cuerpos de agua y a los suelos por escurrimientos agrícolas, vertidos de aguas residuales domésticas e industriales, llegando finalmente a las plantas de tratamientos de aguas residuales (PTAR). Una vez en la PTAR, la mayoría de estas instalaciones son incapaces de eliminar este contaminante, por sus características químicas (Parra, 2024).

La industria farmacéutica es uno de los sectores económicos más grandes e importantes a nivel mundial. Se encarga de desarrollar, producir y comercializar miles de toneladas de productos farmacéuticos, que se consideran bienes de consumo esenciales tanto para la humanidad como para los animales (Jaimés & Vera, 2020).

Los medicamentos más consumidos por los pacientes son los AINEs con un porcentaje del 31%, antidiabéticos con el 18,8% y antibióticos con el 17%. El 66% arrojan el medicamento a la basura, el 20% al inodoro, y un 10,0% donó a familiares. Estos son medicamentos que son desechados en la basura o en otro sitio lo cual causa daños a la salud y al medio ambiente (Farías et al., 2023).

El diclofenaco puede tener impactos significativos en el ecosistema y la salud. Por ejemplo, debido a las características del suelo, estas sustancias pueden infiltrarse en acuíferos o acumularse en el medio ambiente, afectando tanto al ecosistema como a los seres humanos a través de la cadena trófica. Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), los contaminantes emergentes, como el diclofenaco, representan un riesgo potencial para el medio ambiente y la salud humana (Ibarra, 2021).



2.2.2 Concentraciones de diclofenaco en diferentes fuentes de agua

Las concentraciones de diclofenaco en diversas fuentes de agua han revelado hallazgos significativos en distintas regiones del mundo. En África y Europa, se han detectado concentraciones considerables en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales., alcanzando hasta 20 µg/L. Asimismo, en la región de Moscú, se encontró la presencia de este compuesto farmacéutico en aguas residuales tratadas, con concentraciones que oscilan entre 153,8 y 750 ng/L. En Rusia, específicamente en áreas como San Petersburgo, se ha observado la presencia de diclofenaco en aguas superficiales, alcanzando concentraciones de hasta 270,0 ng/L (Campos et al., 2020).

En México, también se han identificado concentraciones de diclofenaco en efluentes de PTAR, como en el estado de Morelos, donde se han registrado concentraciones que varían entre 258 y 1398 ng/L, así como en Chihuahua, donde se han encontrado niveles de 160 ng/L. Estos hallazgos evidencian la amplia distribución y presencia de diclofenaco en diferentes fuentes de agua, señalando la importancia de continuar monitoreando y evaluando su impacto ambiental (Campos et al., 2020).

En los últimos años, en Ecuador, la urbanización y la industrialización han avanzado rápidamente, lo cual ha generado un aumento en la carga de contaminantes en los ríos, como, por ejemplo, los compuestos farmacéuticos, incluido el diclofenaco. En el Río Machángara se ha detectado concentraciones altas que van desde 9,3184 ppm hasta 48,9525 ppm (Ibarra, 2021), sin embargo en el Río San Pedro en el tramo Tambillo -

Cumbayá, en un área de 40 km aproximadamente, se encontraron concentraciones de diclofenaco con valores inferiores a 0,1 µg/L (Pacheco, 2021).

En la Tabla 1 se indica las concentraciones de diferentes contaminantes presentes en los ríos del Ecuador.

Tabla 1 Concentraciones de diclofenaco presentes en los ríos de Ecuador

Río del Ecuador	Contaminantes identificados	Concentración	Año de estudio	Fuente
Machángara	Diclofenaco	48,05 ppm	2021	(Ibarra, 2021)
Machángara	Diclofenaco	14,04 ppm	2021	(Ibarra, 2021)
Machángara	Diclofenaco	9,31 ppm	2021	(Ibarra, 2021)
Machángara	Diclofenaco	10,96 ppm	2021	(Ibarra, 2021)
Machángara	Diclofenaco	12897300 ng/L	2021	(Ibarra, 2021)
San Pedro	Diclofenaco	100 ng/L	2021	(Pacheco,2021)

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

2.2.2.1 Efectos adversos del diclofenaco en el ecosistema

Se han observado efectos adversos asociados con la presencia de diclofenaco en el medio ambiente. Por ejemplo, se han detectado concentraciones del contaminante en tejidos como branquias y riñones de peces de agua dulce, lo que ha resultado en la inhibición de su crecimiento y fecundación. El diclofenaco también ha mostrado ser altamente tóxico para los buitres que se exponen a través de su uso en medicamentos veterinarios para el ganado. Se han registrado casos de mortalidad en poblaciones de buitres en India, Pakistán y Nepal, debido a que estos animales consumen cadáveres de ganado tratado con diclofenaco (Zapata, 2023).

Además, se ha reportado que concentraciones de 100 µg/L de diclofenaco pueden inhibir la síntesis de prostaglandina E2 después de 3 días de exposición en especies como *Mytilus galloprovincialis*. En otras especies como mejillones y peces, el fármaco puede inducir estrés oxidativo a concentraciones de exposición que van desde 5 ng/L hasta 1000 µg/L (Zapata, 2023).

2.3 Métodos de degradación de diclofenaco

El tratamiento de aguas residuales para combatir los contaminantes emergentes enfrenta desafíos considerables debido a la contaminación difusa, la dispersión geográfica y la cantidad significativa de contaminantes vertidos en las fuentes de agua (Ibarra, 2021).

Existen diferentes métodos para la eliminación de productos farmacéuticos, entre ellos están, tratamientos biológicos, fisicoquímicos y de oxidación. Sin embargo, la mayoría de estos métodos presentan desventajas, como la contaminación secundaria, costos de mantenimiento elevados y procedimientos complejos (Zapata, 2023).

Los procesos fisicoquímicos se utilizan principalmente en el tratamiento convencional del agua para así poder eliminar patógenos, regular y controlar problemas de sabor y olor, además de reducir la turbidez. En los últimos años, se han utilizado tecnologías avanzadas como la ósmosis inversa, ultrafiltración, nanofiltración y procesos de oxidación avanzada para eliminar concentraciones bajas de fármaco llegando a porcentajes de degradación entre 77,84% y 97,45% (Zapata, 2023; Ortega, 2017).

Los procesos de oxidación avanzada (POA) generan radicales hidroxilos capaces de oxidar la mayoría de los compuestos químicos complejos en aguas residuales. La fotocatalisis heterogénea es un proceso de oxidación avanzada ampliamente estudiado que utiliza fotocatalizadores nanoestructurados, como el óxido de titanio (TiO₂), para absorber fotones y reactivos, aunque su aplicación en el tratamiento de grandes volúmenes de agua es costosa debido al consumo eléctrico requerido (Zapata, 2023).

Otros POA utilizan ozono con peróxido de hidrógeno ($\frac{O_3}{H_2O_2}$) y han demostrado una alta eficacia en la eliminación de fármacos como ibuprofeno y diclofenaco (Zapata, 2023).

La biorremediación se presenta como una técnica ambiental innovadora que aprovecha la capacidad de los microorganismos para descomponer, eliminar y degradar sustancias contaminantes en los entornos naturales desde hidrocarburos hasta metales pesados, ofreciendo así una solución prometedora para combatir la contaminación ambiental. Además, su capacidad para aplicarse directamente en el lugar afectado minimiza la necesidad de transportar grandes volúmenes de suelos o agua contaminados, lo que la convierte en una opción aún más atractiva desde el punto de vista logístico y económico (Pacheco, 2023).

2.3.1 Tipos de microorganismos utilizados para la biorremediación del diclofenaco

Se sabe que los microorganismos desempeñan un papel crucial en la descomposición de materia orgánica y xenobióticos, incluyendo productos farmacéuticos que producen subproductos que pueden ser nutrientes para otros organismos en la cadena alimentaria. Se han identificado microorganismos capaces de degradar varios AINE. Principalmente,

cepas bacterianas que pertenecen al género *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Patulibacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Stenotrophomonas*. También se han aislados hongos (*Penicillium* sp., *Trametes versicolor*, *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata*, *C. blakesleeana*, *Beauveria bassiana*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ph. sordida*, *Actinoplanes* sp., *Bjerkandera* sp (Zapata, 2023).

En relación con el diclofenaco que es uno de los fármacos más comunes que persiste en el medio ambiente, se han estudiado bacterias capaces de degradar este contaminante, , por ejemplo en el estudio de Mohamed (2023), se identificaron cuatro aislados bacterianos en función de su capacidad para utilizar una alta concentración de diclofenaco (40 ppm) como única fuente de carbono, como fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes aquatilis*, *Achromobacter spanius*, y *Achromobacter piechaudii*; adaptando las condiciones de crecimiento para cada microorganismo, bacterias y obteniendo como resultado un porcentaje de degradación de $97,79 \pm 0,84\%$.

2.4 Análisis bioinformáticos-metagenómicos para identificación de microorganismo

La metagenómica, analiza el material genético presente en muestras ambientales lo que permite entender la diversidad microbiana y los procesos de degradación en entornos naturales, dando a conocer la complejidad de las comunidades microbianas involucradas en la degradación de contaminantes, lo que permite desarrollar estrategias más importantes en relación con los cuerpos de agua (Hernández-León et al., 2010).

Un análisis metagenómico sigue varios pasos detallados para obtener un resultado crucial. Primero, se realizó la toma de muestra, recolectando muestras de un lugar de interés. Luego, se llevó a cabo la extracción de ADN, aislando el material genético presente en las muestras recolectadas. En el tercer paso, se realiza la amplificación de ADN, donde se verifica si es necesario aumentar el material genético obtenido, utilizando técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente, se realiza la secuenciación de ADN, determinando la secuencia de nucleótidos presentes, mediante tecnologías como la secuenciación de nueva generación (NGS). El quinto paso implica el análisis bioinformático, donde se emplearon herramientas como Galaxy para procesar los datos y obtener información sobre la función y composición de las comunidades microbianas presentes en las muestras. Finalmente, se interpretó los resultados, analizando los hallazgos para obtener una comprensión completa del estudio realizado (Ramírez & Rosalvina, 2023).

Parte fundamental del análisis metagenómico son las herramientas bioinformáticas que la abarcan, estas son empleadas para analizar los resultados de secuenciación; aunque esta disciplina puede considerarse bastante recientemente, existe ya una gran variedad de bases de datos, pipelines (flujo de trabajo) y programas como Nextflow y Metabiome las cuales son herramientas flexible debido a la simplificación, al control del flujo de datos y a la gestión de los resultados que se obtienen de los análisis metagenómicos (Lomas, 2021).

El uso de herramientas bioinformáticas es fundamental para analizar estos datos biológicos complejos, y herramientas como Galaxy y KBase han demostrado ser precisas y fáciles de usar. Galaxy, presentada en 2005, se ha destacado por su interfaz gráfica de usuario, facilitando la realización de análisis bioinformáticos de manera accesible y reproducible, permitiendo a los investigadores, incluso sin habilidades de programación, realizar análisis de datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos entre otros. También, KBase, lanzada en 2011, es una alternativa, al ser una plataforma que permite la integración de datos genómicos, transcriptómicos y "ómicas" para análisis integrados gracias a su amplia gama de herramientas y recursos que permiten análisis integrados y modelado de datos biológicos (Correa et al., 2022).

Estas plataformas están diseñadas para simplificar el proceso de análisis bioinformático, permitiendo a los investigadores centrarse en la interpretación de resultados.

3 Materiales y métodos

3.1 Alcance de la investigación

En primer lugar, se debe mencionar que el presente trabajo, se enfoca en la propuesta teórica de solución de un caso de estudio, en el cual para la recopilación bibliográfica se trabajó con artículos científicos en español e inglés de los últimos 4 años de antigüedad (2020-2024) presentes en bases de datos como Google Scholar, Scopus y Scielo. Se realizó una búsqueda sistemática de artículos científicos, revisiones y libros relevantes utilizando términos de búsqueda como "consorcios", "metagenómica", "contaminación", "diclofenaco", "degradación", "multidominio" y sus combinaciones. Se priorizaron estudios que proporcionaron información detallada sobre los flujos de trabajo utilizados en plataformas como Galaxy,

3.2 Análisis metagenómico

En cuanto a procedimiento de caracterización de consorcios microbianos mediante análisis metagenómico, se planteará la metodología más adecuada, la misma que incluye: 1) lugar de recolección de muestras ambientales, en las que existe una mayor probabilidad de encontrar microorganismos tolerantes al contaminante, 2) método de muestreo, transporte de las muestras, 3) proceso de extracción de ADN a partir de los consorcios multidominio (bacterias, hongos y levaduras), 4) Análisis de calidad del ADN extraído, 5) técnicas de secuenciación para análisis metagenómicos.

