



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA.



Instituto de Ciencias.
Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas.

Posgrado en microbiología.

**AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CAPACES DE CRECER
 EN PRESENCIA DE DICLOFENACO A PARTIR DE SUELO DE
 HUMEDALES ARTIFICIALES.**

TESIS.

Que para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias (Microbiología).
Con opción en: *Bioquímica y Genética Microbiana.*

Presenta:

IBT. Maritza Aparicio Juárez.

Director de tesis:

D.C. Antonino Báez Rogelio.

Codirectora:

D.C. Cynthia Romero Guido.

Puebla, Pue.

Noviembre,2019.

DEDICATORIA

**A mis padres por su ejemplo de constancia, lucha y perseverancia.
A mis hermanos por su amor y sus consejos.**

**A mi esposo por ayudarme en momentos difíciles y motivarme a
ser un mejor ser humano.**

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), con número de beca 628772.

Gracias al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas por haberme permitido cursar la maestría y al Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana por haberme permitido realizar la parte experimental de este proyecto.

Gracias al D.C. Jesús Muñoz por ayudarme a enriquecer mis conocimientos.

También agradezco a mis amigos de laboratorio Abisaid, América, Lilia, Lester, Berenice y a Citlali por brindarme sus conocimientos, por su apoyo emocional y muchas otras cosas más.

Agradezco a mi asesor el D.C. Antonino Báez por ser tan empático, comprensivo y paciente. Al mismo tiempo, agradezco a mi Coasesora la D.C. Cynthia Romero.

Agradezco al D.C. Eduardo Torres por haberme permitido trabajar en su laboratorio y brindarme lo necesario para realizar mis experimentos y por su comprensión; agradezco también a la M.C. Gabriela Bairan por su paciencia, por su calidez humana y además por ayudarme en la parte experimental.

Finalmente, agradezco a la D.C. Verónica Quintero por su ayuda incomparable, por la paciencia que me tuvo, por su sencillez y por el amor que nos tiene a los alumnos.

ÍNDICE DE GENERAL.

RESUMEN.	1
INTRODUCCIÓN.	3
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Eficacia de los métodos de tratamiento de aguas residuales.....	5
1.2 Humedales artificiales y su aplicación en el tratamiento de aguas residuales ..	7
1.2.1 Los microcontaminates.....	10
1.2.2 El diclofenaco como microcontaminante.	12
1.3. ANTECEDENTES.	15
2. JUSTIFICACIÓN.	19
2.1 HIPÓTESIS.	20
2.2 OBJETIVO GENERAL.....	20
2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	20
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.	21
2.3.1 Muestreo.	21
2.3.2 Aislamiento de microorganismos.....	21
2.3.3 Crecimiento de aislados en medio mínimo M9-agar con fuente de carbono naproxeno, ibuprofeno o diclofenaco.	22
2.3.4 Determinación de actividad peroxidasas de forma cualitativa en agar.....	22
2.3.5 Conteo de UFC en placa a partir de cultivos en medio líquido M9.....	23
2.3.6. Análisis en HPLC	24
2.3.7. Barrido de absorbancia para determinar cambios en la estructura de la molécula del diclofenaco.	24
2.3.8 Identificación de los microorganismos.....	25
2.3.8.1 Tinción de Gram.....	25
2.3.9 Producción de pioverdina.	25
2.3.10. Crecimiento en citrato y benzoato como única fuente de carbono.	26
2.3.11 PCR del gen 16s ADNr.....	26
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30

3.1. Muestreo del humedal.....	30
3.1.2. Aislamiento de microorganismos.....	30
3.1.3. Crecimiento de los aislados en medio mínimo M9-agar con fuente de carbono naproxeno, ibuprofeno o diclofenaco.....	33
3.2 Crecimiento bacteriano en medio mínimo líquido M9 con diclofenaco como fuente de carbono.	35
3.3. Determinación de actividad peroxidasas de forma cualitativa en agar.....	48
3.4 Identificación molecular.....	50
3.5 Identificación morfológica.....	57
3.6 Búsqueda <i>in silico</i> de enzimas con potencial para la degradación del diclofenaco.	60
CONCLUSIONES.....	62
PERSPECTIVAS.....	63
BIBLIOGRAFÍA.	64
ANEXOS.	71

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Humedal artificial para el tratamiento de aguas residuales.	8
Figura 2. Descripción de los mecanismos involucrados en la eliminación de contaminantes en un humedal artificial	10
Figura 3. Estructura química del diclofenaco.....	13
Figura 4. Vías de entrada del diclofenaco al medio ambiente.....	14
Figura 5. Vía de degradación del diclofenaco por <i>Labrys portucalensis</i> F11..	18
Figura 6. Ecuación para determinar el número de UFC/mL.	24
Figura 7. Regiones variables y oligonucleótidos del gen 16s ADNr utilizados en este proyecto.....	29
Figura 8. Humedal vertical, ubicado en la PTAR de Izúcar de Matamoros, Puebla.	30
Figura 9. Diluciones seriadas en medio mínimo M9 para el aislamiento de microorganismos capaces de crecer con 0.5 mM de diclofenaco..	31
Figura 10. Aislados bacterianos crecidos en la presencia de 0.5 mM de naproxeno, ibuprofeno o diclofenaco.	33
Figura 11. Crecimiento de los aislados en medio mínimo M9 con naproxeno, ibuprofeno o diclofenaco como fuente de carbono.....	34
Figura 12. Crecimiento del aislado HV1N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco.....	37
Figura 13. Crecimiento del aislado HV2N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco.....	37
Figura 14. Crecimiento del aislado HV3N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco.....	38
Figura 15. Crecimiento del aislado HV4N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco.....	38
Figura 16. Crecimiento del aislado HV5N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco.....	39
Figura 17. Crecimiento del aislado HV6N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco.....	39
Figura 18. Crecimiento del aislado HV9N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco.....	40
Figura 19. Crecimiento del aislado HV10N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco.....	40
Figura 20. Crecimiento del aislado HV9D en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco.....	41
Figura 21. Crecimiento del aislado HV12D en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco.....	41

Figura 22. Cromatogramas del sobrenadante del cultivo del aislado HV1N en medio mínimo M9 con diclofenaco.	42
Figura 23. Conteo de UFC/mL del cultivo en medio líquido M9 del aislado HV1N con diclofenaco grado reactivo como única fuente de carbono.....	43
Figura 24. Conteo de UFC/mL del cultivo en medio líquido M9 del aislado HV9D con diclofenaco grado reactivo como única fuente de carbono.....	44
Figura 25. Barrido de absorbancia de los sobrenadantes del cultivo HV1N conteniendo 0.75 mM de diclofenaco.....	46
Figura 26. Barrido de absorbancia del sobrenadante del cultivo HV9D conteniendo 0.75 mM de diclofenaco	47
Figura 27. Electroforesis del ADN extraído de cada uno de los diferentes aislados.	51
Figura 28. Electroforesis de los productos de PCR del gen 16S ADNr de los diferentes aislados..	52
Figura 29. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del gen 16S ADNr de las cepas aisladas de un humedal vertical..	56
Figura 30. Morfología macroscópica de las diez cepas utilizadas en este trabajo..	57
Figura 31. Tinciones de Gram de las diez cepas aisladas en este trabajo.....	58
Figura 32. Crecimiento de las diez cepas en agar centramida.....	59
Figura 33. Las diez cepas aisladas en benzoato y citrato como fuentes de carbono.	60
Figura 34. Curva de calibración del diclofenaco para análisis de muestras en HPLC.....	72
Figura 35. Cromatogramas de HPLC de las diferentes concentraciones utilizadas para la curva de calibración del diclofenaco.....	72

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1 Ejemplos de algunas clases de microcontaminantes.	11
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación del gen 16s ADNr.....	27
Tabla 3. Condiciones de PCR para amplificar el gen del 16s ADNr.....	28
Tabla 4. Mezcla de reacción de PCR para la amplificación del gen 16s ADNr.	28
Tabla 5. Lista de cepas aisladas.	32
Tabla 6. Ensayo de actividad peroxidasa en agar con antiinflamatorios (Ibuprofeno, naproxeno o diclofenaco)	48
Tabla 7. Secuencias de citocromo P450 monooxigenasas encontradas en <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas mosselli</i>	61

RESUMEN.

