



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

**DEGRADACIÓN DE TETRACICLINA A PARTIR DE BACTERIAS
AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES DE ORIGEN HOSPITALARIO.**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA E INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES: ABIGAIL MABEL ARÁUZ RODRIGUEZ

DYLAN GIOVANNY RON MORENO

TUTOR: MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ

Quito-Ecuador

2024

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

Nosotros, Abigail Mabel Aráuz Rodríguez con documento de identificación N° 1754538450 y Dylan Giovanni Ron Moreno con documento de identificación N° 1724648793; 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, 12 de septiembre del año 2024

Atentamente,



Abigail Mabel Aráuz Rodríguez
1754538450



Dylan Giovanni Ron Moreno
1724648793

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

Nosotros, Abigail Mabel Aráuz Rodríguez con documento de identificación N°1754538450 y Dylan Giovanni Ron Moreno con documento de identificación N°1724648793, 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: Degradación de tetraciclina a partir de bacterias aisladas de aguas residuales de origen hospitalario, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología, 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, 12 de septiembre del año 2024

Atentamente,



Abigail Mabel Aráuz Rodríguez
1754538450



Dylan Giovanni Ron Moreno
1724648793

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Tutor de tesis María Elena Maldonado Rodríguez con documento de identificación N° 1707743157, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: DEGRADACIÓN DE TETRACICLINA A PARTIR DE BACTERIAS AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES DE ORIGEN HOSPITALARIO, realizado por Abigail Mabel Aráuz Rodríguez con documento de identificación N° 1754538450 y por Dylan Giovanni Ron Moreno con documento de identificación N° 1724648793 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, 12 de septiembre del año 2024

Atentamente,



Dra. María Elena Maldonado Rodríguez PhD.

CI:1707743157

Dedicatoria y agradecimiento: Abigail Aráuz

A mis queridos padres, Fernando Aráuz y Magaly Rodríguez, quienes desde el principio me han inspirado con su dedicación y sacrificio, enseñándome el valor del esfuerzo y el amor incondicional. A mi querida familia, por su apoyo constante y por ser mi fuente de alegría y motivación a lo largo de esta travesía académica.

A mi querido hermano, Ariel Aráuz cuya presencia y ánimo han sido mi refugio en los momentos difíciles. A mi respetado tutor Daniel Freire, por su sabiduría, paciencia y orientación, que han moldeado no solo este trabajo, sino mi forma de pensar y aprender.

A mi querida Universidad Politécnica Salesiana, por brindarme el ambiente propicio para crecer intelectualmente y por los recursos que han enriquecido mi aprendizaje. Gracias por ser mi hogar académico y por los valores que he adquirido aquí.

Este logro no solo es mío, sino de todos ustedes, quienes han creído en mí y han caminado a mi lado en cada paso del camino. A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento y amor.

Dedicatoria y agradecimiento: Dylan Ron

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Dios. Sin Su guía, fortaleza y sabiduría, este logro no habría sido posible. Agradezco cada bendición y la fortaleza espiritual que me ha permitido perseverar y superar los desafíos a lo largo de este camino.

A mis padres, quienes han sido mi mayor fuente de inspiración y apoyo incondicional. Gracias por su amor inagotable, sus sacrificios constantes y por brindarme la oportunidad de alcanzar mis sueños. Su fe en mí ha sido una luz constante en los momentos más oscuros y una motivación inquebrantable para seguir adelante.

A mi tutor, Daniel Freire, cuya paciencia, conocimiento y dedicación han sido fundamentales en la culminación exitosa de esta tesis. Su orientación y sus valiosos consejos han enriquecido mi trabajo y me han permitido crecer académicamente. Agradezco su compromiso y su confianza en mi potencial.

A mi familia, por su constante apoyo, comprensión y palabras de aliento durante este arduo proceso. Gracias por estar siempre a mi lado, por su amor y por ser un pilar en momentos de dificultad. Su presencia ha sido esencial para mantenerme motivado y enfocado.

A mi compañera de tesis, Abigail Arauz, con quien compartí innumerables horas de trabajo, discusiones, y aprendizaje. Gracias por su colaboración, dedicación y por ser una fuente de inspiración y apoyo mutuo. Juntos, hemos superado desafíos y alcanzados metas que culminan en este trabajo de grado.

Finalmente, a la Universidad Politécnica Salesiana, por proporcionarme un entorno académico estimulante y todas las oportunidades de aprendizaje y crecimiento personal y profesional. Agradezco a todos los profesores y compañeros que han contribuido a mi formación a lo largo de estos años. La educación y las experiencias adquiridas aquí han sido invaluable y han dejado una huella imborrable en mi vida.

A todos ustedes, mi más sincero y profundo agradecimiento.

Resumen

Pese a que se ha demostrado que existen procesos abióticos que pueden transformar la tetraciclina (TC), se cómo los procesos microbianos pueden llegar a degradar la TC en el ambiente acuático. Este trabajo evaluó el porcentaje de degradación de TC mediante el aislamiento de bacterias resistentes de aguas residuales de un hospital de Quito. Se aislaron dos bacterias resistentes a través de diluciones seriadas y estriación en placa. A partir de las bacterias aisladas, se procedió a una caracterización presuntiva por medio de una evaluación macroscópica y microscópica (Tinción Gram). Así mismo, para una identificación secundaria de las bacterias, se aplicó una batería de pruebas bioquímicas denominadas IMVIC. Se evaluó la sensibilidad antimicrobiana a través de antibiogramas disco-placa y, finalmente, se cuantificó la concentración residual de TC por medio de HPLC.

Se identificaron dos cepas bacterianas resistentes: *Klebsiella pneumoniae* (CB1) y *Escherichia coli* (CB2). Solo se utilizó la cepa CB1 para los experimentos debido a que presentó mayor resistencia a la TC. El porcentaje de biotransformación de TC por la cepa CB1 fue medido en el día 4 a un pH de 7,2 y una temperatura de 30 °C. La cepa CB1 degradó el 79% y 81% de la concentración inicial de TC en los tratamientos T1 y T2, respectivamente, después de 4 días.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden brindar una base teórica para estimar la degradación de los antibióticos como la TC en el medio acuático y el potencial uso de la cepa en el diseño de procesos de ingeniería para eliminar la tetraciclina del agua.

Palabras clave: Resistencia, Biotransformación, HPLC, Antibiograma, *Klebsiella pneumoniae*.

Abstract

Although it has been demonstrated that there are abiotic processes that can transform tetracycline (TC), it has been shown that microbial processes can degrade TC in the aquatic environment. This work evaluated the percentage of TC degradation by isolating resistant bacteria from wastewater from a hospital in Quito. Two resistant bacteria were isolated through serial dilutions and plate striations. From the isolated bacteria, we proceeded to a presumptive characterization by macroscopic and microscopic evaluation (Gram stain). Likewise, for secondary identification of the bacteria, a battery of biochemical tests called IMVIC was applied. Antimicrobial sensitivity was evaluated through disc-plate antibiograms and, finally, the residual concentration of CT was quantified by HPLC.

Two resistant bacterial strains were identified: *Klebsiella pneumoniae* (CB1) and *Escherichia coli* (CB2). Only strain CB1 was used for the experiments because it presented greater resistance to CT. The percentage of CT biotransformation by strain CB1 was measured on day 4 at pH 7.2 and a temperature of 30 °C. Strain CB1 degraded 79% and 81% of the initial concentration of CT in treatments T1 and T2, respectively, after 4 days.

The results obtained in this work can provide a theoretical basis for estimating the degradation of antibiotics such as CT in the aquatic environment and the potential use of the strain in the design of engineered processes to remove tetracycline from water.

Key words: Resistance, Biotransformation, HPLC, Antibiogram, *Klebsiella pneumoniae*.

Índice de contenidos

1	INTRODUCCIÓN	1
2	FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	4
2.1	TETRACICLINA: PROPIEDADES Y USO	4
2.1.1	<i>Propiedades químicas y farmacológicas.</i>	4
2.1.2	<i>Uso y presencia en el medio ambiente.</i>	6
2.2	IMPACTO AMBIENTAL DE LAS TETRACICLINAS.....	7
2.2.1	<i>Resistencia Antimicrobiana.....</i>	7
2.3	EFFECTOS ECOLÓGICOS.....	10
2.3.1	<i>Interacción de las tetraciclinas en la microbiota ambiental</i>	10
2.3.2	<i>Consecuencias ecológicas de la presencia de tetraciclinas en cuerpos de agua</i>	10
2.4	DEGRADACIÓN DE TETRACICLINAS POR MICROORGANISMOS	11
2.4.1	<i>Degradación de tetraciclinas por consorcios bacterianos y hongos</i>	11
2.5	TRATAMIENTOS FISICOQUÍMICOS DE DEGRADACIÓN DE TETRACICLINA	11
2.5.1	<i>Cloración</i>	12
2.5.2	<i>Foto-Fetón (Oxidación avanzada).....</i>	12
2.5.3	<i>Uso de biorreactores.....</i>	13
2.6	APLICACIONES POTENCIALES EN BIODEGRADACIÓN	13
2.6.1	<i>Biorremediación Aeróbica de Aguas Residuales Contaminadas con tetraciclina.</i>	13
2.6.2	<i>Biorremediación Anaeróbica de Aguas Residuales Contaminadas con tetraciclina.</i>	14
2.6.3	<i>Humedales artificiales para la remoción de antibióticos.....</i>	15
2.7	AISLAMIENTO DE BACTERIAS	16
2.7.1	<i>Siembra en placa por estrías.....</i>	16
2.7.2	<i>Diluciones seriadas.....</i>	16
2.8	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS.....	17
2.8.1	<i>Tinción gram</i>	17

2.8.2	<i>Pruebas bioquímicas</i>	17
2.9	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).....	19
2.10	ANTIBIOGRAMAS DISCO-PLACA.....	22
3	MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	24
3.1.1	<i>Población</i>	24
3.1.2	<i>Muestra</i>	24
3.2	VARIABLES	24
3.2.1	<i>Variable independiente</i>	24
3.2.2	<i>Variable dependiente</i>	24
3.2.3	<i>Diseño experimental</i>	24
3.3	PRODUCTOS QUÍMICOS Y SOLUCIONES	25
3.4	MUESTRAS PARA IDENTIFICACIÓN	26
3.5	TIPO DE MUESTREO APLICADO PARA LA RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	26
3.6	TRATAMIENTO DE MUESTRAS	26
3.7	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE AGUAS RESIDUALES.....	27
3.7.1	<i>Factores de dilución</i>	27
3.7.2	<i>Siembra de las diluciones preparadas</i>	27
3.7.3	<i>Selección de microorganismos</i>	28
3.8	IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS	28
3.8.1	<i>Identificación macroscópica</i>	28
3.8.2	<i>Identificación microscópica</i>	28
3.8.3	<i>Identificación fisiológica</i>	29
3.8.4	<i>Identificación Bioquímica</i>	29
3.9	ANTIBIOGRAMAS POR DIFUSIÓN EN DISCO	31
3.10	BIOTRANSFORMACIÓN DE LA TETRACICLINA.....	32
3.11	CUANTIFICACIÓN DE TETRACICLINA MEDIANTE HPLC	33

3.11.1	<i>Fase Móvil</i>	33
3.11.2	<i>Preparación de estándares de Tetraciclina</i>	33
3.12	BUFFER MCLVAINÉ	33
3.13	BUFFER EDTA-NACL	34
3.14	MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS	34
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS MICROORGANISMOS.	34
4.2	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA	35
4.2.1	<i>Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB)</i>	35
4.2.2	<i>Pruebas IMVIC</i>	35
4.2.3	<i>Fermentación de azúcares</i>	36
4.3	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD BACTERIANA.....	37
4.3.1	<i>Método del antibiograma disco-placa</i>	37
4.4	CUANTIFICACIÓN TETRACICLINA POR HPLC.....	37
4.4.1	<i>Método cromatográfico del estándar externo</i>	38
4.5	ANÁLISIS DE LA VARIANZA	40
4.5.1	<i>Diseño de Bloques completamente al Azar (DBCA)</i>	40
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
5.1	CONCLUSIONES	46
5.2	RECOMENDACIONES.....	47
6	BIBLIOGRAFÍA	48
7	ANEXOS	51

Índice de figuras

FIGURA 1.	FAMILIA DE TETRACICLINAS	5
FIGURA 2.	PARTES PRINCIPALES DEL EQUIPO HPLC.....	22
FIGURA 3.	CURVA CALIBRACIÓN TETRACICLINA	39
FIGURA 4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE VARIANZA	41
FIGURA 5.	GRÁFICO TRATAMIENTOS DE TETRACICLINA.....	42
FIGURA 6.	GRÁFICO DE CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE TETRACICLINA DEL TRATAMIENTO	
1	43	

FIGURA 7.	GRÁFICO DE CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE TETRACICLINA DEL TRATAMIENTO	
2		44
FIGURA 8.	GRÁFICO DE CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE TETRACICLINA DEL TRATAMIENTO	
CONTROL		45

Índice de tablas

TABLA 1. DILUCIONES	32
TABLA 2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS BACTERIAS.....	35
TABLA 3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS IMVIC Y CARACTERÍSTICAS PARA LA CEPA CB1 (<i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>).....	36
TABLA 4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS IMVIC Y CARACTERÍSTICAS PARA LA CEPA CB2 (<i>E. COLI</i>)...	36
TABLA 5. RESULTADOS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN BACTERIANA	37
TABLA 6. ÁREAS DE LOS ESTÁNDARES DE TETRACICLINA	38

TABLA 7. ÁREAS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS POR HPLC..... 40

TABLA 8. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS TRATAMIENTOS DE TETRACICLINA 40

Índice de anexos

ANEXO 1. AISLAMIENTO DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE 51

ANEXO 2. AISLAMIENTO DE *E.COLI* 51

ANEXO 3. TINCIÓN GRAM DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE..... 52

ANEXO 4. TINCIÓN GRAM DE *E.COLI*..... 52

ANEXO 5. PRUEBAS ROJO DE METILO 53

ANEXO 6. PRUEBAS ROJO DE METILO 53

ANEXO 7. PRUEBA UTILIZACIÓN CITRATO.....	54
ANEXO 8. PRUEBA UTILIZACIÓN CITRATO.....	54
ANEXO 9. PRUEBA VOGES- PROSKAUER	55
ANEXO 10. PRUEBA VOGES- PROSKAUER.....	55
ANEXO 11. PRUEBA CATALASA.....	56
ANEXO 12. PRUEBA CATALASA.....	56
ANEXO 13. PRUEBA INDOL	57
ANEXO 14. PRUEBA INDOL	57
ANEXO 15. ANTIBIOGRAMAS KLEBSIELLA PNEUMONIAE	58
ANEXO 16. ANTIBIOGRAMAS <i>E.COLI</i>	58
ANEXO 17. KLEBSIELLA PNEUMONIAE EN AGAR EMB	59
ANEXO 18. <i>E.COLI</i> EN AGAR EMB	59
ANEXO 19. ESTÁNDARES DE TETRACICLINA	60
ANEXO 20. EXPERIMENTO A PH 7.2 Y 30 °C	60
ANEXO 21. CROMATOGRAMA ESTÁNDAR 1	61
ANEXO 22. CROMATOGRAMA ESTÁNDAR 2	62
ANEXO 23. CROMATOGRAMA ESTÁNDAR 3	63
ANEXO 24. CROMATOGRAMA ESTÁNDAR 4	64
ANEXO 25. CROMATOGRAMA ESTÁNDAR 5	65

1 Introducción

Los antibióticos de tetraciclina (TC), tales como oxitetraciclina (OTC), clortetraciclina (CTC) y tetraciclina (TC), son fármacos de amplio espectro usados principalmente como inhibidores de la síntesis proteica en bacterias (Yang et al., 2020). Se sabe que las tetraciclinas son el segundo grupo de fármacos de mayor fabricación y uso a nivel mundial (García Fernández et al., 2019). Los residuos generados van a desembocar en ríos por medio de efluentes de aguas de origen hospitalario, aguas residuales, residuos de fabricación, orina, heces etc. (Meléndez-Marmolejo et al., 2020). Es así como dichos compuestos son considerados contaminantes emergentes de gran interés científico, puesto que pueden ocasionar graves daños medioambientales y perjudicar la salud humana debido a que se encuentran en concentraciones traza (Meléndez-Marmolejo et al., 2020).