Además, se investigó de forma detallada flujos de trabajo que se pueden aplicar para la determinación de la diversidad microbiana a partir de datos metagenómicos, utilizando plataformas para análisis bioinformáticos como Galaxy. Este proceso comienza con la descripción de la entrada de lecturas crudas de secuenciación, seguido por la evaluación de calidad proponiendo herramientas como FastQC, que tienen como objetivo identificar posibles problemas, como contaminación o degradación de ADN. Luego, se planteó el preprocesamiento de las lecturas con herramientas como Trimmomatic y Cutadapt para eliminar adaptadores y bases de baja calidad (Canal-Alonso et al., 2020). Para la visualización de resultados se van a utilizar herramientas como Krona que ayuda a la asignación taxonómica (Canal-Alonso et al., 2020).

Finalmente, se presenta ejemplos de informes generados con las diferentes herramientas seleccionadas, que permiten la detección de diversidad biológica en el consorcio

analizado, que posteriormente se utilizará para proponer los ensayos de degradación del contaminante elegido.

3.3 Propuesta protocolo para la degradación de diclofenaco

Como parte de la resolución del caso, se propuso una metodología detallada junto con su correspondiente diseño experimental para llevar a cabo ensayos de degradación de diclofenaco mediante la acción de consorcios microbianos. En primer lugar, se abordó la selección y preparación de los consorcios microbianos que se utilizarán en los ensayos, mediante recopilación bibliográfica. La siguiente fase se centró en describir los ensayos de degradación que se podrían aplicar en la cual se especificó las concentraciones con las cuales se deberá trabajar, cantidad de inóculo a utilizar, condiciones de cultivo (temperatura, pH, presencia de luz solar), tiempo de exposición, entre otros.

4 Resultados y discusión

La solución al caso planteado se divide en 3 fases; primero recopilación de información bibliográfica sobre consorcios microbianos en la degradación de diclofenaco y análisis metagenómicos, En segundo lugar, se especificará el flujo de trabajo a aplicar para análisis metagenómicos con la plataforma Galaxy; y por último se detallará la propuesta de ensayos de degradación que se podrían aplicar para el diclofenaco.

4.1 Consorcios microbianos en biorremediación

En primer lugar, un consorcio es un conjunto natural de varias poblaciones microbianas de especies diferentes que trabajan en colaboración dentro de un entorno complejo, donde todos se benefician de las actividades de los otros. Estos consorcios pueden tener modalidades de vida sinérgicas o sintróficas, es decir, ayudan en el consumo de nutrientes permitiendo que el conjunto de poblaciones microbianas sean más efectivas y eficientes en comparación con las poblaciones individuales (Ochoa & Montoya, 2010).

Además, los consorcios sirven como modelo para estudiar la relación entre poblaciones bacterianas durante la biorremediación, ya que implican la acción conjunta de diferentes microorganismos sobre un sustrato, mediante la combinación de sus actividades metabólicas cooperativas (Plata, 2023).

4.2 Tipos de consorcios

4.2.1 Según su origen

4.2.1.1 *Sintéticos*

Un consorcio bacteriano sintético, es creado artificialmente en un entorno controlado de laboratorio, y presenta una mayor eficiencia en comparación con aquellos que se encuentran en el medio ambiente. Estas ventajas se atribuyen a la capacidad de regular las condiciones óptimas de crecimiento y las proporciones de cada cepa, teniendo en cuenta el porcentaje de degradación de cada una de las cepas involucradas. Por tanto, estos consorcios son clave para comprender las interacciones bacterianas en los procesos de biorremediación, ya que involucran la colaboración de diversos microorganismos en la transformación de un sustrato, mediante la combinación de sus actividades metabólicas cooperativas. Para promover esta cooperación, es importante estructurar el entorno espacialmente, evitando la competencia entre especies que podría resultar en la formación de consorcios laminados, donde las especies se segregan físicamente debido a la competencia por recursos (Plata, 2023).

4.2.1.2 Naturales

Dentro de este enfoque, las comunidades microbianas "naturales" utilizadas en biotecnología son de gran interés, ya que la producción o degradación de una sustancia específica puede servir como medida objetiva de su desempeño. Por lo general, estos consorcios se encuentran de manera natural en el medio ambiente y pueden incluir hasta 38 cepas bacterianas diferentes. Los miembros del consorcio se comunican entre sí mediante el intercambio de metabolitos o señales, lo que permite que cada individuo detecte y responda a estas comunicaciones; esta interacción facilita la división del trabajo dentro del consorcio (Plata, 2023).

4.2.2 Según su composición

4.2.2.1 Bacterias

Los consorcios bacterianos son capaces de metabolizar compuestos tóxicos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos, plaguicidas nitroaromáticos y bifenilos policlorados, transformándolos en carbono y energía. Algunas especies incluso pueden mineralizar estos contaminantes en agua (H₂O) y dióxido de carbono (CO₂) (Nikita & Sathiavelu, 2023).

Estos consorcios son utilizados activamente para la degradación de diclofenaco. Recientemente, se desarrolló un consorcio de bacterias sintéticas mediante la optimización de vías metabólicas para mejorar esta degradación. Este consorcio, compuesto por las cepas *Achromobacter* sp., *Sphingobium* sp. y *Rhizobium* sp., logró una degradación de 34,8% (Nikita & Sathiavelu, 2023).

4.2.2.2 Hongos

La aplicación de hongos filamentosos en consorcios contribuye a la degradación de contaminantes debido a que se basa en las reacciones Fenton con o sin enzimas modificadoras de lignina extracelular (LME), por lo que este mecanismo de reacción resulta eficiente gracias a su alto potencial de oxidación de radicales de hidroxilo e inespecificidad (Concha & Hernández, 2023).

Además, los hongos descomponen la biomasa utilizando diversas enzimas como lipasa, amilasa y nucleasa. Son utilizados en la biorremediación ambiental y la biotransformación de residuos orgánicos, metabolizando sustancias químicas para obtener nutrientes. Los hongos son efectivos en la remediación de contaminantes

orgánicos y metálicos en aguas residuales, suelo y aire de manera rentable y ecológica. Pueden crecer en el suelo y en cuerpos de agua, y son resistentes a cambios climáticos, lo que los hace aptos para la biorremediación (Nikita & Sathiavelu, 2023).

El uso de consorcios de hongos, en lugar de cepas individuales, mejora la biorremediación de sustratos mixtos debido a la diversidad en las enzimas producidas, reduciendo costos y energía. Sin embargo, algunos estudios han mostrado menores tasas de degradación en cocultivos comparados con monocultivos, destacando la dificultad de diseñar consorcios eficaces y monitorear su desempeño. A pesar de estos desafíos, la creciente investigación en consorcios fúngicos promete avances significativos en biorremediación (Nikita & Sathiavelu, 2023).

4.2.2.3 *Algas*

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas de tamaños entre 0,001 mm y 2 mm, algunos ejemplos de microalgas incluyen diatomeas, flagelados verdes y dinoflagelados. En los últimos años, las microalgas han captado la atención de los investigadores como una materia prima alternativa para la producción de bioenergía. Cultivar microalgas en aguas residuales permite la biorremediación de estas aguas, ricas en nutrientes, y a la vez genera un alto rendimiento de biomasa de manera energéticamente eficiente. Estudios han destacado los beneficios económicos y medioambientales de usar microalgas como materia prima alternativa, lo que ha llevado a aplicaciones industriales más allá de la investigación de laboratorio (Nikita & Sathiavelu, 2023).

Las microalgas absorben CO₂, reduciendo así la huella de carbono del proceso. Su crecimiento se puede dar en tres modos: fototrófico, heterótrofo y mixotrófico. En el modo fototrófico, la luz solar y el CO₂ son las principales fuentes de carbono y energía. En el modo heterótrofo, las microalgas utilizan sustratos de carbono orgánico como glucosa, glicerol y acetato. Algunas cepas pueden crecer en modo mixotrófico, combinando condiciones fototróficas y heterótrofas simultáneamente o de manera secuencial (Nikita & Sathiavelu, 2023).

Los consorcios de microalgas son especialmente efectivos para la biorremediación de metales pesados, materia orgánica y la fijación de CO₂. El uso de estos consorcios ha

demostrado ser sostenible y económico para el tratamiento terciario de aguas residuales, ofreciendo beneficios adicionales, al mejorar la economía de la producción de biocombustibles con microalgas (Nikita & Sathiavelu, 2023).

En el caso del diclofenaco, en el estudio realizado por (Castro Viteri, 2022), se destaca los consorcios de algas con *Chlorella* sp., *Merismopedia* sp., *Closteriopsis* sp., teniendo como resultado la eliminación de alrededor del 74,68 %, además se destaca la aplicación de microalgas para la recuperación de recursos en aguas residuales y la simultánea contaminación de farmacéuticos.

4.2.2.4 *Multidominio*

El uso de consorcios multidominio comprenden una diversidad de microorganismos donde varios grupos o especies tienen un papel importante y complementario en las funciones globales del consorcio (Nikita & Sathiavelu, 2023).

Entre los consorcios multidominio más investigados son los consorcios mixtos bacteriano-fúngicos, los consorcios hongo-microalgas y los consorcios bacterias-microalgas. Estos consorcios mixtos se emplean comúnmente en la biorremediación de aguas residuales y en la fijación de CO₂. Existen pocos estudios que documentan el uso de consorcios mixtos de hongos y bacterias definidos como una alternativa para el tratamiento de aguas residuales. En cambio, los consorcios mixtos de bacterias y hongos definidos se han utilizado principalmente en la biodegradación de contaminantes recalcitrantes, como efluentes textiles, colorantes y clorobenceno. Se ha demostrado que estos consorcios mixtos logran tasas de biodegradación más elevadas que los cultivos axénicos (Nikita & Sathiavelu, 2023).

Las mezclas de hongos o consorcios de hongos con bacterias se identifican por tener la capacidad de eliminar gran cantidad de microcontaminantes, cabe mencionar que la eficiencia del resultado de degradación se relaciona con las similitudes de las condiciones de crecimiento entre microorganismos (Concha & Hernández, 2023).

Por otro lado, el uso de los consorcios microalgas-bacterias constituye una forma de simbiosis y mutualismo lo que ofrece diversas ventajas en varios ámbitos como la energía, la economía y el medioambiente, debido a su capacidad de adaptación a diferentes entornos gracias a sus características metabólicas (Meneses, 2022).

En lo que respecta a consorcios multidominio destinados a la degradación del diclofenaco, los estudios al respecto son limitados. Por otro lado, en el caso de los consorcios de un solo dominio, se identificó en cinco estudios que los predominantes y más efectivos eran los de bacterias debido a su sinergia y diversidad metabólica (Meneses, 2022).

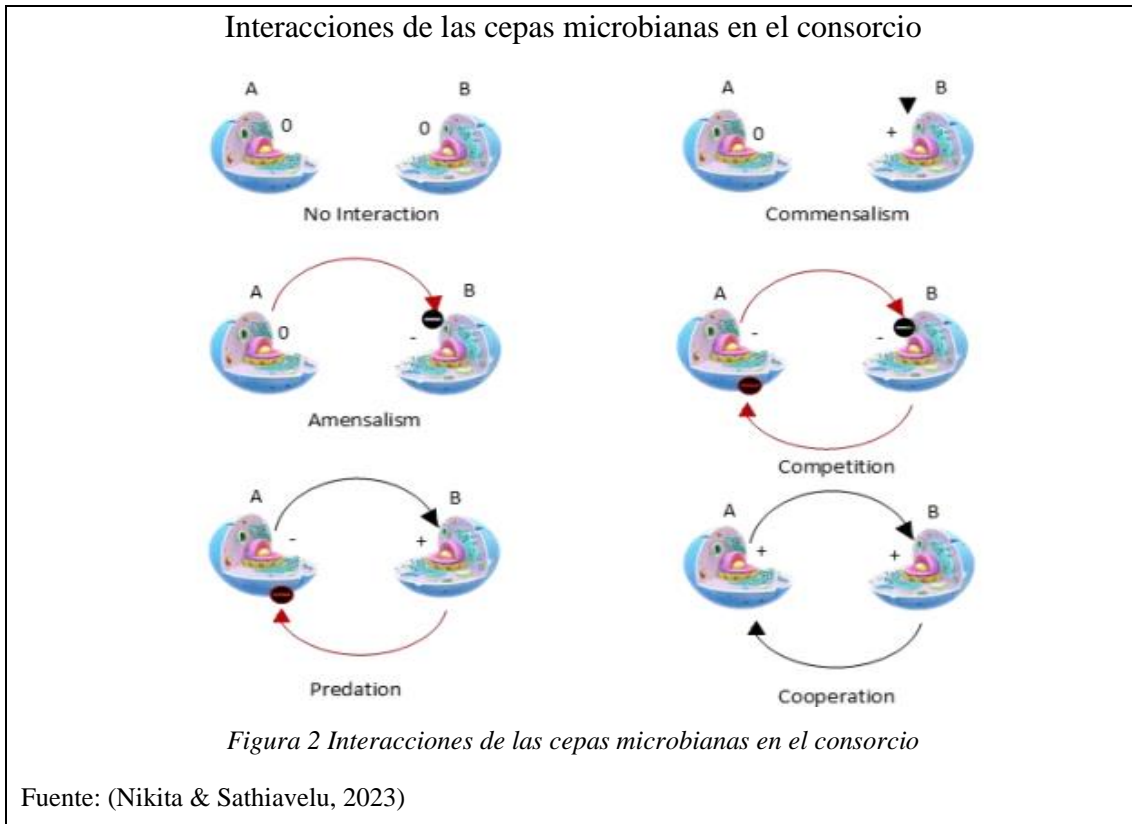
4.3 Ventajas de consorcios microbianos en procesos de biorremediación

Los consorcios microbianos presentan diversas ventajas sobre los monocultivos, tales como la división del trabajo, la organización espacial y una mayor resistencia a perturbaciones ambientales. Se ha demostrado que son una estrategia superior para la biorremediación en ambientes contaminados complejos debido a sus múltiples capacidades metabólicas, resultado de la cooperación entre los miembros del consorcio. Durante la degradación por un consorcio microbiano, los intermediarios metabólicos producidos por una bacteria pueden servir como base para el metabolismo y crecimiento de otros miembros, promoviendo una degradación continua con baja o nula toxicidad (Nieto, 2023).