Los problemas de contaminación resultantes del uso indiscriminado de productos de origen antropogénico, como son los microcontaminantes, tienen un importante impacto nocivo sobre el medio ambiente. Actualmente los microcontaminantes resultan ser de un especial interés por su falta de regulación ambiental. Dentro de la clasificación de microcontaminantes se encuentran fármacos como el diclofenaco que es un antiinflamatorio no esteroideo. El diclofenaco es persistente y recurrente en aguas residuales, debido a ello, este proyecto se enfocó en el aislamiento de microorganismos que pudieran transformar/degradar diclofenaco, con el fin de desarrollar tecnología para su eliminación. Como se ha reportado anteriormente, los humedales artificiales cuentan con mecanismos para remover compuestos orgánicos, es por ello que se decidió realizar el aislamiento de microorganismos a partir de una muestra de suelo de un humedal artificial instalado en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de Izúcar de Matamoros, Puebla. Se obtuvieron treinta y cuatro aislados capaces de crecer en medio mínimo M9-agar con diclofenaco como única fuente de carbono. Diez de los aislados se seleccionaron para evaluar la capacidad de crecer y/o degradar diclofenaco en medio líquido. Los diez aislados crecieron en presencia de 0.75 mM de diclofenaco. En el cultivo del aislado HV1N se observó una disminución en la concentración del diclofenaco, sugiriendo que esta cepa lo usa como fuente de carbono.

Por otra parte, se hizo la búsqueda de enzimas que pudieran estar involucradas en la transformación/degradación del diclofenaco como la peroxidasa y la citocromo P450 monooxigenasa. Para la detección de la actividad peroxidasa en los aislados se realizaron ensayos en medio mínimo M9-agar con diclofenaco (0.75 mM), guaiacol (10 mM), y peróxido de hidrogeno (1 mM). También, se realizó la búsqueda *in silico* de la citocromo P450 monooxigenasa en el genoma de los diez aislados que dieron positivo a la prueba peroxidasa. La identificación morfológica y molecular de los diez aislados positivos a la prueba peroxidasa resultaron pertenecer al género *Pseudomonas*. Los resultados generados en este

trabajo, en su conjunto, sugieren que los diez aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* pudieran estar degradando el diclofenaco.

INTRODUCCIÓN.

La disponibilidad de agua es esencial para el desarrollo del ser humano. Con el tiempo, la demanda del agua potable ha ido en ascenso debido a las actividades socioeconómicas. (Oh et al., 2010). Según los reportes de la CONAPO, se prevé que para el año 2030 el incremento de la población provocará la disminución del agua renovable per cápita alcanzando niveles cercanos 1000 m³/habitante/año lo que se clasifica como escasez de agua (Consejo Nacional de Población, 2013). Debido a lo anterior, resulta importante la búsqueda de alternativas que puedan ayudar a depurar el agua residual, para poder reutilizarla y no solo eso, también poder mejorar la calidad de vida de los seres humanos, reduciendo enfermedades de origen hídrico.

El empleo de tecnologías alternativas de bajo costo y eficientes para el tratamiento de aguas residuales es de suma importancia para la remoción de contaminantes presentes en las aguas residuales domésticas e industriales. Un claro ejemplo de este tipo de tecnología son los humedales artificiales, debido a que son una alternativa económica en su operación y mantenimiento (Rai et al., 2013). Los humedales artificiales son zonas construidas por el hombre, que emulan los mecanismos de depuración que se dan en los humedales naturales. De forma controlada se permite la entrada (influyente) del agua contaminada al humedal y después de un tiempo de residencia se permite la salida (efluente) del agua tratada. En los humedales, la remoción de contaminantes se lleva a cabo a través de mecanismos fisicoquímicos (sedimentación, filtración, precipitación, volatilización, adsorción, fotodegradación) y biológicos mediados por las plantas (acumulación, transformación y volatilización) y por los microorganismos (transformación), siendo los microorganismos un elemento importante en el humedal porque se encargan de la degradación de nutrientes y contaminantes presentes en las aguas residuales.

Las aguas residuales están compuestas por aguas de zonas urbanas, industriales, agrícolas, y domésticas lo que conlleva a la presencia de una elevada cantidad de contaminantes orgánicos entre ellos los llamados “microcontaminantes”. El monitoreo de este tipo de contaminantes no se encuentra dentro de ningún programa de vigilancia ambiental dando como resultado la falta de regulación ambiental para este tipo de contaminantes, además, su ocurrencia ha sido detectada tanto en aguas residuales como en cuerpos naturales de agua (ríos, lagos, estuarios, aguas marinas entre otros). Cabe mencionar que por su falta de estudio, se desconocen los efectos tóxicos en el medio ambiente de la mayoría de los microcontaminantes (Thomaidis & Asimakopoulos, 2012). Los “microcontaminantes”, incluyen sustancias como productos para el cuidado personal, antisépticos, aditivos industriales, hormonas esteroideas, drogas ilícitas, aditivos alimentarios, retardantes de llama, aditivos industriales y fármacos (Lapworth, Baran, Stuart, & Ward, 2012). Dentro de los fármacos encontramos compuestos aromáticos policíclicos, que suelen encontrarse de forma persistente en cuerpos de aguas residuales (Ratola, Cincinelli, Alves, & Katsoyiannis, 2012). El diclofenaco es uno de ellos y es un antiinflamatorio no esteroideo que tiene la característica de ser recurrente y persistente en el agua residual (Lonappan, Brar, Das, Verma, & Surampalli, 2016). Por todo esto, resulta importante dirigir esfuerzos para resolver los problemas relacionados con la presencia de microcontaminantes en las aguas residuales, buscar microorganismos con la capacidad de transformar microcontaminantes, podría ser una estrategia adecuada para abordar el problema.

Con el fin de desarrollar tecnología para eliminar microcontaminantes de las aguas residuales, en este proyecto se aisló e identificó microorganismos provenientes de un humedal artificial ubicado en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de Izúcar de Matamoros, Puebla, capaces de crecer en presencia de diclofenaco como única fuente de carbono.

1. MARCO TEÓRICO.

1.1. Eficacia de los métodos de tratamiento de aguas residuales.

Las aguas residuales son una importante fuente de contaminación descargada en lagos, barrancas, canales y ríos. Según el Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en México se han registrado 2,477 plantas de tratamiento en operación, con una capacidad instalada de 177,973.58 L/s y un caudal tratado de 120,902.20 L/s, con lo que se puede alcanzar una cobertura nacional de tratamiento de aguas residuales municipales del 57.0%, cabe destacar que este registro no toma en cuenta las aguas residuales provenientes de industrias, centros comerciales y hospitales (CONAGUA, 2015). Estos datos indican que el porcentaje restante (43.0%) de aguas residuales municipales no es tratado.

Existen algunos métodos que se podrían usar para el tratamiento terciario de aguas residuales y se describen a continuación.

La ultrafiltración es un método físico, que utiliza membranas para la eliminación de partículas sólidas, el tamaño del poro determina la eficiencia del método. Las membranas de ultrafiltración con tamaños de poro de 15-50 KDa eliminan pequeñas partículas de sólidos incluyendo bacterias (Abdessemed, Nezzal, & Ben Aïm, 1999). Una limitante de la ultrafiltración es que las sustancias más pequeñas que el poro de la membrana no son retenidas, generalmente este método se usa en conjunto con otros métodos como la adsorción mediante carbón activado.

La oxidación, es un método químico que usa la dosificación de oxidantes (hipoclorito, peróxido de hidrogeno, ozono, hipoclorito de nitrato, dióxido de cloro, gas de cloro, ácido peroxiacético y oxígeno puro) para remover los componentes orgánicos e inorgánicos. Este método, tiene alta capacidad de remoción cuando

se emplea ozono como oxidante, el tratamiento con ozono remueve compuestos aromáticos y compuestos insaturados; la desventaja de este método es que genera subproductos tóxicos (Rosal et al., 2010)

El método fotoquímico que se basa en la exposición del agua a la radiación de luz ultravioleta, normalmente junto con oxidantes como el peróxido de hidrogeno y/o catalizadores como el dióxido de titanio. Durante el proceso se generan radicales hidroxilos que promueven la degradación de moléculas orgánica a bajas concentraciones. La desventaja de este método es que puede llegar a generar subproductos como metales, halogenuros, aldehídos y ácidos (Deng & Zhao, 2015).

El intercambio iónico, remueve algunos contaminantes catiónicos disueltos en el agua por medio de un material sólido (resina o zeolita), donde son intercambiados por iones con una carga similar, este método se utiliza para la desmineralización o ablandamiento del agua. Para el ablandamiento del agua, el calcio, y el magnesio u otros cationes se intercambian por sodio. Este método tiene limitantes como el uso de disolventes orgánicos costosos que son muy específicos para cada contaminante presente en el agua a tratar; otra limitante es que las resinas pueden ser obstruidas en su superficie por incrustaciones de minerales u otros componentes que producen el taponamiento de la resina (Gregory & Dhond, 1972)

Los métodos mencionados anteriormente, resultan ser ineficientes, en algunos casos, por la alta incidencia de contaminantes presentes en las aguas residuales, incluso el costo de algunos métodos resulta ser demasiado elevado como para poder ser implementados en plantas de tratamiento de aguas residuales. Por ende, los métodos de tratamiento utilizados en las PTRAs convencionales no incluyen, por lo general, tratamientos terciarios, haciendo que las PTRAs sean ineficientes para remover cierto tipo de microcontaminantes como por ejemplo los fármacos (Acuña et al., 2015; Fatta-Kassinos et al., 2011).