Cabe mencionar que, estos compuestos pueden provocar efectos negativos medioambientales, como resistencia bacteriana patógena, lo cual podría producir más bacterias con resistencia adquirida, disminuyendo la eficacia del medicamento (TC) en organismos vivos, reducir la diversidad bacteriana y generar toxicidad en peces y algas (Meléndez-Marmolejo et al., 2020, p. 53). En un estudio usando embriones de pez cebra (*Danio rerio*) para evaluar la toxicidad por exposición a la (TC), se observó que las larvas presentaron fenotipos de retraso del desarrollo, como retraso de longitud, eclosión, ausencia de hinchamiento de la vejiga natatoria y aumento del área del saco vitelino. Todo esto al exponer a los embriones a una concentración de 20 µg/L de tetraciclina, la cual también causa apoptosis celular y daño oxidativo (Meléndez-Marmolejo et al., 2020, p. 56).

Así mismo, entre los graves efectos para la salud humana se encuentran los efectos teratogénicos, hepatotoxicidad, efectos endocrinos, etc. (Meléndez-Marmolejo et al., 2020, p. 55) . Adicionalmente, tienen como efecto indirecto la disminución de la capacidad del cuerpo para enfrentar las enfermedades infecciosas. Por todo ello se debe proceder a la eliminación de residuos de los antibióticos de los medios acuáticos como aguas de consumo, residuales, y efluentes (Maldonado & Balagurusamy, 2022). Además, es necesario crear un correcto manejo y monitoreo ambiental, ya que se sabe que existen muy pocos estudios del monitoreo de antibióticos en América Latina en diversas fuentes de agua. Se conoce que la tetraciclina se ha monitorizado en cuerpos de agua a concentraciones de (0,1-1,0 µg/L) y en aguas residuales de las grandes industrias a una concentración mayor a 1,5 mg/L (Meléndez-Marmolejo et al., 2020, p.56).

De ahí que, el estudio se llevará a cabo en la ciudad de Quito en un hospital denominado B, en el 2024, durante un periodo de cuatro meses. Un factor clave para el albergue de este antibiótico en las aguas residuales de hospitales es su uso constante. Sin embargo, la composición del agua al mezclarse con varios componentes proporciona un ambiente favorable que estabiliza las tetraciclinas, de esta manera, los compuestos de tetraciclina pueden transformarse mediante procesos abióticos en el medio ambiente.

La tetraciclina puede hidrolizarse en el agua y el proceso se ve afectado por la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la quelación con cationes (Leng et al., 2016). Dado que un gran número de compuestos químicos se encuentran en estas aguas, las condiciones de pH neutro a ligeramente alcalino y las temperaturas moderadas pueden proporcionar un entorno propicio para la supervivencia de las tetraciclinas durante períodos prolongados.

Con respecto a la falta de regulación, monitoreo y tratamiento en la eliminación de antibióticos como la tetraciclina de aguas residuales de los hospitales, podemos decir que es una causa significativa para la acumulación de este contaminante. Así mismo, otra causa igualmente significativa es que los residuos de la tetraciclina originan la selección de bacterias resistentes por medio de transferencia horizontal y vertical de genes a través de elementos genéticos móviles y la transferencia vertical de genes (Yang et al., 2020). Por lo tanto, se podría asumir una alta relación entre los residuos del antibiótico en corrientes acuáticas y el aumento de bacterias resistentes a estos en el medio ambiente. Por otra parte, las tetraciclinas son compuestos orgánicos persistentes que pueden resistir los procesos de tratamiento biológico y fisicoquímico, típicamente utilizados en las plantas de tratamiento de aguas residuales. En consecuencia, la biodegradación podría llegar a ser una tecnología viable para eliminar antibióticos como la tetraciclina del medio ambiente (Maldonado & Balagurusamy, 2022, p.1055).

Como hipótesis del trabajo, se plantea que los microorganismos que aislados de aguas residuales de origen hospitalario tienen la capacidad de biodegradar la tetraciclina mediante actividades metabólicas a concentraciones bajas del antibiótico. El objetivo general es evaluar el porcentaje de degradación de tetraciclina a partir de bacterias aisladas de aguas residuales de origen hospitalario. Para ello, se requiere del aislamiento de las bacterias resistentes a la tetraciclina mediante inoculaciones posteriores en cajas Petri, además de identificar las bacterias de forma macroscópica y mediante pruebas bioquímicas. Así mismo, se evaluará *in vitro* la respuesta de las bacterias aisladas ante la tetraciclina mediante antibiogramas y, finalmente, se cuantificará la concentración de tetraciclina residual por HPLC.

2 Fundamentación teórica

2.1 Tetraciclina: Propiedades y uso

2.1.1 Propiedades químicas y farmacológicas.

Las tetraciclinas son compuestos orgánicos con una estructura común de cuatro anillos, los cuales se encuentran unidos por algunas cadenas de radicales. De ahí que existen tres miembros en la familia de las tetraciclinas: la clortetraciclina, doxiciclina y la tetraciclina. La diferencia entre la clortetraciclina y la tetraciclina radica en que la primera posee un átomo de cloro en su estructura, mientras que la doxiciclina tiene un grupo hidroxilo extra. Todos estos compuestos son muy usados como antibióticos de amplio espectro; otro aspecto importante es que la clortetraciclina y la oxitetraciclina son naturalmente fabricados por *Streptomyces spp*, mientras que otras tetraciclinas son semisintéticas (Willey et al., 2020).

Dichos antibióticos son semejantes en acción a los aminoglucósidos, ya que se dirigen a la subunidad 30S del ribosoma, ocasionando la inhibición de la síntesis de proteínas. Es así como estos antibióticos logran tener una amplia acción bacteriostática contra patógenos intracelulares rickettsias, micoplasmas y clamidias. Además, los efectos conocidos de dichos antibióticos incluyen trastornos gastrointestinales, decoloración de los dientes, lesiones renales y hepáticas (Willey et al., 2020).

Tetraciclina (Clortetraciclina, doxiciclina)

Tetracycline (chlortetracycline, doxycycline)

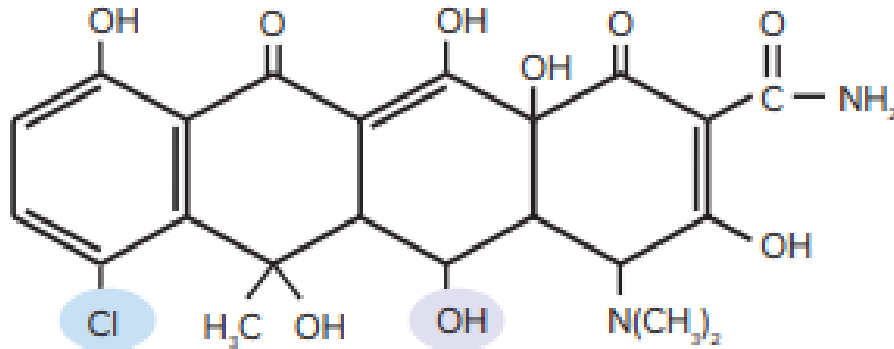


Figura 1. Familia de Tetraciclinas

Fuente: (Willey et al., 2020)

En cuanto a la solubilidad y estabilidad de la tetraciclina, se conoce que la TC presenta baja solubilidad en agua, la cual se ha estimado en aproximadamente 0,2 mg/ mL a un pH neutro. Con la finalidad de mejorar estas propiedades, los investigadores han desarrollado formulaciones en micelas solubles en medios acuosos que utilizan tensoactivos como lauril sulfato de sodio y bromuro de cetrimonio, los cuales mejoran significativamente la solubilidad y también la actividad antibacteriana de la tetraciclina. Así mismo, otra forma de mantener solubilidad y por lo tanto la estabilidad es mediante la incorporación de tetraciclina en hidrogeles de poliacrilato (Meretoudi et al., 2020).

2.1.2 Uso y presencia en el medio ambiente.

Los antibióticos se utilizan en animales de producción alimentaria para múltiples propósitos, como medidas metafilácticas, tratamiento terapéutico y medidas profilácticas, así como promotores del crecimiento (Caneschi et al., 2023). Más de 6.800 toneladas del antibiótico tetraciclina fueron usados en todo el mundo en la agricultura animal siendo muy comunes en veterinaria (Leng et al., 2016). Es así como los antibióticos de administración oral más utilizados en animales de producción alimentaria son las tetraciclinas, sulfonamidas, β -lactámicos y quinolonas. Debido a lo cual, las tetraciclinas poseen una biodisponibilidad oral baja en cerdos (5-15%) y aves de corral ($\leq 5\%$) (Caneschi et al., 2023).

Así mismo la ausente absorción de los antibióticos modifican la microbiota intestinal de manera rápida y permanecen activos en heces excretadas, causando daños graves a los microorganismos ambientales. De ahí que se sugiere que los antibióticos residuales en el polvo agrícola pueden afectar de igual forma la microbiota intestinal al adquirir resistencia; dichos efectos se pueden encontrar en la cadena alimentaria (huevos, carne y leche) son una de las fuentes más importantes en cuanto a la transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos (BRA) y genes de resistencia a los antibióticos (GRA) entre humanos y animales (Caneschi et al., 2023).

2.2 Impacto Ambiental de las tetraciclinas

2.2.1 Resistencia Antimicrobiana

Por lo general, la resistencia a los antibióticos en bacterias se da de forma intrínseca o adquirida. La primera se presenta en bacterias naturalmente resistentes que muestran propiedades heredadas. Así como, la presencia de lipopolisacárido en paredes celulares de las bacterias gram negativas otorga una barrea innata para combatir la penetración de antimicrobianos. Además, dicha resistencia incluye el incremento de su salida o inactivación y la limitar la absorción del fármaco. Por otro lado, la resistencia adquirida incluye la modificación de los objetivos farmacológicos y la inactivación (Helmy et al., 2023).

Así mismo, estudios previos indican que la resistencia de forma adaptativa es la responsable de las diferencias in vivo e in vitro en cuanto a la eficacia de los antibióticos y el fracaso de las terapias clínicas con antibióticos. Se sabe que lo que ayuda en la adquisición a la resistencia, es la plasticidad genética bacteriana y esta se manifiesta como ganancia de fragmentos de ADN extraños que codifican determinantes de resistencia por medio de la transferencia horizontal de genes o por mutaciones en genes bacterianos. Así las bacterias sensibles a los antibióticos consiguen genes moduladores de la resistencia lo cual les permite compartir su material genético a través de tres formas, que son, conjugación, transformación y transducción (Helmy et al., 2023).

2.2.1.1 Lipopolisacárido (LPS) de la membrana bacteriana externa

Los principales mecanismos de resistencia antimicrobiana en células bacterianas son el lipopolisacárido (LPS) que es un importante componente biológicamente activo de las membranas externas de las bacterias gram negativas principalmente este componente actúa como barrera física que reduce la penetración de los antimicrobianos (Helmy et al., 2023).

2.2.1.2 Porinas bacterianas

En consecuencia, las porinas bacterianas son canales de proteínas de membrana que se encuentran en la membrana externa de bacterias Gram negativas y tienen la función de modular el cruce de moléculas hidrofílicas como los β -lactámicos. Además, pueden modificar sus canales de porinas, ya sea alterando la selectividad de las porinas por medio de mutaciones o decreciendo su número (Helmy et al., 2023).

2.2.1.3 Formación de biopelículas

Otros mecanismos de resistencia importantes son la formación de biopelículas o biofilm, que en esencia son el apilamiento de células bacterianas para impedir el acceso de los antimicrobianos a las bacterias, se sabe que aproximadamente entre el 40 % y el 80 % de células terrestres están a modo de biopelículas como mecanismo de defensa ya sea de forma directa o indirecta puesto que facilita la transferencia horizontal de genes de resistencia (Helmy et al., 2023).

2.2.1.4 Destrucción enzimática de moléculas de antibióticos

Así mismo, existe la destrucción enzimática de antibióticos en la cual las bacterias con resistencia producen enzimas que degradan al antibiótico destruyendo así los sitios activos del mismo, dichas enzimas operan a través de glicosilación, acetilación, fosforilación de algunos

sitios en la molécula del antibiótico que evitan la unión con los fármacos correspondientes a sus objetivos ribosómicos (Helmy et al., 2023).

2.2.1.5 Modificación del sitio objetivo del fármaco

Ésta se da cuando las bacterias inhiben la unión de los antimicrobianos modificando las proteínas diana de sus antimicrobianos. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* que presenta resistencia a la vancomicina es un ejemplar de resistencia por reemplazo de un sitio objetivo en este caso se quita la subunidad de alanina en los péptidos de la pared celular y se introduce una subunidad de lactato a la que la vancomicina le impide unirse de forma adecuada. Por último, está el mecanismo de las bombas de eflujo específicas para antibióticos cuya función principal es reconocer estructuras extrañas, mismas que ingresan a las células por medio de su pared celular y previniendo así su acumulación e interacción con las células diana (Helmy et al., 2023).

2.3 Efectos ecológicos

2.3.1 Interacción de las tetraciclinas en la microbiota ambiental

Se conoce que la familia de tetraciclinas naturales puede sufrir una transformación por medio de procesos abióticos en el medio ambiente. Es decir, que pueden hidrolizarse velozmente en agua. Sin embargo, el proceso puede cambiar ya sea por la temperatura, fuerza iónica, pH y quelación con cationes (Leng et al., 2016). Otro punto importante es que las tetraciclinas son fotosensibles por lo cual varios productos de transformación de la fotólisis pueden llegar a ser incluso más tóxicos que el compuesto original (Leng et al., 2016). De ahí que el proceso de biotransformación es muy importante pero muy poco comprendido, así mismo podría encaminar a la formación de productos de la biotransformación distintos a los resultantes de procesos abióticos logrando así obtener productos biodegradables de la tetraciclina menos tóxicos o incluso no tóxicos (Leng et al., 2016).