Los consorcios también pueden soportar mejor los periodos de escasez de nutrientes gracias a la diversidad metabólica y la capacidad de compartir metabolitos entre sus miembros. Incluso, las especies minoritarias dentro del consorcio, retenidas por selección natural, pueden responder eficazmente a tales situaciones. En resumen, los consorcios microbianos son más resistentes a cambios ambientales y tienen una mayor capacidad de adaptarse y degradar una variedad de desechos complejos (Barriga, 2015).

La Figura 2 Interacciones de las cepas microbianas en el consorcio indica diferentes tipos de interacciones entre las cepas microbianas en un consorcio, como son Sin interacción (0,0), en la que ninguna cepa afecta a la otra, las cepas A y B coexisten sin influir en el crecimiento o la actividad de la otra; comensalismo (0, +), donde la cepa B se beneficia de la cepa A, mientras que A no se ve afectada ni negativa ni positivamente; amensalismo (0, -), donde la cepa A no se encuentra afectada, pero su presencia daña a la cepa B; competencia (-, -), donde ambas cepas se ven afectadas, ya que compiten por los mismos recursos limitados. También se indica la depredación (+, -), en la cual la cepa A se beneficia de la cepa B la cual ha sido perjudicada, esto podría ser un caso de parasitismo; cooperación (+, +), donde ambas cepas se benefician mutuamente de su interacción la cual ayuda a mejorar su crecimiento. Por último, el signo (+), indica el beneficio o

aumento en crecimiento o actividad; y el signo (-), indica la inhibición en crecimiento o actividad; mientras que el (0), señala que no existe efecto, ni negativo ni positivo (Nikita & Sathiavelu, 2023).



4.4 Ejemplos de consorcios más utilizados para la degradación de diclofenaco

Los consorcios que comprenden diversas comunidades microbianas han demostrado ser capaces de metabolizar y degradar compuestos como el diclofenaco en entornos acuáticos. Por ejemplo, se han utilizado consorcios de cepas de bacterias *Enterobacter hormaechei* y *Enterobacter cloacea*, que presentan un porcentaje de eliminación del 98% como única fuente de carbono, las cuales se usaron para evaluar la degradación de los AINEs específicamente el diclofenaco (Aissaoui et al., 2021).

El estudio realizado por Mohamed et al., (2023), muestra un consorcio de bacterias conformadas por *Pseudomonas aeruginosa* (S1), *Alcaligenes aquatilis* (S2), *Achromobacter spanius* (S11), y *Achromobacter piechaudii* (S18), indicando que el mayor porcentaje de degradación de diclofenaco registrado fue de $97,79 \pm 0,84$ después de seis días de incubación para *Achromobacter spanius* S11.

El consorcio bacteriano conformado por *Enterobacter hormaechei*, *Arthrobacter nicotianae*, *Pseudomonas* sp., y *Citrobacter youngae* fue capaz de metabolizar el 9,12% del diclofenaco en una concentración de 3 mg/L, y en condiciones cometabólicas con presencia de glucosa, se eliminó el 56% del diclofenaco a la misma concentración (Aissaoui et al., 2017).

Por otro lado, en el estudio realizado por Castro (2022), se destaca los consorcios de algas con *Chlorella* sp. *Merismopedia* sp., *Closteriopsis* sp., teniendo como resultado la eliminación de alrededor del 74,68 % de diclofenaco, además se destaca la aplicación de microalgas para la recuperación de recursos en aguas residuales y la simultánea contaminación de farmacéuticos.

Por tanto, en base a los artículos consultados, en el 33% de los mismos se identifica a la bacteria *Enterobacter hormaechei* y *Pseudomonas* sp como los microorganismos más efectivos para la degradación de diclofenaco con porcentajes que van desde el 56% al 98% en diferentes condiciones.

4.5 Metodología caracterización consorcio para ensayos de degradación

Para los ensayos de degradación se debe comenzar con la selección del inóculo a utilizar, en este caso se propone utilizar una muestra de humedal cercano al río Machángara; Coordenadas (Norte: 9971692,5459; Este: 775429,148), sector de referencia: Hospital del sur, para lo cual se debe limpiar cuidadosamente el área de donde se va a extraer la muestra, para que esté libre de cualquier desecho o escombros, en el caso de ser abundante, se procede a quitar los primeros cm en un área de 15 cm de radio. El muestreo representativo se realiza en forma de zigzag o al azar. Se emplea una pala para una recolección superficial de 0 a 30 cm y se toma de 10 a 20 sub-muestras por lote, las cuales se juntan, se homogenizan bien en un saco y se obtiene una muestra de unos 200 a 500 g (Pápai et al., 2023).

Después se depositan las muestras en bolsas plásticas nuevas, se procede a sellar y etiquetar las bolsas. Es fundamental almacenar las muestras en un sitio fresco para evitar pérdida de humedad y modificación de temperatura. Las muestras recolectadas para el análisis de patógenos deben ser recogidas y conservadas a temperaturas bajas (4 °C) para asegurar su transporte al laboratorio con mínima pérdida de viabilidad (Pápai et al., 2023).

4.5.1 Extracción de ADN de la muestra aclimatada

Para la extracción de ADN de las muestras de suelo se utilizará el Kit DNeasy® PowerSoil® (Qiagen, Inc, Hilden, Germany). Primero se añadirá 0,25 g de muestra de suelo en el tubo PowerBead proporcionado y se agita suavemente hasta obtener una mezcla homogénea. Posterior se agregará 60 µL de Solución C1 y se agitará brevemente, los tubos PowerBead se deben fijar horizontalmente en un adaptador vortex y mezclar a máxima velocidad durante 10 minutos. Después se procederá a centrifugar los tubos a 10.000 x g durante 30 segundos para transferir el sobrenadante a un tubo de recogida limpio de 2 mL (Ríos, 2023).

Se deberá añadir 250 µL de Solución C2 y agitar en vórtex durante 5 segundos e incubar de 2 a 8 °C durante 5 minutos y centrifugar los tubos durante 1 minuto a 10.000 x g. Evitando el sedimento, se transferirá 600 µL de sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 mL. Para después agregar 200 µL de Solución C3 y agitar brevemente e Incubar de 2–8 °C durante 5 minutos. Previamente se debe centrifugar los tubos durante 1 minuto a 10.000 x g, siguiendo el mismo procedimiento mencionado, evitando el sedimento, transferir 750 µL de sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 mL (Ríos, 2023)

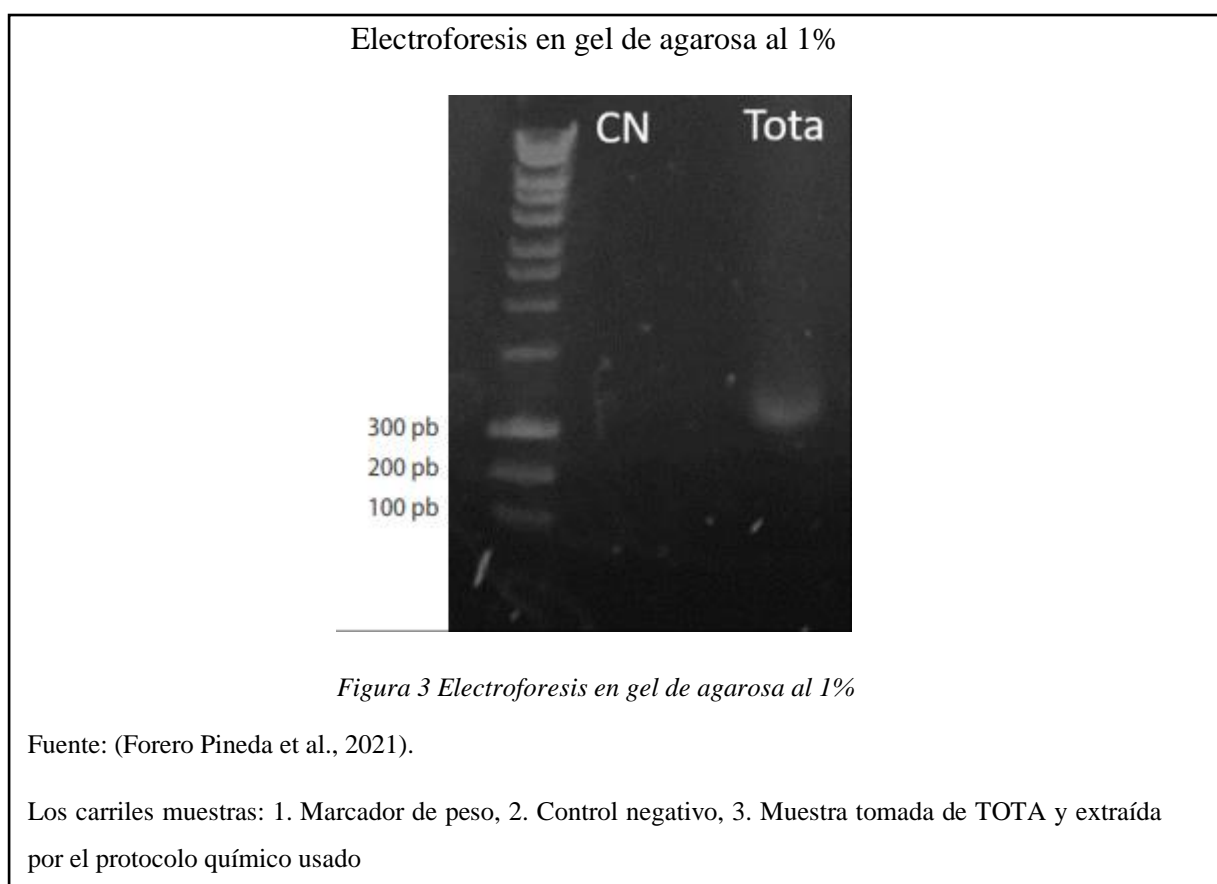
Asimismo, se agitará para mezclar la Solución C4 y agregar 1.200 mL al sobrenadante. Mezclar durante 5 segundos en vortex, para después agregar 675 µL en una Columna MB Spin y centrifugar a 10.000 x g durante 1 minuto, y desechar a flujo continuo (Ríos, 2023). Se debe repetir el procedimiento anterior dos veces, hasta que se haya procesado toda la muestra. Ahora se va a añadir 500 µL de Solución C5 y centrifugar durante 30 segundos a 10.000 x g. Desechar el líquido sobrante y centrifugar de nuevo durante 1 minuto a 10.000 x g. Colocar con cuidado la Columna MB Spin en un tubo de recogida limpio de 2 mL. y agregar 100 µL de Solución C6 al centro de la membrana de filtro blanca. Centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g. y desechar la columna giratoria MB. Es importante almacenar la muestra de ADN en congelación (–20 °C a –80 °C) (Ríos, 2023).

Para la cuantificación del ADN total extraído, se debe preparar la solución de trabajo Qubit™ diluyendo el reactivo Qubit™ HS dsDNA 1:200 en el tampón Qubit™ dsDNA HS. Agregar 198 µL de solución de trabajo Qubit™ a un tubo de ensayo Qubit™ de 500 µL previamente etiquetado. Agregar 2 µL de muestra de ADN y agitar vigorosamente

durante 3 a 5 segundos e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Leer las muestras en el fluorómetro Qubit™ 2.0 (Invitrogen™) (Ríos, 2023).

