

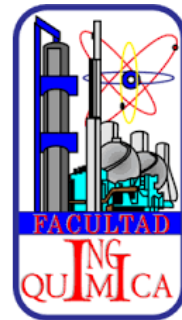


BUAP

Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla

Facultad de Ingeniería Química

Colegio de Ingeniería Ambiental



*Biodegradación de Estradiol y
Algostona mediante consorcios
bacterianos.*

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de licenciatura en:

INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA:

Sayra Guillen Reyna

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Carlos Mendoza Hernández

ÍNDICE GENERAL

Introducción	6
Planteamiento del problema	7
Justificación	8
Objetivos.....	9
Objetivo general:	9
Objetivos específicos	9
Hipótesis.....	10
CAPÍTULO I.....	10
1. Antecedentes.....	10
1.1 Contaminación del agua	10
1.2 Contaminantes emergentes.....	11
1.3 Las hormonas y el sistema endócrino.....	15
1.4 Estrógenos	15
1.5 Estradiol (E2).....	16
1.6 Algestona	18
1.7 Estradiol- Algestona.....	19
1.8 Presencia de estrógenos en el ambiente	20
1.9 Impacto de estrógenos en la salud y el ambiente	20
1.10 Tratamiento de hormonas en agua	22
1.11 Tratamiento microbiológico	24
1.15 Técnicas de análisis	26
1.15.1 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier.....	27
1.15.2 Espectroscopía FTIR-ATR	27
2. Metodología.....	28
2.1 Muestreo de aguas superficiales	28
2.2 Aislamiento de bacterias presentes en las aguas superficiales.....	29
2.3 Conservación de las cepas aisladas.....	29
2.4 Identificación de bacterias con capacidad de degradación de hormonas.....	29
2.5 Generación del inóculo	30
2.6 Ensayo con bacterias de forma individual.....	30

2.7	Formación de consorcios bacterianos.....	30
2.8	Ensayo con consorcios bacterianos.....	30
3	Resultados.....	32
3.1	Aislamiento de bacterias.....	32
3.2	Identificación de bacterias	33
3.3	Espectro de IR del estradiol-algestona	35
3.4	Resultados de las lecturas en el espectrofotómetro FTIR-ATR del ensayo con bacterias individuales en caldo LB	37
3.5	Resultados de las lecturas en el espectrofotómetro FTIR-ATR del ensayo con bacterias individuales en MMM.	44
3.6	Resultados de las lecturas en el espectrofotómetro FTIR-ATR del ensayo con consorcios bacterianos.....	51
	Discusión de resultados.....	53
	Conclusiones	56
	Referencias	57

ÍNDICE DE FIGURAS y GRÁFICOS

Fig. 1	Contaminantes medioambientales (Morales & Méndez, 2021).....	12
Figura 2.	Contaminantes emergentes presentes en el ambiente (Ramírez et. al,2015). ..	13
Fig. 3.	Estrógenos presentes en el ambiente (Ramírez et. al,2015).....	14
Fig. 4.	Estructura química del estradiol	17
Fig. 5.	Identificación de grupos funcionales en espectro de Infrarrojo del estradiol y algestona	37
Gráfica1.	Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Estradiol - Algestona mediante la cepa M2N 3.1 en caldo LB comparada con la hormona.....	38
Gráfica 2.	Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M2K 3.2 en caldo LB comparada con la hormona.	39
Gráfica 3.	Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M1K 2.1 en caldo LB comparada con la hormona.	39
Gráfica 4.	Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M2N 1.1 en caldo LB comparada con la hormona.....	40
Gráfica 5.	Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M1MC 3.1 en caldo LB comparada con la hormona.	40

Gráfica 6. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M1N 2.1 en caldo LB comparada con la hormona.....	41
Gráfica 7. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M3N 3.2 en caldo LB comparada con la hormona.....	41
Gráfica 8. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M1MC 1.1 en caldo LB comparada con la hormona.....	42
Gráfica 9. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M2 MC 1.1 en caldo LB comparada con la hormona.....	43
Gráfica 10. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M4 MC 3.1 en caldo LB comparada con la hormona.....	43
Gráfica 11. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M4N 3.2 en caldo LB comparada con la hormona.....	44
Gráfica 12. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M4N 2.2 en caldo LB comparada con la hormona.....	44
Gráfica 13. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa KM1 2.1 en MMM comparado con la hormona.....	45
Gráfica 14. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M4 N 2.2 en MMM comparado con la hormona.....	46
Gráfica 15. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa NM3 3.2 en MMM comparado con la hormona.....	46
Gráfica 17. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M1MC 3.1 en MMM comparado con la hormona.....	47
Gráfica 18. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M2MC 1.1 en MMM comparado con la hormona.....	48
Gráfica 19. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M4MC 3.1 en MMM comparado con la hormona.....	48
Gráfica 20. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M4N 3.2 en MMM comparado con la hormona.....	49
Gráfica 21. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa NM1 2.1 en MMM comparado con la hormona.....	49
Gráfica 22. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa NM2 3.1 en MMM comparado con la hormona.....	50
Gráfica 23. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa NM2 1.1 en MMM comparado con la hormona.....	50
Gráfica 24. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa KM2 3.2 en MMM comparado con la hormona.....	51
Gráfica 25. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de algestona-estradiol en MMM mediante los consorcios bacterianos comparado con la hormona.....	52

Gráfica 26. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de algestona -estradiol en caldo LB mediante los consorcios bacterianos comparado con la hormona. 53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura de las cepas aisladas.	32
Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas	33
Tabla 3. Identificación de las cepas.....	34
Tabla 4. Formación de consorcios.....	35

INTRODUCCIÓN

En el ambiente existen contaminantes llamados emergentes, cuya presencia no es nueva, pero si el interés por su control ya que la mayoría no se encuentran regulados en nuestro país. Estos contaminantes se encuentran conformados por una amplia categoría de compuestos como los farmacéuticos, productos de cuidado personal, nanomateriales y hormonas.

Las hormonas se consideran compuestos disruptores endócrinos (CDE), es decir, compuestos que interfieren en el funcionamiento normal de los procesos hormonales del sistema endócrino (Estrada, *et al.*,2013). Un ejemplo de estos compuestos son los estrógenos, que son hormonas producidas naturalmente por las mujeres durante su vida reproductiva, sin embargo, estos compuestos también existen en su forma sintética ya que se pueden encontrar también en medicamentos de tratamientos de infertilidad o reemplazo hormonal.

Debido a que todos los seres humanos deseamos hormonas como los estrógenos, por medio de las heces y la orina, este tipo de compuestos llegan al agua, y a través de la descarga de aguas residuales y residuos animales logran incorporarse al ambiente ya que las plantas de tratamiento actualmente instaladas no están diseñadas para la remoción de CDE, puesto que sólo están diseñadas para la remoción de materia orgánica y nutrientes (Estrada *et al.*, 2013).

Los CDE se caracterizan por estar en concentraciones de orden de micro y nanogramos, lo que hace difícil su detección y las bajas remociones de estos compuestos en las plantas de tratamiento se deben a que son recalcitrantes a la biodegradación, por lo que este tipo de compuestos encuentra acumulado en el ambiente desde hace ya varias décadas. El reto en la actualidad es encontrar alternativas viables para degradar estos compuestos de una manera segura antes de que puedan causar un daño irreversible en el ambiente y la salud pública (Ayala,2017).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación del agua es un problema a escala mundial y cada vez son más son más los contaminantes que se pueden encontrar en ella. Un estudio realizado por Ayala (2017) encontró que algunos de los contaminantes emergentes como las hormonas se mantienen en las mismas concentraciones en aguas industriales o de uso doméstico ya tratadas.

El problema es que aún en estas bajas concentraciones producen efectos adversos sobre los organismos; según Ayala (2017) pueden resultar en la feminización de peces, e incluso producir impacto transgeneracional, reiterando que son efectos que se presentan a largo plazo.

Además, estudios han demostrado que estos compuestos se acumulan en el ambiente ya que son difíciles de degradar. La situación es preocupante porque eso implica que se seguirán acumulando, y el reto ahora es averiguar cómo deshacerse de ellos y buscar alternativas para degradarlos (Ayala, 2017).

A ello se suma que en México se desconoce de qué tamaño es el problema; no ha habido un esfuerzo sistemático para determinar cuáles contaminantes emergentes se acumulan, dónde están presentes, o en qué concentraciones (Ayala, 2017).

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la detección de los contaminantes emergentes es de cada vez más común, y gracias a tecnologías avanzadas se han logrado detectar y cuantificar en diversas fuentes de agua. Los estrógenos se han encontrado tanto en aguas tratadas como superficiales. Las concentraciones que se han encontrado varían entre los ng/L a los µg/L, lo cual muestra el carácter persistente y no biodegradable (Ramírez *et al.*, 2015).

Su acumulación en el ambiente se debe a que los procesos un tren de tratamiento convencional de agua residual no están diseñados para remover ese tipo de contaminantes por lo que se vuelve indispensable buscar nuevas alternativas para poder contribuir a la eliminación de estos; dentro de estos encontramos a los métodos biológicos los cuales pueden ser más viables para la biodegradación de estos compuestos en comparación con los métodos fisicoquímicos, ya que presentan ventajas como sus bajos costos, alta efectividad, baja producción de residuos y además son respetuosos con el ambiente (Arnáiz *et al.*, 2000).

Debido a lo anterior una de las propuestas es el uso de microorganismos con capacidad de biodegradar estos contaminantes por medio de consorcios bacterianos.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar la biodegradación del estradiol\ algestona por medio de consorcios bacterianos.

Objetivos específicos

- Aislar bacterias del suelo con potencial de degradar hormonas (estradiol/ algestona)
- Determinar las cepas con capacidad de degradación de hormonas como el estradiol y la algestona
- Crear consorcios bacterianos que tengan efectos sinérgicos para la degradación de estradiol- algestona

- Analizar la biodegradación de estradiol algestona mediante consorcios microbianos por medio de espectrofotometría de IR.
- Realizar ensayos en condiciones variadas para poner a prueba la capacidad de biodegradación de cada consorcio.

HIPÓTESIS

El tratamiento biológico mediante el uso de cepas bacterianas específicas ya sea de manera individual o en consorcios microbianos resultara en la biodegradación del estradiol- algestona en aguas contaminadas con estas hormonas, por lo que podría ser usado como un sistema biotecnológico.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1 Contaminación del agua

La contaminación del agua puede ser definida como cualquier alteración en la composición física, química o biológica en las características esenciales del agua, la cual puede causar daños a todos los consumidores (Guadarrama *et al.*, 2016) volviéndose menos apta para el uso que se ha destinado (Armijio *et al.*, 2019).

El origen de la contaminación del agua puede ser natural o antropogénico, pero sin duda el segundo es el que más contribuye a este fenómeno, debido al crecimiento

poblacional y las actividades industriales y domésticas. Los principales agentes que contaminan el agua incluyen a organismos patógenos (bacterias, virus, parásitos), materia fecal, fertilizantes, pesticidas, fármacos, nutrientes (nitratos y fosfatos), plásticos y compuestos radiactivos (Iberdrola, 2023).

Desde hace algunos años se ha hecho presente el término de “contaminantes emergentes” que se refiere a compuestos que contaminan el agua de manera silenciosa y paulatina, debido a que años atrás no se contaban con métodos analíticos específicos para detectarlos; asimismo, cuando éstos fueron detectados no representaban un problema, considerando que las concentraciones en las que estaban presentes eran muy bajas y nadie imaginaba el impacto que podrían tener a largo plazo, sin embargo, hoy en día estas concentraciones han aumentado y con ello la preocupación de los efectos negativos que puedan representar al ambiente (Ramírez, *et al.*,2015).

1.2 Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes se definen como micro contaminantes de origen sintético o natural que en su mayoría no están regulados y además están asociados a la problemática ambiental. Son compuestos de alta persistencia y baja degradación en el medio ambiente; que pueden tener distinto origen y naturaleza química, por lo que han pasado desapercibidos, hasta hace poco. Sin embargo, estos contaminantes no son nuevos, han estado presentes en el medioambiente, pero no se les había dado la importancia necesaria ya que aún no eran evaluados y no se conocían sus efectos toxicológicos (Morales & Méndez, 2021).

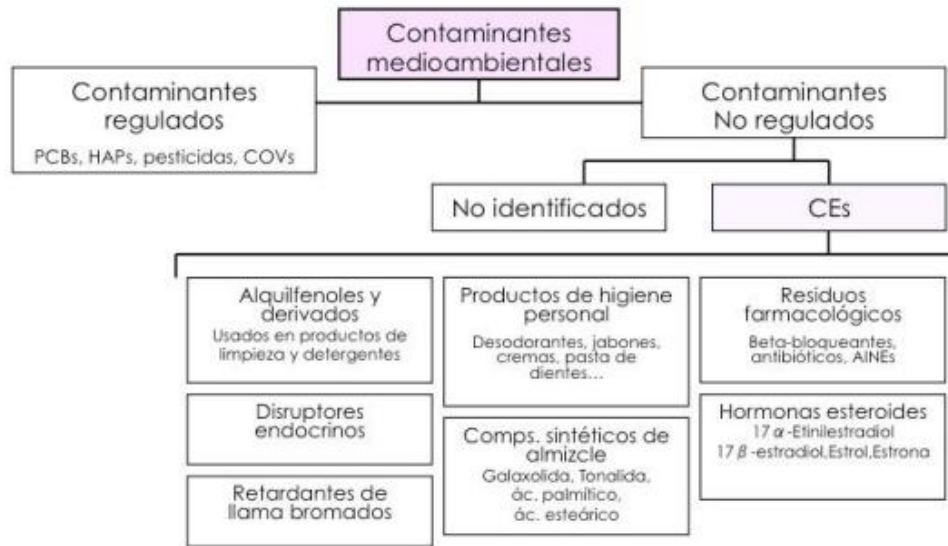


Fig. 1 Contaminantes medioambientales (Morales & Méndez, 2021).

Aunque no existe una lista oficial de contaminantes emergentes presentes en el medio ambiente, se han sugerido diversos contaminantes potencialmente significativos en México. Esta recopilación considera factores como los volúmenes

de uso, la relevancia para la salud pública, el interés por sus efectos toxicológicos y la prominencia científica por su mecanismo de acción (Ramírez *et al.*, 2015; EPA).

Grupo	Compuesto
Esteroides y hormonas	1. Estradiol 2. Testosterona 3. Estrona 4. α -etinilestradiol 5. β -etinilestradiol
Productos para el cuidado personal	6. Galaxolida 7. Tonalida y otros (PCP) 8. Triclosan (enjuague bucal) 9. Oxibenzona 10. DEET (repelente de insectos)
Industriales	11. Pentaclorofenol (PCP) 12. Nonifenoles 13. Bisfenol A 14. Compuestos organiestánicos (organotinas) 15. Butilbencilftalato (BuBeP)
Fármacos	17. Ácido mefenámico 18. Sulfasalazina 19. Ibuprofeno 20. Diclofenaco 21. Nimesulida 22. Ketoprofeno 23. Metil de ácido salicílico 24. Gemfibrozil 25. Ácido clofíbrico y metabolitos 26. Benzafibrate 27. Carbamacepina 28. Salvasartan 29. Metilprednisolona 30. Tadalafilo 31. Dexametasona 32. Clofenamina 33. Astemisol 34. Amlodipino 35. Diltiazem 36. Pentoxifilina 37. Avilamicina 38. Metoprol 39. Citrato de sildenafilo
Antibióticos	40. Sulfametoaxol 41. Trimetropina 42. Ciprofloxacino 43. Roxitromicina 44. Norfloxacino 45. Sulfadiazina 46. Cloranfenicol 47. Conazol 48. Imidazoles y triazoles 49. Sulfacloropiridazina

Figura 2.

Contaminantes emergentes presentes en el ambiente (Ramírez *et. al*,2015).

Estrógenos	Combinado	Marca de productos comerciales
Estradiol		Essventia, Estreva, Evorel, Oestrogel, Primogyn, Sandrena
Estradiol	Algestona	Patector, Patector N.F., Perlutal
	Ciproterona	Climene
	Dienogest	Qlaira
	Drospirenona	Angeliq
	Gestodeno	Avaden
	Hidroxiprogesterona	Gravidinona
	Medroxiprogesterona	Cyclofémina, Femydrol
	Noretisterona	Meslart, Cliane, Mesigyna
	Norgestrel	Progyluton
	Prasterona	Binodian Depot
	Progesteron	Gestrygen, Proger F.
	Testosterona	Despamen
	Trimegestona	Totelle
Estriol		Ovestin (crema, óvulos, tabletas)
Estriol	Progesterona	Florgynal
Etinilestradiol	Ciproterona	Diane
	Clormadinona	Belara 20, Belara
	Desogestrel	Mercilon, Novial, Marvelon
	Drospirenona	Ilimit, Radiance 20, Radiance, Yasmin 24/4, Yasmin
	Etonogestrel	Nuvaring
	Gestodeno	Gynovin, Minesse
	Levonorgestrel	Microgynon, Neogynon, Nordet, Triquilar
	Norelgestromina	Evra
Mestranol	Clormadinona	Lutorial E, Secuentex 21
	Noretisterona	Norinyl 1, Norinyl 28

Fig. 3. Estrógenos presentes en el ambiente (Ramírez et. al,2015).