2.3.2 Consecuencias ecológicas de la presencia de tetraciclinas en cuerpos de agua

Según Meléndez-Marmolejo et al. (2020) La tetraciclina se ha monitorizado en cuerpos de agua (0,1-1,0 µg/L) y en aguas residuales de industrias con una concentración mayor a 1,5 mg/L; sobre todo estar en contacto con (TC) se ha relacionado con la disminución del crecimiento y producción de la clorofila del centeno, lo que provoca estrés oxidativo a partir de 10 mg/L. También se puede observar que los desechos de (TC) (100 mg/kg) en vermicomposta inducen a los genes de resistencia a antibióticos, causando daños a la diversidad microbiana afectando los periodos de descomposición de materia orgánica e inhibiendo varias funciones microbianas como la alteración del sitio de unión al antibiótico y la producción de enzimas inactivadoras (Meléndez-Marmolejo et al., 2020).

2.4 Degradación de tetraciclinas por microorganismos

2.4.1 Degradación de tetraciclinas por consorcios bacterianos y hongos

Shao et al. (2019) mencionan que en estudios anteriores se comprobó la capacidad de enzimas extracelulares e intracelulares procedentes de hongos para biodegradar antibióticos. Tales como, el manganeso peroxidasa creada a base de la podredumbre blanca, así mismo el hongo *Phanerochaete chrysosporium* podría aplicarse como biocatalizador de alta eficiencia para biodegradar tetraciclina y oxitetraciclina. Así mismo, Shao et al. (2019) informan que en un estudio se aisló una cepa *Klebsiella sp. SQY5* de lodos municipales, que poseían gran capacidad para degradar tetraciclinas y desnitrificar.

Por otro lado, Leng et al., (2016) mencionan que en estudios previos informaron acerca de la eliminación de tetraciclina del agua por comunidades microbianas mixtas en sedimentos de ríos. De igual forma se sabe que el micelio de *Pleurotus ostreatus* tiene la capacidad de transformar la oxitetraciclina del suelo en sustancias menos tóxicas. También, se ha encontrado cultivos puros de cepas bacterianas con capacidad para degradar la tetraciclina. Por ejemplo, en un estudio de susceptibilidad a los antibióticos se reportó que *Staphylococcus aureus* presentó un 19,4 % de resistencia a la tetraciclina y un 80,1 % de resistencia a la oxaciclina (Bastidas et al., 2019).

2.5 Tratamientos fisicoquímicos de degradación de tetraciclina

2.5.1 Cloración

La cloración se basa en la capacidad oxidante del cloro, por lo general, reacciona con compuestos orgánicos y minerales en el agua. En el caso de las tetraciclinas, el cloro puede llegar a romper los anillos aromáticos presentes en su estructura y otras estructuras moleculares, llevándolos a compuestos más simples y menos activos biológicamente. Además, el cloro puede oxidar directamente los enlaces dobles y otros grupos funcionales en la molécula de tetraciclina, la desventaja de este proceso es que puede llevar a la formación de subproductos de desinfección como ácidos halo acéticos y trihalometanos, que pueden ser dañinos para la salud. (Meléndez-Marmolejo et al., 2020, p.58).

2.5.2 Foto-Fetón (Oxidación avanzada)

La generación de radicales hidroxilos se lleva a cabo mediante el proceso Foto-Fetón. Estos radicales se producen a través de la reacción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con iones ferrosos (Fe^{2+}) en presencia de radiación ultravioleta (UV). Se entiende que los radicales hidroxilos son esenciales para la degradación de tetraciclinas, ya que reaccionan con los anillos aromáticos que componen la molécula de tetraciclina. Es importante mencionar que el proceso Foto-Fenton es uno de los métodos más efectivos dentro de la oxidación avanzada para la degradación de tetraciclinas. Esta técnica ha demostrado ser altamente eficiente para la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes.

Debemos tomar en cuenta que la formación de los radicales hidroxilos es crucial para la degradación de tetraciclinas, ya que estos pueden reaccionar con los anillos aromáticos presentes en la estructura de la molécula. Asimismo, tienen el objetivo de mejorar la eficacia en la eliminación de los contaminantes emergentes. Se han sugerido diversas investigaciones

en el empleo de nuevas tecnologías, entre las que se destacan los procesos avanzados de oxidación, procesos electroquímicos y adsorción selectiva, entre otros (Meléndez-Marmolejo et al., 2020, p.59).

2.5.3 Uso de biorreactores

A través de estudios, se logró degradar sulfonamidas y β -lactámicos mediante el uso de biorreactores tanto aeróbicos como anaeróbicos, alcanzando elevados porcentajes de degradación, con un 95 % para la demanda química de oxígeno (DQO) y un 92 % para los antibióticos, en un lapso de 3,3 días debido al efecto de adsorción y desorción. De igual manera se evaluó la biodegradabilidad aeróbica y anaeróbica a concentraciones de 50-5000 $\mu\text{g/l}$ para los antibióticos olaquinox (OLA), metronidazol (MET), tilosina (TYL) y oxitetraciclina (OTC), todas estas evaluaciones se llevaron a cabo en un sistema de matraz de agitación simple que simula las condiciones en aguas superficiales, de esta manera se determinó que la biodegradación fue notablemente más lenta en las pruebas realizadas en ausencia de oxígeno. No obstante, se logró la degradación de los compuestos en diferentes intervalos de tiempo: de 4 a 8 días (OLA), de 9,5 a 40 días (TYL), de 14 a 104 días (MET) y de 42 a 46 días (OTC) (Meléndez-Marmolejo et al., 2020, p.59).

2.6 Aplicaciones potenciales en biodegradación

2.6.1 Biorremediación Aeróbica de Aguas Residuales Contaminadas con tetraciclina.

En la biorremediación aeróbica, las bacterias aisladas de aguas residuales hospitalarias se utilizan para degradar la tetraciclina en presencia de oxígeno. Este proceso permite una eliminación eficaz y rápida de la tetraciclina, reduciendo el riesgo de contaminación del agua y

sus efectos negativos en la salud humana y el medio ambiente; por otro lado, la biorremediación aeróbica puede implementarse en sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales y hospitalarias, ofreciendo una solución rentable y sostenible para la eliminación de tetraciclinas.

Un ejemplo de microorganismo utilizado en este proceso son las bacterias *Pseudomonas*, que se encuentran ampliamente distribuidas en varios entornos naturales, incluyendo el suelo, las plantas, los animales, el aire y el agua; las *Pseudomonas taiwanensis* son cepas bacterianas aerobias Gram negativas, con forma de bastón, móviles y no formadoras de esporas, que se encuentran aisladas del suelo.

Por otro lado, las *Pseudomonas pseudoalcaligenes* son bacterias gram negativas aerobias que pueden utilizar el cianuro como fuente de nitrógeno y pueden ser utilizadas en la biorremediación; las *Bacillus flexus* son bacterias Grampositivas, con forma de bastón y formadoras de endosporas, se pueden aislar de las heces presentes en el suelo y han demostrado actividad contra los aditivos de cloruro de polivinilo, aunque presentan una baja tasa de biodegradación del cloruro de polivinilo. Estos organismos aerobios han sido estudiados por su capacidad de degradar tetraciclinas en lodos de aguas residuales. En comparación, la biodegradación anaerobia requiere una incubación más larga que la aerobia, como es el caso de *Pseudomonas taiwanensis*. La adición de este tipo de bacterias no solo contribuye a la biodegradación de antibióticos, sino que también modifica la composición de la comunidad microbiana en un nuevo ecosistema, ayudando a las vías de degradación de xenobióticos (Yang et al., 2020, p.7).

2.6.2 Biorremediación Anaeróbica de Aguas Residuales Contaminadas con tetraciclina.

La biorremediación anaeróbica se perfila como una solución eficaz para eliminar la tetraciclina presente en las aguas residuales. Las bacterias aisladas de aguas residuales hospitalarias han demostrado la capacidad de degradar la tetraciclina en ausencia de oxígeno, lo que posibilita su utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales anaeróbicos. Este enfoque ofrece ventajas significativas, como la reducción del consumo energético y la generación de subproductos menos tóxicos, convirtiéndolo en una opción atractiva para remediar las aguas residuales contaminadas con tetraciclinas.

Algunos microorganismos tienen una alta eficiencia para la eliminación de tetraciclina en aguas residuales contaminadas, especialmente en medios anaeróbicos. La bacteria *Clostridium perfringens*, un organismo anaeróbico obligado, dispone de una gran capacidad para degradar estos antibióticos en medios carentes de oxígeno. Esta bacteria, conocida por su capacidad de formar esporas muy resistentes al calor, se encuentra en suelos, aguas superficiales, sedimentos y en el tracto gastrointestinal de animales y humanos. Además, ha sido estudiada por su eficacia en la decoloración de varios colorantes reactivos (Yang et al., 2020, p.7-8).

2.6.3 Humedales artificiales para la remoción de antibióticos

Los humedales artificiales se construyen para controlar los procesos biológicos en condiciones similares a las naturales, pero en un ambiente controlado. Estos sistemas se componen de cuatro elementos: vegetación, microorganismos, agua y sedimento. Estos elementos interactúan entre sí y se mantienen un equilibrio en el ecosistema mediante procesos como la fitorremediación, la biodegradación y otros. Aunque existen varios puntos a favor del uso de humedales, su efectividad puede variar según la temperatura o estación del año. La interacción entre sedimento, planta y microorganismo contribuye hasta un 99% en la remoción del antibiótico. Durante el proceso de secuestro, las plantas acumulan los compuestos tóxicos en las vacuolas

mediante un mecanismo de detoxificación generando metabolitos residuales que son exportados a otras partes de la planta o eliminados en forma de CO₂. Estas respuestas contribuyen al proceso de eliminación de residuos de antibióticos del medio acuático (Maldonado & Balagurusamy, 2022, p.1058).

2.7 Aislamiento de bacterias

2.7.1 Siembra en placa por estrías

El cultivo axénico de células es necesario para la caracterización de una especie individual, por ello se puede obtener colonias aisladas a través de la técnica de siembra en estrías que consiste en inocular la mezcla microbiana sobre un extremo de la caja Petri con agar con la ayuda de un asa de siembra, y se extiende formando estrías en uno o varios sentidos sobre la superficie, por último, un buen aislamiento depende de la correcta separación de las células individuales. Las colonias aisladas mediante esta técnica se pueden usar para inocular un medio líquido fresco y preparar cultivos puros (Prescott Lansing et al., 2004).

2.7.2 Diluciones seriadas

El aislamiento de bacterias por medio de diluciones seriadas es una técnica cuantitativa y cualitativa. Es cualitativa ya que permiten caracterizar las diferentes morfologías coloniales y por otro lado es cuantitativa ya que permite conocer con exactitud el número de bacterias presentes en una suspensión. La técnica consiste en realizar diluciones sucesivas de la muestra en un ambiente estéril, de manera que irá disminuyendo el número de microorganismos de la suspensión inicial, con la finalidad de sembrar una cantidad conocida de inóculo en placas Petri. Es muy importante realizar las diluciones en una disolución mineral isotónica que preserve la viabilidad de las células sin permitir la división celular. En general, se toma un volumen de 0,1 mL de inóculo y se siembra sobre una placa de Petri. Además, esta técnica permite conocer el número de microorganismos viables en la muestra original (Domenech Antonio et al., 2010).

2.8 Identificación y Caracterización de bacterias

2.8.1 Tinción gram

La tinción de Gram es, a menudo, la primera y única herramienta para hacer un diagnóstico provisional en la identificación de la mayoría de las bacterias, considerando el tipo de muestra y el diagnóstico presuntivo del proceso infeccioso (Fernández Ana et al., 2010). Esta prueba diferencial es de gran ayuda en la clasificación de microorganismos como Gram negativos o Gram positivos dependiendo del tipo de pared bacteriana. La tinción de Gram permite distinguir diferencias morfológicas (cocos, bacilos u otros) y estructurales de la pared (Domenech Antonio et al., 2010).

2.8.2 Pruebas bioquímicas

La batería de pruebas bioquímicas IMVIC (Indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y Citrato) son un conjunto de cuatro pruebas fundamentales en la microbiología ambiental para una adecuada identificación de enterobacterias (Fernández Ana et al., 2010).

2.8.2.1 Catalasa

La catalasa se encuentra en la mayoría de los microorganismos que contienen citocromos, estas bacterias productoras de esta enzima descomponen el peróxido de hidrógeno en agua, el cual se libera en forma de burbujas, esta prueba se utiliza principalmente para diferenciar entre las bacterias de la familia *Micrococacceae* (gram positivas) y las especies de *Streptococcus* y *Enterococcus* (gram negativas) (Fernández Ana et al., 2010).

2.8.2.2 Oxidasa

Esta prueba determina la presencia de enzimas oxidasas en bacterias, la reacción de la oxidasa ocurre debido a un sistema de citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo. El citocromo reducido por el oxígeno molecular produce agua o peróxido de hidrógeno, dependiendo de la especie bacteriana (Fernández Ana et al., 2010).

2.8.2.3 Indol

Esta prueba se utiliza para identificar la liberación de indol en un cultivo bacteriano. El indol es uno de los productos de degradación del aminoácido triptófano. La presencia de la enzima triptofanasa en la bacteria causa la hidrólisis del aminoácido y su desaminación, produciendo indol, ácido pirúvico y amoníaco. (Fernández Ana et al., 2010).

2.8.2.4 Citrato

Esta prueba se utiliza para determinar que microorganismo puede usar citrato como su fuente de carbono en su metabolismo y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno, lo que resulta en la alcalinización del medio. En las enterobacterias con estas capacidades se encuentran géneros como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Salmonella*. Sin embargo, bacterias como *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* no pueden crecer utilizando citrato como única fuente de carbono (Fernández Ana et al., 2010).

2.8.2.5 Rojo metilo

La prueba se la emplea para evaluar la capacidad de un microorganismo para producir y conservar estables los productos ácidos finales procedentes de la fermentación de la glucosa, a través de la ruta de fermentación ácido-mixta facilita la identificación específica de diversas especies de bacilos entéricos gramnegativos brindando información detallada sobre su metabolismo (Fernández Ana et al., 2010).

2.8.2.6 Voges-Proskauer

La prueba de Voges-Proskauer se utiliza para determinar si un microorganismo tiene la capacidad de fermentar la glucosa mediante la ruta butanodiólica, durante este proceso se produce acetoína como un producto intermediario que reacciona con α -naftol formando un complejo rojizo (Fernández Ana et al., 2010).

2.9 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La Cromatografía líquida de alta eficiencia usa pequeñas partículas, a altas presiones de flujo y columnas que son de volumen pequeño pero de gran longitud lo que permite un funcionamiento con alta resolución. Para minimizar la difusión y el tiempo necesario para el movimiento de los componentes de la muestra hacia los sitios de interacción en la columna, deben cumplirse dos criterios. El primero es que el material de empaque debe estar finamente dividido y poseer una alta regularidad esférica para permitir una correcta homogeneidad y densidad de empaque; en segundo lugar, la fase estacionaria debe estar en forma de una película delgada y uniforme, sin lugares para el estancamiento (Gary Christian, 2010).