1.2 Humedales artificiales y su aplicación en el tratamiento de aguas residuales.

Los humedales artificiales también conocidos como humedales construidos; son una tecnología de tratamiento verde que simula los humedales naturales, han sido ampliamente usados en el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales, como lodos domésticos, efluentes industriales, agua de ríos contaminados, agua residual urbana y agrícola (Badhe, Saha, Biswas, & Nandy, 2014; Harrington & Scholz, 2010; Saeed & Sun, 2012; Yalcuk & Ugurlu, 2009).

Los humedales artificiales son utilizados actualmente como un método alternativo de tratamiento secundario y/o terciario para aguas residuales. Estos tipos de sistemas han tenido un gran auge en los últimos años debido a que requieren poca energía, un área de construcción pequeña, y los requerimientos para su operación son mínimos, haciéndolos métodos sustentables (Wu et al., 2015).

Como ya se mencionó, los humedales existen de forma natural en el planeta y abarcan aproximadamente el 6% de la superficie de la tierra (Ibáñez, 2016). Los humedales constan de un conjunto de ecosistemas (agua, suelo y vegetación), en donde el agua inunda una gran superficie del suelo.

Los humedales constan de los siguientes elementos (Figura 1).

- Suelo hídrico. Capa de suelo mineral orgánico del humedal, el cual se encuentra frecuentemente saturado con agua y en él se encuentran raíces de la vegetación presente, el material utilizado para este componente del humedal puede ser tezontle, grava, arena, entre otros. Generalmente en esta capa se encuentran también algunas conexiones de tubería o conexiones a la superficie.
- Vegetación. Se emplean plantas que son capaces de crecer en el agua (macrófitas); de las cuales las hojas emergen sobre el agua.

- Agua. La cual provee un hábitat acuático a organismos, peces y otros animales vertebrados, a las plantas macrófitas y a la población de microorganismos.
- Detrito. Es la acumulación de material vivo y material orgánico muerto en el humedal; por ejemplo, invertebrados y microorganismos como bacterias u hongos (Kadlec & Wallace, 2008; Stottmeister et al., 2003).

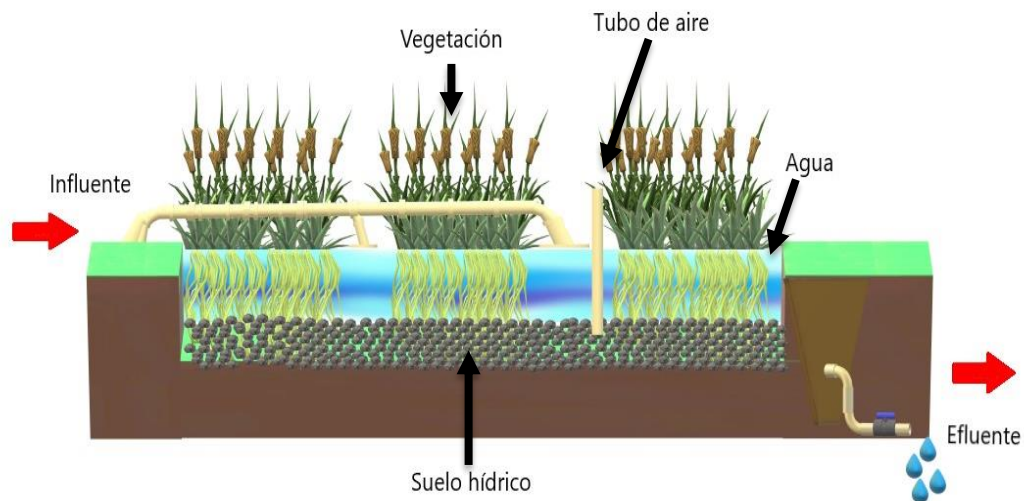


Figura 1. Humedal artificial para el tratamiento de aguas residuales.

La combinación de elementos en el humedal, así como la simbiosis planta-microorganismos, contribuyen a la eliminación de contaminantes (Figura 2). La remoción de contaminantes puede ser por medio de mecanismos fisicoquímicos, como la filtración, la sedimentación y la precipitación, incluso la luz solar elimina coliformes fecales. Por medio de mecanismos biológicos pueden eliminar algunos metales pesados como el cadmio, cobre, zinc, plomo, mercurio, selenio entre otros. En los humedales no solo se pueden remover metales pesados si no también algunos elementos como el nitrógeno y el fósforo por medio de la

precipitación y/o transformación (Delgadillo, Camacho, & Andrade, 2010; Norton, 2014; William, 1999).

En los humedales también existen mecanismos de remoción de compuestos orgánicos, llevada a cabo por los microorganismos que se encuentran en el humedal, los microorganismos usan los compuestos orgánicos como fuente de energía para su reproducción. Las reacciones que los microorganismos utilizan para la conversión de materia orgánica son, hidrólisis, oxidación y reducción.

Por otra parte, dependiendo de la profundidad en el humedal, se pueden encontrar diferentes ambientes que pueden ser colonizados por diferentes microorganismos:

En la superficie del humedal existe un ambiente aeróbico por lo tanto los microorganismos que utilizan oxígeno como aceptor final de electrones se encontrarán ahí; este ambiente es el más eficiente para transformar la materia orgánica.

En las zonas de ambiente anóxico del humedal se encuentran nitratos, carbonatos y sulfatos que sirven como aceptores finales para algunos microorganismos.

Finalmente; en el caso del ambiente anaeróbico los microorganismos utilizan los compuestos orgánicos como aceptores y donadores de electrones finales (Weber & Legge, 2013).

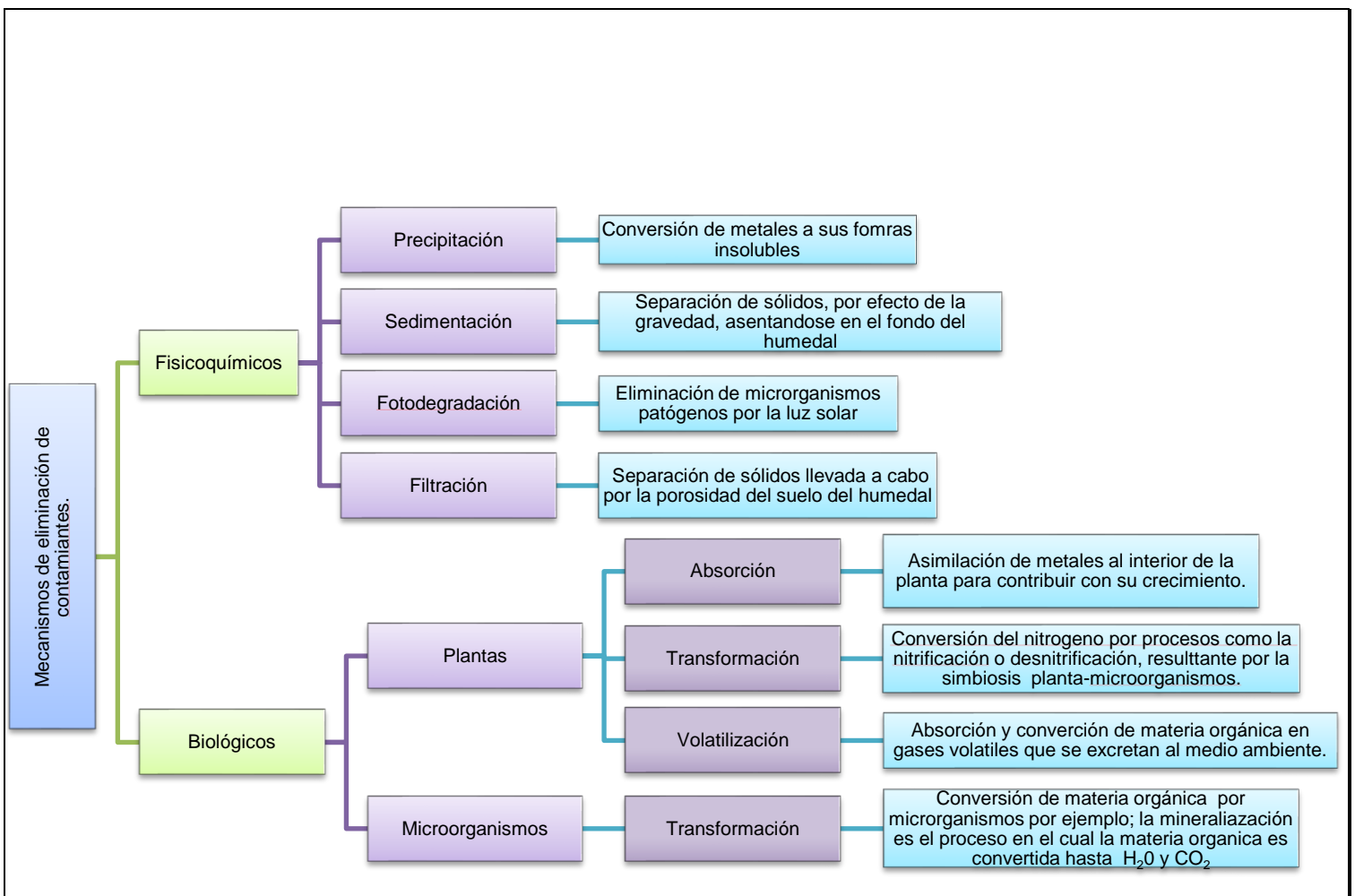


Figura 2. Descripción de los mecanismos involucrados en la eliminación de contaminantes en un humedal artificial

1.2.1 Los microcontaminantes.

La contaminación del agua es un problema creciente por la introducción de compuestos contaminantes que tienen un gran impacto en el medio ambiente y representan un riesgo potencial para salud pública. Actualmente existen un tipo de contaminantes que tiene la característica de encontrarse a bajas concentraciones en el agua conocidos como microcontaminantes (Akpor & OTohinoyi, 2014).