La concentración y calidad del ADN total extraído se determinará utilizando el Kit Qubit™ dsDNA HS (Invitrogen™) y electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) (Ríos, 2023).

La Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa al 1% indica integridad del material extraído debido a la ausencia del ADN degradado, también se observa pureza y alta calidad.



4.5.2 Técnica de secuenciación (Illumina)

La tecnología de secuenciación de Illumina por síntesis (SBS), también conocida como secuenciación de alto rendimiento, es una tecnología de secuenciamiento de próxima generación (NGS) utilizada a nivel mundial. Esta tecnología es responsable de generar más del 90% de los datos de secuenciación globales debido a su alta precisión y lecturas sin errores (Orozco, 2018).

La tecnología de secuenciación Illumina tiene la capacidad de generar secuencias de ADN de buena calidad, por tanto, se usa en el análisis de muestras de suelos y consorcios

bacterianos, por ende, la técnica previamente mencionada ayuda a detectar una amplia gama de microorganismos presentes en las muestras de suelos importantes para estudios de diversidad microbianas y evaluaciones de salud del suelo. El sistema MiSeq de Illumina proporciona una solución integral de secuenciación, que incluye la generación de clústeres, la amplificación y la secuenciación. Estos procesos pueden ser monitoreados en tiempo real a través del sitio web de Illumina®, BaseSpace. Finalmente, los datos obtenidos se convierten automáticamente a formatos de archivo estándar para su análisis posterior (Orozco, 2018).

4.5.3 Metodología para secuenciación de ADN de humedal

A. Preparación de la biblioteca

Este proceso comienza con la fragmentación aleatoria de la muestra de ADN seguida de la ligadura de adaptadores en los extremos 5' y 3'. Posteriormente, la tagmentación combina las reacciones de fragmentación y ligadura en un solo paso, lo que mejora significativamente la eficiencia del proceso. Luego, los fragmentos con adaptadores se amplifican mediante PCR y se verifica la calidad de la biblioteca utilizando gel de agarosa (Orozco, 2018).

B. Generación de clústeres

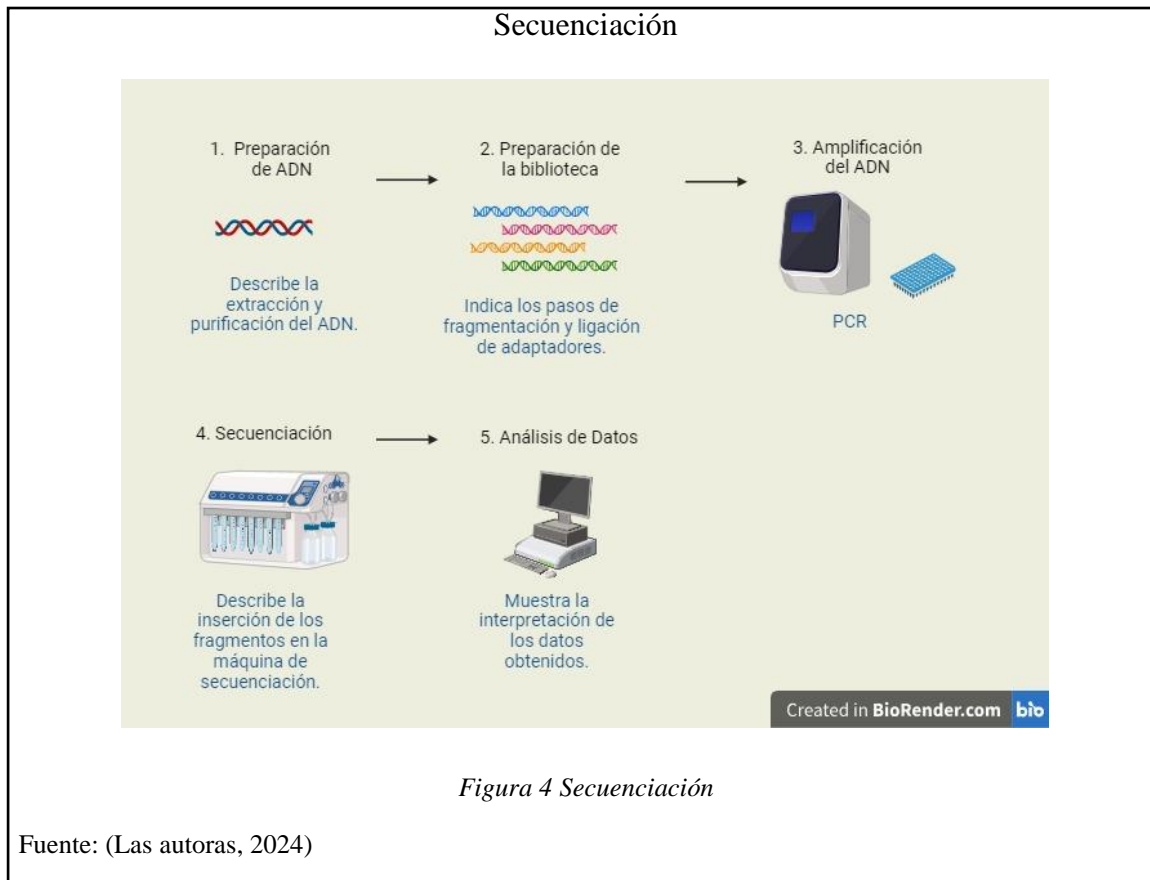
La biblioteca se carga en una celda de flujo (flow cell) donde los fragmentos se capturan en un "césped" de oligonucleótidos complementarios adheridos a la superficie de los adaptadores de la biblioteca. Cada fragmento se amplifica en clústeres clonales diferentes mediante amplificación por puente. Una vez completado este proceso las plantillas están listas para la secuenciación (Orozco, 2018).

C. Secuenciación por síntesis (SBS)

Se utiliza el método de "terminador reversible" que detecta bases individuales a medida que se incorporan en las hebras de ADN. Este método genera una secuencia base por base altamente precisa, eliminando errores específicos, incluso en regiones de secuencias repetitivas y homopolímeros (Orozco, 2018).

D. Análisis de datos

Durante el análisis de datos y la alineación, las nuevas lecturas de secuencia se alinean con un genoma de referencia. Después de la alineación, se pueden realizar análisis metagenómicos (Orozco, 2018).



4.5.4 Pipeline de análisis metagenómico

El análisis metagenómico genera varios tipos de archivos, que incluyen: archivos de datos sin procesar del secuenciador, que contienen las lecturas de secuenciación originales de cada muestra como son los archivos FASTQ. Estos archivos se utilizan para la evaluación de la calidad de las secuencias y el preprocesamiento aplicado a los datos, generando como resultado archivos FASTQ filtrados e informes de calidad (HTML o TXT). Después, se procede con el ensamblaje, que genera archivos en formato FASTA (Alba, 2021).

Seguido de los archivos de anotaciones, que proporcionan información sobre los genes, los elementos funcionales y las asignaciones taxonómicas identificados en la muestra metagenómica (Alba, 2021).

4.6 Análisis bioinformático en el servidor Galaxy Australia

A continuación, se presenta el flujo de trabajo en la plataforma Galaxy Australia, planteado para analizar los datos de secuenciación de la muestra de humedad propuesta como fuente de los consorcios a utilizar posteriormente en los ensayos de degradación de diclofenaco.

4.6.1 Iniciar sesión en Galaxy Australia

Galaxy Australia es una plataforma de análisis de datos, fácil de usar que permite realizar diversos análisis bioinformáticos. En la Figura 5 Iniciar sesión se indica el inicio de sesión al servidor Galaxy Australia.



4.6.2 Creación de la historia

Para crear una historia hay que presionar en el símbolo “+” (Figura 6 Pantalla principal) luego para editar el nombre presionar la figura que tiene un lápiz y escribir el nombre deseado para la creación de la historia, en este caso es “Análisis metagenómico”.

Pantalla principal



Figura 6 Pantalla principal

Fuente: (Las autoras, 2024)

Creación de la historia



Figura 7 Creación de la historia

Fuente: (Las autoras, 2024)

4.6.3 Cargar datos

En la Figura 8 Cargar datos indica como cargar datos, para esto hay que copiar la ubicación del enlace (la muestra ambiental por utilizar va a ser la siguiente https://zenodo.org/record/7871630/files/JC1A_R1.fastqsanger.gz (la cual en este caso correspondería a la muestra de humedal del Río Machángara).

Dar clic en cargar datos en la parte superior del panel de herramientas
Seleccionar Pegar/Recuperar datos, pegar los enlaces en el campo de texto, dar clic en “Empezar”.

Cargar datos

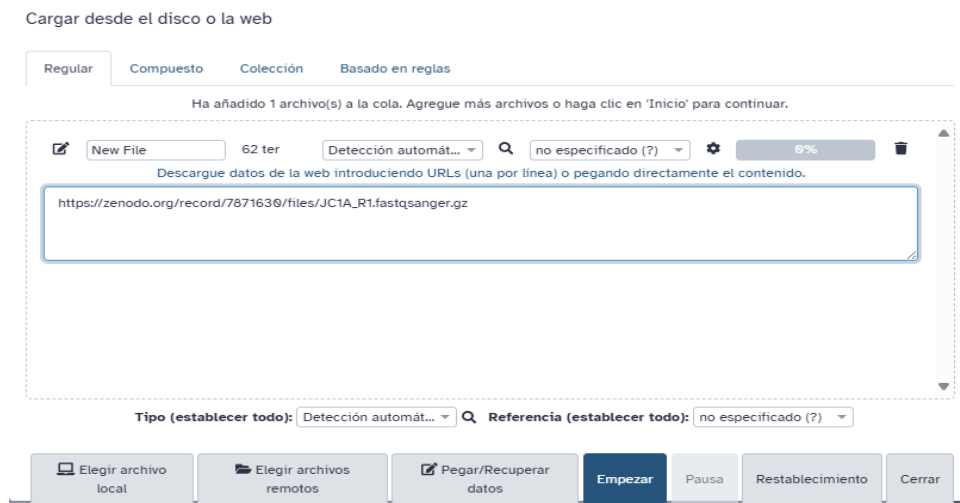


Figura 8 Cargar datos

Fuente: (Las autoras, 2024)

Una vez subido los datos, se analizó la calidad de las secuencias en el programa FastQC, cuyo informe presenta los siguientes resultados:

- **Estadísticas básicas**

En la Figura 9 Estadísticas básicas se indica información de datos cargados, como nombre del archivo, tipo, codificación, secuencias totales (137139), bases totales (29,2 Mbp), secuencias marcadas como mala calidad (0), longitud de la secuencia (20-251) y el porcentaje GC (64).

Estadísticas básicas



Estadísticas básicas

Medir	Valor
Nombre	JC1A_R1_fastqsanger_gz.gz
Tipo de archivo	Llamadas base convencionales
Codificación	Sanger / Illumina 1.9
Secuencias totales	137139
Bases totales	29,2 Mbp
Secuencias marcadas como de mala calidad	0
Longitud de la secuencia	20-251
%GC	64

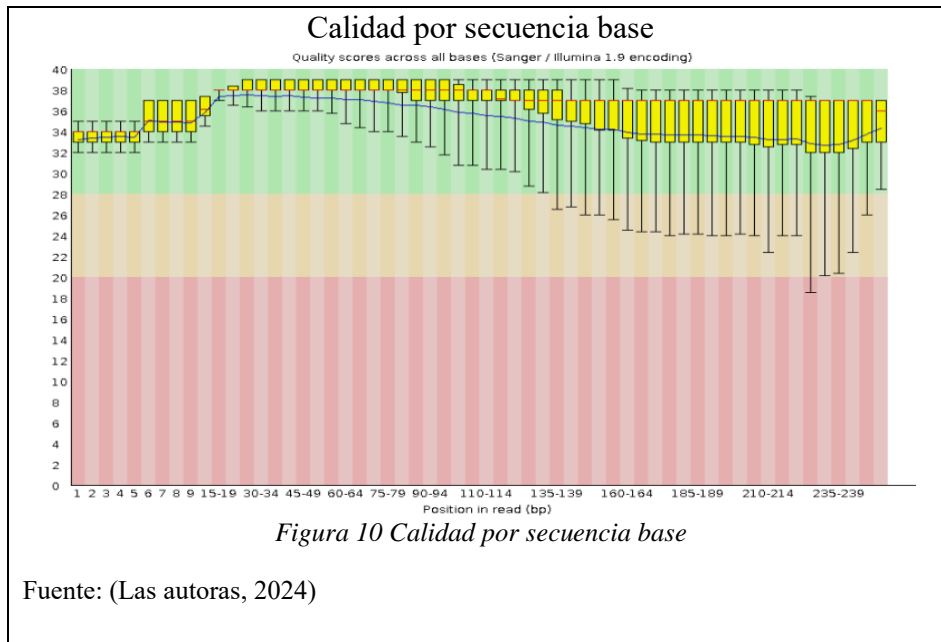
Figura 9 Estadísticas básicas

Fuente: (Las autoras, 2024)