Los contaminantes emergentes más destacados que están presentes en el agua son los fármacos, compuestos per fluorados, hormonas, drogas y productos de cuidado e higiene personal. Las hormonas, en especial han llamado la atención de los investigadores ya que tienen la capacidad de alterar el sistema endócrino de los animales y causar daños en el ambiente (IMTA, 2018).

1.3 Las hormonas y el sistema endócrino

El sistema endocrino es el conjunto de órganos y tejidos del organismo que liberan un tipo de sustancias llamado hormonas, las cuales utiliza para controlar y coordinar el metabolismo interno del cuerpo (homeostasis), el nivel de energía, la reproducción, el crecimiento y desarrollo, y la respuesta a lesiones, estrés y factores ambientales (NHI, 2020).

Las hormonas actúan como mensajeros químicos del cuerpo, viajando por el torrente sanguíneo para llegar a diversos tejidos y órganos. Dentro de los tipos de hormonas que son controladas por el sistema endócrino están las que regulan el crecimiento y desarrollo metabólico, la función sexual, reproducción y el estado de ánimo (NHI, 2020) .Las hormonas que regulan las funciones sexuales tienen múltiples funciones en el ciclo reproductivo en los humanos. En general, estas hormonas son las responsables de la aparición de los caracteres sexuales secundarios en la pubertad y, posteriormente, se encargan de regular todo el ciclo reproductivo.

Las hormonas sexuales se encuentran en ambos sexos, pero en concentraciones diferentes tanto en hombres como en mujeres. Los andrógenos son hormonas sexuales típicas masculinas, mientras que los estrógenos son hormonas sexuales típicas femeninas (Santiago, Trolice, Barranquero, & Salvador, 2022).

1.4Estrógenos

Los estrógenos son producidos de manera natural por los organismos. La función principal de los estrógenos en el cuerpo es regular el desarrollo, mantenimiento y

función del sistema reproductor en ambos géneros. En los humanos se producen tanto en las mujeres como en hombres, pero en diferentes cantidades, siendo las mujeres las que los producen y utilizan en mayor cantidad (Hileman, 1994).

Las mujeres producen hormonas sexuales femeninas, principalmente estrógenos y progesterona. Los estrógenos (estradiol, estrona y estriol) son principalmente producidos por los ovarios. Son hormonas esteroideas, responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en mujeres a partir de la pubertad.

Las principales hormonas esteroideas sexuales son el estradiol, progesterona y testosterona, siendo el estradiol el de mayor importancia (Dimogerontas & Liapi, 2014).

1.5 Estradiol (E2)

El estradiol, la hormona sexual femenina más crucial, se produce principalmente en los ovarios junto con la progesterona. Sin embargo, también está presente en pequeñas cantidades en las glándulas suprarrenales, junto con la testosterona. La producción de estradiol es un proceso complejo que está regulado por otras dos hormonas: la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que se producen en la hipófisis. Cuando el nivel de estradiol es suficiente, se inhibe la producción de FSH y LH para evitar un exceso (MAPFRE, 2023).

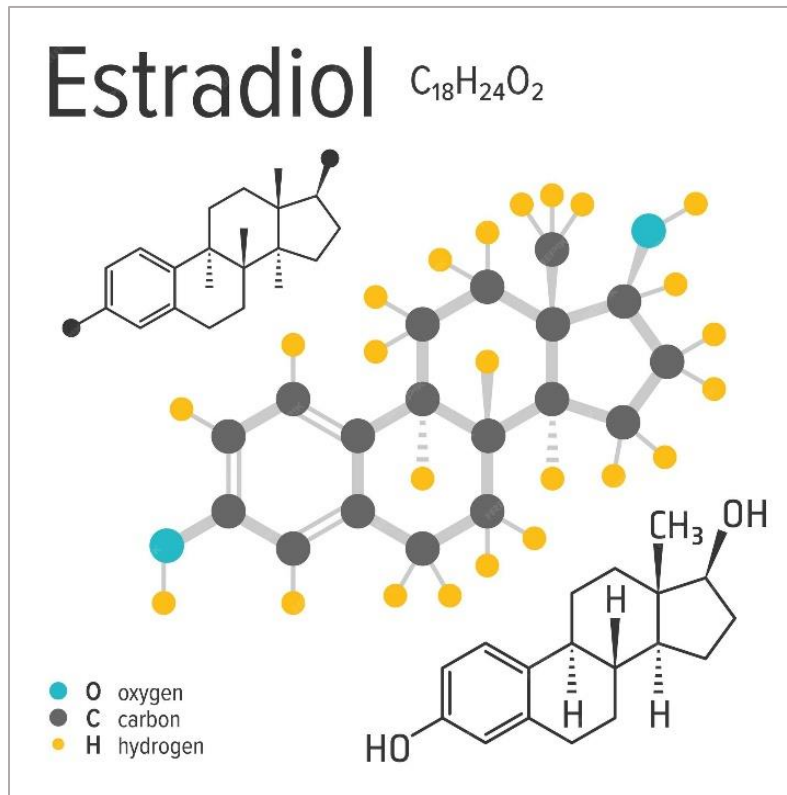


Fig. 4. Estructura química del estradiol

El estradiol es una hormona esteroide que pertenece a la familia de los estrógenos y es una forma específica de estrógeno. El estradiol tiene varios grupos funcionales en su estructura molecular que se enlistan a continuación:

- Anillo esteroide: El estradiol, como una hormona esteroide, tiene una estructura básica de anillo esteroide. Este anillo consiste en tres anillos de seis átomos de carbono fusionados.
- Grupo hidroxilo (-OH): El estradiol tiene varios grupos hidroxilo (-OH) en su estructura. Estos grupos hidroxilo son características importantes de los compuestos estrogénicos y pueden estar presentes en varias posiciones dentro de la molécula.

- Grupo cetona (C=O): Hay un grupo cetona en la estructura del estradiol, que se encuentra en una posición específica del anillo esteroide.
- Doble enlace: La molécula de estradiol contiene varios dobles enlaces, que son características comunes de los compuestos esteroides.

La fórmula química del estradiol es $C_{18}H_{24}O_2$, y su estructura detallada implica una disposición específica de los átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno en la molécula. Estos grupos funcionales contribuyen a las propiedades y funciones biológicas del estradiol como una hormona estrogénica en el cuerpo humano.

El 17α -etinilestradiol es uno de los estrógenos más potentes que se encuentran en las aguas superficiales. Este compuesto, junto con otros estrógenos naturales, está presente en las aguas residuales en concentraciones de hasta 27 nanogramos por litro (Estrada y Arriaga, 2012). Incluso concentraciones traza tan bajas como seis nanogramos por litro pueden terminar con las poblaciones de peces (Kidd *et al.*, 2007).

1.6 Algestona

La algestona es un progestágeno sintético utilizado en algunos anticonceptivos y tratamientos hormonales. Su estructura química incluye varios grupos funcionales como los que se mencionan a continuación:

- Anillo esteroide: La algestona, al igual que muchos progestágenos, tiene una estructura básica de anillo esteroide. Este anillo consiste en tres anillos de seis átomos de carbono fusionados.

- Grupo cetona (C=O): Hay un grupo cetona en la estructura de la algestona, que es característico de los compuestos esteroides.
- Grupos metilo (CH₃): La algestona tiene varios grupos metilo en su estructura. Estos grupos metilo están unidos a varios átomos de carbono en el anillo esteroide.
- Grupo alquilo: Además de los grupos metilo, la algestona contiene una cadena alquílica en su estructura.
- Grupos funcionales oxigenados: Se pueden encontrar grupos oxigenados en la estructura, como el grupo hidroxilo (-OH).

La fórmula química de la algestona es C₂₉H₃₆O₃, y su estructura molecular detallada implica una disposición específica de átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno en la molécula. Estos grupos funcionales contribuyen a las propiedades y funciones biológicas de la algestona como un progestágeno en el cuerpo.

1.7 Estradiol- Algestona

La algestona junto al estradiol son un fármaco que se utiliza como método de anticoncepción, se usa para prevenir el embarazo y también para regular los ciclos menstruales.

La algestona y el estradiol son hormonas que en conjunto producen anovulación, es decir, evitan que el óvulo sea expulsado de los ovarios cada mes, situación que ocurre generalmente el día 14 del ciclo menstrual de la mujer.

1.8 Presencia de estrógenos en el ambiente

La presencia de los estrógenos en el ambiente puede ser de origen natural o antropogénico. Una fuente natural es la excreción diaria de los seres humanos de los diferentes estrógenos (estradiol, la estrona y el estriol). La cantidad que los seres humanos expulsan de estos compuestos varía en hombres y mujeres, se calcula que en los hombres la excreción diaria de estradiol, estrona y estriol es de 1.6, 3.9, 1.5 μg , respectivamente, en el caso de las mujeres es de 3.5, 8, 4.8 μg , respectivamente; en mujeres embarazadas, la excreción diaria de estriol llega hasta 6 000 μg (Petrovic, *et al.*, 2008).

Como fuente antropogénica, la concentración de los estrógenos en el ambiente puede estar relacionada con las cantidades producidas y utilizadas en terapias hormonales tanto para seres humanos como para ganado y animales domésticos. Por ejemplo, Petrovic *et al.* (2008) reportan que las mujeres que toman anticonceptivos basados en etinilestradiol excretan 35 μg (1.75%) de este estrógeno sintético cada día.

1.9 Impacto de estrógenos en la salud y el ambiente

De manera natural los estrógenos están presentes tanto en vertebrados como en invertebrados, no obstante, se ha determinado que cuando los seres humanos y la fauna se exponen a concentraciones de estrógenos mayores a las que produce normalmente un organismo, se producen efectos adversos que repercuten en su sistema endócrino (Ramírez *et al.*, 2015).

Los estrógenos pueden tener efectos en diferentes aspectos y receptores, a continuación, se describen algunos de ellos.

En los últimos tiempos, ha aumentado la preocupación por los efectos de los estrógenos naturales y semisintéticos. Esto se debe a los casos de cáncer en mujeres que se sometieron a terapia hormonal sustitutiva o utilizaron anticonceptivos, así como a los casos de feminización de peces en los ríos (Ramírez *et al.*, 2015).

- *Efectos a nivel celular*

En los seres humanos, los niveles anormales de estrógenos pueden aumentar el riesgo de cáncer de mama, útero y testículos (Cavaliere *et al.*, 2000; Dimogerontas y Liapi, 2014). Los efectos biológicos se producen cuando un receptor hormonal, unido a un estrógeno o a un disruptor endocrino, se une a regiones específicas del ADN en el núcleo celular (Hileman, 1994), o durante el metabolismo de los estrógenos.

Cavaliere *et al.* (2000) descubrieron que el estradiol, la estrona y el dietilestilbestrol provocan errores cromosómicos y mutaciones genéticas tanto *in vitro* como *in vivo* en animales. Esto ocurre debido a la producción de especies reactivas de oxígeno durante el metabolismo de los estrógenos. Explican que las quinonas intermedias derivadas de la oxidación del 4-hidroxiestradiol o la 4-hidroxiestrona pueden reaccionar con las purinas (adenina y guanina) del ADN para formar sitios mutagénicos.

En 2002, el Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos (2011) confirmó que el 17- β -estradiol, la estrona, el 17 α -etinilestradiol y el mestranol son potencialmente cancerígenos y según estudios epidemiológicos realizados en humanos, la utilización de estrógenos por mujeres posmenopáusicas y su uso como anticonceptivos se asocia a un mayor riesgo de cáncer de mama (Ramírez *et al.*, 2015).

La flora y fauna están expuestas a los estrógenos cuando se incorporan al ambiente por descargas de agua residual municipal, efluentes de plantas de tratamiento o por escurrimientos con desechos de la ganadería y otras actividades pecuarias. (Ramírez, *et al.*, 2015).

Debido a todos los efectos que pueden llegar a tener los estrógenos en los diferentes campos, su presencia en el ambiente representa un riesgo ambiental y de salud pública ya que tiene un alto potencial de persistir en los ecosistemas, y producir acumulación y toxicidad para los seres vivos (Ramírez *et al.*, 2015).

Uno de los estrógenos que mayor impacto ha tenido en el ambiente es el estradiol, ya que es un compuesto persistente que se ha estado acumulando desde hace ya varias décadas y que además es difícil de degradar.

1.10 Tratamiento de hormonas en agua

Se han encontrado estrógenos como la estrona (E1), 1 β -estradiol (E2), estriol (E3) y 17 α -etinilestradiol (EE2) en el agua, los cuales se encuentran en las aguas residuales no tratadas y tratadas en concentraciones entre 1 y 400 ngL⁻¹ (Jürgens *et al.*, 2002).

Las plantas de tratamiento convencionales no se diseñaron para eliminar o descomponer contaminantes emergentes como los estrógenos. Como resultado, los efluentes de estas plantas contienen cantidades significativas de estas sustancias, que se vierten y acumulan en el medio ambiente (Ramírez, 2015)

Los tratamientos que se han utilizado para la remoción de estrógenos en agua se clasifican en procesos físicos, biológicos y avanzados de oxidación (Ramírez, *et al.*, 2015).

- **Físicos:** adsorción (carbón activado, carbón activado granular, resinas de intercambio iónico, quitina, quitosán, polímeros impresos molecularmente, hidróxido doble laminar Mg-Al y nanotubos de carbono, lodos activados) y filtración por membranas (ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa, destilación de contacto directo con membranas y microfiltración de fibra hueca) (Ramírez, *et al.*, 2015).
- **Biológicos:** aerobios (lodos activados, filtro percolador, biorreactor de membranas y sistemas de reactor de lecho fijo), nitrificación, anaerobios, microalgas (*Selenastrum*, *Ankistrodesmu*, *Lemna*, *Anabaena*, *Chlorococcus*, *Spirulina*, *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Anaebena*) y sistemas de tratamiento enzimáticos (ligninolíticas, lacasa, peroxidasa de rábano) y microorganismos aislados (*Fusarium proliferatum*) (Ramírez, *et al.*, 2015).
- **Procesos avanzados de oxidación:** fotólisis (UVC, UVB, UVA-visible, solar, fotosensibilizado), fotocatalisis heterogénea (dióxido de titanio, óxido de cinc, sulfuro de cinc, óxido férrico, silicio, óxido de estaño y sulfuro de cadmio, entre otros), oxidantes fuertes (ferrato, ozono, ácido hipocloroso, dióxido de

cloro, óxido de manganeso, hierro-tetraamidomacrocíclico), combinación de oxidantes fuertes con radiación ultravioleta (UV-peróxido de hidrógeno, foto-Fenton, resina cubierta con reactivo Fenton) y sonólisis (20-1000 kHz) (Ramírez, *et al.*, 2015).

1.11 Tratamiento microbiológico

Como su nombre indica, los tratamientos biológicos de aguas residuales se basan en el empleo de microorganismos, fundamentalmente bacterias, para la depuración de las mismas (Arnáiz, *et al.* 2000).

Las bacterias pueden biodegradar contaminantes como las hormonas, estas las descomponen en productos más simples y menos activos.

1.12 Biorremediación

La biorremediación es una técnica que utiliza organismos vivos como hongos, bacterias planta y algas para eliminar, descomponer o modificar contaminantes y mitigar su impacto en el suelo, el agua y el aire. (DCSBA, s.f.) Esto quiere decir que muchos de los microorganismos que viven en el ambiente son capaces de metabolizar algunos compuestos químicos que son tóxicos para la naturaleza (Iturbe, 2010).

Para garantizar la eficacia de la biorremediación, los microorganismos deben utilizar su actividad enzimática sobre los contaminantes y transformarlos en productos que

no sean peligrosos. Este proceso sólo puede ser exitoso cuando las condiciones del ambiente permiten el crecimiento y la actividad microbiana, lo que usualmente requiere de la manipulación de los parámetros ambientales para facilitar su crecimiento (DCSBA, s.f.). Algunos factores importantes a considerar para que la biorremediación se lleve a cabo de manera eficiente son agua, temperatura, pH, oxígeno, macro y micronutrientes. (Iturbe, 2010)

Las técnicas de biorremediación suelen ser más rentables que los métodos tradicionales, como la incineración, y algunos contaminantes pueden tratarse *in situ*, reduciendo los riesgos de exposición al limpiar lugares contaminados. (DCSBA, s.f.)

Las hormonas, a pesar de ser contaminantes difíciles de eliminar del ambiente, se pueden biodegradar por medio del uso de bacterias con capacidad metabólica específica para estos compuestos.

1.13 Biodegradación

La biodegradación es un proceso natural mediante el cual los microorganismos, como bacterias y hongos, descomponen sustancias orgánicas complejas en productos más simples. Este proceso puede ocurrir de forma natural en la naturaleza y es esencial para el ciclo de nutrientes. En el contexto de la biorremediación, la biodegradación se utiliza para descomponer contaminantes en el suelo, agua u otros medios, convirtiéndolos en compuestos menos tóxicos

o inofensivos. La velocidad y eficacia de la biodegradación pueden mejorarse mediante técnicas como la bioestimulación y la bioaumentación. (Torres, 2003)

1.14 Biodegradación de hormonas por medio de bacterias

La biodegradación de hormonas por medio de bacterias es un proceso en el que las bacterias descomponen y degradan las hormonas presentes en el medio ambiente. Las hormonas pueden encontrarse en fuentes variadas, como las aguas residuales, los cuerpos de agua y otros entornos naturales.