Según la UNESCO “un microcontaminante es cualquier producto químico, sintético o natural, que no sea comúnmente monitoreado o regulado en el medio ambiente con efectos ecológicos o para la salud humana potencialmente conocidos o sospechosos” (UNESCO-IHP International Initiative on Water Quality, 2014).

Los microcontaminantes son compuestos persistentes que no son eliminados o transformados por los tratamientos convencionales de las PTAR's, dando como resultado la detección de estas sustancias en aguas residuales ya tratadas, interaccionando con elementos o moléculas presentes en el agua formando nuevos compuestos químicos y pueden acumularse o resultar bioactivos (Das et al., 2017).

Dentro de la clasificación de los contaminantes emergentes se encuentran una diversidad de compuestos que pueden ser de origen natural o químico que se usan en actividades antropogénicas, en el Tabla 1 se muestran algunas clases de microcontaminantes.

Tabla 1 Ejemplos de algunas clases de microcontaminantes.

Clase	Por ejemplo
Retardantes de llamas	Tetrabormisfenol, Hexabormociclododecano Definil éteres polibrominados.
Pesticidas	Dicloro difenil tricloroetano (DDT), Lindano Bentazona Atrazina
Compuestos perfluorados	Sulfonato de perfluorooctanato Ácido perfluorooctanico
Fármacos y productos de origen personal (hormonas, antibióticos, productos de cuidado personal, antiinflamatorios)	Estradiol, estrona Sulfadiazina, tilmicosina Flutamida, miconazol Naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno

1.2.2 El diclofenaco como microcontaminante.

Dentro de los microcontaminantes encontramos a una clase que incluye a los fármacos (hormonas, antibióticos, antiinflamatorios), los cuales son medicamentos utilizados en la agricultura y medicina. Se estima que, en promedio anual, por persona, se consumen aproximadamente 15 gr de fármacos al año; en los países industrializados el consumo es de 50 a 150 gr. (Bravo, 2009).

En la clase que incluye a los fármacos se encuentra el diclofenaco que es un compuesto aromático con el nombre químico de Ácido 2-(2 [(2,6 diclorofenil) amino] fenil) acético (Figura 3).

El diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideo que posee propiedades analgésicas y antipiréticas, recomendado para el tratamiento de artritis y de algunas lesiones agudas; se puede administrar en la piel, por vía intramuscular u oral (NCBI, 2019). Normalmente es usado como sal de sodio o sal de potasio con la finalidad de mejorar su solubilidad y absorción, este antiinflamatorio es de venta libre sin prescripción médica en la mayoría de los países y es de un precio económico por tal razón se incrementa su consumo (Hernando, Mezcua, Fernández-Alba, & Barceló, 2006).

Basándose en los datos de salud del Intercontinental Marketing Services (IMS), se estima que en promedio se consumen 1443 ± 58 toneladas de diclofenaco a nivel mundial (Acuña et al., 2015). Cabe mencionar que en este estudio no se tomó en cuenta el consumo de diclofenaco para uso veterinario, ya que no se cuenta con la disponibilidad de datos.

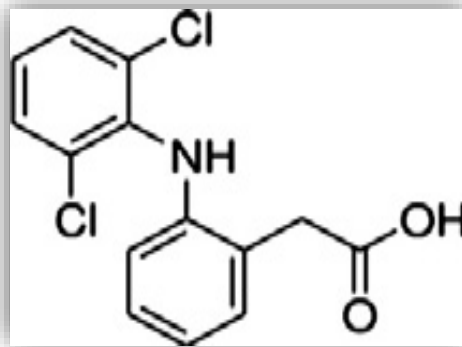


Figura 3. Estructura química del diclofenaco.

Figura tomada de www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, www.chemspider.com

A pesar de su consumo a nivel mundial, no existen medidas reglamentarias o legislaciones para la producción y el consumo del diclofenaco (Lonappan et al., 2016), causando preocupación por ser un microcontaminante con efectos adversos sobre el medio ambiente, afectando la vida de especies marinas. En seguida se describirán las vías de entrada del diclofenaco al medio ambiente (figura 4). Se comienza por la producción de este antiinflamatorio en la industria farmacéutica. Después de ser adquirido el diclofenaco es consumido. Al ser excretado por el organismo una parte de este compuesto puede permanecer como diclofenaco y el resto convertirse en metabolitos derivados del diclofenaco que enseguida terminan en aguas residuales. Es importante mencionar que el tratamiento convencional que utilizan las PTAR's no elimina completamente este microcontaminante, y dependiendo del método empleado es la eficiencia de remoción la cuál varía del 30 a 75% (Vieno & Sillanpää, 2014). Por tal razón se convierte en un microcontaminante persistente. Finalmente el diclofenaco puede terminar en aguas superficiales (Ternes, 2007). Las concentraciones de diclofenaco en aguas superficiales son de ng/L y en aguas residuales se ha detectado hasta µg/L (Schwarzenbach et al., 2006). La ocurrencia de este fármaco en el ambiente afecta a la vida marina como es el caso del crustáceo (*Daphnia magna* sp.) el cuál muere al ser expuesto a concentraciones de mg/L de diclofenaco (Haap, Triebkorn, & Köhler, 2008). En otro estudio realizado en el pez medaka japones (*Oryzias latipes*) el diclofenaco en concentraciones de ng/L

puede afectar a este pez a nivel renal y gastrointestinal (Lee, Ji, Lim Kho, Kim, & Choi, 2011) En el caso del pez cebra se observó el retraso de eclosión cuando los embriones fueron expuestos a $\mu\text{g/L}$ de diclofenaco (Letzel, Metzner, & Letzel, 2009). A pesar de existir evidencia de los efectos adversos del diclofenaco para la vida acuática, el estudio de este microcontaminante en el medio ambiente ha sido poco investigado.