• Calidad por secuencia base

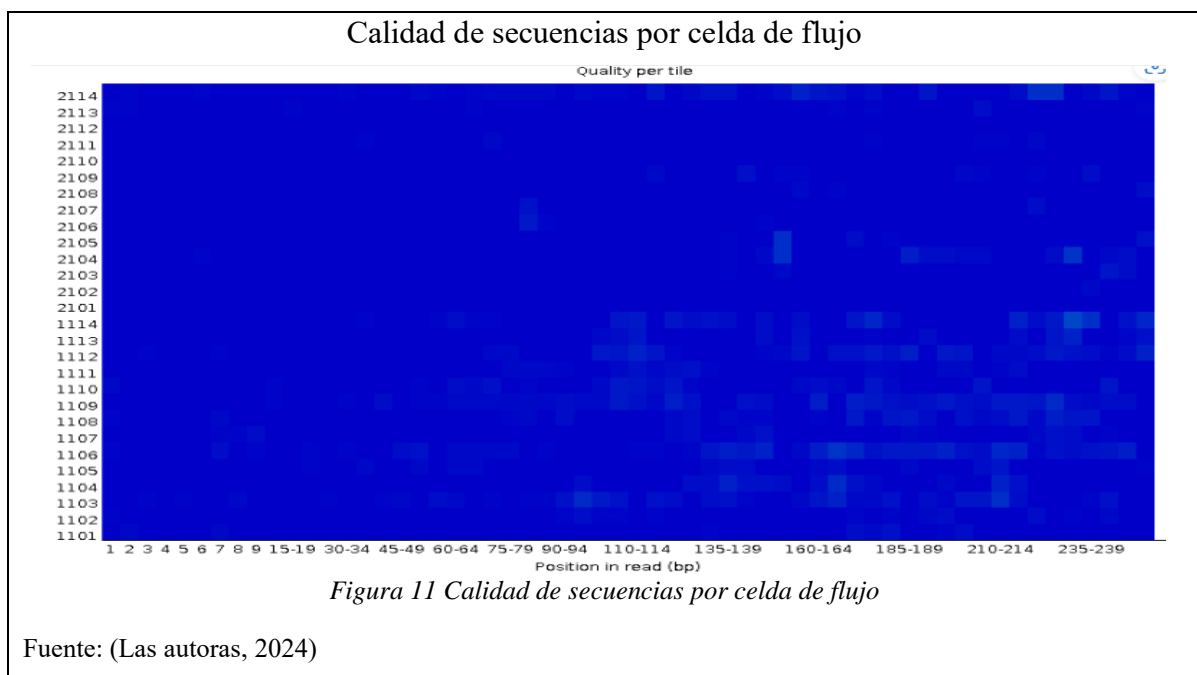
En este punto indica que en el eje X se encuentran las secuencias, mientras que en el eje Y esta la calidad de las bases.

En la Figura 10 Calidad por secuencia base se observa tres colores, rojo representa secuencias de mala calidad, amarillo secuencias moderada y verde secuencias de muy buena calidad. Como todas las secuencias de la muestra se encuentran en el rango de color verde se puede concluir que la calidad de la secuencia está en un muy buen estado. Además, la calidad de las bases en este gráfico se basa en el índice Phred, y los valores más altos indican una mayor precisión en las llamadas de bases. Los valores Q superiores a 30 se consideran de alta calidad, los valores entre 20 y 30 se consideran de calidad aceptable y los valores inferiores a 20 se consideran de baja calidad (Galaxy, 2024). El gráfico muestra que las primeras bases son de alta calidad, pero la calidad disminuye hacia el final de la secuencia.



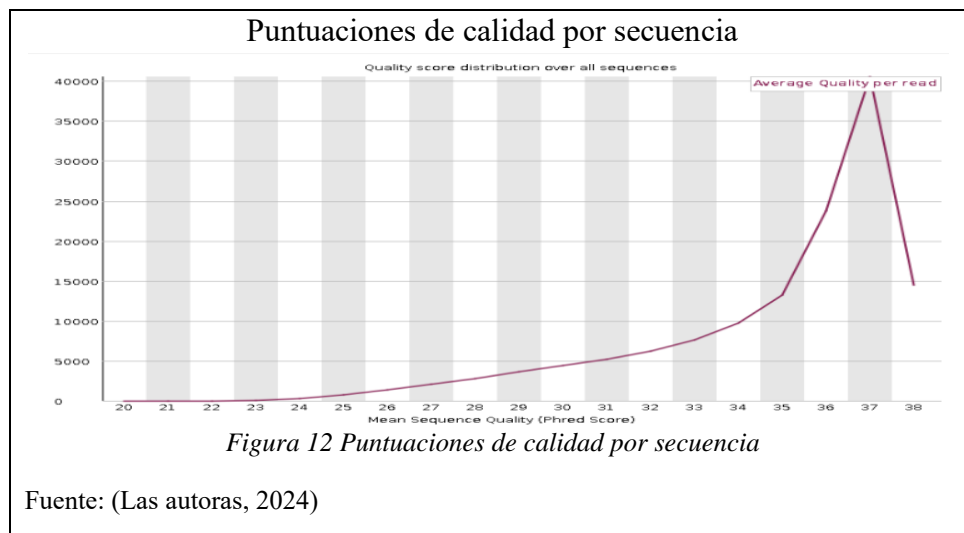
- **Calidad de secuencia por celda de flujo**

La calidad de secuencia por celda de flujo solo se mostrará en los análisis de resultados si se utiliza una biblioteca de Illumina que conserva sus identificadores de secuencia originales, aquí se codifica la secuencia por celda de flujo procedente de cada lectura (Galaxy, 2024), por tanto, la Figura 11 Calidad de secuencias por indica la calidad de secuencias, en la cual se puede observar que la mayoría es de color azul, lo que asocia que la secuencia es de muy buena calidad.



- **Puntuaciones de calidad por secuencia**

En la Figura 12 Puntuaciones de calidad por secuencia muestra la distribución de las puntuaciones de calidad promedio de todas las secuencias en el conjunto de datos. En el eje X representa la puntuación de calidad promedio de las secuencias (Phred score), con un rango de 20 a 38, mientras que en el eje Y muestra la cantidad de lecturas (secuencias) que tienen una puntuación de calidad promedio específica, con valores que varían de 0 a 40,000. La curva en el gráfico refleja el número de lecturas en función de su puntuación de calidad promedio (Galaxy, 2024). La mayoría de las lecturas presentan una puntuación de calidad alta, concentrándose en torno a una puntuación de calidad promedio de 37. Se observa un pico muy marcado en la puntuación de calidad 37, lo que indica que la mayoría de las lecturas tienen una calidad excelente, señalando datos de secuenciación de alta calidad.



- **Contenido de secuencias por base**

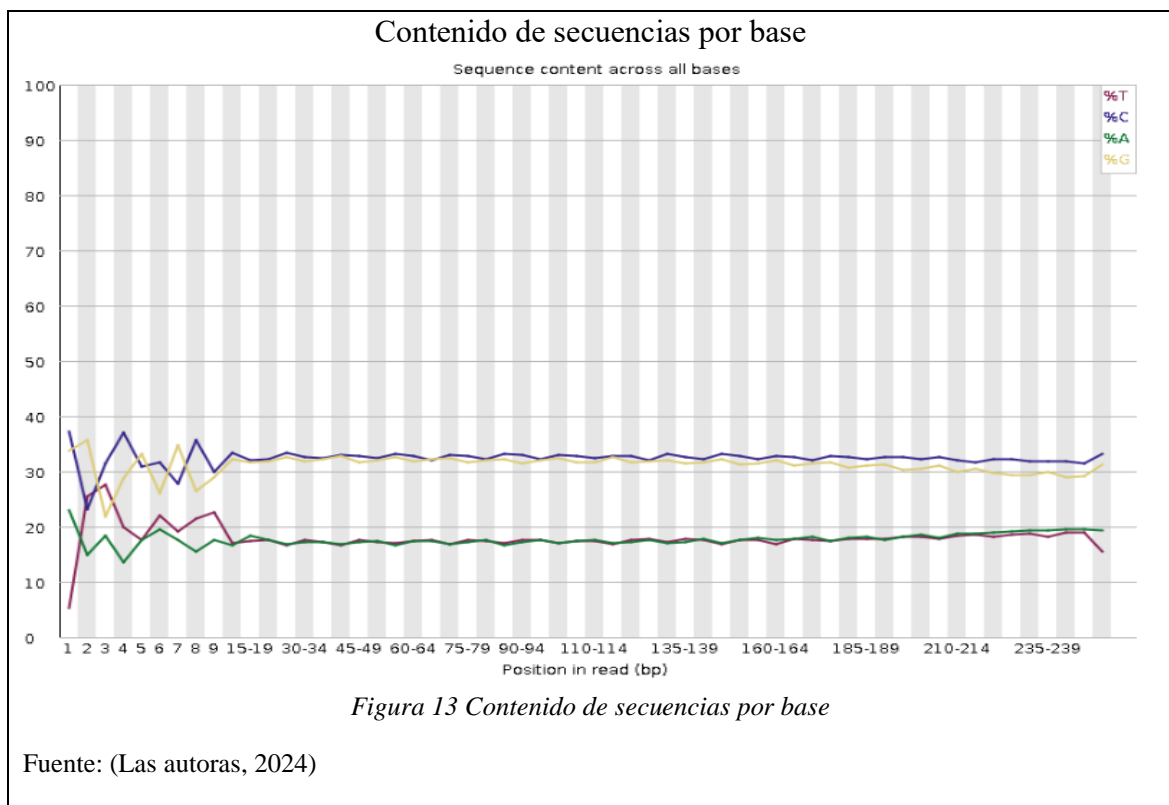
En la Figura 13 Contenido de secuencias por base indica en el eje X la posición en la lectura de secuenciación, medida en pares de bases (bp), las cuales van desde la posición 1 hasta aproximadamente 240 bp, mientras que en el eje Y indica el porcentaje de cada nucleótido en cada posición de la lectura, con un rango de 0% a 100% (Galaxy, 2024).

Curvas del gráfico:

- %T (Timina): Línea rosa.
- %C (Citosina): Línea azul.

- %A (Adenina): Línea verde.
- %G (Guanina): Línea amarilla.

En las primeras posiciones (1-10 bp), se puede observar una mayor variabilidad en el contenido de nucleótidos, lo cual es común debido a la variabilidad en la eficiencia de secuenciación durante los primeros ciclos. A partir de la posición 10, los contenidos de los cuatro nucleótidos se estabilizan y se mantienen relativamente constantes a lo largo de la secuencia. El contenido de A y T es aproximadamente igual y cercano al 30%, mientras que el contenido de C y G es también aproximadamente igual y cercano al 20%. En un conjunto de datos de secuenciación equilibrado y sin sesgo, se esperaría que los porcentajes de A y T sean aproximadamente iguales, así como los de C y G.

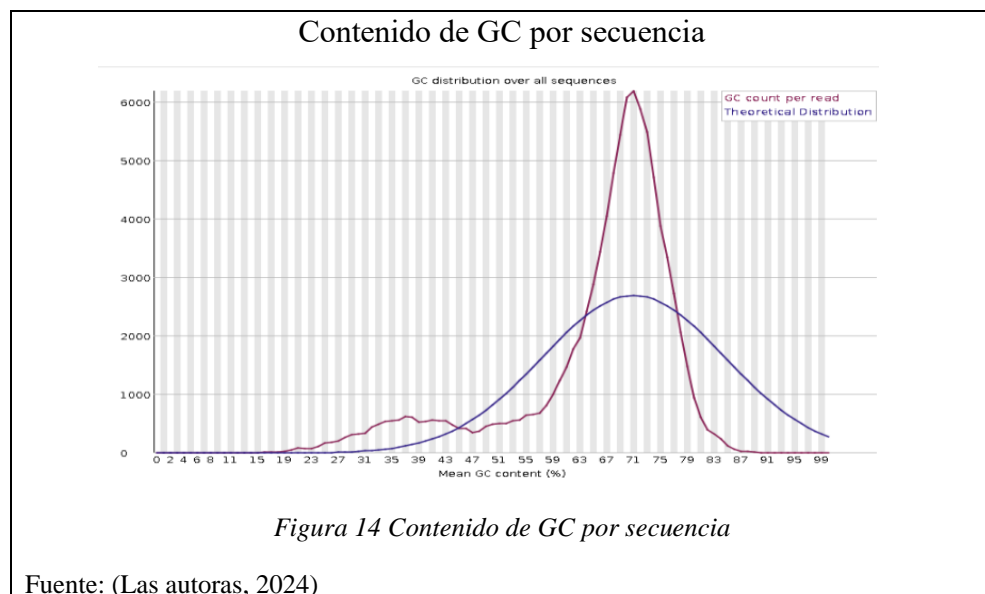


• Contenido de GC por secuencia

En la Figura 14 Contenido de GC por secuencia indica la distribución del contenido de GC en todas las secuencias del conjunto de datos. En el eje X representa el contenido promedio de GC (%) en las secuencias, abarcando desde el 0% hasta el 100%. Mientras que en el eje Y muestra la cantidad de lecturas (secuencias) con un contenido específico de GC, con valores que varían de 0 a 6000.