Las bacterias son capaces de degradar las hormonas porque estas son compuestos orgánicos y los microorganismos tienen la capacidad de metabolizar y descomponer materiales orgánicos. Dicha degradación se realiza mediante una serie de reacciones bioquímicas que convierten los compuestos de hormonas en formas menos activas y menos tóxicas. (Torres, 2003)

Existen varios tipos de bacterias que pueden degradar hormonas, incluyendo algunas cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Comamonas*. Estos microorganismos son capaces de degradar diferentes tipos de hormonas, incluyendo estrógenos, andrógenos y progestágenos.

1.15 Técnicas de análisis

Las técnicas para la determinación de hormonas se basan fundamentalmente en espectroscopia de IR y cromatografía de líquidos de alta eficacia.

1.15.1 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja (IR) se fundamenta en el hecho de que casi todas las moléculas absorben la luz en la región infrarroja del espectro electromagnético y la convierten en vibración molecular. La absorción de la luz es característica de la naturaleza de los enlaces químicos presentes en una muestra analizada. (BRUKER, 2023). La absorción se mide como una función de longitud de onda (como números de onda, típicamente de $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$) con un equipo llamado espectrómetro. El resultado que se obtiene de un análisis de espectroscopía de infrarrojo es un espectro de infrarrojo que sirve como una característica "huella digital molecular" que se puede utilizar para identificar muestras orgánicas e inorgánicas. La espectroscopia ATR FT-IR ha superado a muchas otras técnicas de muestreo, ya que en su mayoría es no destructiva, muy fácil de aplicar y adecuada para analizar sólidos y líquidos en su estado normal (BRUKER, 2023).

1.15.2 Espectroscopía FTIR-ATR

La espectroscopía FT-IR es ampliamente utilizada en síntesis orgánica, ciencia de polímeros, ingeniería petroquímica, industria farmacéutica y análisis de alimentos y estimación de contaminantes atmosféricos provenientes de los procesos industriales (UNAM, 2022).

La Espectroscopia Infrarroja (IR) permite identificar grupos funcionales en muestras sólidas y líquidas, en la región de 4000 a 400 cm^{-1} . Al contar con el accesorio de Reflectancia Total Atenuada (ATR) nos permite obtener espectros infrarrojos de muestras sin ningún tipo de preparación, por lo que es posible analizar sólidos de baja solubilidad, películas, fibras, geles, pastas, adhesivos y polvos. (UNAM, 2022)

El equipo con el cual se realizan las muestras es el Spectrum Two de Perkin-Elmer, una de las ventajas de trabajar con este equipo es que se requiere poca cantidad de muestra para realizar el análisis y se puede trabajar con compuestos orgánicos e inorgánicos (UNAM, 2022).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Muestreo de aguas superficiales

Se obtuvieron cuatro muestras de agua de diferentes ríos y un lago de la ciudad de Puebla. Las muestras fueron tomadas del lago de C.U. BUAP con coordenadas 19°00'16.2" N, 98°12'20.6" W; el río Atoyac en dos puntos diferentes con

coordenadas 18°57'04.4" N, 98°16'12.7" W y 19°01'18.0" N, 98°13'42.5" W; el río Zapatero con coordenadas 19°03'08.5" N, 98°25'43.14" W. Las muestras se tomaron de acuerdo con la norma PROY-NMX-AA-003-SCFI-2009 y fueron almacenadas a 4° C para su correcto uso y manejo.

2.2 Aislamiento de bacterias presentes en las aguas superficiales

Para el aislamiento de las bacterias presentes en las muestras de agua se prepararon 4 matraces con caldo Luria Bertani (LB) y se adicionó 3 ml de muestra de agua con hormonas (estradiol-algestona) en una concentración de 0.5 mg/mL y 7.5 mg/mL respectivamente, incubándose a 30°C durante 48 horas. Posteriormente se sembraron y aislaron en placas con medios selectivos Mc Conkey y agar King A y no selectivos, agar nutritivo.

2.3 Conservación de las cepas aisladas

Para conservar las cepas hasta que estas sean usadas, las bacterias se propagan en Caldo Luria Bertani (LB) durante 48h a 30°C, posteriormente se centrifugaron a 11 000 rpm durante 15 minutos. El pelet se resuspendió en caldo LB y se mantuvieron a 4°C.

2.4 Identificación de bacterias con capacidad de degradación de hormonas

La identificación de las bacterias se realizó mediante las pruebas bioquímicas: movilidad, indol y ornitina (MIO), agar de hierro y lisina (LIA), agar Hierro de Kligler (KIA), agar citrato de Simmons, Urea, rojo de metilo (RM) y Voges Proskauer (VP) (Koneman,2003).

2.5 Generación del inóculo

Para la generación del inóculo las cepas se propagaron en caldo LB, durante 48 h a 30°C, posteriormente se centrifugaron a 11 000 rpm durante 8 minutos, se separó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio mínimo mineral (MMM), ajustándose a 0.5 A, a 600nm que equivale aproximadamente a 1×10^9 UFC/mL.

2.6 Ensayo con bacterias de forma individual

Una vez preparado el inóculo se hicieron ensayos individuales para identificar la eficacia de cada una de las cepas, se realizaron dos ensayos con 1 ml uno con caldo LB y otro con MMM, conteniendo estradiol- agostona a una concentración de 1 mg/ml y 15 mg/ml respectivamente, inoculándose con 100 microlitros de bacteria incubándose por 6 días a 30°C. Pasado el tiempo del ensayo de biodegradación las muestras fueron centrifugadas a 11 000 rpm, durante 8 min; se separó el sobrenadante y se leyó en el espectrofotómetro FTIR-ATR.

2.7 Formación de consorcios bacterianos

De las doce cepas aisladas, se formaron tres consorcios de cuatro cepas cada uno. La formación de estos se realizó al azar procurando que cada uno tuviera cepas de diferente género.

2.8 Ensayo con consorcios bacterianos

Una vez preparado el inóculo se hicieron ensayos con los consorcios microbianos formados, para identificar la eficacia de cada una de las cepas, se realizaron dos ensayos con 0.5 ml uno con caldo LB y otro con MMM, conteniendo estradiol- agostona a una concentración de 1 mg/ml y 15 mg/ml respectivamente,

inoculándose con 50 microlitros del consorcio microbiano (12.5 µl de cada cepa) y se incubó por 6 días a 30°C. Después de 7 días las muestras fueron centrifugadas a 11 000 rpm, durante 8 min; se separó el sobrenadante y se leyó en el espectrofotómetro FTIR-ATR.

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS

3.1 Aislamiento de bacterias

Se aislaron un total de 12 cepas que mostraron capacidad para interactuar en el medio con hormona.

Las 12 cepas aisladas se designaron con la siguiente nomenclatura:

Tabla 1. Nomenclatura de las cepas aisladas.

Cepa 1	M3N 3.2
Cepa 2	M1MC1.1
Cepa 3	M1MC3.1
Cepa 4	M2MC1.1
Cepa 5	M4MC3.1
Cepa 6	M4N3.2
Cepa 7	M4N2.2
Cepa 8	M2N 3.1
Cepa 9	M2 N1.1
Cepa 10	M2K 3.2
Cepa 11	M1N 2.1
Cepa 12	M1K 2.1

Para la nomenclatura asignada, la primera parte corresponde al número de la muestra de la que fueron aisladas (M1: muestra 1, M2: muestra 2, M3: muestra 3 y M4: muestra 4); la segunda parte corresponde al medio en donde fueron sembradas (N:nutritivo, MC: mac conkey y K: king) y la parte final corresponde al número de placa y número de cepa aislada de cada medio.

3.2 Identificación de bacterias

Las bacterias con capacidad para degradar las hormonas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas cuyos resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas

Cepa	CIT	KIA			LIA		M	I	O	Urea	RM	VP
		Gas	H ₂ S	A/A, Alc/A	H ₂ S							
M3N 3.2	+	-	+	A/A	+	+	-	+	+	+	+	-
M1MC1.1	+	-	+	A/A	-	-	-	-	-	+	+	+
M1MC3.1	+	-	-	A/A	+	-	+	-	-	+	+	-
M2MC1.1	+	-	-	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-
M4MC3.1	-	-	-	A/A	-	-	+	-	+	+	+	-
M4N3.2	-	+	-	A/A	-	-	+	-	+	+	+	-
M4N2.2	-	-	-	A/A	-	+	+	-	+	-	+	-
M2N 3.1	+	-	-	A/A	+	+	-	-	+	+	+	-
NM2 1.1	+	-	-	A/A	-	-	-	-	-	+	+	-
KM2 3.2	+	++	-	A/A	+	+	+	-	-	-	+	-
NM1 2.1	+	-	-	A/A	-	+	+	-	+	+	-	+
KM1 2.1	+	-	-	A/A	-	-	-	-	+	+	+	-

(CIT:citrato, KIA: agar Hierro de kligler, LIA: agar de hierro y lisina, M: movilidad, I: indol, O: Ornitina, RM: rojo de metilo VP: Voges Proskauer, Gas: Producción de gas, H₂S: Producción de ácido sulfhídrico, A/A: Medio ácido/ ácido, Alc/A: medio alcalino/ácido).

Tabla 3. Identificación de las cepas

Cepa	Identificación
M3N 3.2	<i>Citrobacter freundii</i>
M1MC 1.1	<i>Citrobacter freundii</i>
M1MC 3.1	<i>Citrobacter freundii</i>
M2MC 1.1	<i>Pantoea agglomerans</i>
M4MC 3.1	<i>Pantoea agglomerans</i>
M4N 3.2	<i>Escherichia coli</i>
M4N 2.2	<i>Pantoea agglomerans</i>
M2N 3.1	<i>Citrobacter freundii</i>
M2N 1.1	<i>Pantoea agglomerans</i>
M2K 3.2	<i>Klebsiellae pneumoniae</i>
M1N 2.1	<i>Pantoea agglomerans</i>
M1K 2.1	<i>Pantoea agglomerans</i>

Tabla 4. Formación de consorcios

	Cepa	Identificación
C1	MN3 3.2	<i>Citrobacter freundii</i>
	M1MC1.1	<i>Citrobacter freundii</i>
	M1MC3.1	<i>Citrobacter freundii</i>
	M2MC1.1	<i>Pantoea agglomerans</i>
C2	M4MC3.1	<i>Pantoea agglomerans</i>
	M4N3.2	<i>Escherichia coli</i>
	M4N2.2	<i>Pantoea agglomerans</i>
	NM2 3.1	<i>Citrobacter freundii</i>
C3	NM2 1.1	<i>Pantoea agglomerans</i>
	KM2 3.2	<i>Klebsiellae pneumoniae</i>
	NM1 2.1	<i>Pantoea agglomerans</i>
	KM1 2.1	<i>Pantoea agglomerans</i>

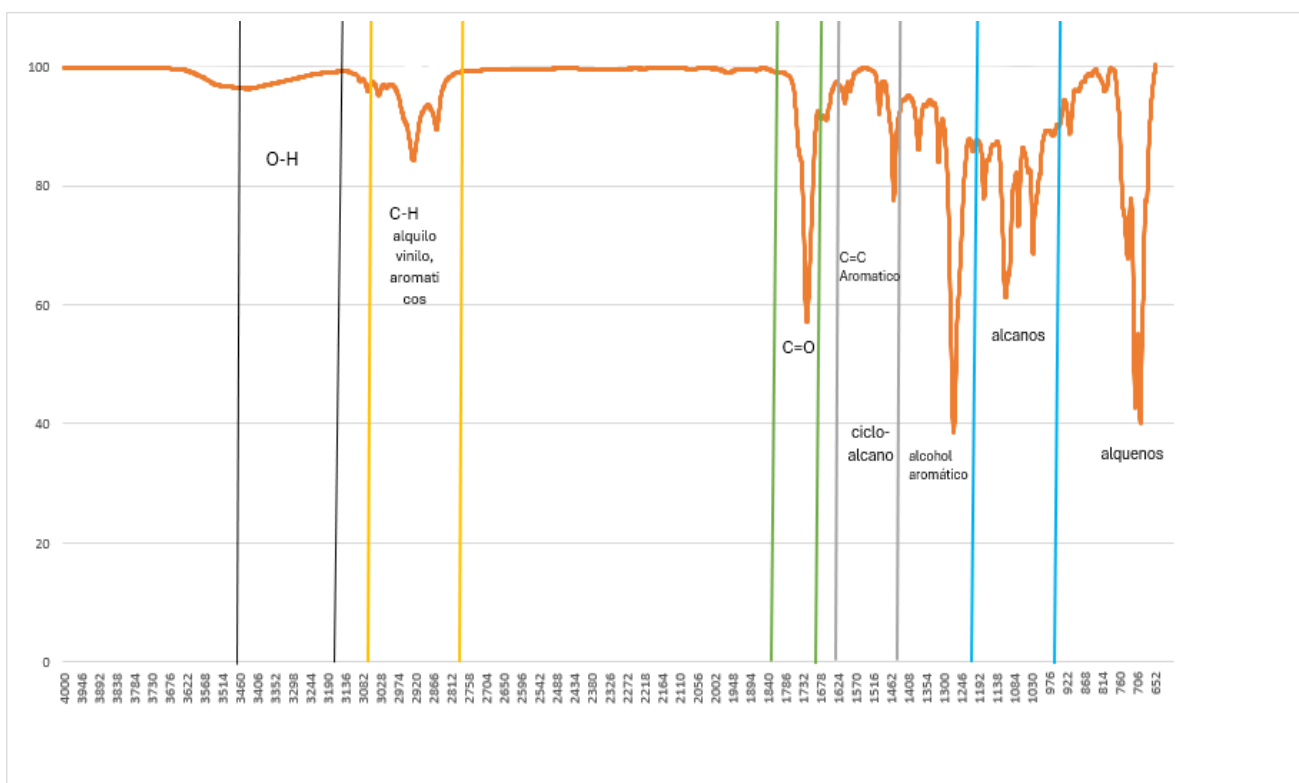
(C1: consorcio 1, C2: consorcio 2, C3: consorcio 3)

3.3 Espectro de IR del estradiol-algestona

En la fig. 5 se muestra el espectro de infrarrojo del estradiol-algestona a una concentración de 1mg/ ml y 15 mg/ml, respectivamente, en donde se identifican las bandas correspondientes a los grupos funcionales característicos de las hormonas. En el rango de los 3200 a los 3500 se encuentran las bandas relacionadas con enlaces de estiramiento de los grupos -OH; entre los 2800 y 3000 cm^{-1} las bandas ligadas al estiramiento de los -C-H donde se encuentran enlaces de tipo alquilo,

vinilo y aromáticos; la región de los 1710- 1725 cm^{-1} corresponde al grupo carbonilo (C=O) de las cetonas.

Los picos con señal débil que se encuentran alrededor de los 1465 cm^{-1} corresponden a los enlaces -C=C- de compuestos aromáticos y cicloalcanos; continuando hacia los 1267 cm^{-1} la banda corresponde a la región de los alcoholes aromáticos, entre los 960 y 1100 se presentan bandas de alcanos y finalmente en el rango de los 700 cm^{-1} se encuentran los enlaces de los grupos funcionales de los alquenos (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).



% de Transmitancia

Longitud de onda (cm^{-1})

Fig. 5. Identificación de grupos funcionales en espectro de Infrarrojo del estradiol y algestona

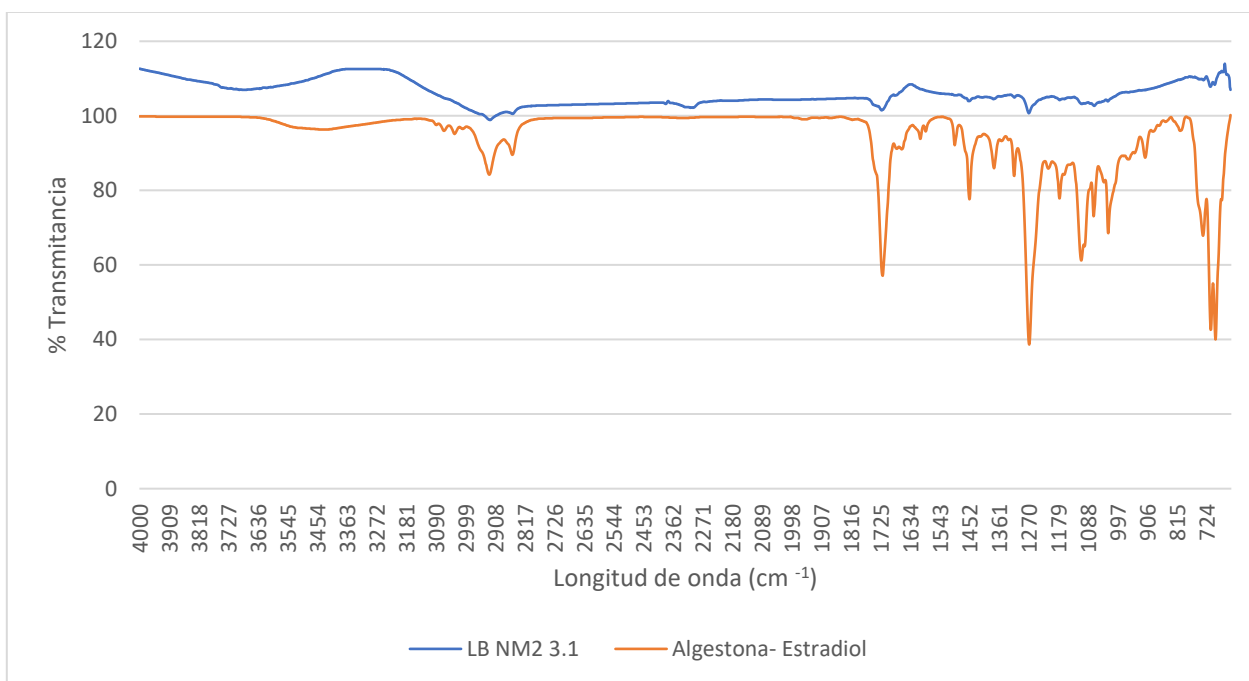
3.4 Resultados de las lecturas en el espectrofotómetro FTIR-ATR del ensayo con bacterias individuales en caldo LB

El análisis de la biodegradación de las hormonas Estradiol-Algestona en caldo LB mediante espectroscopia FTIR-ATR con las diferentes cepas bacterianas probadas se muestran en las gráficas 1-12.