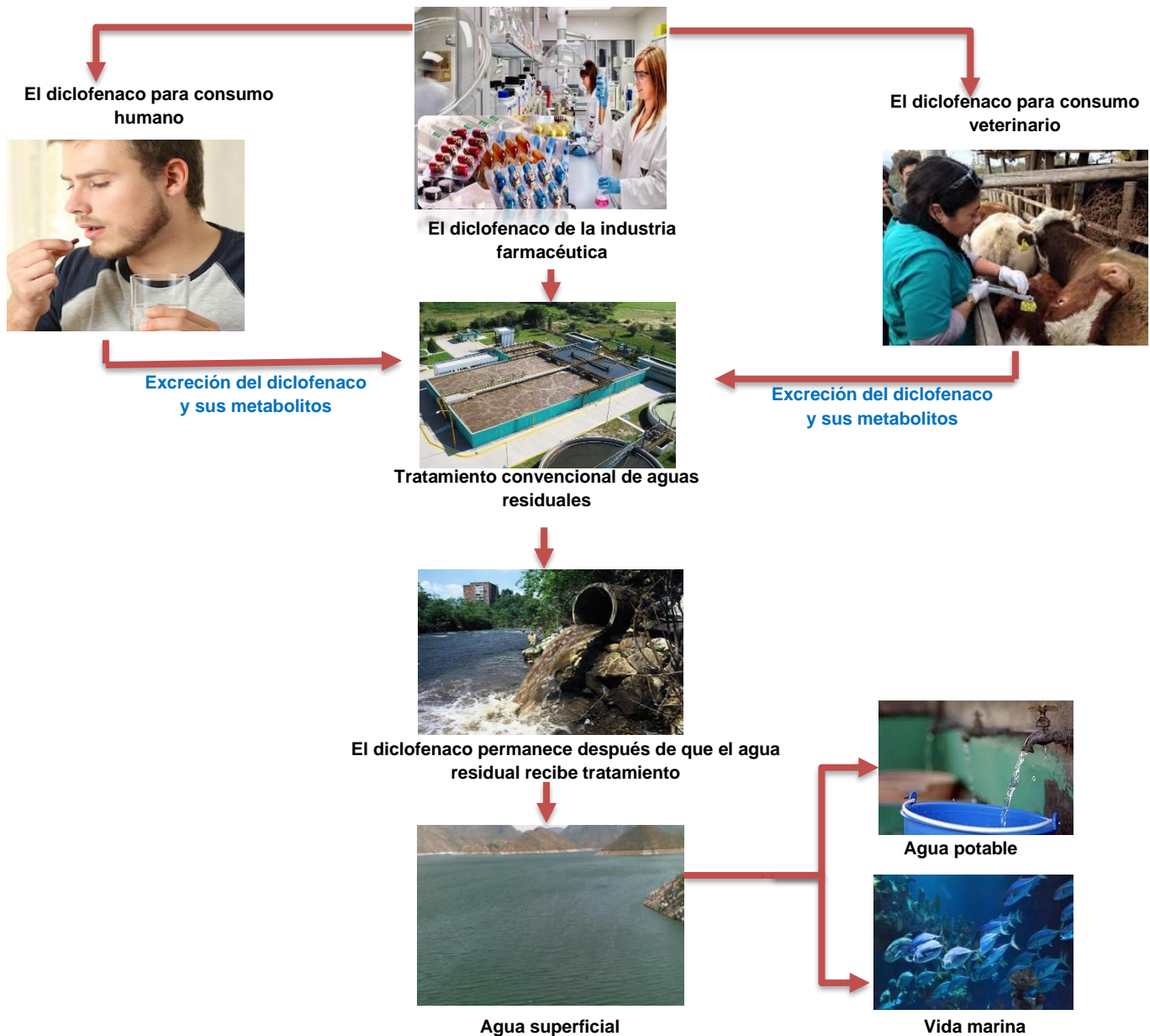


Figura 4. Vías de entrada del diclofenaco al medio ambiente. Figura modificada de Lonappan et al., (2016).

1.3. ANTECEDENTES.

En el estado de Puebla, la PTAR de Izúcar de Matamoros hace sus descargas en el río Nexapa. Un estudio sobre la calidad del agua del río Nexapa demostró la presencia de contaminantes como fármacos, productos para el cuidado personal (galaxolide y tonalide), protectores solares (Parsol CMX y Sunchen UV15), estimulantes (cafeína) y otros de uso frecuente en la industria (metildihidrojasmonato) (Navarro A., Herrera J., 2006; Navarro A., 2006; Navarro F. A. E., Montufar S E., Ramírez G. M., Téllez V. A., Rodríguez., 2005).

Por lo anterior, en la PTAR de Izúcar de Matamoros, Puebla, se instalaron sistemas de humedales híbridos combinando mesocosmos verticales y horizontales como tratamiento terciario para depurar las aguas residuales. Los humedales fueron construidos utilizando plantas macrófitas como *Typha spp.* y *Phragmites australis*. El porcentaje de remoción de algunos microcontaminantes como cafeína, galaxolide, naproxeno, alquilenosles y coprostanol en los humedales fue de hasta 86%. (Morales, 2016).

A pesar de contar con antecedentes que demuestran la remoción de microcontaminantes por medio de humedales artificiales, aún se desconocen en detalle los mecanismos que causan tal efecto en los humedales. Los microorganismos juegan un papel crucial en la degradación de la materia orgánica en el humedal (Weber & Legge, 2013), se presume que los microorganismos cuentan con enzimas que podrían estar involucradas en la transformación/degradación de microcontaminantes. Una enzima que es capaz de degradar compuestos aromáticos e incluso compuestos xenobióticos, utilizada en la depuración de aguas residuales es la peroxidasa, que por su inespecificidad puede degradar una amplia variedad de compuestos (Lundell, Mäkelä, & Hildén, 2010). Las peroxidasas que son oxidorreductasas, reducen el peróxido de hidrogeno y oxidan una variedad de compuestos; contienen un grupo hemo, protoporfirina IX como grupo prostético (Hamid & Khalil-ur-Rehman, 2009). Las

peroxidasas aplicadas en la biorremediación han sido las de la clase II que incluye la versátil peroxidasa, lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa. Estas peroxidasas son enzimas extracelulares secretadas por hongos descomponedores de la lignina, son eficientes para oxidar compuestos aromáticos de alto potencial redox (Sugawara et al., 2017).

Algunas otras peroxidasas como la superfamilia de decolorantes del tinte (DyP) presentes mayoritariamente en bacterias, han sido capaces de oxidar colorantes (a lo cual se debe su nombre) y compuestos aromáticos recalcitrantes (Bansal & Kanwar, 2013). Otras peroxidasas son las peroxigenasas UPO, estas son enzimas que catalizan reacciones de oxifuncionalización dependiendo del sustrato en particular, y las condiciones de reacción, pertenecientes a la familia hemo-tiolato peroxidasa (Hofrichter, Ullrich, Pecyna, Liers, & Lundell, 2010), otra enzima perteneciente a esta familia es la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumado* cuya capacidad de oxidar contaminantes emergentes ha sido comprobada (León, A, 2015).

Los estudios enfocados a la degradación de compuestos como el diclofenaco son pocos y la mayoría han sido reportados en hongos. Un estudio realizado sobre la degradación del diclofenaco por una versátil peroxidasa de *Bjerkandera adusta* pudo degradar en 80% el diclofenaco presente en la muestra (2.5 mg/L) en un lapso de tiempo de 25 minutos (Eibes, Debernardi, Feijoo, Moreira, & Lema, 2011). *Phanerochaete sordida* YK624 degradó el diclofenaco (0.1 mg/L) en 6 días (Hata, Kawai, Okamura, & Nishida, 2010), también se observó la degradación del diclofenaco (10 mg/L) por *Trametes versicolor* en tan solo 24 horas (Marco-Urrea, Pérez-Trujillo, Cruz-Morató, Caminal, & Vicent, 2010), en estos dos últimos estudios se propone que está involucrada la citocromo P450 monooxigenasa, una enzima capaz de hidroxilar el diclofenaco.

En microorganismos se sabe que una enzima involucrada en la degradación del diclofenaco es la citocromo P450 monooxigenasa. Se han reportado trabajos sobre la degradación del diclofenaco mediante bacterias, como es el caso de un consorcio microbiano aislado del suelo de un bosque, capaces de eliminar el

diclofenaco a concentraciones de 0.1 y 1.0 g/L en menos de 10 días, pero se desconocen los mecanismos involucrados (Facey, Nebel, Kontny, Allgaier, & Hauer, 2018). Existe otro estudio más detallado sobre la degradación del diclofenaco y sus intermediarios, llevado a cabo por una sola bacteria (*Labrys portucalensis F11*); aislada de un suelo contaminado, la cual fue capaz de degradar el 70% del diclofenaco presente en el medio de cultivo a concentraciones de 1.7-34 μM . El estudio de los intermediarios producidos durante la biodegradación del diclofenaco sugiere que la enzima citocromo P450 monooxigenasa es la encargada de realizar el primer paso de transformación del diclofenaco. A continuación, se explica la formación de los metabolitos resultado de la degradación del diclofenaco por *Labrys portucalensis F11* (Figura 5). Se detectaron 12 metabolitos intermediarios en la degradación del diclofenaco. El DCF 1 son especies de diclofenaco monohidroxilado; el DCF 3 es resultado de pérdida de CO_2 , HCL y H_2O , aquí se puede observar la fragmentación por hidroxilación del diclofenaco, sustituyendo al cloro (deshalogenación). La formación de los isómeros hidroxilados, generalmente son catalizados por monooxigenasas y dioxigenasas. Para la formación del DCF 4 ocurre una metilación en el hidroxilo llevado a cabo, hipotéticamente, por una metiltransferasa. Para el DCF 5 ocurre una descarboxilación, este metabolito fue detectado solamente en la alimentación periódica con acetato durante el cometabolismo y supuestamente es llevado a cabo por una descarboxilasa. Para el DCF 6 hubo una formación de un enlace doble, para la formación del DCF 7 se sugiere la adición de dos oxígenos que se debe a una doble hidroxilación del anillo aromático, para el DCF 8 se produce una descarboxilación, después ocurre una hidroxilación por una monooxigenasa en los metabolitos 9 y 10. Finalmente, se adiciona un grupo azufre al DCF 11 presuntamente por la enzima sulfatransferasa, ocurriendo una reacción de sulfación en el DCF 12. La formación de los metabolitos 4 y 12 no ha sido reportada en otros estudios por lo que falta aún la confirmación de las estructuras (Moreira et al., 2018).