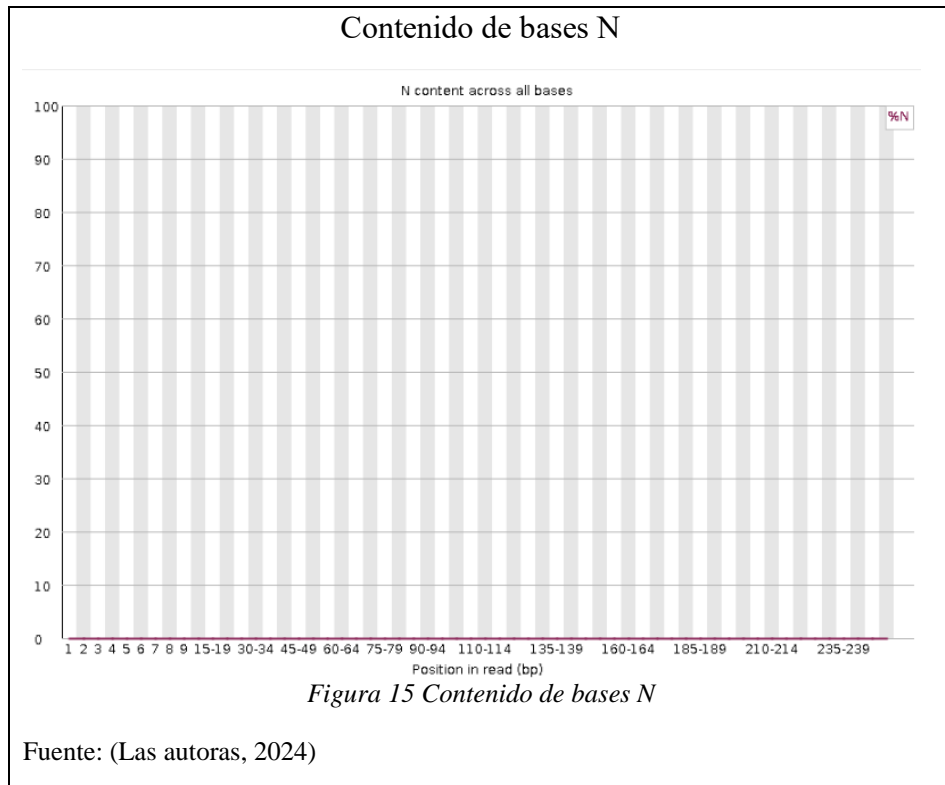
La curva roja muestra la distribución real del contenido de GC en las lecturas del conjunto de datos, mientras que la curva azul representa la distribución teórica esperada del contenido de GC si las secuencias fueran aleatorias y sin sesgo (Galaxy, 2024).

La curva roja presenta un pico pronunciado alrededor del 70% de contenido GC, lo que sugiere que la mayoría de las secuencias tienen un contenido de GC cercano al 70%, indicando una distribución de GC sesgada hacia valores altos. Por otro lado, la curva azul, que representa la distribución teórica, tiene un pico más ancho y centrado, característico de una distribución normal de contenido de GC.



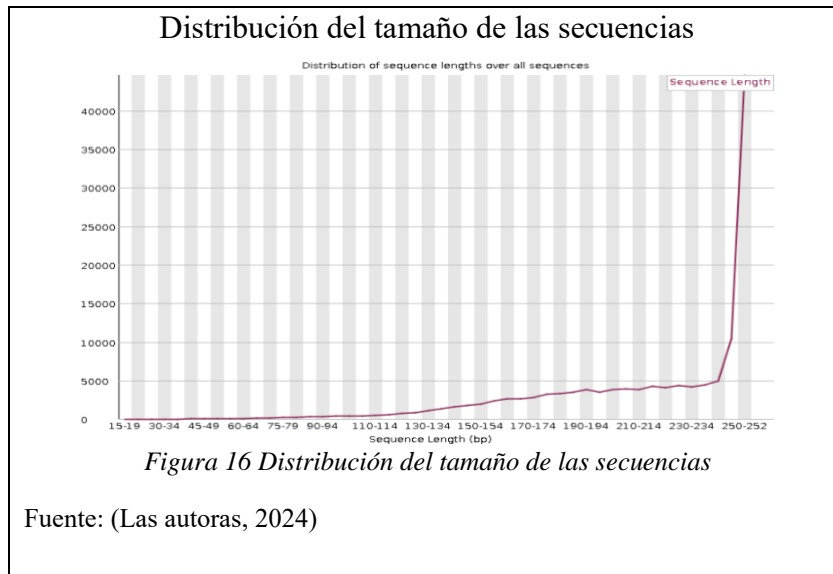
- **Contenido de bases N**

En este caso se observó que existió buena calidad, ya que ha sido preciso el llamado de bases porque dice que va desde 0 en cuanto a contenido de N dentro de la secuencia con indica la Figura 15 Contenido de bases N.



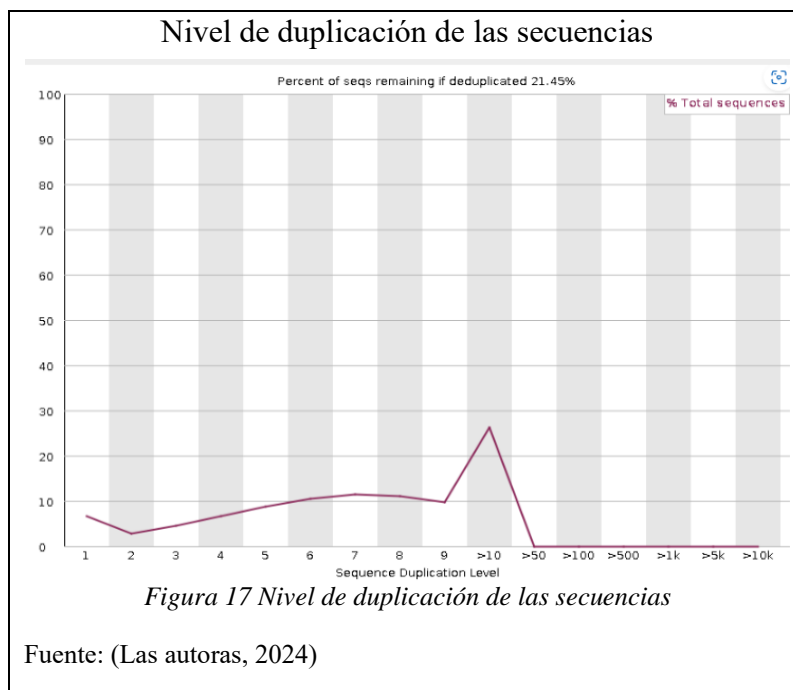
- **Distribución del tamaño de las secuencias**

El tamaño de las lecturas va entre 200 a 250 pb que es lo que indica el eje X y en el eje Y, dice el número de lecturas que tiene ese tamaño que son todas, además la gráfica muestra la distribución de las longitudes de las secuencias obtenidas por Illumina. La mayoría de las secuencias tienen una longitud de entre 250 y 252 pares de bases (bp). Esto sugiere que las lecturas obtenidas por Illumina en este caso tienen una longitud aproximada de 250-252 bp como indica la Figura 16 Distribución del tamaño de las secuencias.



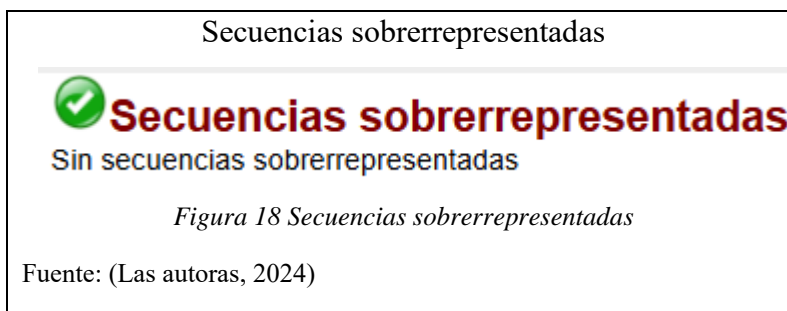
- **Nivel de duplicación de las secuencias**

En la Figura 17 Nivel de duplicación de las secuencias muestra una duplicación del 21.45%. El eje X representa el nivel de duplicación de las secuencias (cuántas veces se repite cada secuencia), mientras que el eje Y muestra el porcentaje total de secuencias (Galaxy, 2024). Hay una pequeña cantidad de secuencias duplicadas una o dos veces, y el nivel de duplicación es relativamente constante hasta el nivel 9. A partir de más de 10 duplicaciones, hay un pico significativo en el porcentaje de secuencias duplicadas. Las duplicaciones mayores a 50, 100, 500, 1k, 5k y 10k son casi inexistentes o muy bajas. Esto indica que hay un grupo considerable de secuencias que se repiten más de 10 veces, pero la mayoría de las secuencias tienen niveles de duplicación relativamente bajos.



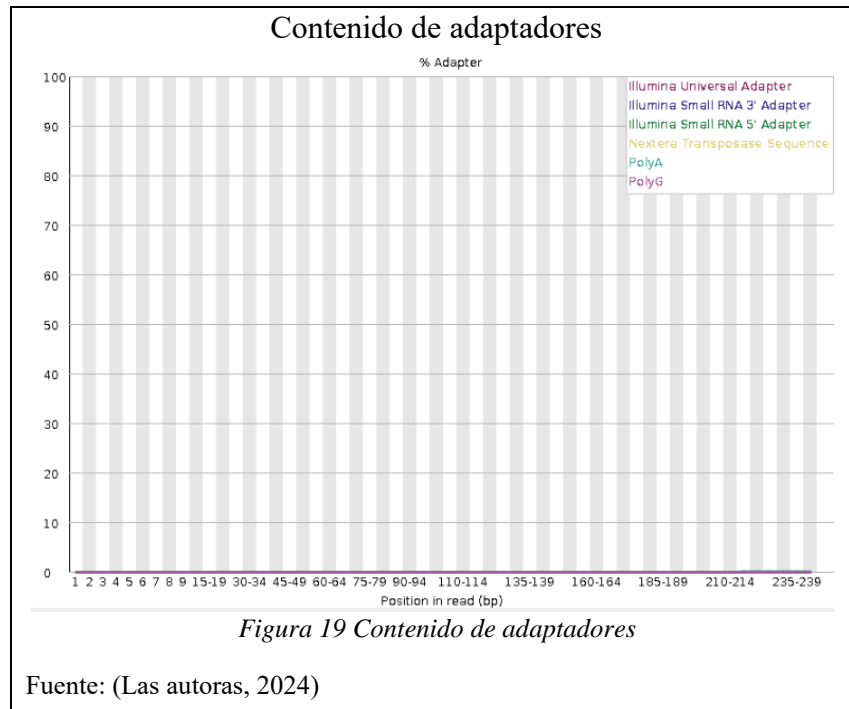
- **Secuencias sobrerrepresentadas**

La Figura 18 Secuencias sobrerrepresentadas indica que no hay secuencias sobrerrepresentadas en el conjunto de datos analizado. Esto significa que ninguna secuencia aparece con una frecuencia significativamente mayor de lo esperado, lo cual sugiere una distribución equilibrada y uniforme de las secuencias sin elementos que dominen excesivamente el conjunto.



- **Contenido de adaptadores**

Como la línea es recta en el eje “X” se concluyó que no existieron adaptadores en esta secuencia como indica la Figura 19 Contenido de adaptadores.



4.7 Identificación de las especies microbianas

MetaPhlAn2 la identificación de las especies microbianas presentes a partir de un archivo con las lecturas y sus cantidades relativas. Para hacer esto MetaPhlAn2 compara cada una de las lecturas con su base de datos de genes marcadores obtenidos de más de 3000 especies de microorganismos (Sánchez, 2023).

En la herramienta se deben introducir los siguientes parámetros y dar clic en “Ejecutar herramienta”.

“Archivo de entrada” → archivo Fasta con las lecturas.