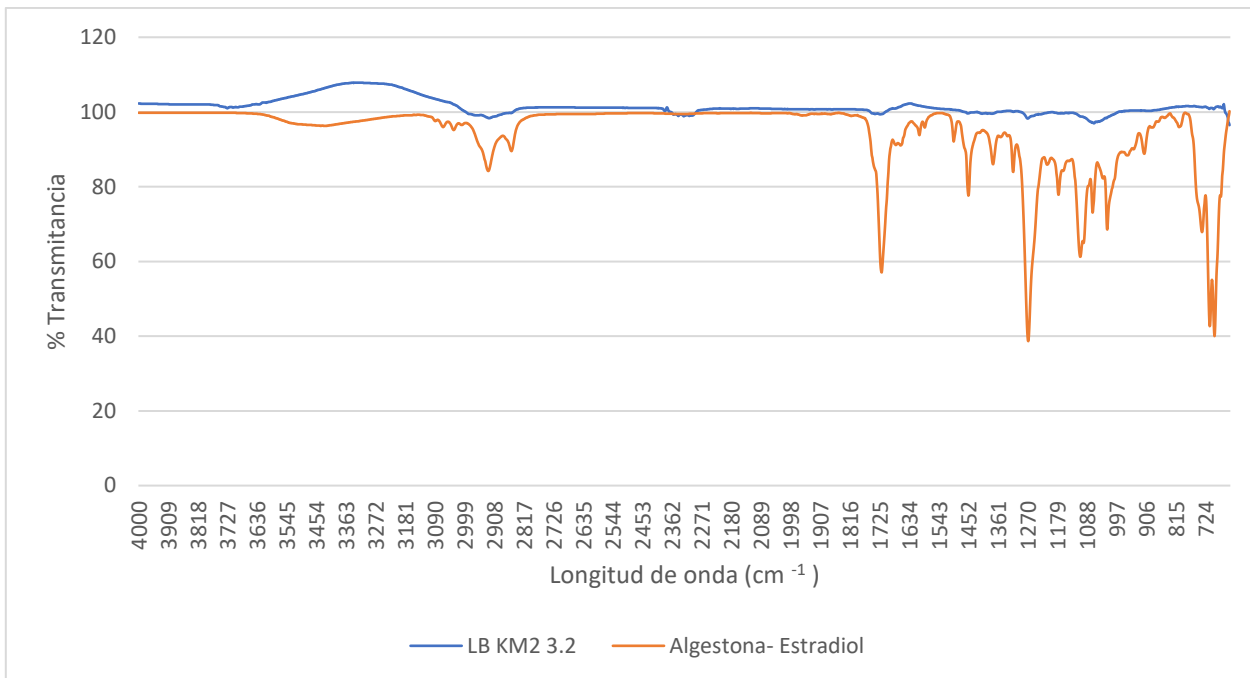
El gráfico 1 representa la biodegradación de la cepa *Citrobacter freundii* NM2 3.1 en caldo LB, donde podemos observar una disminución de los picos correspondientes a los grupos funcionales mencionados anteriormente, a pesar de que siguen apareciendo algunas señales muy débiles, es evidente la biodegradación de las hormonas por medio de la cepa, ocurriendo una biodegradación en compuestos más sencillos, pero no totalmente mineralizados. En los gráficos 7,8,9 y 10 se aprecia una mejor eliminación de los picos comparada con el gráfico 1, lo que evidencia la capacidad de biodegradación de las bacterias usando a las hormonas como su fuente de carbono.

En los gráficos 2,3 y 4 se observa una muy buena eliminación de los grupos funcionales del Estradiol- Algestona mostrando que las cepas *Klebsiellae pneumoniae* KM2 3.2, *Pantoea agglomerans* KM1 2.1, *Pantoea agglomerans* NM2 1.1, funcionaron de una manera efectiva, tendiendo hacia la mineralización del compuesto.

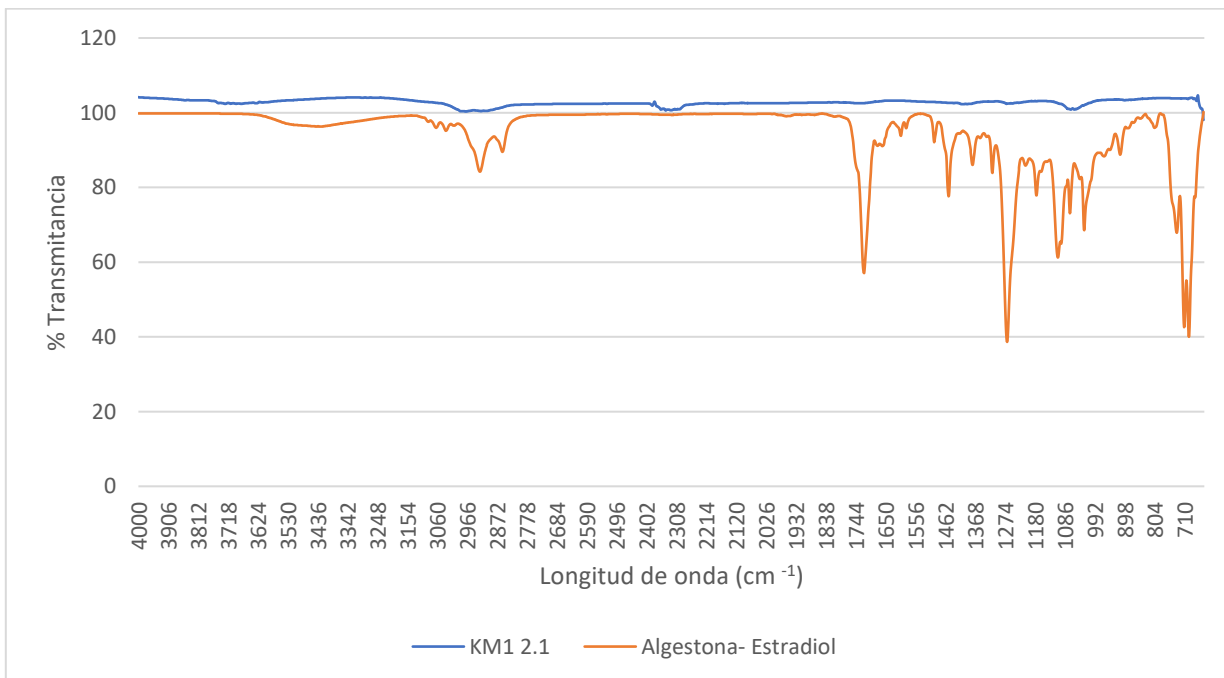
En los gráficos 5,6,11 y 12 se observa una excelente biodegradación de las cepas *Citrobacter freundii* M1MC1.1, *Citrobacter freundii* KM1 2.1, *Pantoea agglomerans* M4MC 3.1 y *Escherichia coli* M4N3.2, evidenciando la capacidad de las cepas para utilizar a las hormonas como su única fuente de carbono y mineralizar el compuesto.



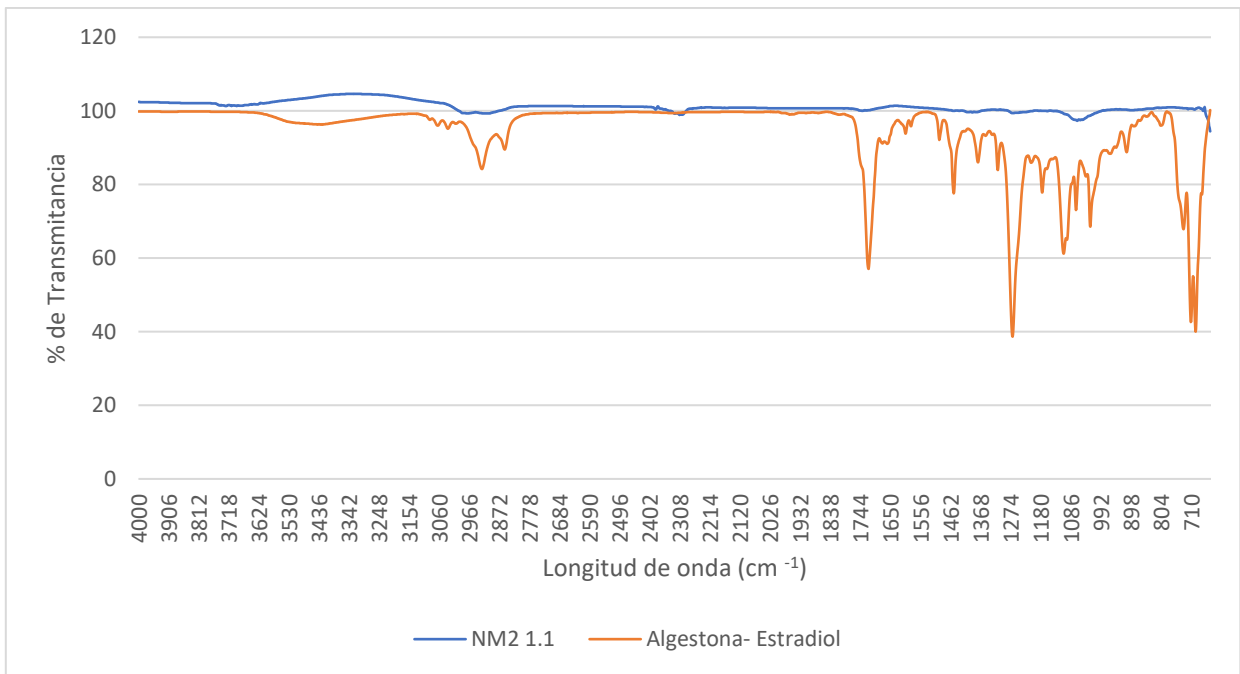
Gráfica1. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Estradiol - Algestona mediante la cepa M2N 3.1 en caldo LB comparada con la hormona.



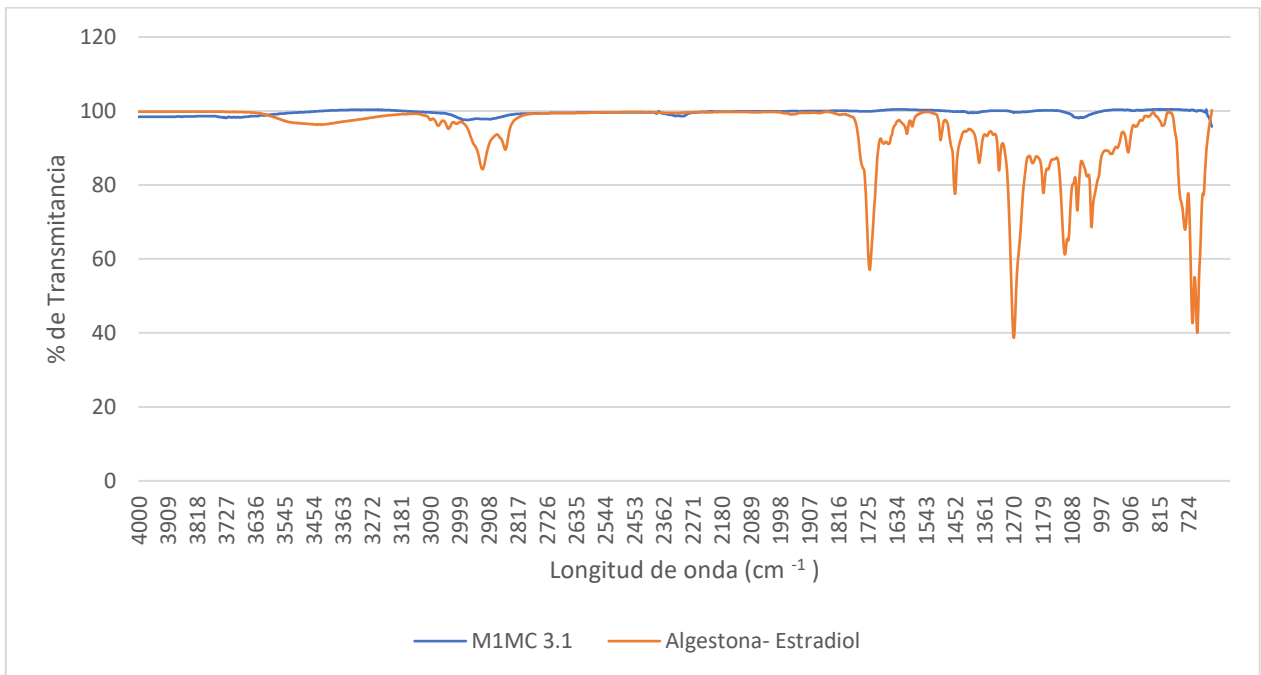
Gráfica 2. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M2K 3.2 en caldo LB comparada con la hormona.



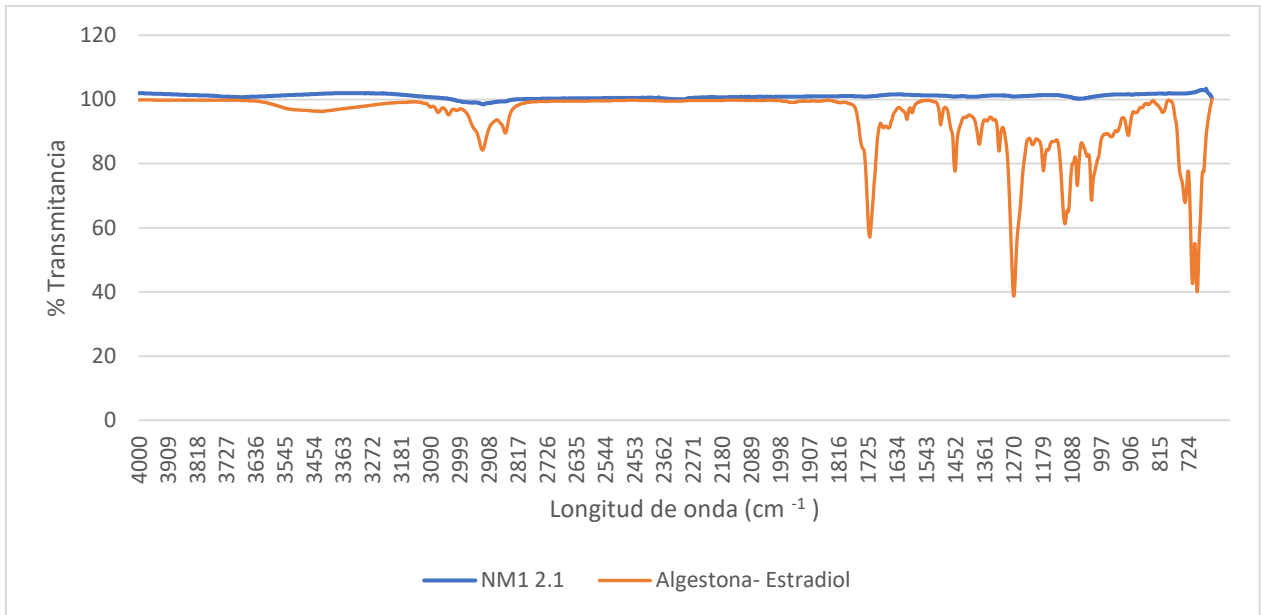
Gráfica 3. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M1K 2.1 en caldo LB comparada con la hormona.