Las fases estacionarias son de sílice de alta pureza, con poco contenido de trazas de metales, y su diámetro típico es de 5 a 10 μm . Por otra parte, se necesitan presiones de hasta 1000 a 3000 libras por pulgada cuadrada para obtener una rapidez de flujo de 1 a 2 mL/min, en columnas de 3 a 5 mm de diámetro y de 10 a 30 cm de longitud, sin embargo, en algunos casos se requieren presiones hasta de 6 000 psi (Gary Christian, 2010).

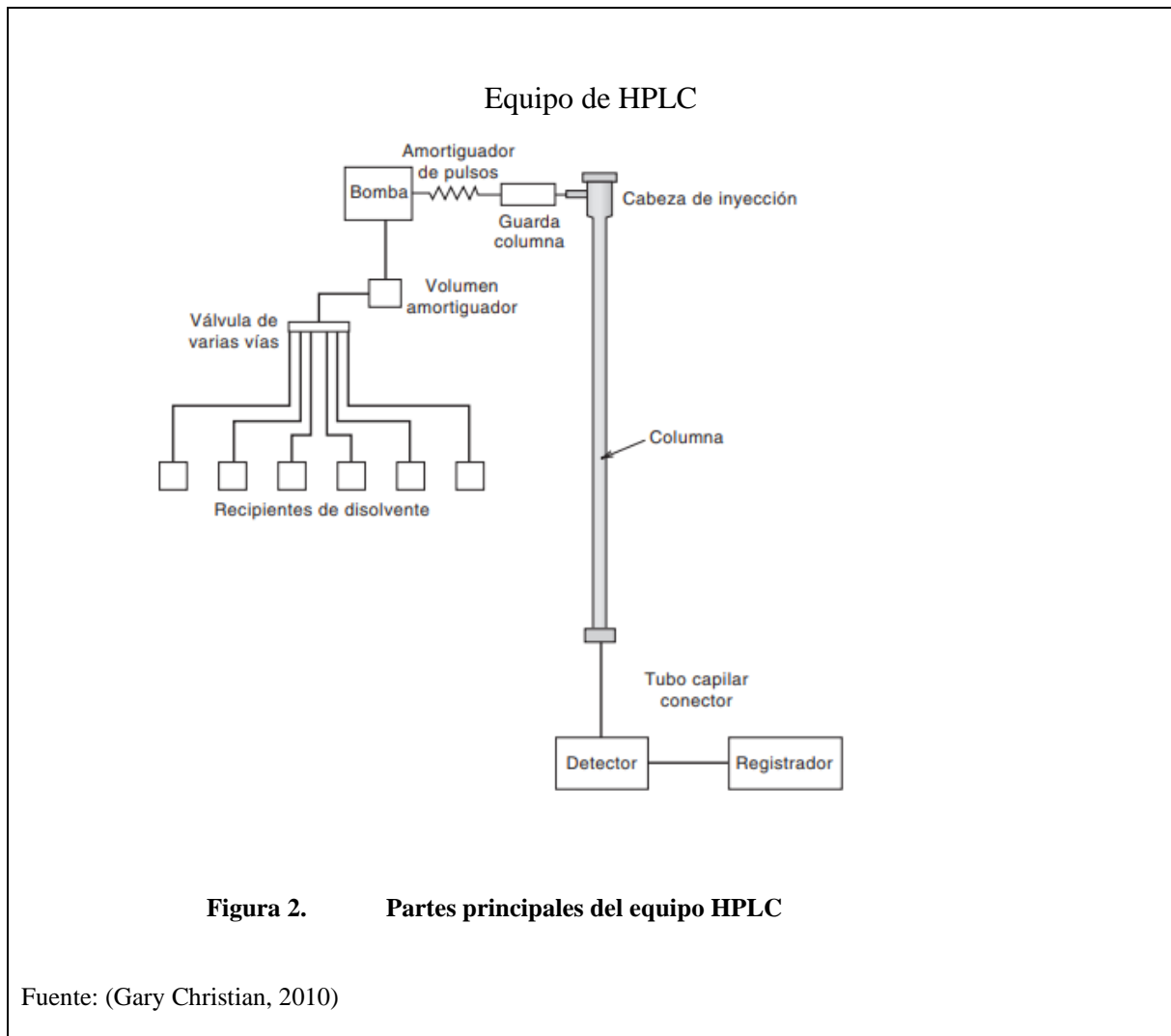
Un aparato de cromatografía de líquidos de alta eficiencia se compone de cuatro partes principales:

Sistema de suministro de fase móvil: Este sistema presenta una bomba para llegar a las presiones requeridas, y suele contener algún medio para producir un gradiente de elución, aunque también existen fases móviles isocráticas. Por otro lado, los disolventes deben ser puros, miscibles y estar desgasificados para evitar la formación de burbujas. Además, deben ser de grado “HPLC”, es decir, que se hayan filtrado en poros de 0.2 μm . Con ello se consigue una duración prolongada de la bomba, porque se evita el rayado, y se reduce la contaminación o la obstrucción de la columna (Gary Christian, 2010).

Sistema de inyección de muestra: Las muestras se pueden introducir manualmente a la válvula con una jeringa que llena el circuito de la muestra. Hoy se usan, de manera sistemática, válvulas automáticas de muestreo en las que las muestras se toman de un muestreador automático y su operación no requiere atención (Gary Christian, 2010).

Columna: Una columna de 4.6 mm de diámetro, bien empacada con partículas de 5 μm debe poseer un número de platos del orden de 60 000 a 90 000 placas/metro, a flujos de 1 mL/min. Además, se sabe que las columnas delgadas producen mayor resolución (Gary Christian, 2010).

Detector: En la cromatografía de líquidos de alta eficiencia se necesitan detectores con gran sensibilidad, en general para cantidades de microgramos a nanogramos. Los detectores que más se usan son refractómetros y detectores de ultravioleta (UV). El detector ultravioleta es de gran selectividad, alrededor de 10^{-8} g/mL (0.01 ppm). No es sensible a la temperatura, su coste es relativamente bajo y se puede usar con gradiente de elución. Es sensible a una gran cantidad de compuestos orgánicos. Debido a sus ventajas, con el detector UV se hacen cerca de 80% de las mediciones (Gary Christian, 2010).



2.10 Antibiógramas disco-placa

El antibiógrama disco-placa es una prueba para determinar la sensibilidad antimicrobiana, consiste en colocar, en la superficie de agar de una caja Petri previamente inoculada con el microorganismo de interés, discos de papel con el antibiótico. Tan pronto el disco entra en contacto con la superficie del agar, el filtro absorbe el agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un

gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por un halo de inhibición (Cantón Rafael et al., 2000).

3 Materiales y métodos

3.1 Población y Muestra

3.1.1 Población

La población está definida por las aguas residuales del alcantarillado final provenientes de un hospital de carácter confidencial en la ciudad de Quito.

3.1.2 Muestra

Las muestras de agua residual que se obtuvieron del alcantarillado final, se tomó muestras compuestas para asegurar la homogeneidad de estas.

3.2 Variables

3.2.1 Variable independiente

Para esta investigación la variable independiente constituye las cepas bacterianas resistentes a la tetraciclina obtenidas del agua residual de origen hospitalario.

3.2.2 Variable dependiente

La variable dependiente es la concentración de tetraciclina en la biodegradación de esta.

3.2.3 Diseño experimental

Para la investigación se utilizó el diseño experimental DBCA (diseño en bloques completamente al azar). Para la elaboración de los tratamientos, se evaluó la capacidad de

degradación de la bacteria aislada CB1 sometida a dos concentraciones de tetraciclina (10,12 mg/L), para lo cual, todos los matraces se colocaron en la autoclave por 15 minutos a 121°C y posteriormente en cámara UV por 12 minutos antes de inocular los mismos.

Los tratamientos se diseñaron de la siguiente forma: Tratamiento 1 (T1): medio Luria Bertani con 10mg/mL de Tetraciclina y 2 mL del inóculo bacteriano (1.5×10^8 UFC/mL); Tratamiento 2 (T2): medio Luria Bertani con 12 mg/mL de Tetraciclina y 2 mL del inóculo bacteriano (1.5×10^8 UFC/mL) ; Tratamiento 3 (T3): Control (sin microorganismos pero con 12 mg/mL de Tetraciclina), Así mismo como el diseño es un DBCA se planteó como variable dependiente a la concentración de tetraciclina y a la variable independiente como los tratamientos con diferentes dosis de tetraciclina, por otra parte, la temperatura es un factor extrínseco a los tratamientos que no se pudo controlar. Además, cabe resaltar que todo el diseño experimental se realizó por triplicado.

3.3 Productos Químicos y Soluciones

Todos los productos químicos se adquirieron en la Universidad Politécnica Salesiana. El medio MR-VP (medio de Clark y Lubs) se preparó utilizando 0,15 g de glucosa Anhidra, 0,21 g de Peptona, 0,15 g de fosfato dipotásico K_2HPO_4 a un pH de 6,9. Por otro lado para la preparación del reactivo de Kovacs se usó 15 mL de alcohol amílico, 5 mL de HCL [1 M] y 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído. El α - naftol (5%) se preparó colocando 5 g de α - naftol en 100 mL de alcohol etílico absoluto, también se preparó una solución indicadora de Rojo de metilo para lo cual se usó 0,6 g de Rojo de metilo en 15 mL de metanol. Además, se usó tetraciclina de calidad analítica al 98% de pureza, oxalato amónico [0,1 M], acetonitrilo y metanol de grado

HPLC, por otra parte, el medio LB se formuló usando 2,5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona y 2,5 g de NaCl (Shao et al., 2019).

3.4 Muestras para identificación

Para el presente proyecto se recolectó muestras de aguas residuales de origen hospitalario de forma aleatoria procedentes de la provincia de Pichincha, ciudad de Quito, Av. 6 de diciembre y Patria, las cuales fueron sujetas a varias pruebas para el aislamiento y posterior identificación de bacterias con la capacidad de biodegradación de la tetraciclina.

3.5 Tipo de muestreo aplicado para la recolección de las muestras.

Se realizó la toma de muestras haciendo uso del muestreo compuesto, el cual consiste en una mezcla de distintas muestras puntuales de una misma fuente, tomadas a intervalos, las muestras se tomaron al azar en 3 distintos puntos del alcantarillado del hospital y se almacenaron en frascos de vidrio ámbar herméticos, con sus respectivos datos de identificación en una etiqueta con la siguiente información: Número de muestra, hora del muestreo, Nombre de la institución, fecha, responsables, etc.

3.6 Tratamiento de muestras.

Se transportaron dichas muestras en un cooler con hielo para preservar la viabilidad de las muestras hasta su llegada al laboratorio en un ambiente de refrigeración de 4°C, para su posterior uso.

3.7 Aislamiento de microorganismos de aguas residuales.

3.7.1 Factores de dilución.

De la muestra original compuesta se tomó 1 mL de inóculo y se transfirió al primer tubo con 9 mL de agua peptonada 0,1 % dicho tubo corresponde a la dilución 10^{-1} , luego de agitar bien el tubo 10^{-1} se procedió a transferir 1 mL con una nueva pipeta estéril a un segundo tubo para formar la dilución 10^{-2} . Así realizando estas operaciones sucesivamente en una cabina de flujo laminar desinfectada con savlon y alcohol al 96% se logró obtener diluciones seriadas, que van de 10^{-1} a 10^{-6} (Domenech Antonio et al., 2010).

3.7.2 Siembra de las diluciones preparadas.

Según se usa el método de siembra en placa por extensión que consiste en pasar un volumen de 0,1 mL de una mezcla microbiana diluida conteniendo hasta un centenar de células, al centro de una caja Petri y extenderla sobre toda la superficie con un asa acodada estéril de vidrio. Por ello, se sembró 0,1 mL de las tres últimas diluciones (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}) por duplicado a una temperatura de 37° C por 48 horas con las placas Petri en posición invertida (Domenech Antonio et al., 2010).

3.7.3 Selección de microorganismos.

En este punto se requiere obtener cepas axénicas, por lo que después de 48 horas de incubación se seleccionó colonias que presentaron diferente morfología tomando como criterio que las UFC estén entre 30 a 300 colonias. Luego, se procedió a sembrar las colonias escogidas en seis cajas Petri en cabina de flujo laminar desinfectada con savlon y alcohol al 98 % por el método de estriación en placas Petri con un medio selectivo “agar endo” conocido como agar MacConkey que permite el crecimiento de bacterias gram negativas y se incubó a 37 ° C por 48 horas (Domenech Antonio et al., 2010).

3.8 Identificación de los microorganismos

3.8.1 Identificación macroscópica

Para la identificación macroscópica de las bacterias previamente aisladas, se observó la morfología colonial en el agar MacConkey, caracterizando para cada colonia su forma, elevación, margen, color y textura (Fernández Ana et al., 2010).

3.8.2 Identificación microscópica

Para esta identificación se usó la tinción Gram, se colocaron en dos portaobjetos las dos cepas bacterianas con una gota de agua destilada se mezcló y se fijó la muestra. Luego, como primer paso, se aplicó cristal violeta y se dejó reposar por un minuto, después, se realiza un lavado de la placa con agua destilada, como segundo paso, añadimos Lugol por un minuto y lavamos. Como tercer paso añadimos alcohol cetona por 30 segundos para decolorar, como cuarto paso, aplicamos safranina la cual actúa como contraste dando el color final a las bacterias y

permitiéndonos distinguir entre Gram negativos y Gram positivos. Se debe tener una placa de control para asegurarse de que no de una tinción diferente. Después las placas se observaron al microscopio electrónico con objetivos 10x, 40x, y 100x este último con la ayuda de una gota de aceite de inmersión (Domenech Antonio et al., 2010).

3.8.3 Identificación fisiológica

Para una caracterización e identificación presuntiva se utilizó el medio selectivo y diferencial EMB (Eosina Azul de Metileno), se preparó dicho medio con las especificaciones ya antes mencionadas, se autoclavó a 121 °C por 15 minutos, transcurrido ese tiempo se dejó enfriar en medio a unos 40 °C se dispensó en 2 cajas Petri, se dejó secar y se procedió a inocular por la técnica de estriado con las dos cepas bacterianas CB1 y CB2, en condiciones estériles, luego se incubaron a 37 °C por 48 horas, Finalmente, pasado el tiempo de incubación se observó características típicas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Domenech Antonio et al., 2010)

3.8.4 Identificación Bioquímica

3.8.4.1 Indol

Se inocularon en dos tubos con 9 mL de medio de cultivo con triptona las dos cepas aisladas previamente CB1 y CB2, Luego, se incubaron a 37 °C durante 48 horas transcurrido este tiempo se procedió a agregar de 4 a 5 gotas del reactivo de Kovacs a los tubos , con cuidado se deslizó el reactivo por la pared del tubo evitando agitar el tubo, si es positivo para el indol se forma un

aro de color rojo en la superficie del tubo, de ser negativo se forma un aro de color amarillo(Fernández Ana et al., 2010).