“Base de datos con genes marcadores específicos de clado” → “almacenado en caché”

“Base de datos almacenada en caché con genes marcadores específicos del clado” → “MetaPhlAn2 genes marcadores específicos del clado”

Se puede abrir directamente los archivos obtenidos por MetaPhlAn2, pero para visualizarlos mejor se utilizó el programa Krona. Para ello primero convertir los archivos devueltos por MetaPhlAn2 para que puedan ser visualizados en Krona. Utilizar para ello la herramienta “Format MetaPhlAn2 output for Krona”, como se visualiza en la Figura 20 Herramienta MetaPhlAn2

Herramienta MetaPhlan2

The screenshot shows the Galaxy interface for the MetaPhlan2 tool. The tool parameters are configured as follows:

- Input file:** 1: JC1A_R1.fastqsanger.gz
- Database with clade-specific marker genes:** Locally cached
- Accepted formats:** (dropdown menu)
- Database with clade-specific marker genes (cached):** MetaPhlan2 clade-specific marker genes
- Type of analysis to perform:** Profiling a metagenomes in terms of relative abundances
- Taxonomic level for the relative abundance output:** All taxonomic levels
- Minimum total nucleotide length for the markers in a clade for estimating the abundance without considering sub-clade abundances:** 3000

The History panel on the right shows a job titled 'Análisis metagenómico' with a file '1: JC1A_R1.fastqsanger.gz'.

Figura 20 Herramienta MetaPhlan2

Fuente: (Las autoras, 2024)

Herramienta Format MetaPhlan2 output for Krona

The screenshot shows the Galaxy interface for the Format MetaPhlan2 output for Krona tool. The tool parameters are configured as follows:

- Input file (MetaPhlan2 output):** 2: MetaPhlan2 on data 1: Community profile
- Accepted formats:** (-profile)
- Additional Options:**
 - Email notification:** No
- Run Tool:** (button)
- Help:**
 - What it does:** MetaPhlan is a computational tool to profile the structure and the composition of microbial communities (Bacteria, Archaea, Eukaryotes and Viruses) from metagenomic shotgun sequencing data with species level resolution. For more information, check the user manual. This tool formats MetaPhlan2 output to be ready for Krona.
 - Tutorials:** There is 1 tutorial available which uses this tool. These tutorials include training for the current version of the tool. View all tutorials referencing this tool.

The History panel on the right shows a job titled 'Análisis metagenómico' with the following files:

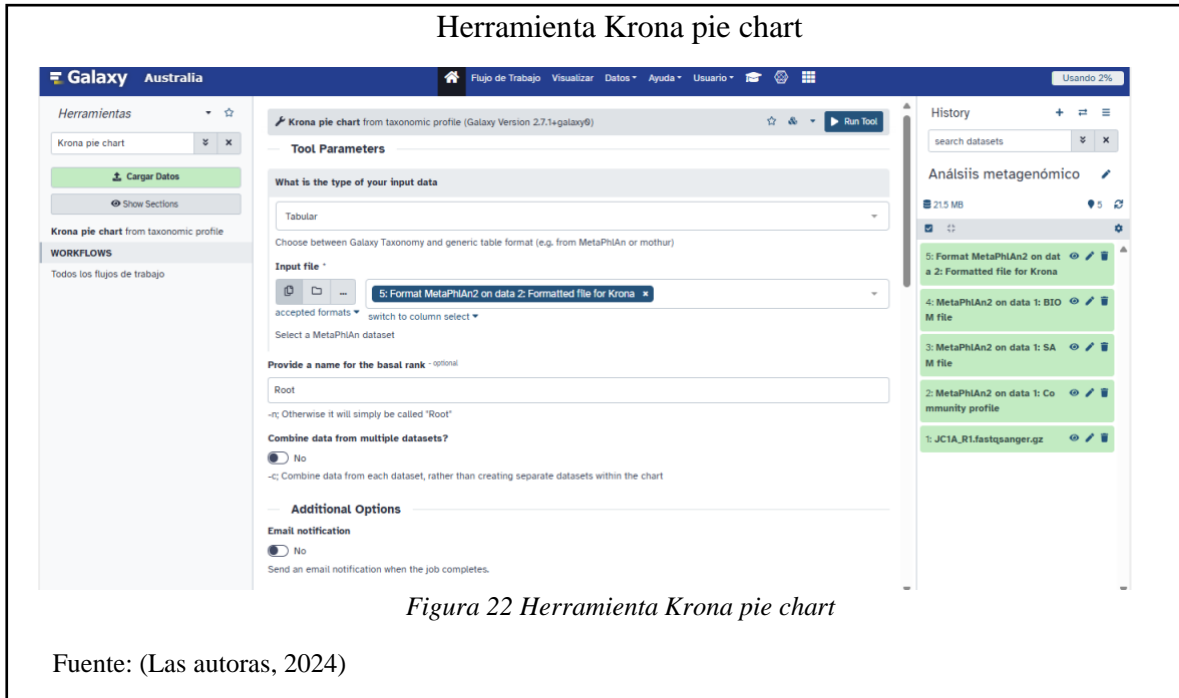
- 1: JC1A_R1.fastqsanger.gz
- 2: MetaPhlan2 on data 1: Community profile
- 3: MetaPhlan2 on data 1: SA M file
- 4: MetaPhlan2 on data 1: BIO M file

Figura 21 Herramienta Format MetaPhlan2 output for Krona

Fuente: (Las autoras, 2024)

A continuación, buscar la herramienta “Krona pie chart”, y se introduce los siguientes parámetros de funcionamiento: “Cuál es el tipo de datos de entrada” → Tabular, “Archivo de entrada” → Archivo formateado para Krona

Krona es una herramienta que permite explorar datos jerárquicos con zoom y gráficos circulares de varias capas. Los gráficos interactivos de Krona son independientes y se pueden ver con cualquier navegador web moderno.



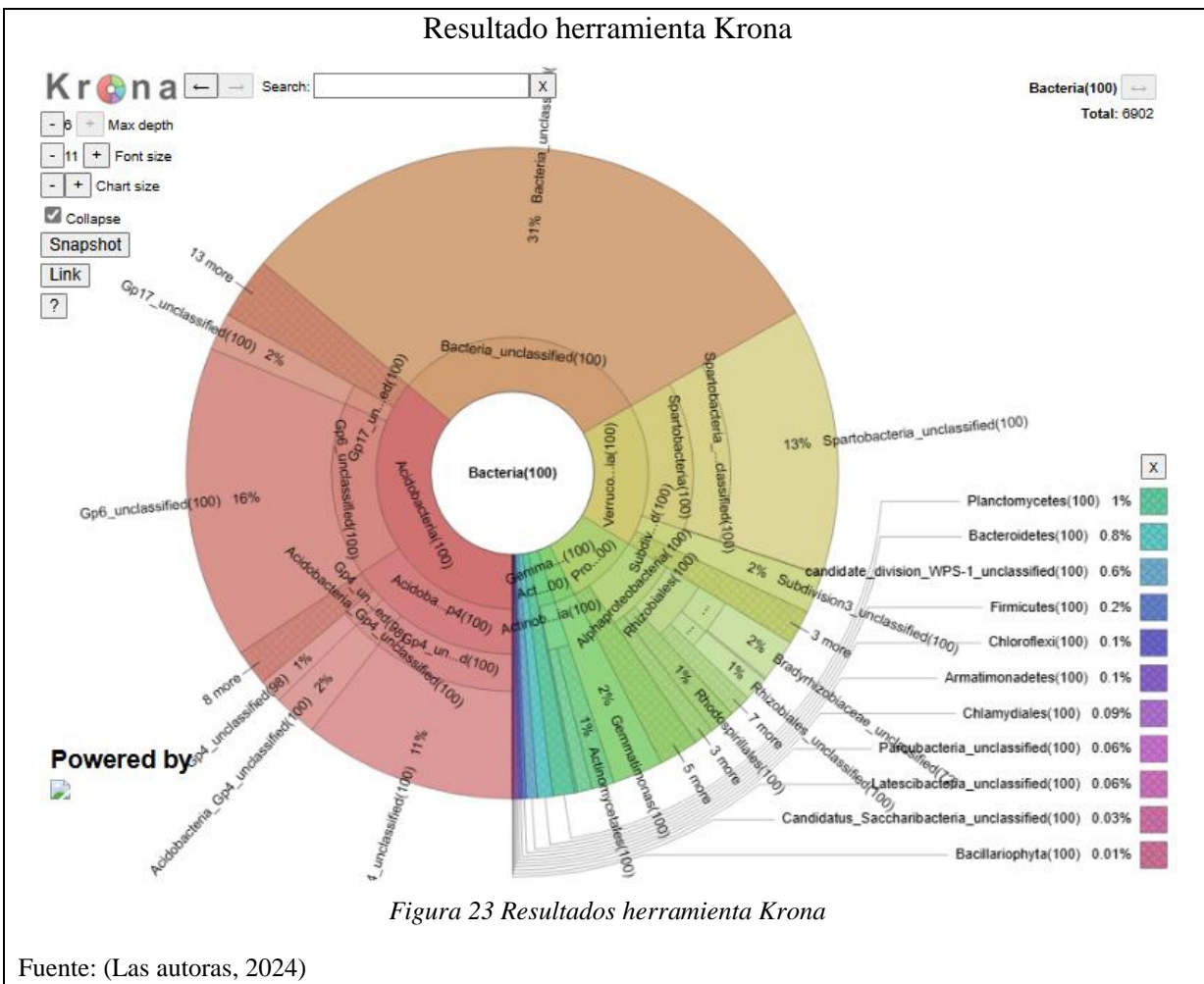
El resultado obtenido de la herramienta Krona indica que, en la imagen obtenida, muestra la distribución taxonómica de los organismos presentes en las muestras analizadas. La estructura jerárquica del gráfico de Krona muestra el dominio más alto, Bacteria, en el medio. A medida que se expanden hacia afuera, los segmentos representan grupos taxonómicos más específicos. Los colores diferencian diferentes filos bacterianos, siendo el rojo, el marrón y el verde los más destacados en esta muestra. Los segmentos más grandes indican una mayor abundancia relativa de ese grupo de bacterias.

En la Figura 23 Resultados herramienta Kronase puede observar que el 100% de los organismos encajan en el dominio Bacteria *Enterobacter*, una bacteria que suele pertenecer al filo Proteobacteria y específicamente a la clase *Gammaproteobacteria*, se puede representar en secciones gráficas que van del rojo al marrón, lo cual es característico de las Proteobacteria.

En los suelos de los humedales se observa una sorprendente diversidad bacteriana, lo que refleja el entorno rico en nutrientes y las condiciones variadas. Se destacan grupos como *Acidobacterias* y *Proteobacterias* que juegan un papel importante en la degradación de

la materia orgánica y el ciclo de nutrientes (Galaxy, 2024). *Enterobacter* es conocido por su capacidad de sobrevivir en ambientes acuáticos y húmedos, interactuando con una variedad de otros microorganismos (Galaxy, 2024). Adicionalmente, *Enterobacter* puede estar involucrado en la degradación de la materia orgánica y en procesos importantes como la nitrificación y desnitrificación en suelos de humedales, que exhiben condiciones anaeróbicas o microaerófilas típicas de estos ambientes saturados de agua. Sus interacciones con otros microorganismos, como *Acidobacterias* y *Actinobacterias*, forman redes complejas que influyen en la salud y el funcionamiento de los ecosistemas de humedales (Galaxy, 2024).

En conclusión, la visualización de Krona proporciona una imagen clara de la diversidad bacteriana en los suelos de los humedales, lo que demuestra la presencia potencial de *Enterobacter* dentro de las *Proteobacterias* y su importante papel ecológico en ese entorno específico.



4.8 Metodología ensayo de degradación diclofenaco

Para el desarrollo del caso, se propone la siguiente metodología para evaluar la capacidad de degradación de diclofenaco del consorcio microbiano propuesto previamente.

4.8.1 Hipótesis

- **H1:** Los tratamientos conformados por consorcios bacterianos degradarán significativamente la concentración de diclofenaco presentes en agua.
- **H0:** No existirá una degradación significativa en la concentración de diclofenaco con el uso de consorcios bacterianos comparado con el control negativo.

4.8.2 Selección y Preparación de Muestras

Para el ensayo de degradación, como inóculo se tomarán 12 litros de agua del humedal del río Machángara en alícuotas de 1 litro; para ello es necesario el uso de mandil, guantes y herramientas estériles, deben recogerse en bolsas de plástico preesterilizadas las cuales son netamente apropiadas para uso microbiológico además deben estar cerradas muy bien para evitar fugas. durante el tránsito. Las muestras recolectadas tienen tiempos de espera breves y deben transportarse y almacenarse siempre entre temperaturas de 0 ° C y 10 ° C. Al llegar al laboratorio, las muestras deben refrigerarse y analizarse lo más pronto posible, preferiblemente dentro de las 2 h siguientes a la recogida (Mohamed, Asair, Ah, et al., 2023).