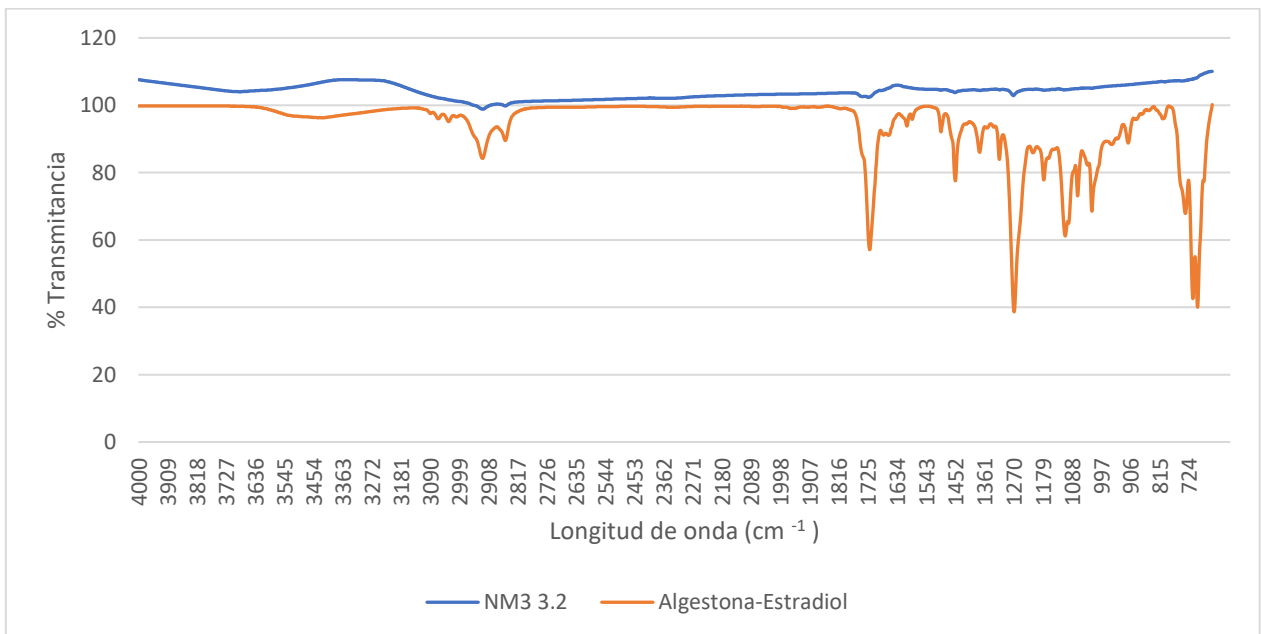
Gráfica 4. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M2N 1.1 en caldo LB comparada con la hormona.



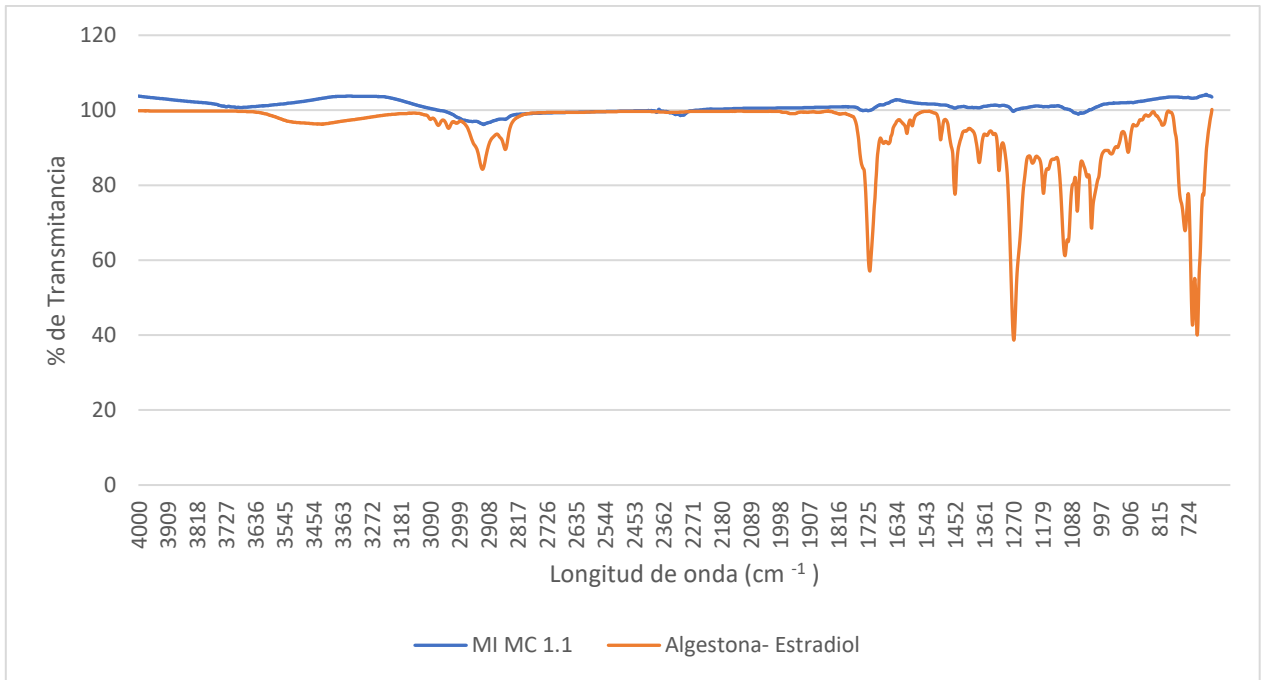
Gráfica 5. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M1MC 3.1 en caldo LB comparada con la hormona.



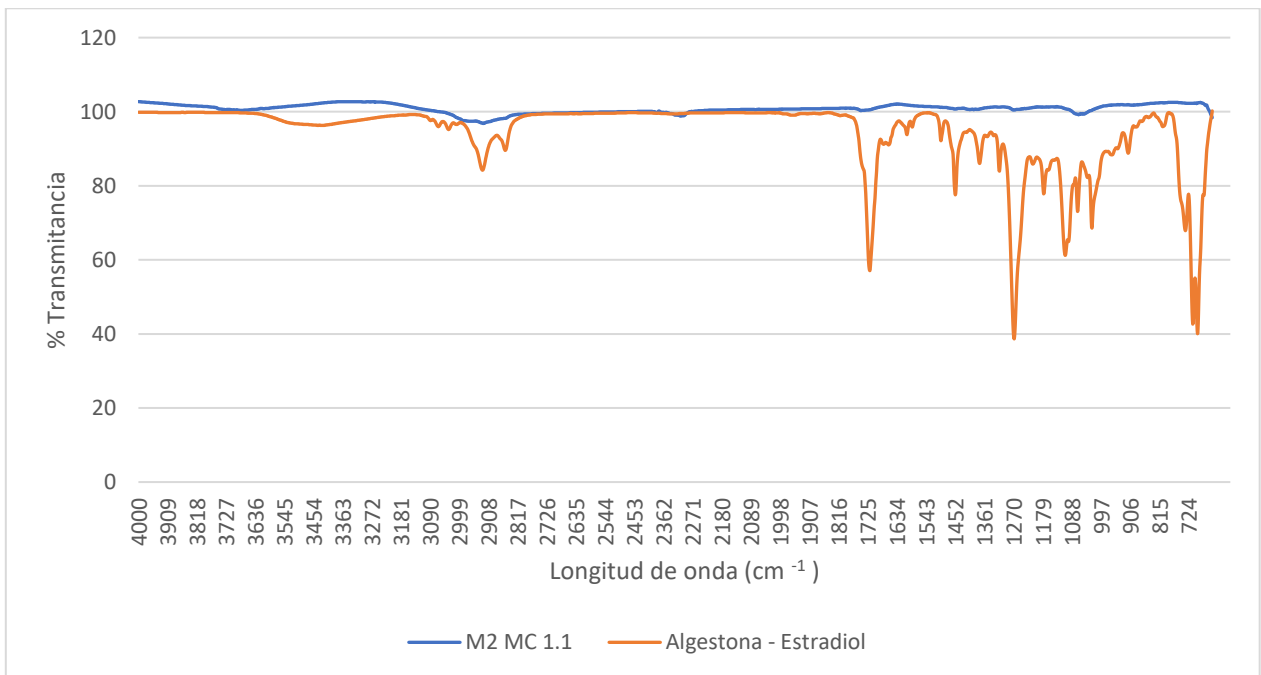
Gráfica 6. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M1N 2.1 en caldo LB comparada con la hormona.



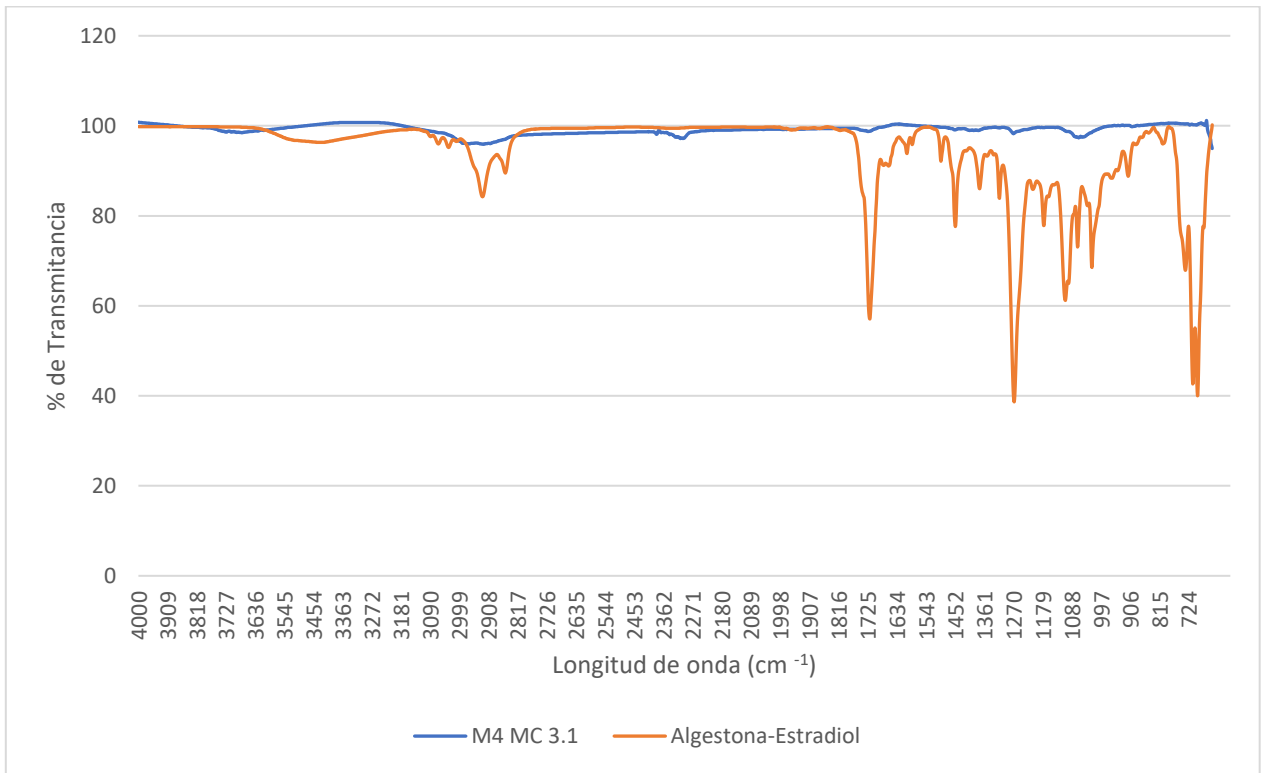
Gráfica 7. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M3N 3.2 en caldo LB comparada con la hormona.



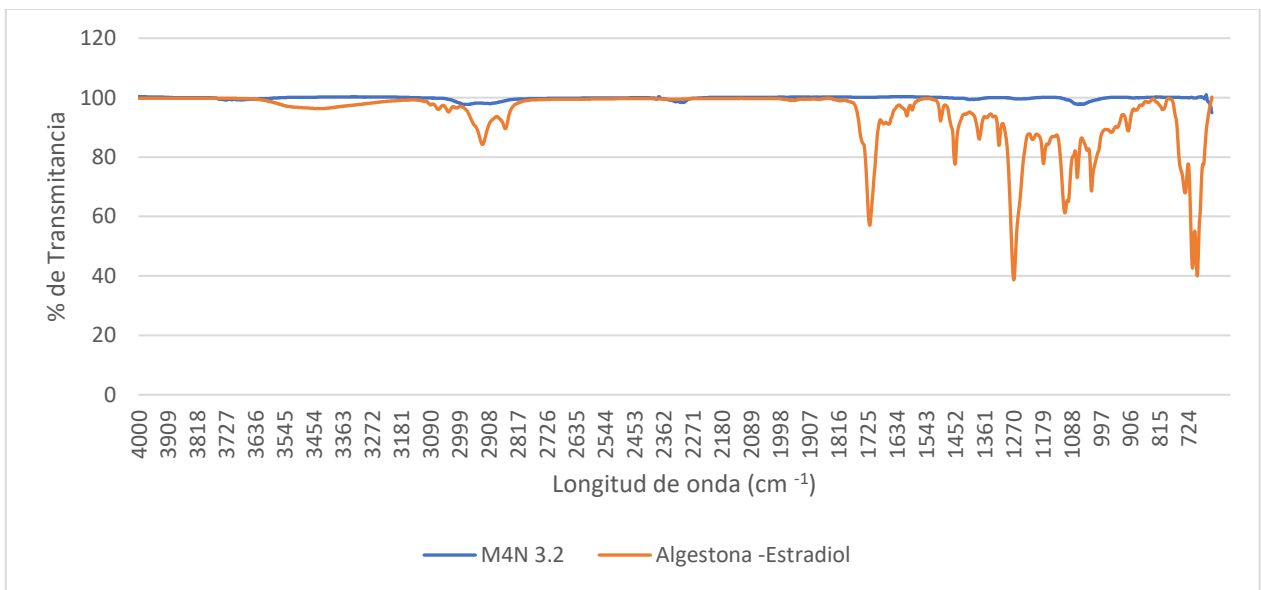
Gráfica 8. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M1MC 1.1 en caldo LB comparada con la hormona.



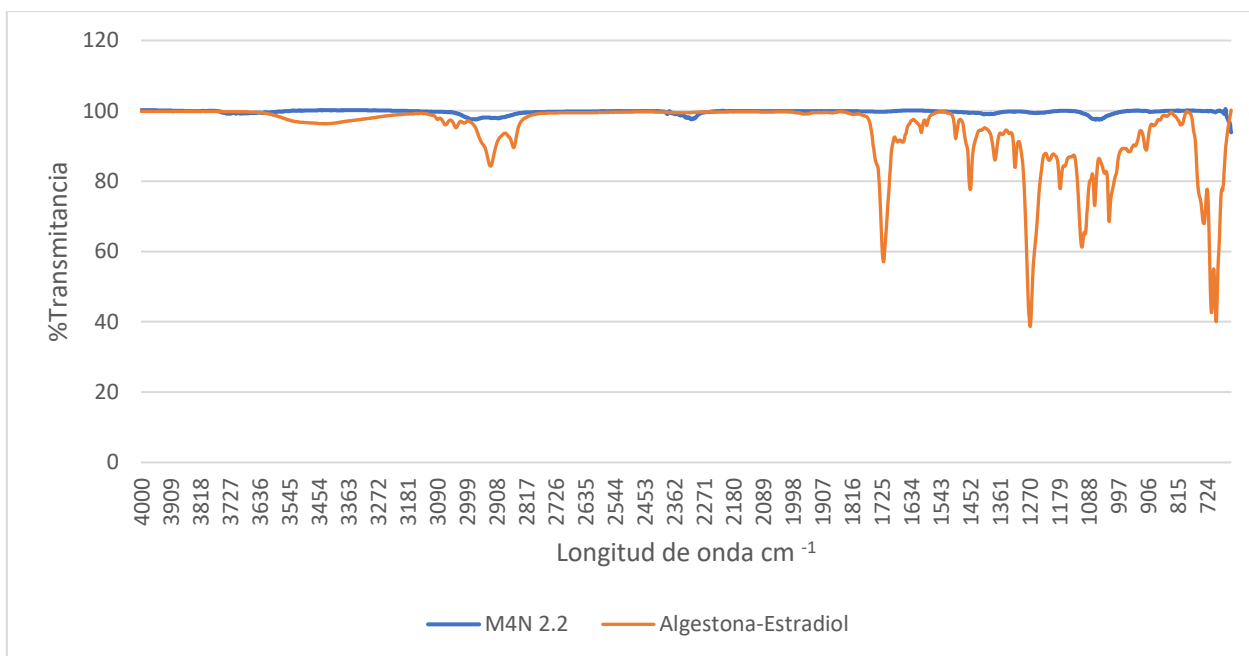
Gráfica 9. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M2 MC 1.1 en caldo LB comparada con la hormona.



Gráfica 10. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M4 MC 3.1 en caldo LB comparada con la hormona.



Gráfica 11. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de *Algestona*/estradiol mediante la cepa M4N 3.2 en caldo LB comparada con la hormona.



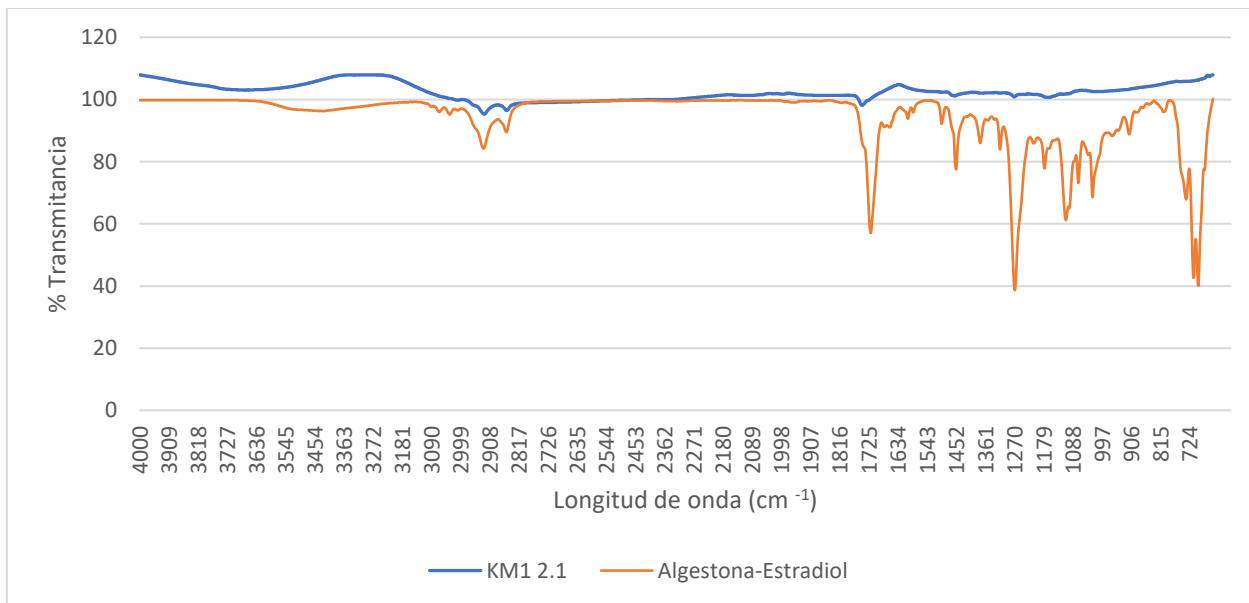
Gráfica 12. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de *Algestona*/estradiol mediante la cepa M4N 2.2 en caldo LB comparada con la hormona.