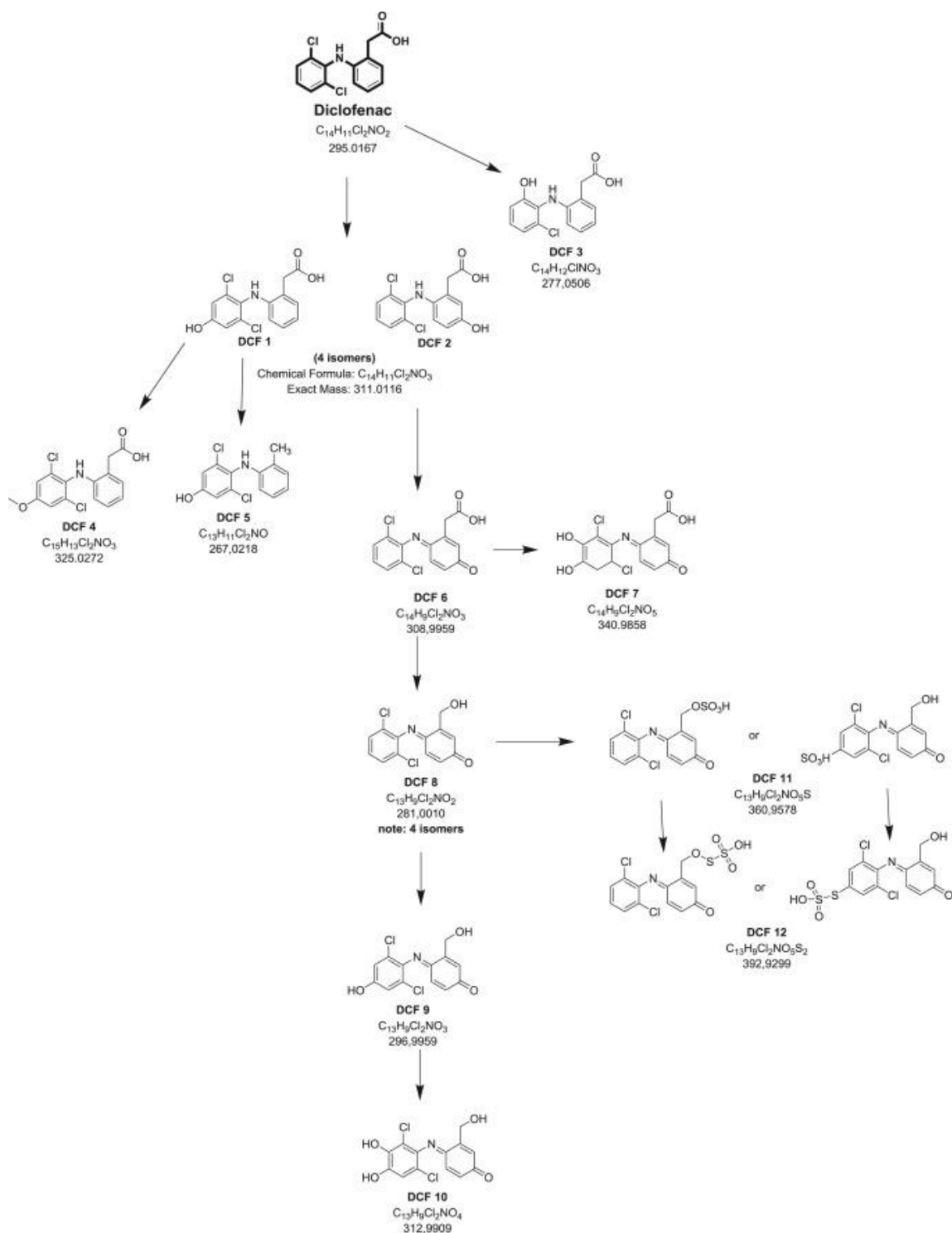


Figura 5. Vía de degradación del diclofenaco por *Labrys portucalensis* F11.
 Figura tomada de Moreira et al., (2018).

2. JUSTIFICACIÓN.

El uso excesivo de antiinflamatorios no esteroideos tales como el diclofenaco naproxeno e ibuprofeno ha propiciado la aparición de estos microcontaminantes en el ambiente a concentraciones que podrían representar una amenaza seria contra los seres vivos. El proceso convencional de tratamiento de aguas residuales tiene una limitada capacidad para remover este tipo de microcontaminantes, causando su aparición en cuerpos de agua. El diclofenaco es considerado un microcontaminante persistente presente en aguas residuales en concentraciones del orden de microgramos que afecta a los ecosistemas marinos y que incluso podría estar comprometiendo la salud pública por su incidencia en aguas potables y subterráneas. Por lo anterior es necesario desarrollar tecnologías que nos permitan eliminar microcontaminantes como el diclofenaco de las aguas residuales o transformarlo en compuestos menos nocivos. El objetivo del presente estudio fue aislar microorganismos capaces de crecer en presencia de diclofenaco como única fuente de carbono para posteriormente investigar los mecanismos de degradación y/o transformación que nos permitan desarrollar conocimiento y tecnología para depurar las aguas residuales.

2.1 HIPÓTESIS.

Existen microorganismos, presentes en los humedales artificiales, capaces de transformar o degradar microcontaminantes como el diclofenaco.

2.2 OBJETIVO GENERAL.

Aislar de microorganismos capaces de degradar/transformar diclofenaco a partir de suelo de humedales artificiales.

2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Aislar microorganismos capaces de crecer en presencia de diclofenaco, como única fuente de carbono.
2. Determinar si los microorganismos aislados presentan actividad de peroxidasa.
3. Identificar molecularmente a los microorganismos aislados.
4. Realizar una búsqueda *in silico*, en los genomas de los microorganismos aislados, de enzimas con potencial para degradar el diclofenaco.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.

2.3.1 Muestreo.

Se tomó una muestra del suelo de un humedal a una profundidad aproximada de 20 cm. El muestreo se realizó conforme a la Norma Oficial Mexicana NOMM-021-RECNAT-2000. Las condiciones de transporte para las muestras de suelo fueron a 4°C, en recipientes de polietileno con tapa de cierre hermética.

2.3.2 Aislamiento de microorganismos.

Para el aislamiento de microorganismos provenientes del suelo de un humedal vertical de la PTR de Izúcar de Matamoros, Puebla, se realizó la siguiente metodología; en un tubo falcon se agregó 1 gramo de suelo del humedal vertical el cuál fue disuelto en 10 mL de agua estéril, y se le adicionó 0.5 mM de antiinflamatorio (diclofenaco sódico inyectable marca AMSA; naproxeno e ibuprofeno, genéricos de farmacias del ahorro), al inicio del proyecto se comenzó a trabajar con estos tres antiinflamatorios. Sin embargo; después el proyecto se centró en el diclofenaco ya que es el antiinflamatorio menos estudiado. Otro procedimiento para el aislamiento se realizó sin enriquecer la muestra de suelo con antiinflamatorio. Por ello se pesó 1 gramo de suelo y se disolvió en 10 mL de agua estéril. Como control negativo se agregó en un tubo falcon 10 mL de agua estéril y el antiinflamatorio. Los tubos con las muestras de suelo y el control negativo se incubaron a 30°C por 24 h en agitación a 150 rpm en un agitador marca Labnet Orbit modelo 1900.

Una vez transcurridas las 24 h se procedió a realizar diluciones seriadas, para las tres diferentes suspensiones (suelo+antiinflamatorio+agua, suelo+agua y antiinflamatorio+agua) de cada uno de los tres diferentes antiinflamatorios. Las

diluciones fueron 1/10, 1/00, 1/1,000, 1/10,000, 1/100,00 y 1/1,000,000 se tomó 20 μ L de cada dilución para platear en medio mínimo M9 (Anexo 1) con el respectivo antiinflamatorio como única fuente de carbono a una concentración de 0.75 mM. Se dejó incubar las placas a 30°C por 24 h.

A partir del crecimiento microbiano en placa de MM9-antiinflamatorio se escogieron colonias independientes y de diferente morfología. Se procedió a realizar varias resiembras en medio LB (anexo 2) hasta aislar.

2.3.3 Crecimiento de aislados en medio mínimo M9-agar con fuente de carbono naproxeno, ibuprofeno o diclofenaco.

Para este ensayo primero se preparó un preinóculo de cada uno de los treinta y cuatro aislados en LB-antiinflamatorio (naproxeno, ibuprofeno o diclofenaco, dependiendo del antiinflamatorio del cual fuera proveniente el aislado), después se inoculo cada uno de los treinta y cuatro aislados en un volumen de 250 μ L de LB-antiinflamatorio en una placa ELISA durante 24 h a 30°C a 150 rpm. Pasadas las 24 h se procedió a realizar el método de sellado masivo que consistió en estampar microgotas con ayuda de un replicador metálico en placas de medio sólido M9-antiinflamatorio. Las placas fueron incubadas a 30°C por 24 h. (Corral, Lugo et al., 2012).