3.8.4.2 Catalasa

Para esta prueba se tomó con la ayuda de un asa de siembra el centro de las dos colonias aisladas CB1 y CB2 para colocarlas en papel estéril, Luego se deposita una o dos gotas de agua oxigenada al 30 %, si la bacteria posee la enzima catalasa, se producirá la liberación de burbujas de oxígeno debido a la descomposición del peróxido de hidrógeno. Este burbujeo es indicativo de un resultado positivo para la prueba de la catalasa (Fernández Ana et al., 2010).

3.8.4.3 Oxidasa

Para llevar a cabo esta prueba se colocaron dos tiras de papel impregnado de 2-3 gotas de reactivo de Kovacs. Luego, en el papel se colocaron una colonia aislada en cada tira, se observó los cambios de color en las colonias en un lapso de 5-10 segundos, el cambio de color a púrpura y negro se da en un rango de 10-20 segundos, como consecuencia de que el reactivo se oxida en presencia del citocromo oxidasa formándose el azul de Wuster en caso de ser positivo, en caso negativo no hay cambio de color (Fernández Ana et al., 2010).

3.8.4.4 Citrato

Esta prueba se realizó en dos tubos con agar Citrato de Simmons, a través de la técnica de sembrado en pico de flauta, se procedió a inocular con un asa de siembra en zigzag los tubos y se incubaron a 37 °C por 48 horas. Es así como, las bacterias capaces de usar el citrato provocarán el cambio de color del medio de verde a azul intenso, por viraje del indicador de pH, azul de bromotimol, a la vez que se observa crecimiento en la superficie (Fernández Ana et al., 2010).

3.8.4.5 Rojo metilo y Voges-Proskauer

Para realizar esta prueba se tomó 9 mL de medio Clark y Lubs y se colocó la mitad del medio, es decir, 4,5 mL en cada tubo, para realizar en estos cuatro tubos las dos pruebas correspondientes. Se inocularon los tubos y se incubaron a 37 °C por 48 horas pasado ese tiempo se añadió 4 a 5 gotas de rojo metilo para observar la reacción, si el cambio de color es a un rojo intenso se considera positivo y negativo si este no genera ningún cambio. Para la prueba de Voges-Proskauer se añadieron 0,6 ml del Reactivo A de Voges-Proskauer (α -naftol al 5% en alcohol etílico absoluto), el medio presenta aspecto lechoso, Luego se añadió 0,2 ml del Reactivo B de Voges-Proskauer (KOH 40%), si la prueba es positiva, transcurridos 10 minutos desde la adición de los reactivos, aparecerá un color rosado-violáceo (Fernández Ana et al., 2010).

3.9 Antibiogramas por difusión en disco

Se realizó una siembra en césped de las dos cepas aisladas previamente con un hisopo estéril en cajas Petri con agar Mueller- Hinton. Para ello, primero se llevó el inóculo de bacterias en medio de cultivo de Triptona a una escala McFarland de 0,08-0,20 midiendo sus absorbancias en el espectrofotómetro, lo cual significa una concentración de 1×10^8 UFC/mL. Luego, se procedió a colocar en las cajas Petri 3 discos de antibiótico tetraciclina a una concentración de 30 mg/mL de manera equidistante, Finalmente se selló con Parafilm y se incubó a 37 °C por 48 horas. Así mismo, una vez que pasó el periodo de tiempo, se observó y midió los halos de inhibición formados con un pie de rey en mm (Cantón Rafael et al., 2000).

3.10 Biotransformación de la tetraciclina

Los experimentos de biotransformación con la cepa de *Klebsiella pneumoniae* se llevaron a cabo en matraces de 500 mL. Para esto, se cultivó a dicha cepa en medio líquido Luria Bertani a 35 °C por 48 horas para alcanzar la fase exponencial de la bacteria, en un agitador ajustado a 100 rpm. Después se prepararon diluciones del cultivo, que fueron de 80%, 60%, 40% y 20 %, para luego medir su absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm, la cual se puede observar en la *Tabla 1*. Luego, las células se ajustaron a una absorbancia de 0,08, lo cual equivale a una concentración de 1×10^8 UFC/mL.

Tabla 1. Diluciones

Diluciones	ABS	K*ABS
100%	1.845	38.39
80%	1.581	32.89
60%	1.206	25.09
40%	1.045	21.74
20%	0.41	8.54

Luego, se tomó un volumen de 2 ± 0.1 mL de inóculo y se colocó en tres matraces con su respectiva dosis de tetraciclina correspondiente al Tratamiento 1 (12 mg). Así mismo, en otros tres matraces se colocó el mismo volumen de inóculo, pero con diferente dosis de tetraciclina correspondiente al tratamiento 2 (10mg). En los últimos 3 matraces, se colocó solo tetraciclina en una dosis de 12 mg/ml. Todo esto se realizó en una cabina de flujo laminar, en condiciones estériles. Finalmente, se cubrieron los 9 matraces con papel aluminio y se colocaron en un lugar sin la incidencia de luz directa. Para lograr una oxigenación adecuada del medio de cultivo, se

instalaron difusores de oxígeno en cada matraz durante un período de cuatro días (Leng et al., 2016).

3.11 Cuantificación de tetraciclina mediante HPLC.

3.11.1 Fase Móvil

La fase móvil consistió en 67% (V/V) de Oxalato amónico [0,1 M] en agua de alta pureza, es decir, Tipo I, además 22 % (V/V) de acetonitrilo y 11 % (V/V) de metanol grado HPLC (98%). Para prepararlo, se realizó una mezcla en una botella BOECO con 670 mL de solución de oxalato amónico, 220 mL de acetonitrilo y 110 mL de metanol grado HPLC. Luego, la mezcla fue filtrada por medio de filtros 0,45 μm . Finalmente, para desgasificar la mezcla, se colocó la botella en ultrasonido por 15 minutos (Leng et al., 2016).

3.11.2 Preparación de estándares de Tetraciclina

Para la curva de calibración, se prepararon 5 estándares, los cuales fueron diluidos a partir de una solución stock de 125 mg/mL. Esta solución se preparó pesando 125 mg de tetraciclina al 98% de pureza y aforando con agua de alta pureza Tipo I en un matraz de 100 mL. De ahí, se tomaron alícuotas para obtener diluciones a las siguientes concentraciones: 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, 1000 ppm y 1250 ppm.

3.12 Buffer McIlvaine

Se preparó pesando 14,19 gramos de fosfato monoácido de sodio (Na_2HPO_4) y 9,60 gramos de ácido cítrico en un balón aforado de 100 mL, se disolvió y se aforó con agua de alta pureza Tipo I (Leng et al., 2016).

3.13 Buffer EDTA-NaCl

Se pesaron 16,81 g de Na₂ EDTA y 14,6 g de NaCl en un balón aforado de 100 mL, se disolvió y se aforó con buffer de McIlvaine. Se controló el pH a un valor de 4,00 (Leng et al., 2016).

3.14 Método de extracción de las muestras

Se midió la concentración de tetraciclina residual en el día 4 de los matraces, para lo cual se tomó un volumen de 2 ± 0.1 mL de la solución de cada matraz y se centrifugó a 8000 g, a una temperatura de 4 °C, por 10 minutos. Luego, se añadió el tampón McIlvaine -Na₂ EDTA al sobrenadante de las muestras en partes iguales para quelar los iones metálicos. Finalmente, se colocaron las muestras en viales ámbar para HPLC de 1,5 mL, se utilizó una columna C18, a una temperatura de 40 °C, con una fase móvil de 1 mL / min⁻¹, a un volumen de inyección de 20 µL y se monitorizó por un detector UV a una longitud de onda de 355 nm (Leng et al., 2016).

4 Resultados y discusión

4.1 Aislamiento y Caracterización morfológica de los microorganismos.

Se obtuvieron un total de 6 aislamientos en cajas petri con medio MacConkey, de las cuales se consiguió dos cultivos axénicos de dos cepas bacterianas, que posteriormente se evaluaron por sus características morfológicas. A continuación, se aplicó la técnica de tinción Gram, en la cual se observó que las dos cepas de microorganismos aislados presentaron una forma cilíndrica característica de los bacilos. Además, presentaron una coloración rosada, lo cual indica que son Gram negativos.

Por otra parte, se llevó a cabo el análisis morfológico de las colonias aisladas por medio de una inspección visual. Estas características pueden apreciarse en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Caracterización morfológica de las bacterias

Código	Forma	Elevación	Margen	Textura	Color	Tinción gram
CB1 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	Circular	Convexa	Entero	mucoide	Rosáceo tenue	negativo
CB2 (<i>E.coli</i>)	Redonda	Convexa	Entero	No mucoide	Rojo a rosa	negativo

4.2 Pruebas de identificación bioquímica

4.2.1 Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB)

Se realizaron siembras en este medio selectivo para gram negativos de las dos cepas aisladas con la finalidad de caracterizarlos por su color, los resultados obtenidos para la determinación de *E.coli* fueron colonias típicas de tonalidad verde metálico con brillo y su centro de tonalidad negra, por otro lado, para la cepa presuntiva de *Klebsiella pneumoniae* se obtuvo colonias mucosas de tonalidad rosada - morada.

4.2.2 Pruebas IMVIC

Las pruebas bioquímicas IMVIC muy utilizadas para la identificación de coliformes se aplicaron a las dos cepas de bacterias previamente aisladas, se presentan los resultados de las pruebas en la *Tabla 3* y *Tabla 4*.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas IMVIC y características para la cepa CB1 (*Klebsiella pneumoniae*).

Pruebas	Reacción	Positivo	Negativo
Rojo Metilo	-		Amarillo
Utilización Citrato	+	Azul	
Voges-Proskauer	+	Rojizo	
Catalasa	+	Efervescencia con burbujas	
Oxidasa	-		Sin cambio de color
Indol	-		Halo amarillo

Tabla 4. Pruebas bioquímicas IMVIC y características para la cepa CB2 (*E.coli*).

Pruebas	Reacción	Positivo	Negativo
Rojo Metilo	+	Rojo	
Utilización Citrato	-		Verde
Voges-Proskauer	-		Sin coloración
Catalasa	+	Efervescencia con burbujas	
Oxidasa	-		Sin cambio de color
Indol	+	Halo Rojo Cereza	

4.2.3 Fermentación de azúcares

Por lo general, las bacterias anaeróbicas facultativas y anaeróbicas fermentan carbohidratos como la lactosa a ácidos orgánicos los cuales se detectaron a través del medio selectivo y diferencial Agar MacConkey, teniendo así que para la cepa CB1 se observó una coloración rosada en las colonias ya que al asimilar y fermentar la lactosa el pH del medio disminuye cambiando así de rojo neutro a rosa, por otro parte, para la cepa CB2 se observó en las colonias una coloración rojo ladrillo rodeadas por un halo turbio debido a las sales biliares que precipitaron, se muestran los resultados en los anexos.

4.3 Pruebas de sensibilidad bacteriana

4.3.1 Método del antibiograma disco-placa

En cuatro cajas petri con agar Muller – Hinton se inocularon las dos cepas bacterianas a una concentración de 1×10^8 UFC/mL Se obtuvieron los siguientes resultados en la *Tabla 5* .

Tabla 5. Resultados de los halos de inhibición bacteriana

Microorganismo	Antimicrobiano (30 mg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)	Interpretación
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tetraciclina	≤ 14	Resistente
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tetraciclina	≤ 14	Resistente
<i>E.coli</i>	Tetraciclina	15.31	Intermedio
<i>E.coli</i>	Tetraciclina	15.2	Intermedio

4.4 Cuantificación tetraciclina por HPLC

4.4.1 Método cromatográfico del estándar externo

Para lograr cuantificar de manera precisa la tetraciclina se preparó estándares de tetraciclina en un intervalo de concentraciones de 250-1250 ppm. Para cada estándar se analizó tres réplicas. Los resultados de los cromatogramas de los estándares se presentan en la *Tabla 6*, además se incluye las áreas y la concentración de los 5 estándares preparados los cuales sirvieron para la cuantificación de tetraciclina en las muestras del estudio.

Tabla 6. Áreas de los estándares de tetraciclina

Estándar Tetraciclina (ppm)	Áreas		
	A1	A2	A3
250	6936084	6930000	6295000
500	14270920	13860000	12590000
750	17328622	20790000	18885000
1000	28325582	27720000	25180000
1250	29847583	34650000	31475000

Con las áreas que se obtuvieron de las concentraciones de los respectivos estándares se realizó la gráfica de la curva de calibración la cual se puede observar en la figura 3. En donde se muestra la relación que existe entre la concentración inyectada por el equipo y el área detectada por el HPLC.

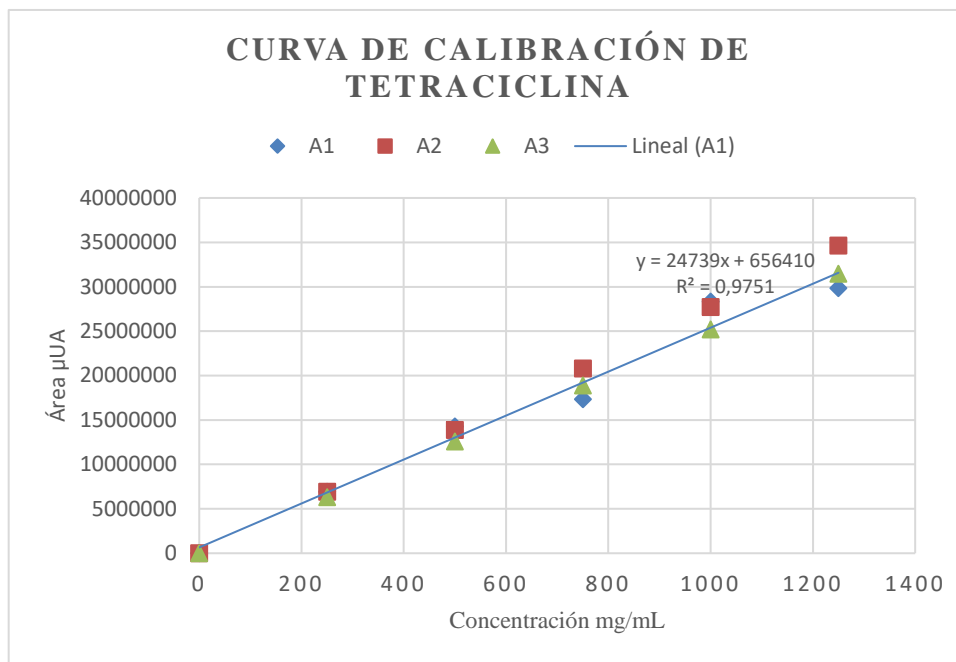


Figura 3. Curva calibración tetraciclina

Fuente: (Los autores, 2024)

Por otro lado, se detectó que el tiempo de retención para la tetraciclina se encuentra en un rango de 5,6 a 6 minutos para los estándares mientras que para la muestras fue de 3,9 a 4,9 minutos. En estudios previos se encontró que el valor de retención para la tetraciclina es de 6,51 minutos aunque esto depende de la habilidad de inyección de la muestra y de las condiciones con las que se trabaje en el equipo de HPLC (Leng et al., 2016).