3.5 Resultados de las lecturas en el espectrofotómetro FTIR-ATR del ensayo con bacterias individuales en MMM.

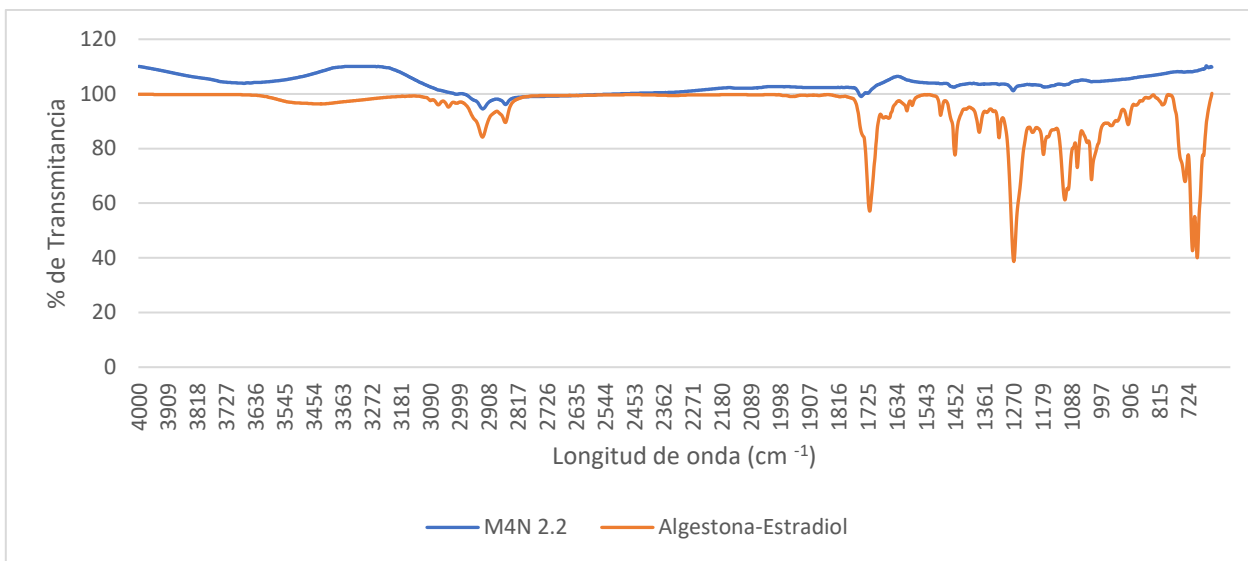
El análisis de la biodegradación mediante espectroscopia FTIR-ATR del estradiol-*algestona* en MMM con las diferentes cepas bacterianas se muestran en las gráficas 13- 24.

Los gráficos representan la biodegradación de las cepas de manera individual en donde se observa la eliminación de los picos correspondientes a las bandas de los grupos funcionales presentes en el estradiol-*algestona*, como los grupos -OH, comprendidos entre los 2800 y 3000 cm^{-1} de frecuencia de absorción; las bandas

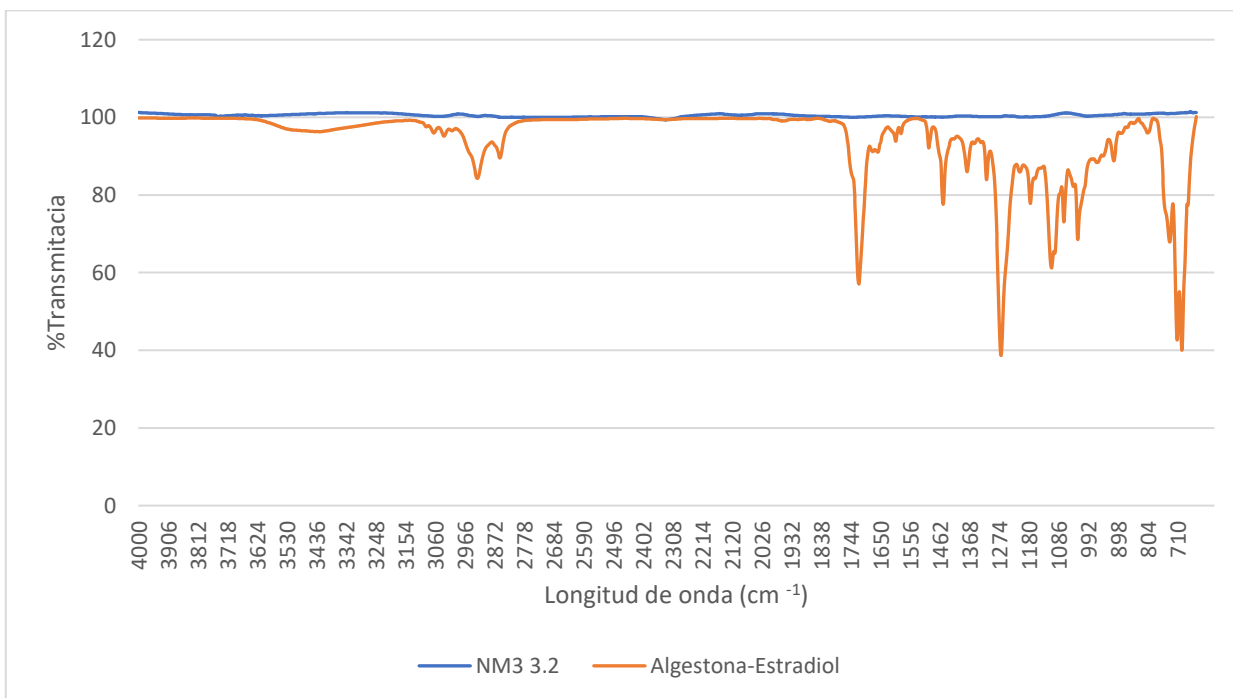
ligadas al estiramiento de los -C-H entre los 2800 y 3000 cm^{-1} , donde se encuentran enlaces de tipo alquilo, vinilo y aromático; el grupo carbonilo C=O en el rango de los 1725 cm^{-1} ; los enlaces -C=C- de compuestos aromáticos y cicloalcanos con señales alrededor de los 1465 cm^{-1} ; los alcoholes aromáticos mostrando picos alrededor de los 1267 cm^{-1} ; los enlaces correspondientes al estiramiento de los alcanos entre los 960 y 1100 cm^{-1} , y finalmente los enlaces de los grupos funcionales de los alquenos en el rango de los 700 cm^{-1} (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).



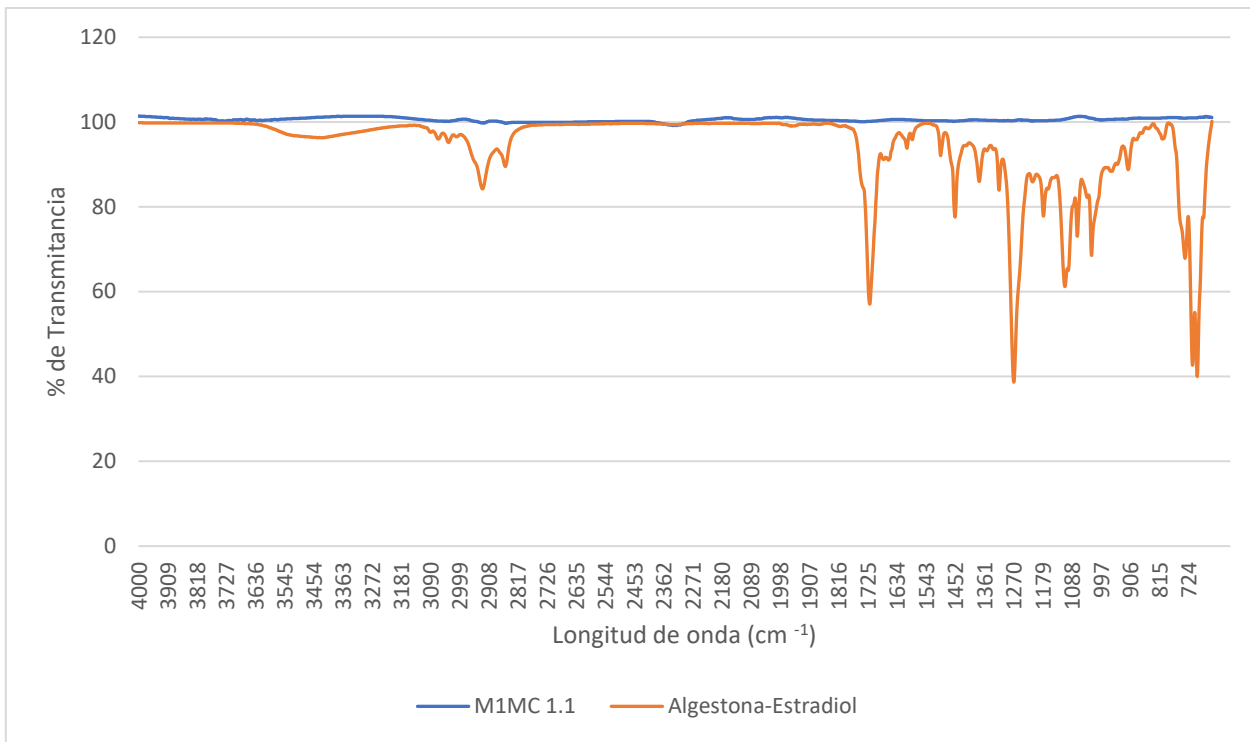
Gráfica 13. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa KM1 2.1 en MMM comparado con la hormona.



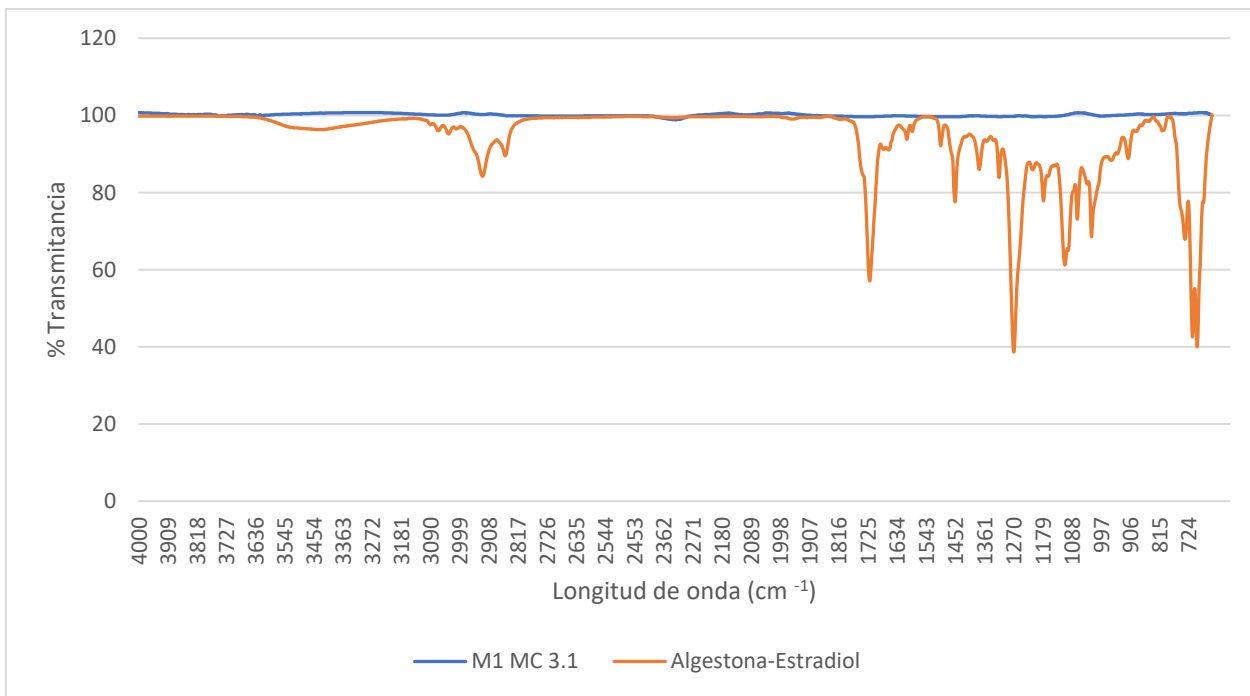
Gráfica 14. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M4 N 2.2 en MMM comparado con la hormona.



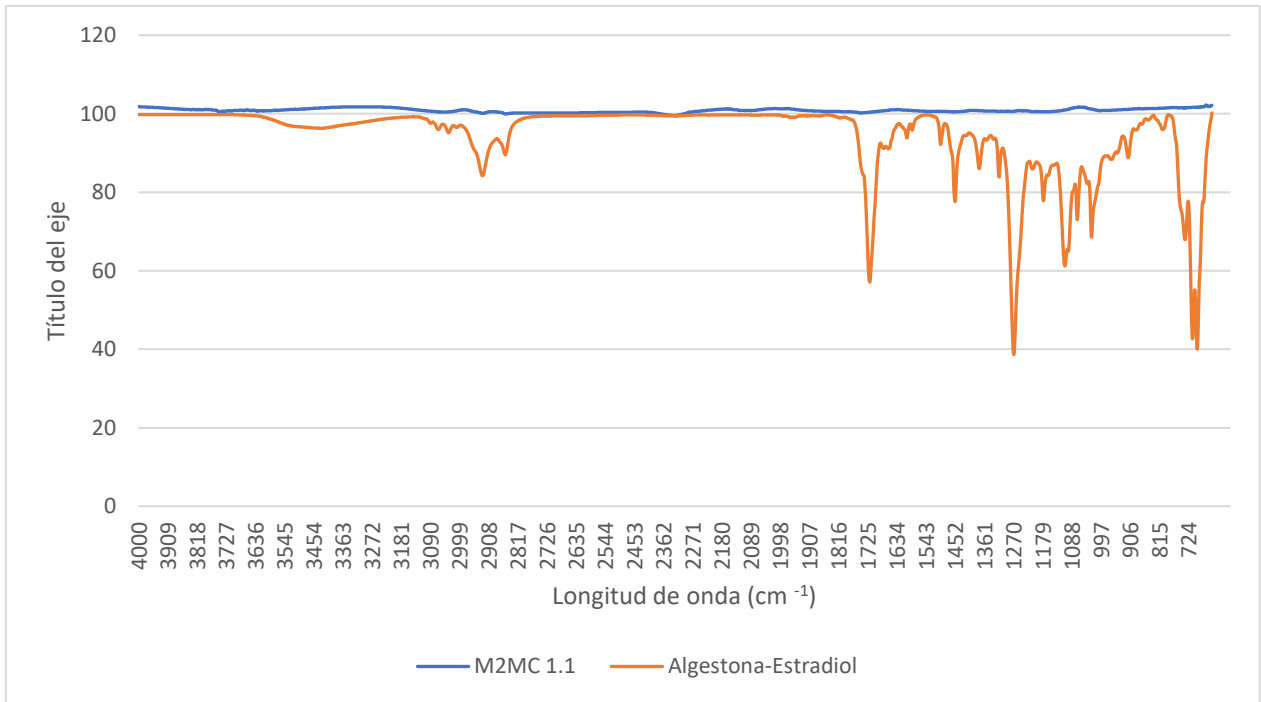
Gráfica 15. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa NM3 3.2 en MMM comparado con la hormona.