2.3.4 Determinación de actividad peroxidasas de forma cualitativa en agar.

Para este ensayo se utilizó medio mínimo M9-agar (anexo 2), adicionándole los siguientes componentes con sus respectivas concentraciones finales: guaiacol 10 mM, diclofenaco (DCF) 0.75 mM, peróxido de hidrogeno 1 mM. Para este ensayo

se realizó un preinóculo de cada una de los treinta y cuatro aislados en un volumen de 250 μ L con LB-antiinflamatorio en una microplaca durante 24 h a 30°C a 150 rpm. Después se procedió a realizar el método de sellado masivo de los treinta y cuatro aislados en MM9-agar con guaiacol para observar cual aislado tenía actividad positiva a peroxidasa. Finalmente, las placas se incubaron a 30°C y se monitorearon por 5 días.

2.3.5 Conteo de UFC en placa a partir de cultivos en medio líquido M9.

Para estos experimentos se realizó un preinóculo en un tubo falcon con 10 mL de LB-diclofenaco (0.75 mM) que se incubó a 30°C por 24 h en agitación. Subsecuentemente se centrifugó a 5000 rpm por 10 min y después se realizó un lavado con agua inyectable estéril (marca PiSA), esto se repitió dos veces. Una vez realizados los lavados se ajustó a una densidad óptica (D.O) de 0.1 en un matraz de 250 mL con MM9-diclofenaco (0.75 mM) con 50 mL de medio líquido y se dejó incubando a 37 °C en agitación en un agitador orbital Thermo Scientific modelo MaxQ 4000. Una vez inoculado el matraz se midió la D.O a las 0 h, 10 h, 24 h, 48 h y 72 h, a la par que se realizó el conteo de colonias para determinar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Muñoz, Rojas et al., 2016). Para esto primero se realizaron diluciones seriadas 1/10 hasta 1/1,000,000 después se tomaron 20 μ L de cada dilución y se plateó en el medio sólido, se dejó incubar las placas durante 24 h a 37°C, después se procedió a calcular las UFC (Figura 6). Los controles fueron en medio M9-SC (sin fuente de carbono) con cada una de los aislados. Estos experimentos se realizaron por triplicado para las diez cepas que presentaron actividad peroxidasa y se determinó la desviación estándar.

La misma metodología se aplicó para los ensayos realizados con diclofenaco sódico grado reactivo marca Sigma Aldrich el cual se disolvió en metanol. Se realizó un cultivo control con medio mínimo M9-metanol para descartar que las

bacterias estuvieran utilizando el metanol como fuente de carbono. Estos ensayos con diclofenaco grado reactivo y sus controles se realizaron por duplicado excepto el de metanol que fue ensayo único.

$$UFC/ml = NC \times FDX50'$$

Figura 6. Ecuación para determinar el número de UFC/mL.

Donde, NC= número de colonias, FD= Factor de dilución, 50= número para convertir a mL (se agrega una gota de 20 µL).

2.3.6. Análisis en HPLC.

Para monitorear si el diclofenaco era degradado, se realizó un análisis de cromatografía líquida de alta presión en un cromatógrafo marca Perkin Elmer Serie 200 equipado con detector UV-Vis modelo 785A sistema de interfase Network Chromatography NC1900. Para ello se inyectó 20 µL de las muestras del sobrenadante de cada uno de los cultivos. Cada una de las muestras fue diluida en 1:100, antes de ser inyectadas al cromatógrafo. La fase móvil fue 50% H₂O y 50% acetonitrilo con una velocidad de flujo de 0.8 mL/min. La longitud de onda para detectar el diclofenaco fue de 276 nm.

2.3.7. Barrido de absorbancia para determinar cambios en la estructura de la molécula del diclofenaco.

Para realizar el barrido de absorbancia de las muestras se tomó de estas 300 µL y se diluyeron con 700 µL de medio mínimo M9 sin fuente de carbono utilizando una celda de cuarzo de 1 mL. Se procedió a realizar la lectura en un rango de 200 a

600 nm en un espectrofotómetro UV-Vis marca Varían modelo Cary 50 de haz simple equipado con el software Cary Winuv.

2.3.8 Identificación de los microorganismos.

2.3.8.1 Tinción de Gram.

Para comenzar con la identificación de los microorganismos, lo primero que se realizó fue la tinción de Gram (Gram Equipo de colorantes, Hycel). Y se realizó lo siguiente. Se preparó un frotis en un portaobjetos que después fue fijado con calor por la flama de un mechero, después se cubrió con el colorante violeta de genciana, se esperó un minuto. Se escurrió el colorante violeta de genciana y después se cubrió con solución yodo de Gram, se esperó un minuto. Luego, se lavó con alcohol cetona hasta su decoloración y dejó secar los restos de alcohol. Después, se cubrió el frotis con colorante safranina y se esperó un minuto. Finalmente, se lavó repetidas veces con agua corriente hasta eliminar el colorante, se secó; y se observó al microscopio. Para observar las muestras en el microscopio óptico marca Motic modelo BA-200, se utilizó el objetivo 100x agregando aceite de inmersión entre el objetivo y el preparado.

2.3.9 Producción de pioverdina.

Para producir el pigmento pioverdina los aislados se crecieron en agar centramida (Anexo 3). Los aislados fueron sembrados e incubados a 30°C por 48 h y luego fueron expuestos a luz UV en un transiluminador, Marca Spectroline modelo TR-365R.

2.3.10. Crecimiento en citrato y benzoato como única fuente de carbono.

Para saber si estas cepas utilizan el citrato y el benzoato como única fuente de carbono se preparó medio mínimo M9-citrato, M9-benzoato con 10 mM de citrato o benzoato, adicionándole cloranfenicol (100µg/L). Se agregó 20 µL de preinóculo líquido LB-DCF (0.75 mM) de cada uno de los diez aislados, en la placa de agar sólido previamente preparada, posteriormente se dejó incubar a 30°C por 24 h.

2.3.11 PCR del gen 16s ADNr.

Para la identificación molecular de los microorganismos primero se realizó la extracción de ADN genómico (Bacteria DNA preparation kit, Jena Bioscience).

Preparación para bacterias Gram negativas.

A. Lisis celular. Se realizó un cultivo “overnight” en LB-DCF (0.75 mM) el cual se incubó a 30°C en agitación. Se tomó 500 µL de cultivo y se centrifugó a 10,000 g por 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Después, se mezcló vigorosamente por 30-60 s. Y se agregó 8 µL de proteinasa K mezclándose por pipeteo luego se incubó a 60°C por 10 min y se dejó enfriar por 5 min. Después se agregó 300 µL de buffer de unión y se mezcló suavemente. Se colocó el tubo en hielo por 5 min y se centrifugó por 5 min a 10,000 g.

A. Activación de columna. Se pasó la columna a un tubo de colección de 2 mL y se agregó 100 µL de buffer de activación en la columna, se centrifugó a 10,000 g por 30 s y se descartó el sobrenadante.

B. Carga de columna. Se pasó la columna en un tubo de colección de 2 mL. Y se transfirió el lisado a la columna y se centrifugó a 10,000 g por 30 s. Se descartó el sobrenadante.

D. Lavado primario. Se agregó 500 µL de buffer de lavado en el centro de la columna y se centrifugó por 30 s a 10,000 g. Se descartó el sobrenadante

C. Lavado secundario. Se agregó 500 µL de buffer de lavado in la columna, se centrifugó por 30 s a 10,000 g y se descartó el sobrenadante a continuación se centrifugó nuevamente a 10,000 g por 1 min para remover el buffer de lavado residual y se descartó el tubo de 2 mL y se colocó la columna en un tubo de elución

D. Elución de ADN. Se agregó 40 µL de agua en el centro de la columna y se incubó a temperatura ambiente por 1 min. Por último, se centrifugó a 10,000 g por 2 min y el permeado se almacenó a -20°C

El ADN se cuantificó en un NanoDrop modelo 2000 de Thermo Scientific y se observó la integridad del ADN en un gel de agarosa al 1%. El gel se corrió a 100 volts por 40 min. Una vez cuantificado el ADN genómico se realizaron dos reacciones de PCR del gen 16s ADNr con un volumen de 20 µL (Tabla 4) por aislado utilizando el reactivo master mix (GoTaq, Green,2x, Promega). Para la PCR se utilizaron los oligonucleótidos universales, 27f y 1391r (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación del gen 16s ADNr.

8f (Forward)	5' TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3'	(Turner, Pryer, Miao, & Palmer, 1999).
1391r (Reverse)	5'CAG GGG CGG TGT GTA CA 3'	Modificado de Walker & Pace, (2007).

Tabla 3. Condiciones de PCR para amplificar el gen del 16s ADNr.

Desnaturalización	95°C-3 min 95°C-30 s
Alineamiento	52°C-45 s
Extensión	72°C-1.40 min 30x 72°C-5 min 12°C- α

Tabla 4. Mezcla de reacción de PCR para la amplificación del gen 16s ADNr.