En la *Tabla 7* se muestran los resultados de las áreas de las muestras analizadas y recolectadas en el día 4 por triplicado.

Tabla 7. Áreas de las muestras analizadas por HPLC

Concentración mg/mL	Tratamientos	muestra CB1 + TC			Control TC		
		A1	A2	A3	A1	A2	A3
12	T1	5558561	5048228	6057808	33263000	28653679	30216000
10	T2	6582069	5619760	5659431			

Por otra parte, en la *Tabla 8* se presentan los resultados de las concentraciones en ppm de las muestras analizadas en el día 4 por triplicado en el HPLC. Así mismo, se muestra el diseño experimental utilizado denominado diseño de Bloques completamente al Azar (DBCA).

Tabla 8. Diseño experimental de los tratamientos de tetraciclina

Tratamientos	I	II	III
T1	232	211	253
T2	232	198	199
T3 (Control)	1199	1033	1090

4.5 Análisis de la Varianza

4.5.1 Diseño de Bloques completamente al Azar (DBCA)

Análisis de Varianza

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CONCENTRACIÓN TC	9	1,00	0,99	8,49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1580677,33	4	395169,33	205,43	0,0001
BLOQUES	8164,67	2	4082,33	2,12	0,2354
TRATAMIENTOS	1572512,67	2	786256,33	408,73	<0,0001
Error	7694,67	4	1923,67		
Total	1588372,00	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=127,63083

Error: 1923,6667 gl: 4

BLOQUES Medias n E.E.

I 554,33 3 25,32 A

III 514,00 3 25,32 A

II 480,67 3 25,32 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=127,63083

Error: 1923,6667 gl: 4

TRATAMIENTOS Medias n E.E.

T3 1107,33 3 25,32 A

T1 232,00 3 25,32 B

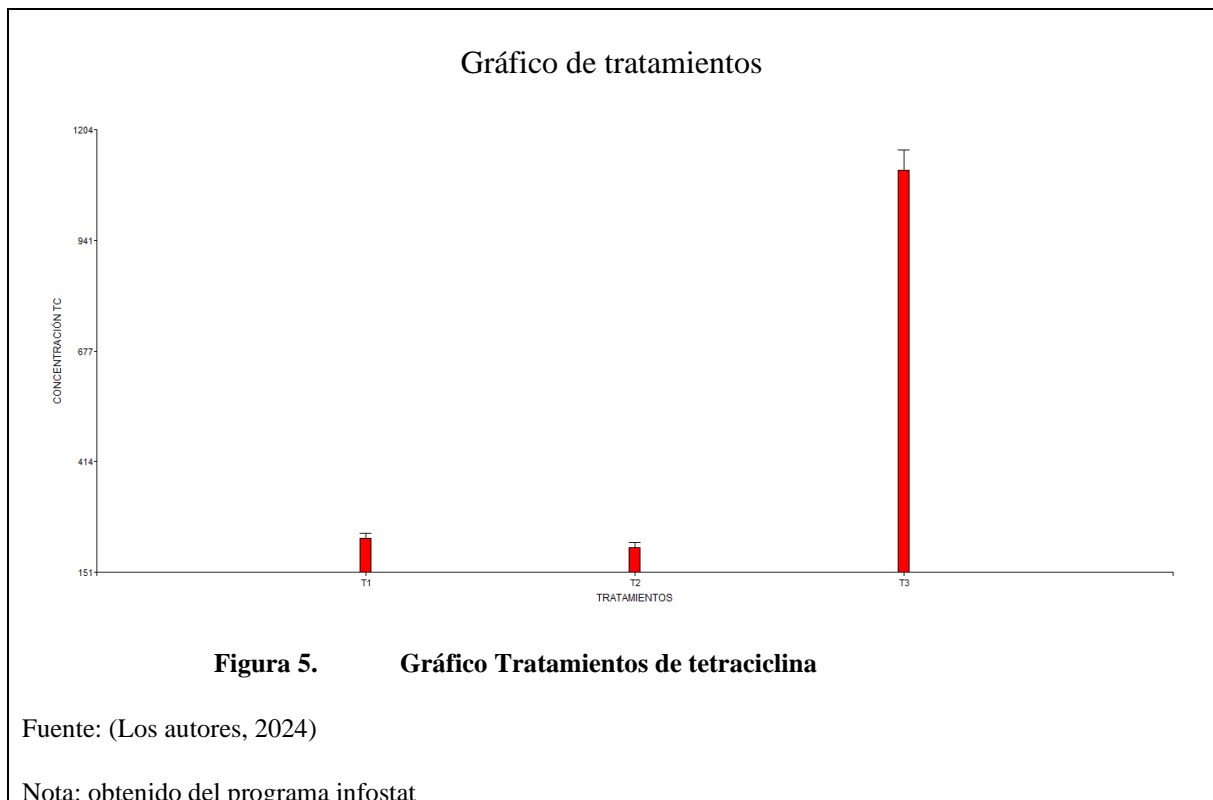
T2 209,67 3 25,32 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 4. Análisis estadístico de varianza

Fuente: (Los autores, 2024)

Nota: obtenido del programa infostat



Hipótesis

Ho: $T1=T2=T3$

Ha: $T1 \neq T2 \neq T3$

Hipótesis secundaria:

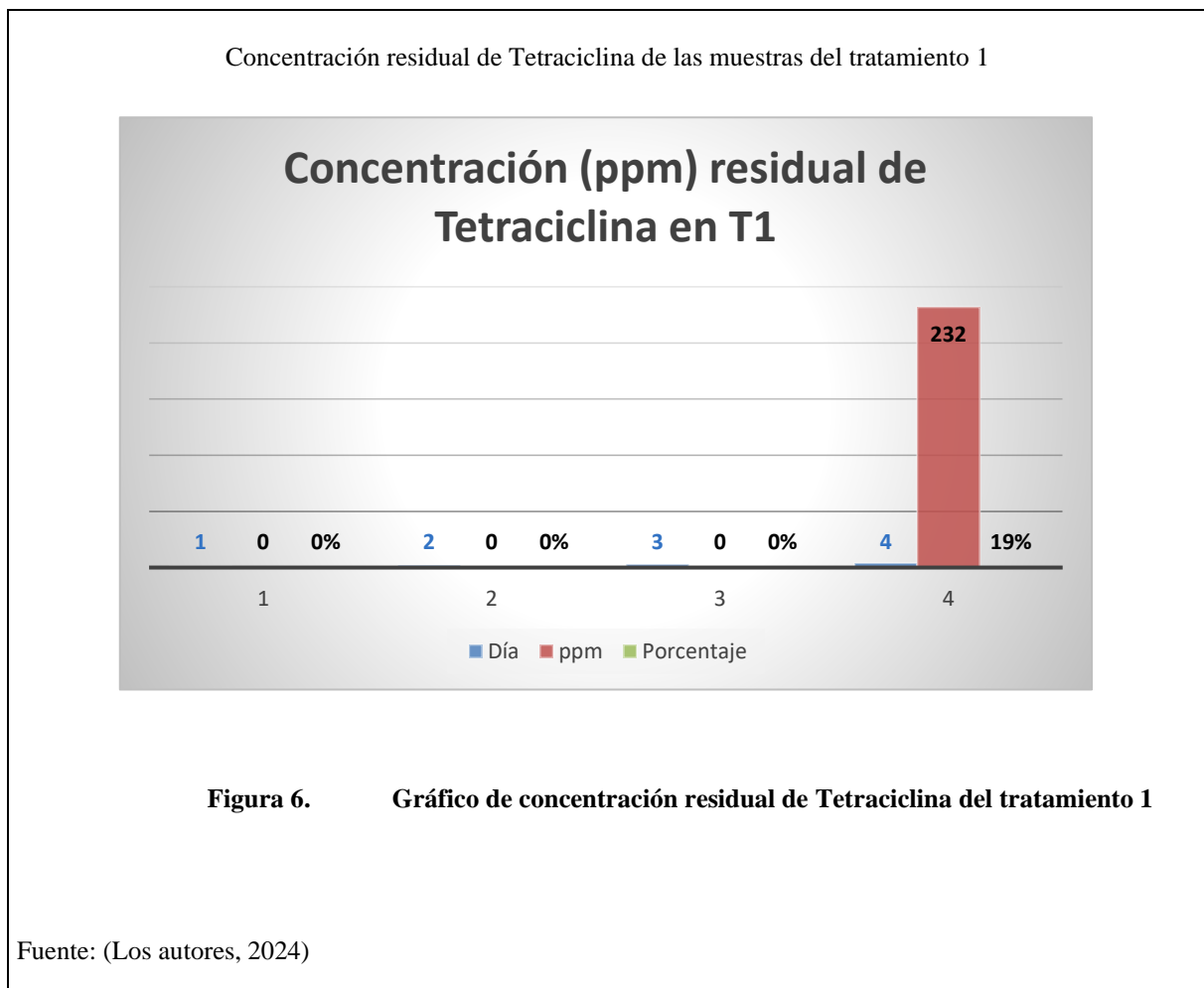
Ho: La temperatura no influye

Ha: La temperatura si influye

Como resultados de análisis estadístico se presenta que a un nivel de significancia de 95 % se rechaza la Ho y se acepta la Ha ya que el p-valor es menor al $\alpha = 0.05$, lo cual indica que al menos un tratamiento con tetraciclina es diferente. Por otro lado, en función de la

prueba post hoc de Tukey (5%) se puede inferir que los mejores tratamientos son el T1 y T2 ya que poseen las medias más bajas de concentración residual de tetraciclina y no difieren significativamente entre los dos tratamientos. Por otro lado, para los bloques se observó que el p-valor es mayor al $\alpha = 0.05$ por lo que el factor externo en este caso la temperatura no influye en el experimento.

En las siguientes figuras, constan las medias de los resultados de las muestras analizadas en el día 4 así como las que poseen un resultado negativo, además se muestra el porcentaje de Tetraciclina residual de las muestras analizadas para cada tratamiento.



Concentración residual de Tetraciclina de las muestras del tratamiento 2

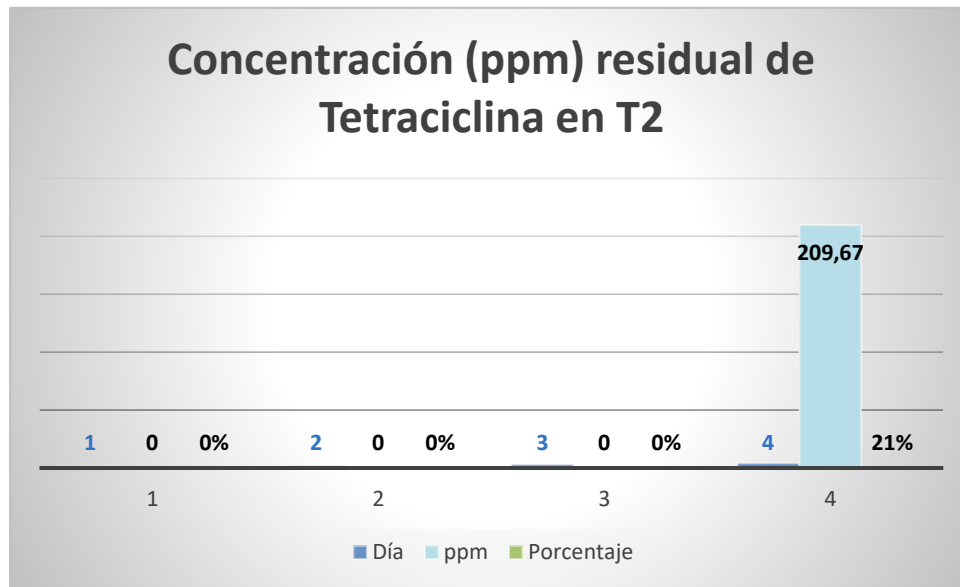


Figura 7. Gráfico de concentración residual de Tetraciclina del tratamiento 2

Fuente: (Los autores, 2024)

Concentración residual de Tetraciclina de las muestras del tratamiento 3

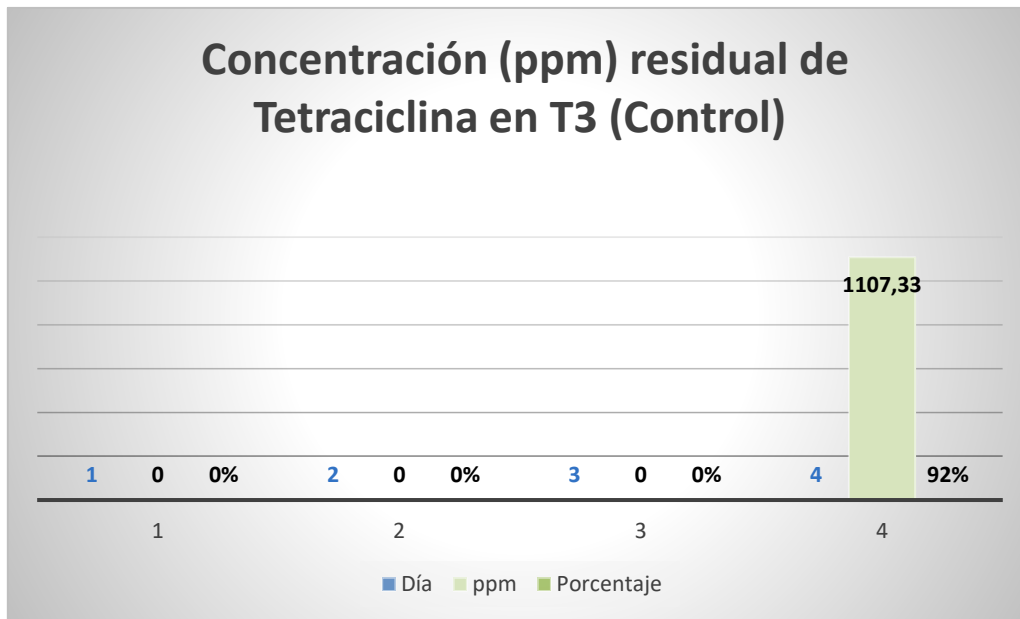


Figura 8. Gráfico de concentración residual de Tetraciclina del tratamiento Control

Fuente: (Los autores, 2024)

5 Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se logró aislar dos cepas bacterianas CB1 (*Klebsiella pneumoniae*) y CB2 (*E.coli*) con la capacidad de degradar al antibiótico tetraciclina.

Se identificó a las bacterias resistentes CB1 y CB2 como *Klebsiella pneumoniae* y *E.coli* respectivamente y se comprobó que son bacilos los cuales presentan una forma cilíndrica característica, gram negativos, fermentadores de lactosa y miembros de la familia Enterobacteriaceae.