4.8.3 Preparación de inóculos

Un primer consorcio microbiano A estará conformado por una mezcla de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, y *Rhodococcus erythropolis*. Para la preparación del inóculo, se cultivarán las bacterias en medio LB (Luria-Bertani) y se ajustará la densidad celular a una concentración de $10^6 \frac{UFC}{mL}$.

La composición de un litro del medio LB, se detalla en la *Tabla 2 Composición del medio LB*

Tabla 2 Composición del medio LB

Extracto de levadura	5 g
----------------------	-----

Tryptona (peptona)	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10 g

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

El segundo consorcio bacteriano B incluirá a *Acinetobacter baumannii*, *Micrococcus luteus* y *Sphingomonas paucimobilis*. Para lo cual se cultivará las bacterias en medio LB y ajustar la densidad celular a una concentración de $10^6 \frac{UFC}{mL}$.

4.8.4 Diseño Experimental

- **Número de réplicas:** 3 réplicas por cada tratamiento, dando un total de 12 muestras.
- **Condiciones de incubación:** Todas las muestras previamente recolectadas se incubarán a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) con agitación constante para asegurar la oxigenación adecuada.

4.8.5 Procedimiento

Se establece alícuotas de un volumen específico de agua residual en Erlenmeyers para realizar los análisis de degradación. Cada tratamiento se realiza en tres réplicas para asegurar la repetibilidad y confiabilidad de los resultados.

4.8.5.1 Preparación de las Alícuotas

Se utilizará Erlenmeyers de 250 mL y se llenarán con 200 mL de agua residual en el Tratamiento T1: Consorcio Bacteriano A, se añadirá 10 mL de una suspensión del consorcio bacteriano A, a las tres réplicas. En el tratamiento T2: Consorcio Bacteriano, el procedimiento es exactamente lo mismo, solo cambiaría la suspensión del consorcio bacteriano B. Para el control positivo (CP) se añadirá 10 mL de H₂O₂ (10 mM) a cada Erlenmeyer que contiene 200 mL de agua residual, cabe mencionar que se utiliza el peróxido de hidrógeno ya que permite analizar la eficacia de los consorcios bacterianos. En cuanto al control negativo (CN) las tres réplicas correspondientes estarán sin ningún tratamiento previo.

4.8.5.2 Análisis de Datos

- **Método estadístico:** Análisis de Varianza (ANOVA) seguido de una prueba post-hoc (Tukey) para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.
- **Mediciones para realizar:**
 - Concentración inicial de diclofenaco en todas las muestras.
 - Concentración de diclofenaco en cada punto de muestreo (días 0, 10, 20, 30).
 - Porcentaje de degradación: $Porcentaje\ de\ degradación = (Ci - cf) \times \frac{100}{cf}$

En la cual Ci es la concentración de DCF al inicio del experimento y Cf es la concentración al final del experimento (Mohamed, Asair, Ah, et al., 2023).

4.8.6 Resultados Esperados

Se espera que los diferentes tratamientos con consorcios bacterianos muestren una reducción en la concentración de diclofenaco en comparación con el control negativo, lo cual indica la mejora de estos consorcios en la degradación del contaminante. El control positivo deberá mostrar una degradación rápida y significativa del diclofenaco, sirviendo como referencia para la efectividad de los tratamientos biológicos.

5 Conclusiones y recomendaciones

La caracterización metagenómica de consorcios microbianos ha revelado una notable diversidad de microorganismos capaces de degradar diclofenaco, incluyendo bacterias, hongos y algas con genes específicos para la biodegradación de compuestos xenobióticos.

Los análisis metagenómicos muestran que ciertos consorcios poseen rutas metabólicas especializadas, facilitando la eficiente degradación del diclofenaco gracias a la presencia de genes que codifican enzimas como oxidorreductasas y peroxidasas.

Se recomienda realizar estudios adicionales para optimizar las condiciones ambientales que favorezcan la actividad de los consorcios microbianos más eficientes, lo que podría mejorar significativamente la tasa de degradación del diclofenaco.

Además, se aconseja desarrollar tecnologías basadas en estos consorcios, como biorreactores y sistemas de filtración biológica, para ofrecer soluciones sostenibles en la eliminación de diclofenaco de ambientes acuáticos y terrestres. Es esencial fomentar la investigación interdisciplinaria para integrar estos consorcios en procesos industriales de tratamiento de aguas y suelos.

6 Bibliografías

- Aissaoui, S., Fagnani, E., Pérez, S., Ouled-Haddar, H., & Sifour, M. (2021). Removal of diclofenac by a local bacterial consortium: UHPLC-ESI-MS/MS analysis of metabolites and ecotoxicity assessment. *Brazilian Journal of Microbiology*, *52*(2), 749–759. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00464-9>
- Aissaoui, S., Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Beggah, C., & Benhamada, F. (2017). Biological removal of the mixed pharmaceuticals: Diclofenac, ibuprofen, and sulfamethoxazole using a bacterial consortium. *Iranian Journal of Biotechnology*, *15*(2), 135–142. <https://doi.org/10.15171/ijb.1530>
- Alba, L. (2021). *Creación de un pipeline para el análisis de datos metagenómicos basados en nextflow*. 54.
- Barriga, G. (2015). *Remoción de metales pesados de efluentes industriales del sector metal mecanico utilizando un consorcio bacteriano nativo*. 00(0), 132.
- Campos, M., Moreno, L., Piñón, G., Reyes de la Cruz, F., Gonzales, M. del P., & Razo, T. (2020). *Recuperación de antiinflamatorios y antihistamínicos empleando componentes naturales mediante la técnica de extracción líquido-líquido*. 7.
- Can, L. (2021). *Capacidad de degradación de antiinflamatorios no esteroideos por bacterias*.
- Canal-Alonso, Á., Jiménez, P., Egido, N., Prieto, J., & Corchado, M. (2020). *Integración de nextflow y AWS para el análisis genómico a gran escala Un estudio de caso hipotético*. 1–9.
- Castañeda-Chávez, M. del R., López-Sánchez, B. Y., Reyes-Velázquez, C., Lango-Reynoso, F., & Lizardi-Jiménez, M. A. (2022). Dominant species identification of a microbial consortium efficient in diesel degradation. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, *38*, 155–167. <https://doi.org/10.20937/RICA.54235>
- Castro, A. (2022). Enfoques y métodos para la aplicación de biorremediación en la degradación de contaminantes ambientales. *High Tech-Engineering Journal*, *2*(2), 9.
- Castro Viteri, A. L. (2022). Enfoques y Métodos para la Aplicación de Biorremediación en la Degradación de Contaminantes Ambientales. *HIGH TECH-ENGINEERING*

JOURNAL, 2(2). <https://doi.org/10.46363/high-tech.v2i2.2>

Concha, L., & Hernández, S. (2023). *Evaluación del sinergismo entre especies bacterianas y fúngicas, con capacidades metabólicas específicas en el consumo del contaminante emergente carbamazepina.*

<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/25357>

Correa, R., Verli, H., & Cardoso, R. (2022). *Editorial: Original strategies for training and educational initiatives in bioinformatics.*

<https://doi.org/10.3389/feduc.2022.1003098>

Farías, M., Flores, A., Cambizaca, Y., Palomino, K., & Villegas, J. (2023). *Desecho de medicamentos caducados / no utilizados en pacientes del centro de salud de El Guabo 2023.* 4, 1–13.

Forero Pineda, N., Marín - Suárez, J., Forero- Ulloa, F. E., & Gómez-Palacio, A. (2021). Extracción de ADN bacteriano a partir de cuerpos de agua de uso agrícola. *Ciencia y Agricultura*, 18(1), 36–45.

<https://doi.org/10.19053/01228420.v18.n1.2021.11703>

Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M., & Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton*, 79, 133–139.

Ibarra, R. (2021). *Contaminantes emergentes, diclofenaco y carbamazepina en el río Machángara, Quito DM, análisis de remoción mediante nano absorción y diseño de la fase de retención para adaptarse a una planta de tratamiento de aguas residuales.* 7(3), 112.

Jaimes, J., & Vera, J. (2020). Los contaminantes emergentes de las aguas residuales de la industria farmacéutica y su tratamiento por medio de la ozonización. *Informador Técnico*, 84(2), 15. <https://doi.org/10.23850/22565035.2305>

Lomas, A. (2021). *Creación de un pipeline para el análisis de datos metagenómicos basados en nextflow.*

Meneses, Y. (2022). *Aplicabilidad de las microalgas Chlorella vulgaris sp y Scenedesmus sp en consorcios alga/bacteria como biofertilizante.* 8.5.2017, 50.

Mohamed, M., Asair, A., Fetyan, N., & Elnagdy, S. (2023). Complete biodegradation of

- diclofenac by new bacterial strains postulated pathways and degrading enzymes. *Microorganisms*, 11(6), 18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061445>
- Mohamed, M. S. M., Asair, A. A., Ah, N., & Elnagdy, S. M. (2023). *Biodegradación completa del diclofenaco por nuevas cepas bacterianas : vías postuladas y enzimas degradantes*.
- Mohamed, M. S. M., Asair, A. A., Fetyan, N. A. H., & Elnagdy, S. M. (2023). Complete Biodegradation of Diclofenac by New Bacterial Strains: Postulated Pathways and Degrading Enzymes. *Microorganisms*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061445>
- Montenegro, C. (2023). *Efectos tóxicos derivados de la contaminación ambiental por fármacos*. 137.
- Nieto, E. (2023). Estudio de cultivos bacterianos degradadores de PAH desde los estudios de diversidad a la microbiómica funcional. In *Nro* (Vol. 8). <http://www.eltoldodeastier.fahce.unlp.edu.ar/numeros/numero15/pdf/MEscobarGuti%0Ahttp://www.eltoldodeastier.fahce.unlp.edu.ar/numeros/numero15/pdf/LGDVaamonde.pdf>
- Nikita, G., & Sathiavelu, A. (2023). Trends in application of Microbial Consortium for Bioremediation a mini review. *Research Journal of Biotechnology*, 18(6), 10. <https://doi.org/10.25303/1806rjbt1050114>
- Ochoa, D., & Montoya, A. (2010). Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Revista Facultad de Ciencias Económicas*, 18(2), 55–74. <https://doi.org/10.18359/rfce.2272>
- Orozco, K. (2018). Biodegradación de colorante azul directo por consorcios bacterianos aislados de un efluente textil de Lima, Perú. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 1–90. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/8807>
- Ortega, H. (2017). *Estudio de la eliminación de Diclofenaco en aguas residuales mediante fotocátalisis*.
- Pacheco, A. (2021a). *Determinación de contaminantes emergentes carbamazepina y diclofenaco en el Río San Pedro y análisis de tratamiento con nanotecnología*.

- <https://repositorio.espe.edu.ec/jspui/bitstream/21000/24123/1/T-ESPE-044397.pdf>
- Pacheco, A. (2021b). *Determinación de contaminantes emergentes carbamazepina y diclofenaco en el Río San Pedro y análisis de tratamiento con nanotecnología* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/24123/1/T-ESPE-044397.pdf>
- Pacheco, J. (2023). *Universidad Católica de Santa María Facultad de Ciencias Farmacéuticas , Bioquímicas y Biotecnológicas Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica*. 82.
- Pápai, M., Benedek, T., Táncsics, A., Bornemann, T., Plewka, J., Probst, A., Hussein, D., Maróti, G., Menashe, O., & Kriszt, B. (2023). Selective enrichment identification and isolation of diclofenac ibuprofen and carbamazepine degrading bacteria from a groundwater biofilm. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(15), 18. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24975-6>
- Parra, L. (2024). *Degradación de diclofenaco y carbamazepina a través de procesos de oxidación avanzada basados en ultrasonido*. 135. www.udea.edu.co
- Parra L. (2023). *Degradación de diclofenaco y carbamazepina a través de procesos de oxidación avanzada basados en ultrasonido*.
- Plata, K. (2023). *Diseño de un consorcio bacteriano sintético con capacidad de degradar petróleo crudo*. 80.
- Ramírez, P., & Rosalvina, N. (2023). *Resistencia antimicrobiana en aguas residuales urbanas y de hospitales de huánuco determinadas mediante análisis metagenómico 2021*.
- Ramos, M. (2023). *Estudio de la dinamica ambiental y efectos ecotoxicologicos de parabenos estrategias de mitigacion en ambientes acuaticos*. 10, 2022–2023.
- Ríos, W. (2023). *Caracterización de microbiomas bacterianos presentes en suelos cacaoteros con alta y baja concentración de cadmio del Municipio de Yacopí-Cundinamarca*.
- Rodríguez, M. (2021). *Riesgos de los plaguicidas para el ambiente*.
- Sánchez, J. (2023). *Analisis metagenomico*. 2, 9.

Zapata, A. (2023). *Mecanismo de remoción de diclofenaco y naproxeno y sus productos de degradación en un humedal construido rol de los microorganismos*. 150.