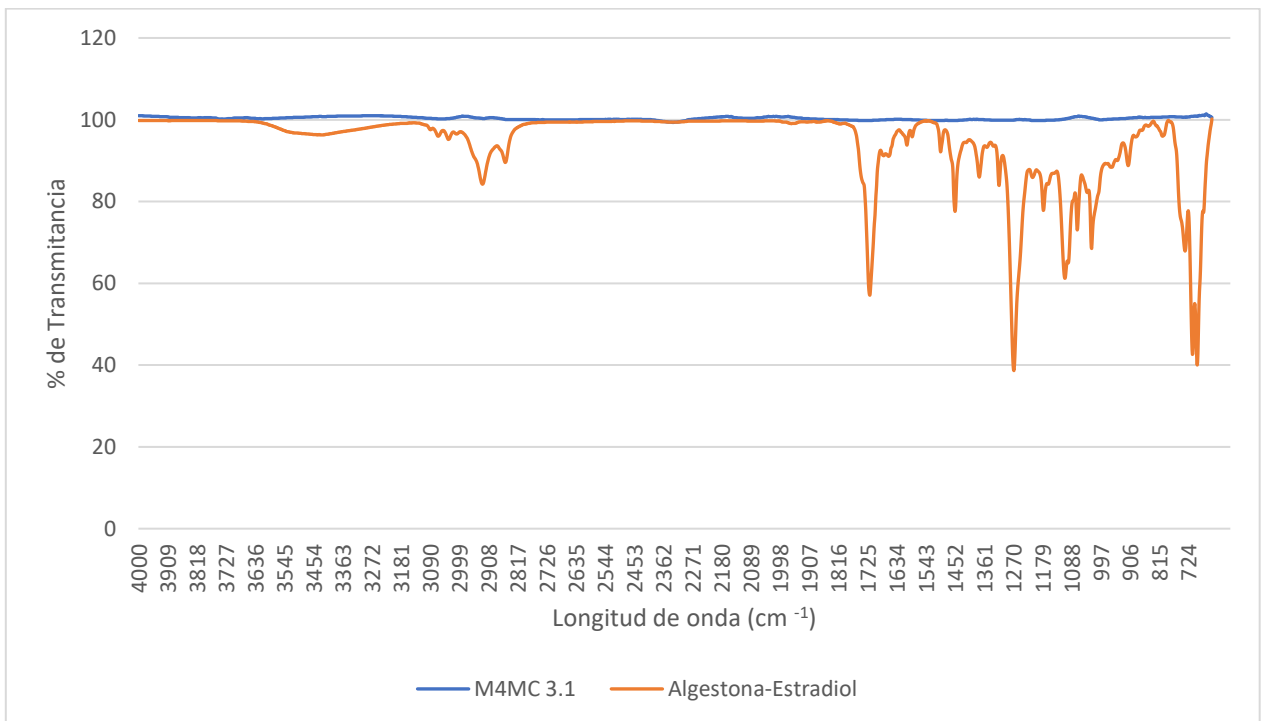
Gráfica 16. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M1MC 1.1 en MMM comparado con la hormona.



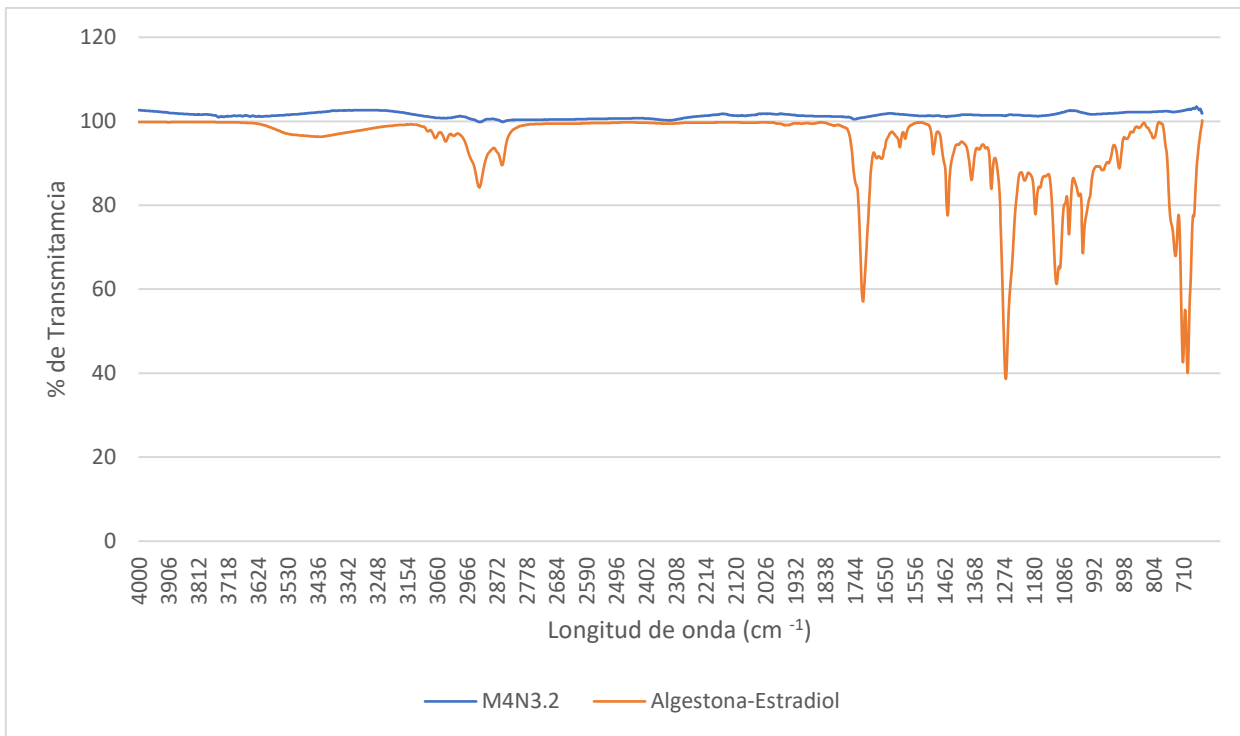
Gráfica 17. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M1MC 3.1 en MMM comparado con la hormona.



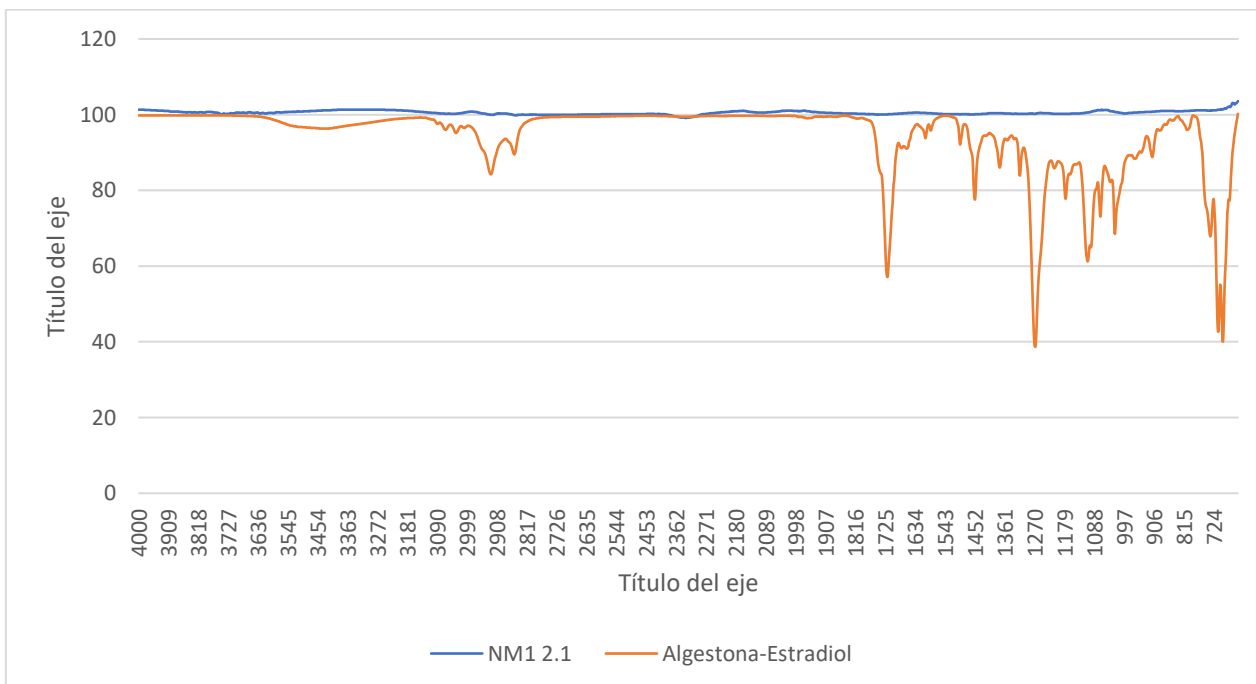
Gráfica 18. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M2MC 1.1 en MMM comparado con la hormona.



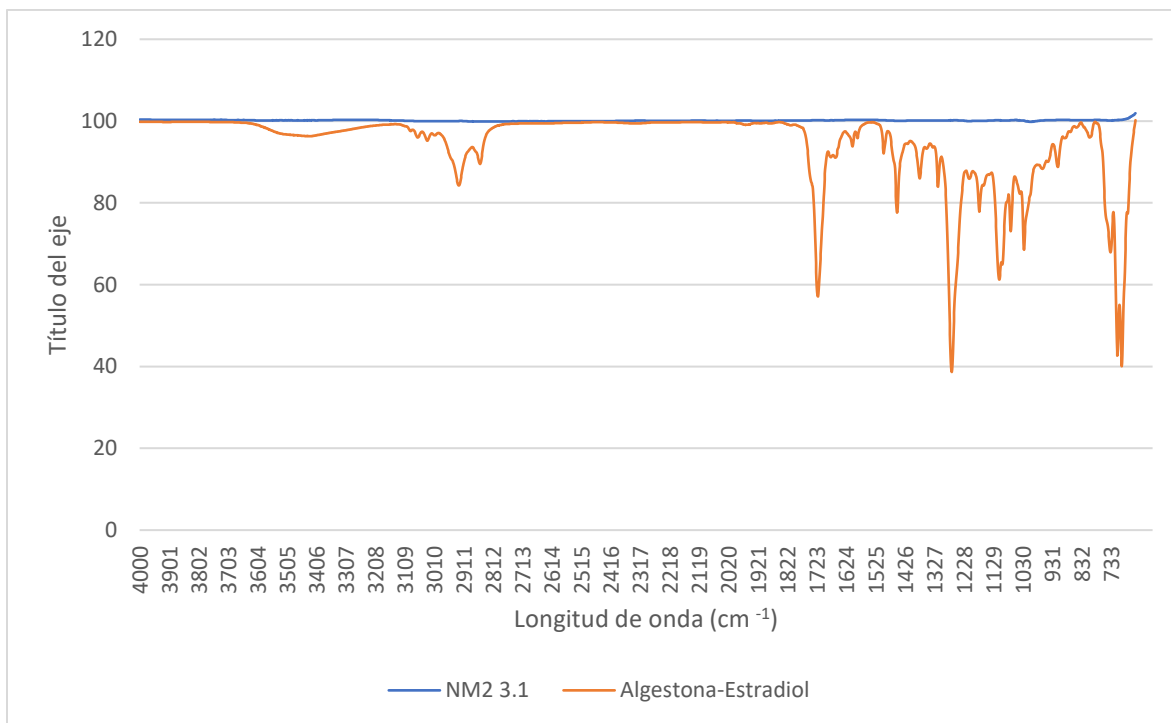
Gráfica 19. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M4MC 3.1 en MMM comparado con la hormona.



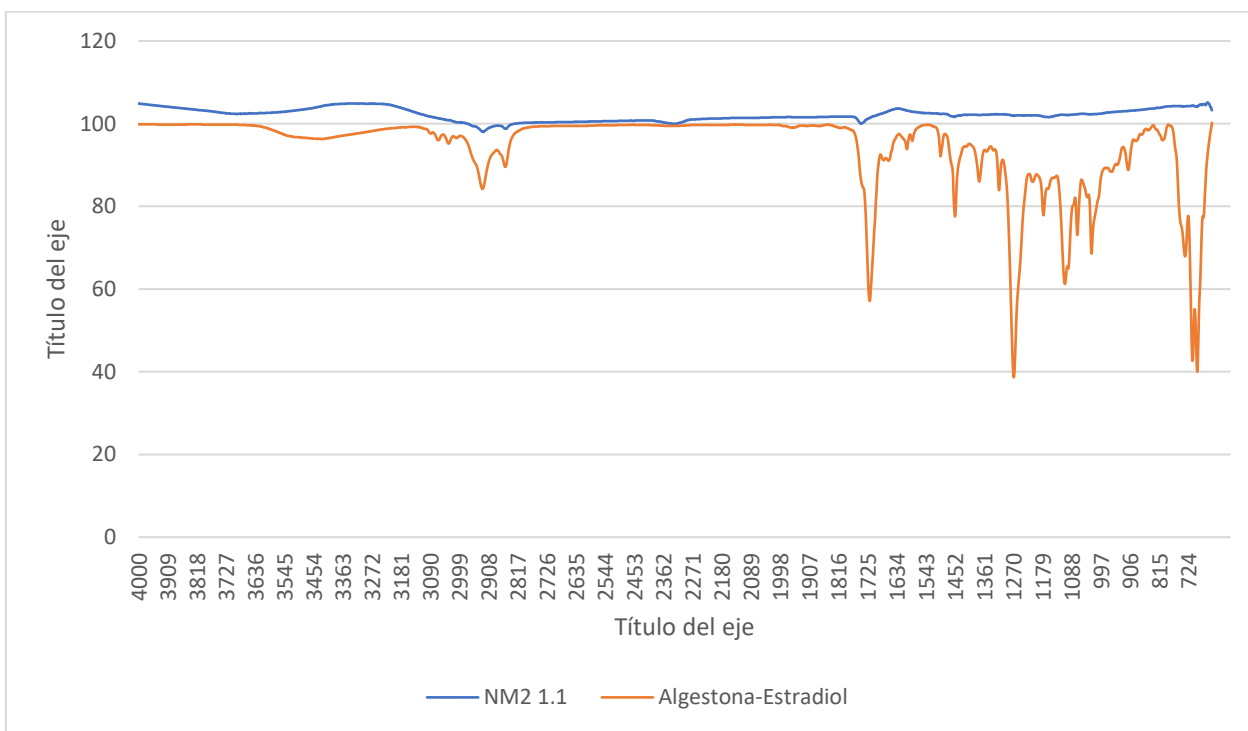
Gráfica 20. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa M4N 3.2 en MMM comparado con la hormona.



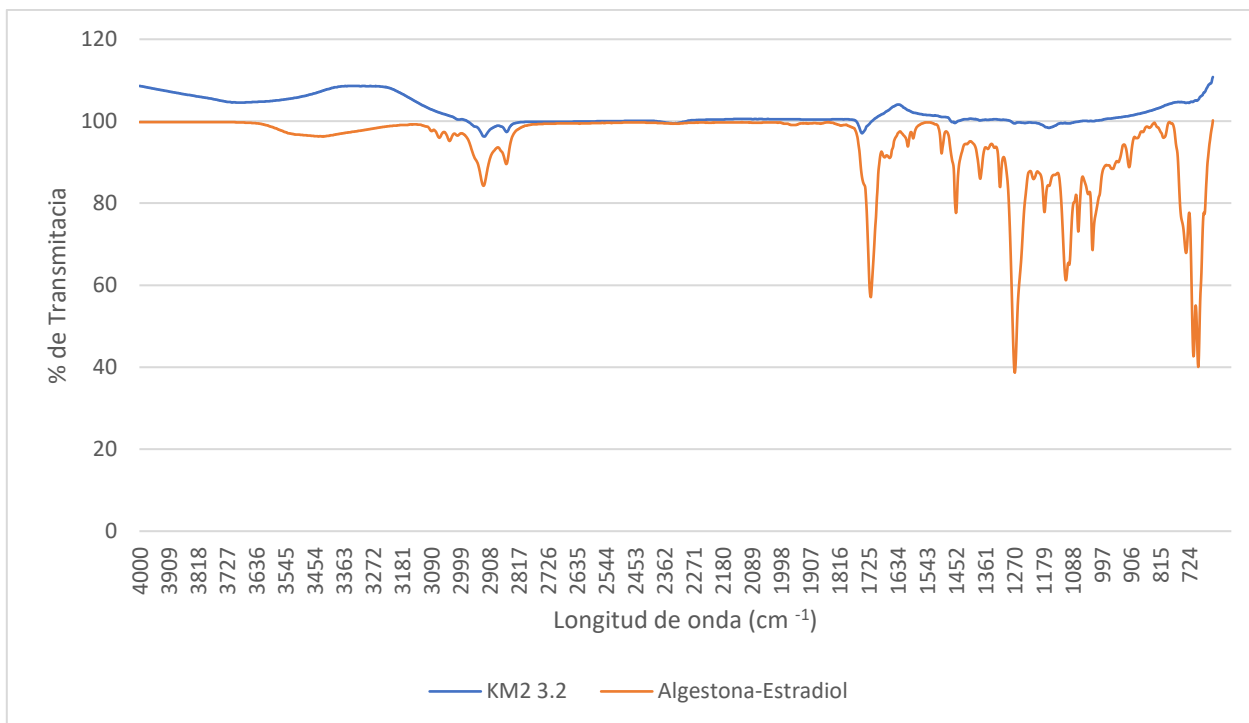
Gráfica 21. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa NM1 2.1 en MMM comparado con la hormona.



Gráfica 22. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa NM2 3.1 en MMM comparado con la hormona.