Se evaluó la respuesta in vitro de las bacterias CB1 y CB2 ante la tetraciclina mediante antibiogramas por el método de difusión en disco mediante las cuales se concluyó que *Klebsiella pneumoniae* tiene una resistencia alta a la tetraciclina a una concentración de 30mg/mL mientras que *E.coli* presenta una resistencia intermedia a la tetraciclina a la misma concentración.

Se concluyó que al realizar la cuantificación de tetraciclina residual en las muestras de los tratamientos T1 (12 mg/mL) y T2 (10 mg/mL) existió una degradación del 79 % y 81 % de su concentración inicial de tetraciclina respectivamente a los cuatro días con un pH de 7,2 y una temperatura de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda manejar otras variables para analizar en los efectos que causarían en la degradación de la tetraciclina por ejemplo probando con diferentes sustratos como glicerol, lactosa o sacarosa, además utilizando diferentes pH.

Se sugiere aplicar pruebas de carácter genético, es decir, análisis de PCR y secuenciación para una identificación más específica de las cepas confirmando así el género y especie de las bacterias de interés.

Se recomienda preparar los estándares de tetraciclina para el análisis cromatográfico por HPLC el mismo día ya que no son muy estables.

6 Bibliografía

- Bastidas, C. A., Villacrés-Granda, I., Navarrete, D., Monsalve, M., Coral-Almeida, M., & Cifuentes, S. G. (2019). Antibiotic susceptibility profile and prevalence of *mecA* and *lukS-PV/lukF-PV* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from nasal and pharyngeal sources of medical students in Ecuador. *Infection and Drug Resistance*, *12*, 2553–2560. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219358>
- Caneschi, A., Bardhi, A., Barbarossa, A., & Zaghini, A. (2023). The Use of Antibiotics and Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine, a Complex Phenomenon: A Narrative Review. In *Antibiotics* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030487>
- Cantón Rafael, García Elías, Gómez Luisa, Martínez Luis, Rodríguez Carmen, & Vila Jordi. (2000). *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*.
- Domenech Antonio, López Arantxa, Oliver Antonio, & Ramírez Antonio. (2010). *Técnicas de aislamiento*.
- Fernández Ana, García Celia, Saéz Juan, & Valdezate Sylvia. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología* (Cercenado Emilia & Cantón Rafael, Eds.).
- García Fernández, C., González, M., Emilio, M., & González Gómez, J. (2019). *Extracción de tetraciclina de medios acuosos empleando nuevos disolventes*.
- Gary Christian. (2010). *Química Analítica*. 606–612.
- Helmy, Y. A., Taha-Abdelaziz, K., Hawwas, H. A. E. H., Ghosh, S., AlKafaas, S. S., Moawad, M. M. M., Saied, E. M., Kassem, I. I., & Mawad, A. M. M. (2023). Antimicrobial Resistance and Recent Alternatives to Antibiotics for the Control of

- Bacterial Pathogens with an Emphasis on Foodborne Pathogens. In *Antibiotics* (Vol. 12, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020274>
- Leng, Y., Bao, J., Chang, G., Zheng, H., Li, X., Du, J., Snow, D., & Li, X. (2016a). Biotransformation of tetracycline by a novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* DT1. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.06.053>
- Leng, Y., Bao, J., Chang, G., Zheng, H., Li, X., Du, J., Snow, D., & Li, X. (2016b). Biotransformation of tetracycline by a novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* DT1. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 125–133. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.06.053>
- Maldonado, I., & Balagurusamy, N. (2022a). Biotransformation of antibiotics in artificial wetlands: Role of microorganisms. *Ecologia Austral*, 32(3), 1054–1069. <https://doi.org/10.25260/EA.22.32.3.0.1792>
- Maldonado, I., & Balagurusamy, N. (2022b). Biotransformation of antibiotics in artificial wetlands: Role of microorganisms. *Ecologia Austral*, 32(3), 1054–1069. <https://doi.org/10.25260/EA.22.32.3.0.1792>
- Meléndez-Marmolejo, J., García-Saavedra, Y., Galván-Romero, V., Díaz De León-Martínez, L., Vargas-Berrones, K., Mejía-Saavedra, J., & Flores Ramírez, R. (2020). *Emerging contaminants. Environmental problems associated with antibiotic use. New detection and remediation techniques and legislative perspectives in Latin America.*
- Meretoudi, A., Banti, C. N., Siafarika, P., Kalampounias, A. G., & Hadjikakou, S. K. (2020). Tetracycline water soluble formulations with enhanced antimicrobial activity. *Antibiotics*, 9(12), 1–24. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120845>

Prescott Lansing, Harley John, & Klein Donald. (2004). *Siembra en placa por extensión y en estrías* (Gamazo Carlos & Lasa Iñigo, Eds.; Quinta). The McGraw-Hill.

Shao, S., Hu, Y., Cheng, J., & Chen, Y. (2019). Biodegradation mechanism of tetracycline (TEC) by strain *Klebsiella* sp. SQY5 as revealed through products analysis and genomics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 185.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109676>

Willey, J., Sandman, K., & Wood, D. (2020). *Prescott's Microbiology* (Eleventh edition). McGraw-Hill .

Yang, C. W., Liu, C., & Chang, B. V. (2020a). Biodegradation of amoxicillin, tetracyclines and sulfonamides in wastewater sludge. *Water (Switzerland)*, 12(8).

<https://doi.org/10.3390/W12082147>

Yang, C. W., Liu, C., & Chang, B. V. (2020b). Biodegradation of amoxicillin, tetracyclines and sulfonamides in wastewater sludge. *Water (Switzerland)*, 12(8).

<https://doi.org/10.3390/W12082147>

7 Anexos

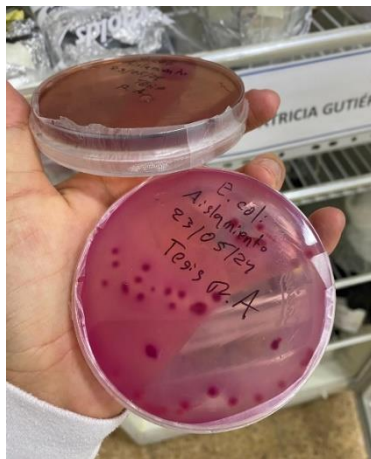
Aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*



Anexo 1. Aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*

Fuente: (Los autores, 2024)

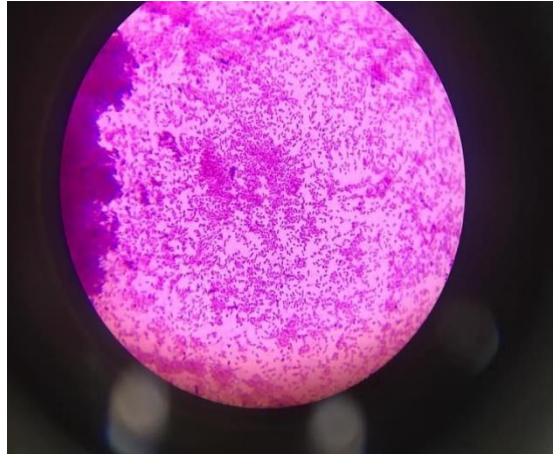
Aislamiento de *E.coli*



Anexo 2. Aislamiento de *E.coli*

Fuente: (Los autores, 2024)

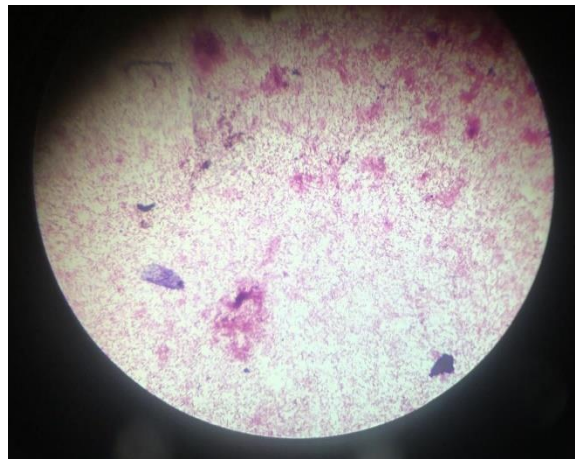
Tinción Gram de *Klebsiella pneumoniae*



Anexo 3. Tinción Gram de *Klebsiella pneumoniae*

Fuente: (Los autore, 2024)

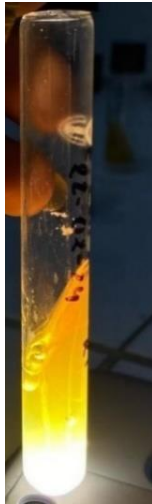
Tinción Gram de *E.coli*



Anexo 4. Tinción Gram de *E.coli*

Fuente: (Los autores, 2024)

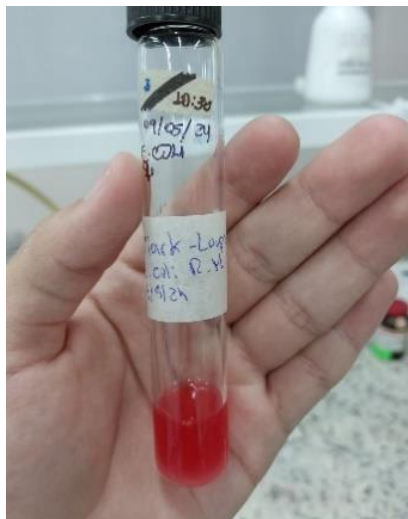
Pruebas Rojo de Metilo



Anexo 5. Pruebas Rojo de Metilo

Fuente: (Los autores, 2024)

Pruebas Rojo de Metilo



Anexo 6. Pruebas Rojo de Metilo

Fuente: (Los autores, 2024)

Prueba utilización Citrato



Anexo 7. Prueba utilización Citrato

Fuente: (Los autores, 2024)

Prueba utilización Citrato



Anexo 8. Prueba utilización Citrato

Fuente: (Los autores, 2024)

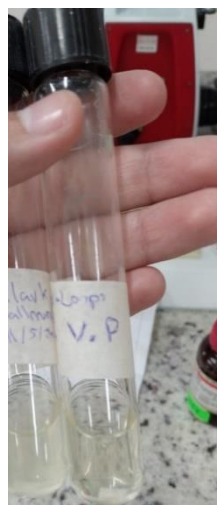
Prueba Voges- Proskauer



Anexo 9. Prueba Voges- Proskauer

Fuente: (Los autores, 2024)

Prueba Voges- Proskauer



Anexo 10. Prueba Voges- Proskauer

Fuente: (Los autores, 2024)

Prueba Catalasa



Anexo 11. Prueba Catalasa

Fuente: (Los autores, 2024)

Prueba Catalasa



Anexo 12. Prueba Catalasa

Fuente: (Los autores, 2024)

Prueba Indol



Anexo 13. Prueba Indol

Fuente: (Los autores, 2024)

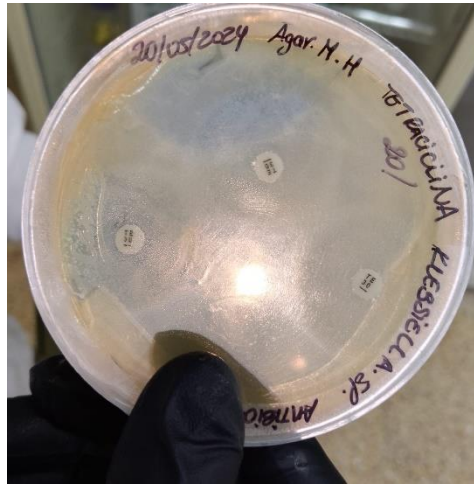
Prueba Indol



Anexo 14. Prueba Indol

Fuente: (Los autores, 2024)

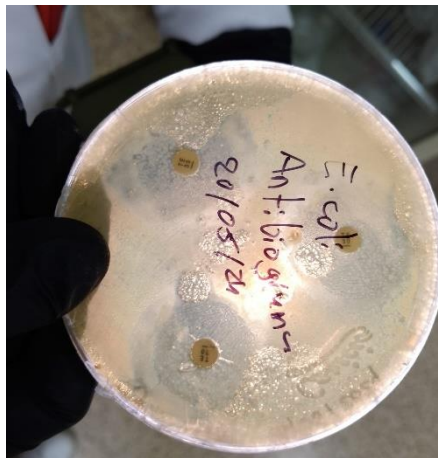
Antibiogramas *Klebsiella pneumoniae*



Anexo 15. Antibiogramas *Klebsiella pneumoniae*

Fuente: (Los autores, 2024)

Antibiogramas *E.coli*



Anexo 16. Antibiogramas *E.coli*

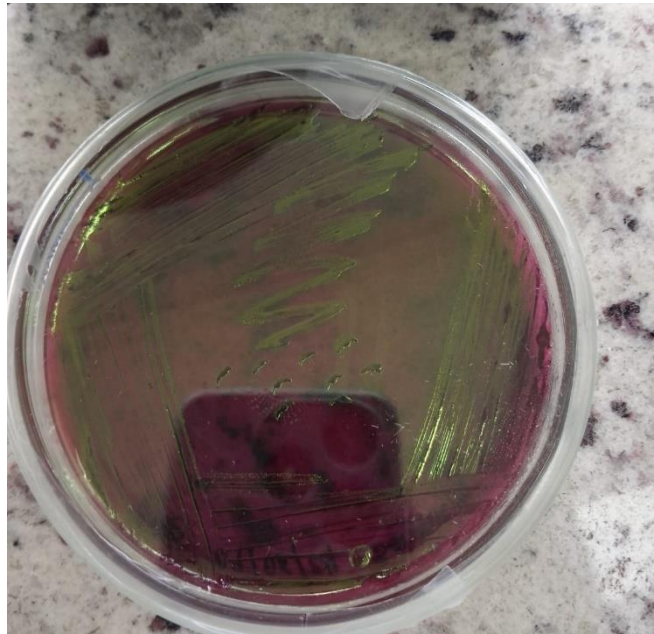
Fuente: (Los autores, 2024)

Klebsiella pneumoniae en Agar EMB



Anexo 17. *Klebsiella pneumoniae* en Agar EMB
Fuente: (Los autores, 2024)

E.coli en Agar EMB



Anexo 18. *E.coli* en Agar EMB
Fuente: (Los autores, 2024)

Estándares de tetraciclina



Anexo 19. Estándares de tetraciclina

Fuente: (Los autores, 2024)