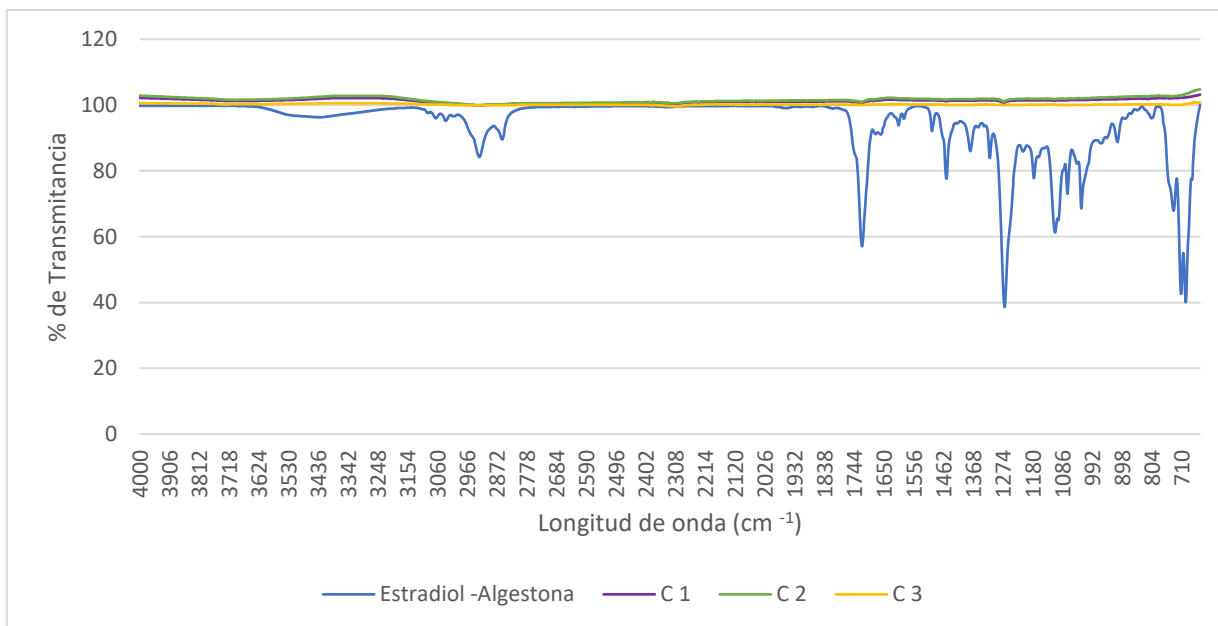
Gráfica 23. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa NM2 1.1 en MMM comparado con la hormona.



Gráfica 24. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de Algestona/estradiol mediante la cepa KM2 3.2 en MMM comparado con la hormona.

3.6 Resultados de las lecturas en el espectrofotómetro FTIR-ATR del ensayo con consorcios bacterianos.

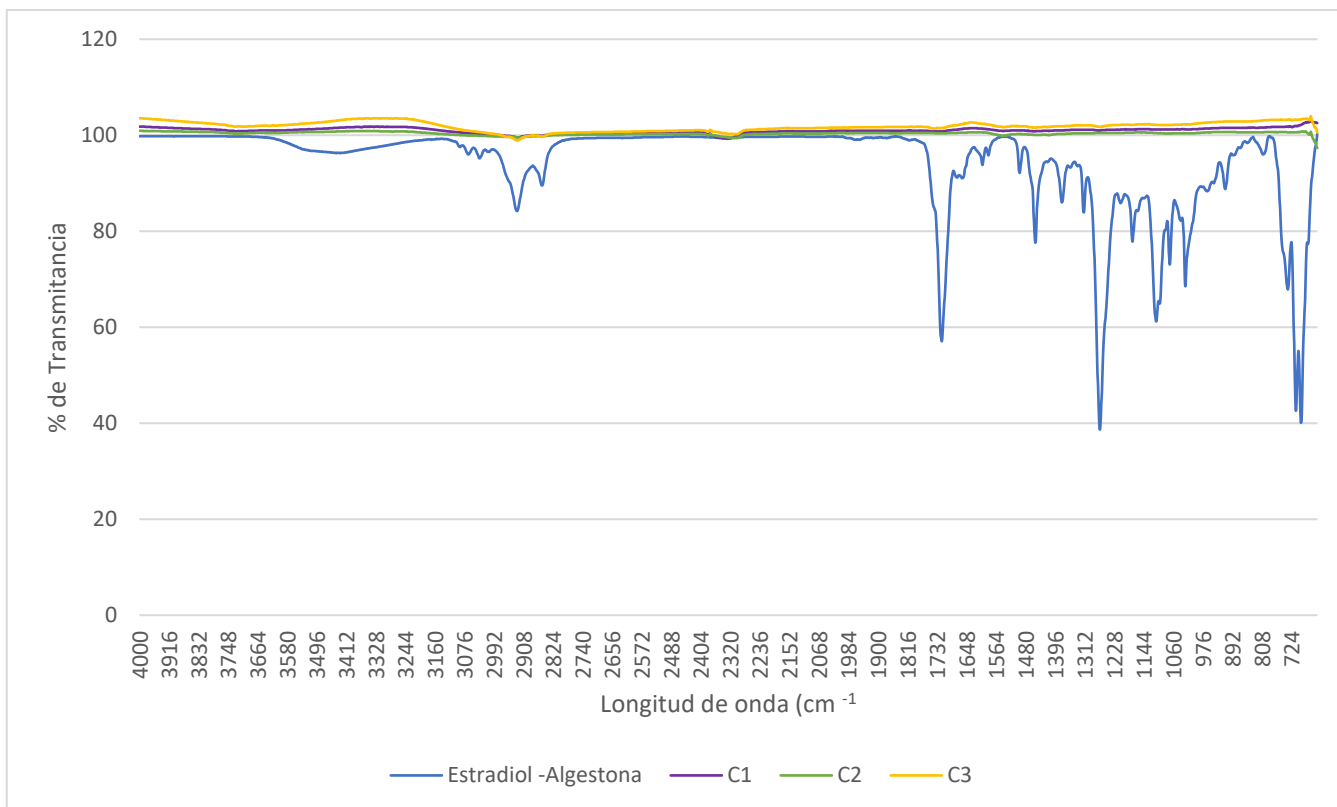
Los resultados del análisis de biodegradación del ensayo realizado en MMM con los tres consorcios bacterianos al sexto día del tratamiento se muestran el gráfico 25 donde podemos observar que los tres consorcios mostraron una respuesta similar, los tres lograron tener un efecto sinérgicos, pudiendo biodegradar el compuesto estradiol-algestona, tendiendo incluso hacia la mineralización del mismo.



Gráfica 25. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de algestona-estradiol en MMM mediante los consorcios bacterianos comparado con la hormona.

En el gráfico 26 se muestran los resultados del análisis de biodegradación del ensayo realizado en caldo LB con los tres consorcios bacterianos al sexto día del tratamiento.

Se observa que en los tres consorcios hubo una respuesta sinérgica y en ninguno de ellos fue de tipo antagónica, pudiendo eliminar los grupos funcionales presentes en el compuesto estradiol-algestona, llevándose a cabo la biodegradación del compuesto.



Gráfica 26. Espectro de infrarrojo de la biodegradación de algestona -estradiol en caldo LB mediante los consorcios bacterianos comparado con la hormona.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Hasta la fecha, se han aislado una serie de bacterias degradadoras de E2 de diferentes entornos y se ha informado de su eficacia, como *Novosphingobium sp.* (Ibero *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021), *Rhodococcus sp.* (Hsiao *et al.*, 2021; Moreira *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2022), *Sphingomonas sp.* (Chen *et al.*, 2017; Kurisu *et al.*, 2010) y *Microbacterium sp.* (Hao *et al.*, 2023; Xiong *et al.*, 2023). Por ejemplo, la cepa SJTH1 puede degradar el 90% de 10 mg/L de E2 en una semana (Xiong *et al.*, 2020), un tiempo muy similar en el que degradó el Estradiol- Algestona en el presente trabajo de investigación; y la cepa FJ1 puede degradar el 98% de E2

después de 10 días a una concentración inicial de E2 de 15 mg/L (Zhang *et al.*, 2021).

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, se lograron aislar cepas de los géneros *Citrobacter freundii*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, *Klebsiellae pneumoniae* que presentaron la capacidad de biodegradar las hormonas el estradiol- algestona en condiciones aerobias, transformándolos en compuestos más simples mediante la actividad enzimática, concordando con los resultados obtenidos por Zhang *et. al* 2024 en donde las bacterias *Oleigrimonas*, *Pseudomonas*, *Terrimonas* y *Nitratireductor* degradaron el E2 a E1 por un metabolismo aerobio vía deshidrogenación por la actividad enzimática de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Los resultados obtenidos mostraron que la utilización de consorcios bacterianos para la eliminación de compuestos disruptores endocrinos del agua como los estrógenos, específicamente el estradiol- algestona es eficaz como tratamiento biológico, logrando que las bacterias utilicen las hormonas como su única fuente de carbono y que juntas en un consorcio tuvieran un efecto sinérgico. El tiempo de 6 días en el que se logró la biodegradación es mucho menor que el reportado por Estrada y colaboradores en 2013, donde se evaluó el desempeño de un biorreactor con membranas sumergidas (BRMS) a nivel planta piloto para remover estrógenos (E1, E2 y EE2) presentes en las aguas residuales de la zona metropolitana de la CDMX, donde se obtuvieron resultados favorables después de los 94 días de operación, alcanzando las mejores remociones hasta los 234 días, representando un tiempo muy extenso en contraste con el sistema evaluado en el presente trabajo

de investigación; sabiendo esto, podemos establecer que este sistema puede ser efectivo para su aplicación en sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Aunado al corto tiempo de remoción del E2 que se logró en la presente investigación, los resultados de los 2 medios en los que se llevó a cabo el experimento (MMM y caldo LB) fueron favorables en ambos casos, sin embargo, la utilización de un medio mínimo sería lo ideal, ya que las bacterias utilizan a las hormonas como única fuente de carbono, y los reactivos usados se requieren en cantidades muy pequeñas, lo que establecería que los costos serían bajos y factibles para su aplicación a gran escala.

Los resultados obtenidos en esta investigación, como primera instancia ofrecen una base para futuras investigaciones y aportan nuevas perspectivas al campo de la biorremediación en donde se apliquen sistemas para la eliminación de contaminantes emergentes del agua como los estrógenos, ofreciendo la posibilidad de ser analizados por otras técnicas como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), continuando así la línea de investigación propuesta es en este trabajo.

CONCLUSIONES

1. Las bacterias de los géneros *Citrobacter freundii*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiellae pneumoniae* presentan la capacidad de biodegradación de las hormonas estradiol-algestona en concentraciones de 1 mg/ ml y 15 mg /ml respectivamente, usándolos como única fuente de carbono.
2. Los consorcios microbianos tienen la capacidad de biodegradar las hormonas estradiol- algestona presentando un efecto sinérgico.
3. Los sistemas de biorremediación por medio de consorcios bacterianos pueden ser utilizados como procesos biotecnológicos para la biodegradación de hormonas en agua.
4. A manera complementaria es necesario evaluar la biodegradación de las hormonas estradiol-algestona mediante sistemas más sensibles como HPLC, para conocer más a detalle el porcentaje de biodegradación de éstas.
5. La aplicación de los sistemas de biorremediación es esencial para desarrollar enfoques efectivos y sostenibles para la remediación de la contaminación ambiental mostrando ventajas importantes como bajos costos, eficiencia y siendo amigables con el ambiente.

REFERENCIAS

- Armijio, R., Basegio, N., Brinidilda, C., & Ramos, T. (2019). *Contaminantes químicos del agua*. Obtenido de Revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide: <https://www.upo.es/cms1/export/sites/upo/moleqla/documentos/Numero35/Destacado-3.pdf>
- Arnáiz, C., Isac, L., & Lebrato, j. (Marzo de 2000). *Tratamiento biológico de aguas residuales*. Obtenido de Revista Tecnología del Agua,.
- Ayala, M. (17 de enero de 2017). *Boletín UNAM-DGCS-034*. Obtenido de Preocupante, presencia de estrógenos en cuerpos de agua como contaminantes emergentes: https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2017_034.html#:~:text=Las%20hormonas%20llegan%20a%20los,de%20uso%20dom%C3%A9stico%20ya%20tratadas
- BRUKER. (2023). *Guía de espectroscopía infrarroja*. Obtenido de Conceptos básicos de la espectroscopía: <https://www.bruker.com/es/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>
- Cavalieri, E., Frenkel, K., Liehr, J. G., Rogan, E., & Roy, D. (2000). Chapter 4: Estrogens as Endogenous Genotoxic Agents-DNA Adducts and Mutations. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 27,75-93.
- DCSBA, U. A. (s.f.). *Biorremediación*. Obtenido de Introducción a la biorremediación: https://dmd.unadmexico.mx/contenidos/DCSBA/BLOQUE2/BI/07/BBRN/unidad_01/descargables/BBRN_U1_Contenido.pdf
- Estrada, E. B., Mijaylova, P., Moeller, G., Mantilla, G., Ramírez, N., & Sánchez, M. (jun de 2013). *Presencia y tratamiento de compuestos disruptores endócrinos en aguas residuales de la Ciudad de México empleando un biorreactor con membranas sumergidas*. Obtenido de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432013000200011
- Galindo, M. (2015). *Evaluación del desempeño de dos sistemas de tratamiento para la remoción de esteroides en aguas residuales*. Obtenido de UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO: http://repositorio.imta.mx/bitstream/handle/20.500.12013/1562/T_054.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Guadarrama, R., Kido, J., Roldan, G., & Salas, M. (2016 de septiembre de 2016). *Contaminación del agua*. Obtenido de Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales: https://www.ecorfan.org/spain/researchjournals/Ciencias_Ambientales_y_Recursos_Naturales/vol2num5/Revista_de_Ciencias_Ambientales_y_Recursos_Naturales_V2_N5_1.pdf
- Hao, P., Lv, Z., Hanyu, P., Zhang, J., Wang, L., Zhu, Y., . . . Gao, Y. (s.f.).
- Hao, P., Lv, Z., Hanyu, P., Zhang, J., Wang, L., Zhu, Y., . . . Gao, Y. (1 de Enero de 2024). *Characterization and low-temperature biodegradation mechanism of 17 β -estradiol-degrading bacterial strain Rhodococcus sp. RCBS9*. Obtenido de Science Direct: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117513>
- Iberdrola. (2023). *La contaminación del agua: cómo no poner en peligro nuestra fuente de vida*. Obtenido de <https://www.iberdrola.com/sostenibilidad/contaminacion-del-agua#:~:text=Los%20principales%20contaminantes%20del%20agua,resulte%20invisible%20en%20muchas%20ocasiones>
- IMTA. (16 de Noviembre de 2018). *El desafío de los contaminantes emergentes*. Obtenido de Instituto Mexicano de Tecnología del Agua: <https://www.gob.mx/imta/articulos/el-desafio-de-los-contaminantes-emergentes>
- Iturbe, R. (2010 de marzo de 2010). *¿Qué es la biorremediación?* Obtenido de Universidad Nacional Autónoma de México.: https://www.dgdc.unam.mx/assets/cienciaboletto/cb_11.pdf
- Jürgens, M., Holthaus, K., Johnson, A., Smith, J., Hetheridge, M., & Williams, R. (2002). The Potential for Estradiol and Ethinylestradiol Degradation in English Rivers. Obtenido de Environmental Toxicology and Chemistry.
- Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P., & Winn, W. (2003). *Diagnóstico Microbiológico*. Argentina: Panamericana .
- Morales, L., & Méndez, G. (2021). *Biorremediación de carbamazepina por hongos y bacterias en aguas residuales*. Obtenido de DOI. 10.21931/RB/2021.06.02.28
- Natalia, D. I. (Septiembre de 2013). *Estudio de la eliminación de contaminantes emergentes en aguas mediante procesos de oxidación avanzados*. Obtenido de Universidad de Barcelona: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/308120/NDLCG_TESIS.pdf?sequence=1
- NHI. (30 de octubre de 2020). *Hormonas*. Obtenido de Biblioteca Nacional de Medicina: <https://medlineplus.gov/spanish/hormones.html#:~:text=Las%20hormonas%20son%20los%20mensajeros,Crecimiento%20y%20desarrollo>
- Ramírez, I., Martínez, P., Quiroz, M., & Bandala, E. (Sep-Oct de 2015). *Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente*. Obtenido de Technol. cienc. agua vol.6 no.5 Jiutepec: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-24222015000500003

- Santiago, E., Trolice, M., Barranquero, M., & Salvador, Z. (16 de junio de 2022). *Hormonas sexuales masculinas y femeninas – ¿Qué funciones tienen?* Obtenido de Reproducción Asistida ORG: <https://www.reproduccionasistida.org/hormonas-sexuales/>
- Silva, C., Otero, M., & Esteves, V. (2012). *Processes for the Elimination of Estrogenic Steroid Hormones from Water: A Review. Environmental Pollution.*
- Skoog, D., Holler, J., & Nieman, T. (2001). *Principios de análisis Instrumental.* España: McGRAW-Hill.
- Torres, D. (2 de agosto de 2003). *El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos.* Obtenido de Red de Revistas Científicas de América Latina: <http://www.aeet.org/ecosistemas/032/informe1.htm>
- UNAM. (2022). *Espectroscopía FTIR-ATR.* Obtenido de Enlace UNAM: <https://enlace.unam.mx/espectroscopia-ftir-atr/>
- Zhang, S., Ye, X., Lin, X., Zeng, X., Meng, S., Luo, W., . . . Hu, Z. (2024). *Novel insights into aerobic 17β-estradiol degradation by enriched microbial communities from mangrove sediments.* Obtenido de Journal of Hazardous Materials: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133045>