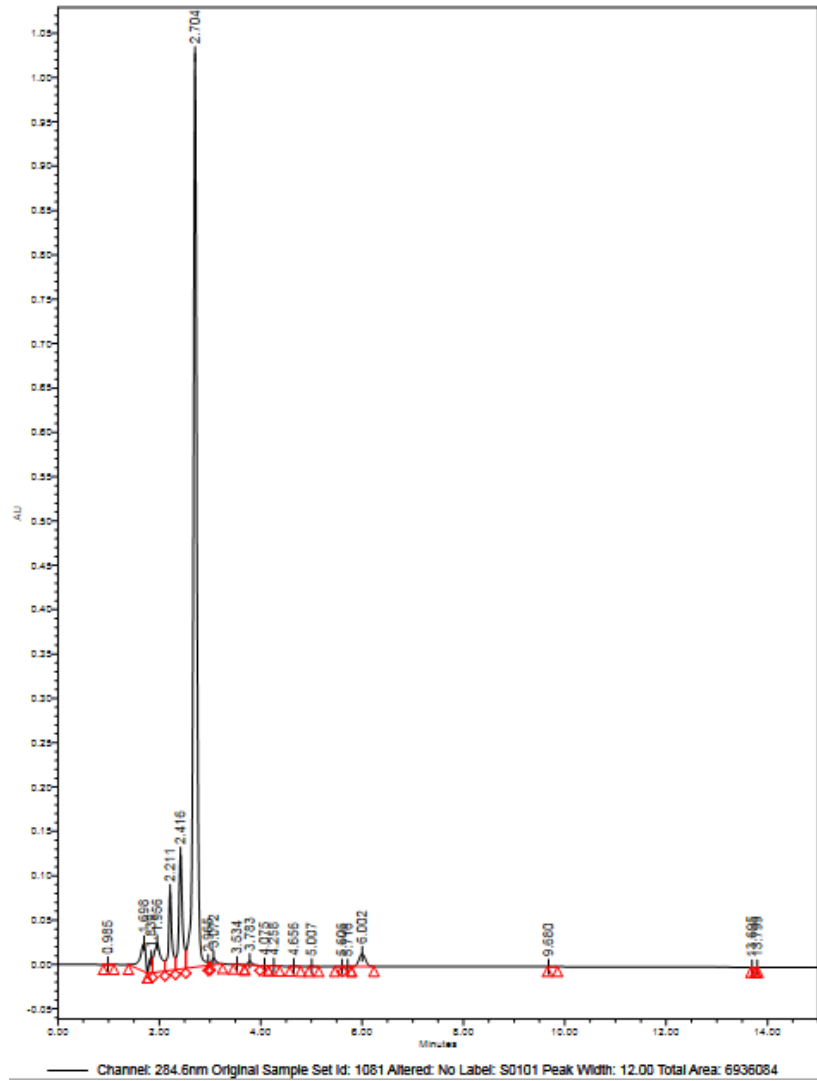
Experimento a pH 7.2 y 30 °C



Anexo 20. Experimento a pH 7.2 y 30 °C

Fuente: (Los autores, 2024)

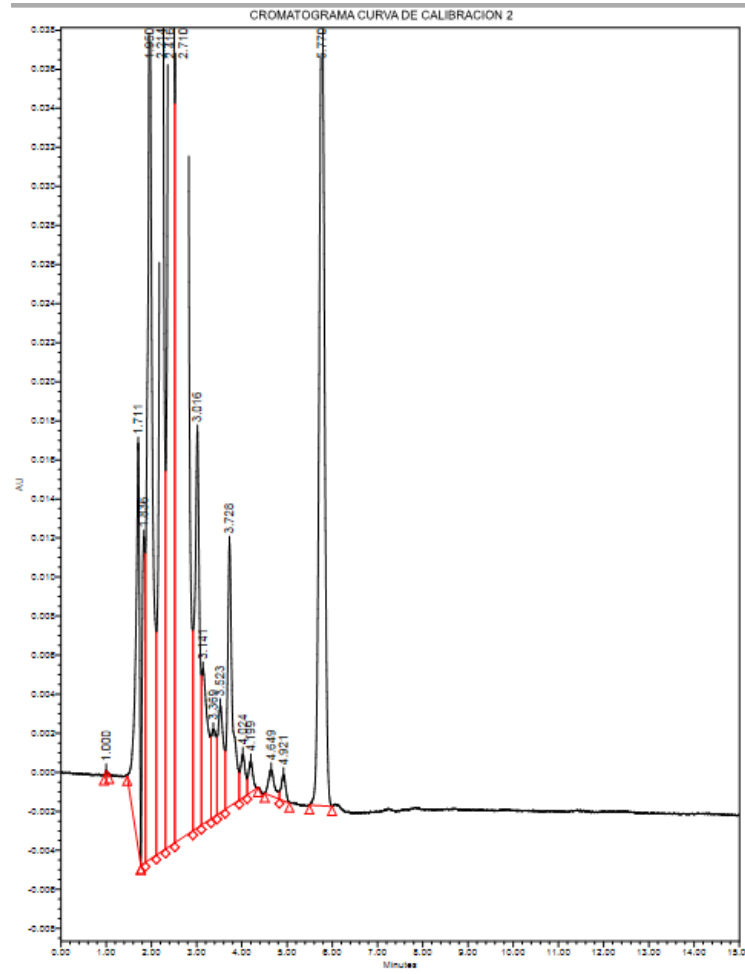
Cromatograma Estándar 1



Anexo 21. Cromatograma Estándar 1

Fuente: (Los autores, 2024)

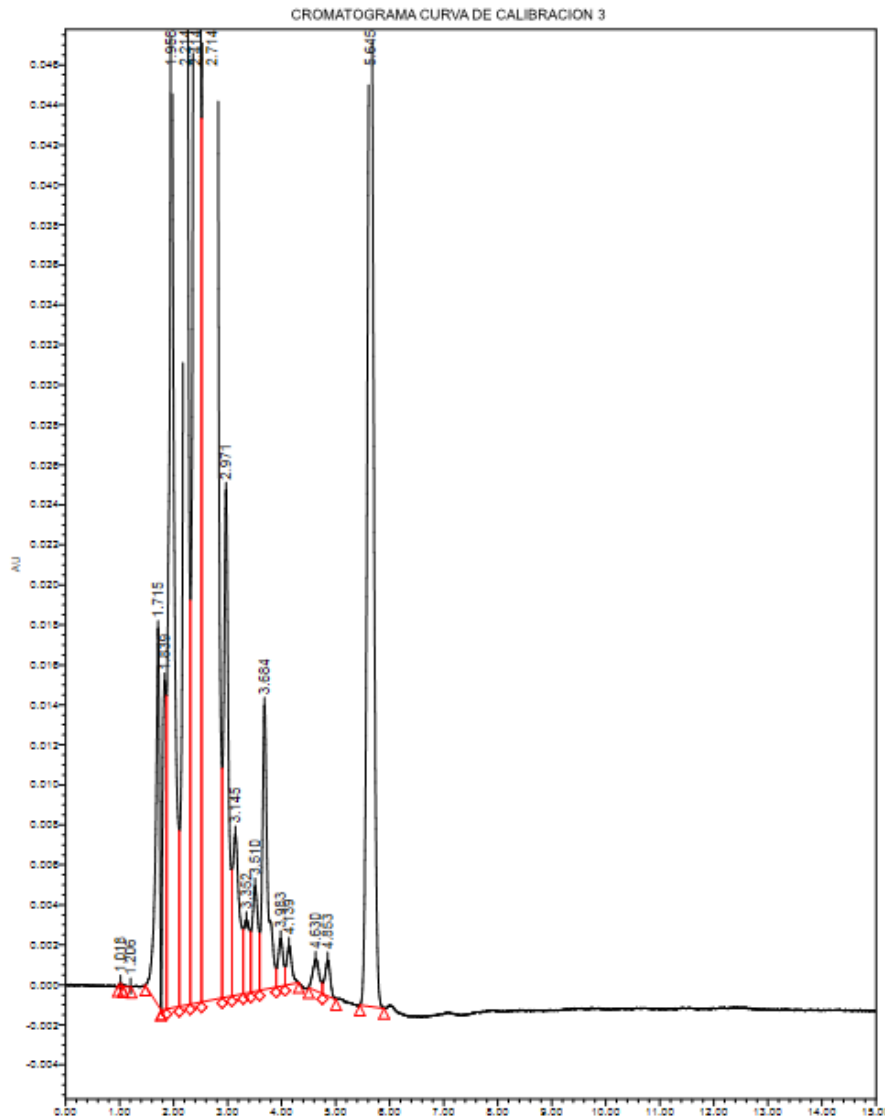
Cromatograma Estándar 2



Anexo 22. Cromatograma Estándar 2

Fuente: (Los autores, 2024)

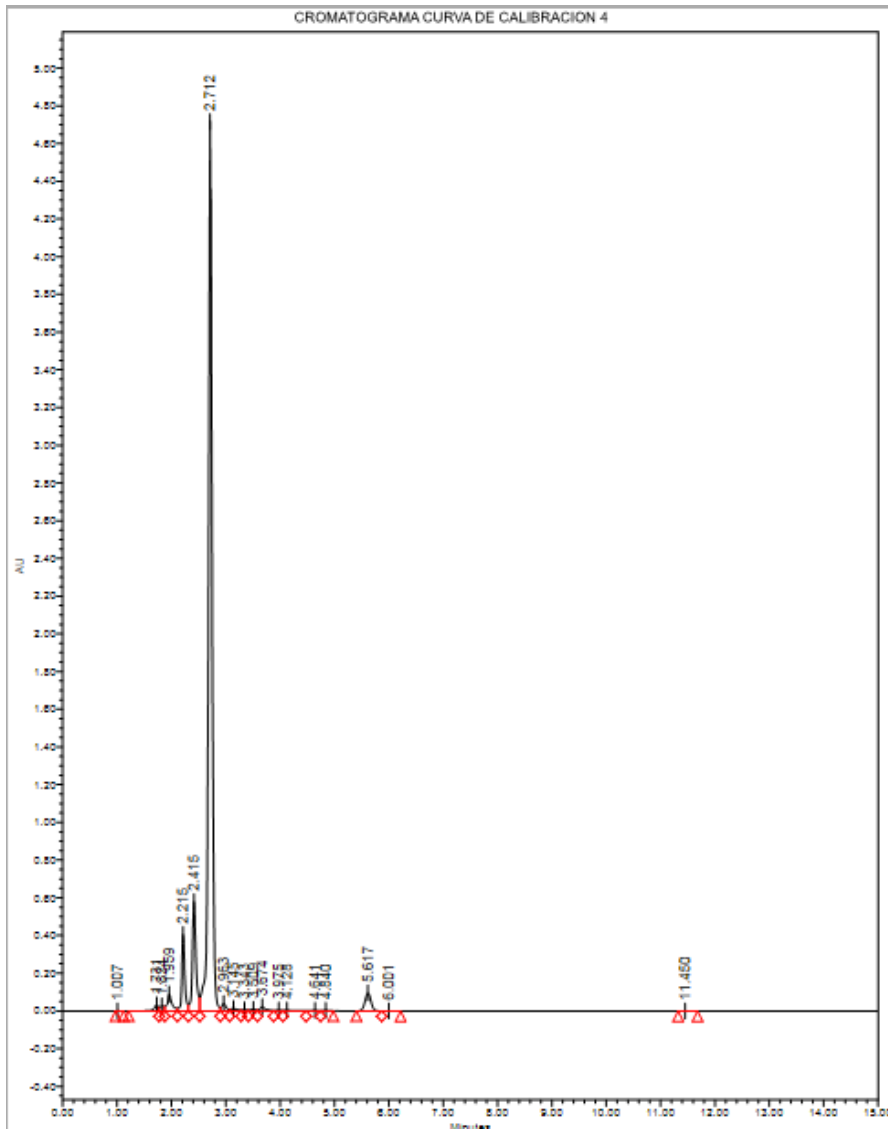
Cromatograma Estándar 3



Anexo 23. Cromatograma Estándar 3

Fuente: (Los autores, 2024)

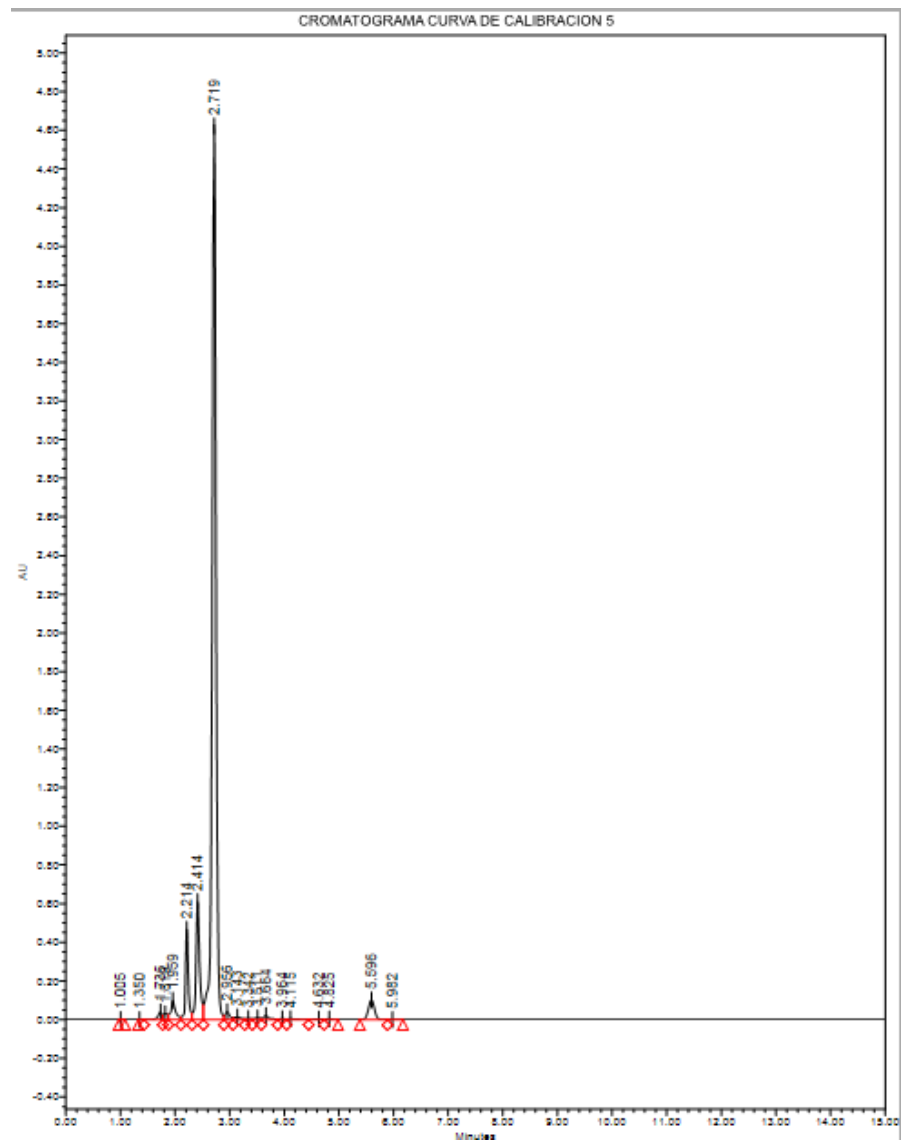
Cromatograma Estándar 4



Anexo 24. Cromatograma Estándar 4

Fuente: (Los autores, 2024)

Cromatograma Estándar 5



Anexo 25. Cromatograma Estándar 5
Fuente: (Los autores, 2024)