Componente	Cantidad (μL)
Master mix	10
Oligonucleótido forward	1
Oligonucleótido reverse	1
ADN	1 (\approx 75 ng)
Agua libre de nucleasas	7
<i>Volumen total</i>	20

Arriba se presentan las condiciones que se utilizaron para la PCR (Tabla 3), después de realizar la PCR se corrió un gel de agarosa al 1% a 100 volts por 40 min. El producto PCR fue de aproximadamente 1400 pb (Figura 7). Posteriormente realizó la purificación del producto de PCR (Zymoclean DNA recovery Kit). Para esto primero se cortó el fragmento de gel de agarosa y se transfirió el trozo de agarosa a un microtubo de 1.5 mL, después se agregó 3 volúmenes de ADB por cada volumen de agarosa. Luego se incubó a 55°C por 10 minutos hasta que la agarosa este completamente disuelta. Después se transfirió la solución de agarosa derretida a una columna de Zymo Spin en un tubo de colección. Se centrifugó por 60 s a 10,000 g y se descartó el sobrenadante. Luego, se agregó 200 μ L de Buffer de lavado a la columna y centrifugó por 30 s, se descartó el sobrenadante y se repitió el paso. Finalmente se agregó 15 μ L de agua

directamente a la matriz de la columna. La columna se transfirió a un microtubo de 1.5 mL y centrifugó por 60 s para eluir el ADN.



Figura 7. Regiones variables y oligonucleótidos del gen 16s ADNr utilizados en este proyecto. V1-V9 son regiones hipervariables en el gen 16s ADNr, los oligonucleótidos utilizados fueron 8f y 1391r mostrados en flechas azules. Figura modificada de <https://help.ezbiocloud.net/16s-rna-and-16s-rna-gene/>.

Se midió la concentración y la pureza del purificado en un NanoDrop. Los purificados del gen del 16s ADNr se mandaron a secuenciar al Laboratorio de Servicios Genómicos Langebio-Cinvestav, Irapuato, Gto. Las secuencias se analizaron con el programa BioEdit; y se alinearon con el programa Clustal Omega.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Muestreo del humedal.

Se tomaron muestras de suelo de un humedal vertical (Figura 8) localizado en la PTAR de Izúcar de Matamoros Puebla, una vez tomadas las muestras, estas fueron transportadas y almacenadas en refrigeración hasta su uso.



Figura 8. Humedal vertical, ubicado en la PTAR de Izúcar de Matamoros, Puebla.

3.1.2. Aislamiento de microorganismos.

Para el aislamiento que se observa en la placa de la Figura 9b, se platearon diluciones de una suspensión constituida de un gramo de suelo en 10 mL de agua

estéril la cual se incubó por 24 h a 30°C previo a realizar las diluciones seriadas. De igual forma se hizo el aislamiento en placa de la Figura 9c, pero en este caso la suspensión de suelo se suplementó con 0.5 mM de diclofenaco (DCF) grado medicamento inyectable. Para descartar que el diclofenaco *per se*, tuviera microorganismos, se incluyó un control negativo que consistió en una suspensión 0.5 mM de diclofenaco la cual también se incubó por 24 h a 30°C previo a las diluciones seriadas (Figura 9a). Las diluciones se platearon en medio mínimo M9 donde la única fuente de carbono fue el diclofenaco (0.5 mM). Como se muestra en la figura 9, el diclofenaco comercial grado inyectable no contiene ninguna

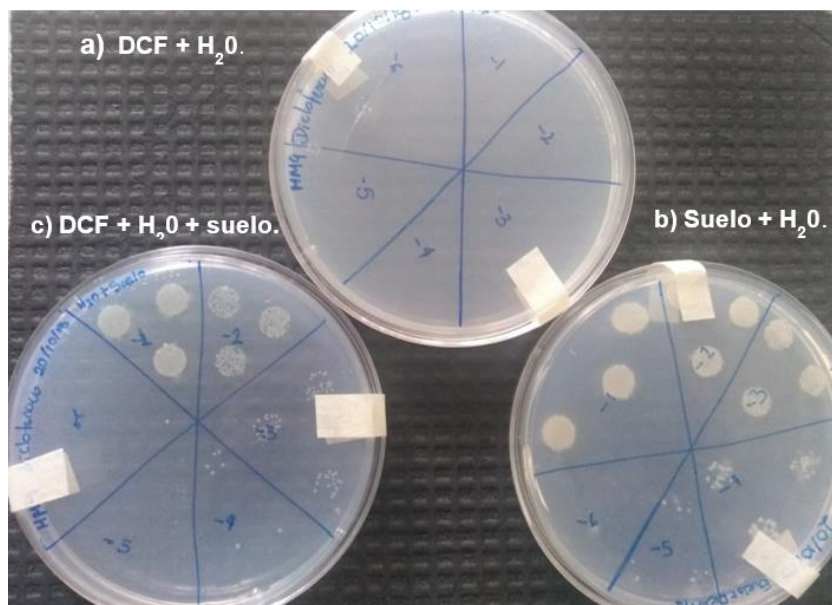


Figura 9. Diluciones seriadas en medio mínimo M9 para el aislamiento de microorganismos capaces de crecer con 0.5 mM de diclofenaco.

a) Control negativo constituido de diclofenaco y agua, no se obtuvo crecimiento por lo tanto el material se encontraba estéril. b) Suelo de humedal con agua, el crecimiento se observa hasta la dilución 1/100,000 se obtuvieron 2.5×10^8 UFC/gr c) Suelo de humedal suplementado con 0.5mM de diclofenaco, se obtuvo crecimiento hasta la dilución 1/1000,000 con 1.5×10^9 de UFC/gr.

bacteria capaz de crecer en medio mínimo con diclofenaco como única fuente de carbono. Aparentemente la incubación del suelo con diclofenaco aumentó el número de bacterias ya que se observó crecimiento a una dilución mayor (Figura

9c). Este mismo procedimiento de aislamiento se realizó para ibuprofeno y naproxeno, con resultados similares al crecimiento mostrado en las placas con diclofenaco. Una vez crecidas las colonias de las diluciones 1/10, 000 y 1/1,000,000 de los diferentes antiinflamatorios, se tomaron colonias con diferentes morfologías y se realizaron varias rondas de resiembras por estría hasta el completo aislamiento de colonias con morfologías únicas.

A continuación, en la Figura 10, se muestran los aislados obtenidos a partir del medio mínimo M9 con antiinflamatorio como fuente de carbono. El número de aislados obtenidos con el antiinflamatorio naproxeno fueron quince, con ibuprofeno fueron siete y con diclofenaco fueron doce. Los cuales fueron nombrados de la siguiente manera ver Tabla 5.

Tabla 5. Lista de cepas aisladas.

Naproxeno (15 aislados)	HV1N, HV2N, HV3N, HV5N, HV5N, HV6N, HV7N, HV8N, HV9N, HV10N, HV11N, HV12N, HV13N, HV14N, HV15N.
Diclofenaco (12 aislados)	HV1D, HV2D, HV3D, HV4D, HV5D, HV6D, HV7D, HV8D, HV9D, HV10D, HV11D, HV12D.
Ibuprofeno (7 aislados)	HV1B, HV2B, HV3B, HV4B, HV5B, HV6B, HV7B
Por ejemplo. HV1N	
HV= humedal vertical, 1= número de aislado, N, B, D= naproxeno, ibuprofeno o diclofenaco respectivamente	

Naproxeno



Ibuprofeno



Diclofenaco



Figura 10. Aislados bacterianos crecidos en la presencia de 0.5 mM de naproxeno, ibuprofeno o diclofenaco.

3.1.3. Crecimiento de los aislados en medio mínimo M9-agar con fuente de carbono naproxeno, ibuprofeno o diclofenaco.

Los 34 aislados fueron capaces de crecer en los tres diferentes antiinflamatorios sin importar la procedencia del medio mínimo M9-antiinflamatorio del que fueron aislados (Figura 11). Cada círculo representa el crecimiento de cada uno de los diferentes aislados. Además, como control negativo se crecieron los treinta y cuatro aislados en medio mínimo M9 sin fuente de carbono (SC), esperando que ningún aislado creciera ya que dicho medio no contenía fuente de carbono; sin embargo, si hubo crecimiento. El crecimiento de estos aislados en el control negativo puede sugerir dos cosas: 1) El agar contenía otros compuestos orgánicos

que pudieron favorecer el crecimiento de los microorganismos. 2) Los aislados bacterianos tienen la capacidad de usar el agar como fuente de carbono. Esta segunda opción es muy poco probable ya que se sabe que las bacterias agarolíticas son capaces de producir un cráter indicando el consumo de agar (Poduval & Ghadi, 2017) y en nuestras placas no se observó dicho fenómeno. Considerando que el agua destilada pudiera contener residuos de contaminantes

capaces de proveer la fuente de carbono para el crecimiento de microorganismos, se utilizó agua grado inyectable (PisA) para formular el medio sólido (agar-agua),

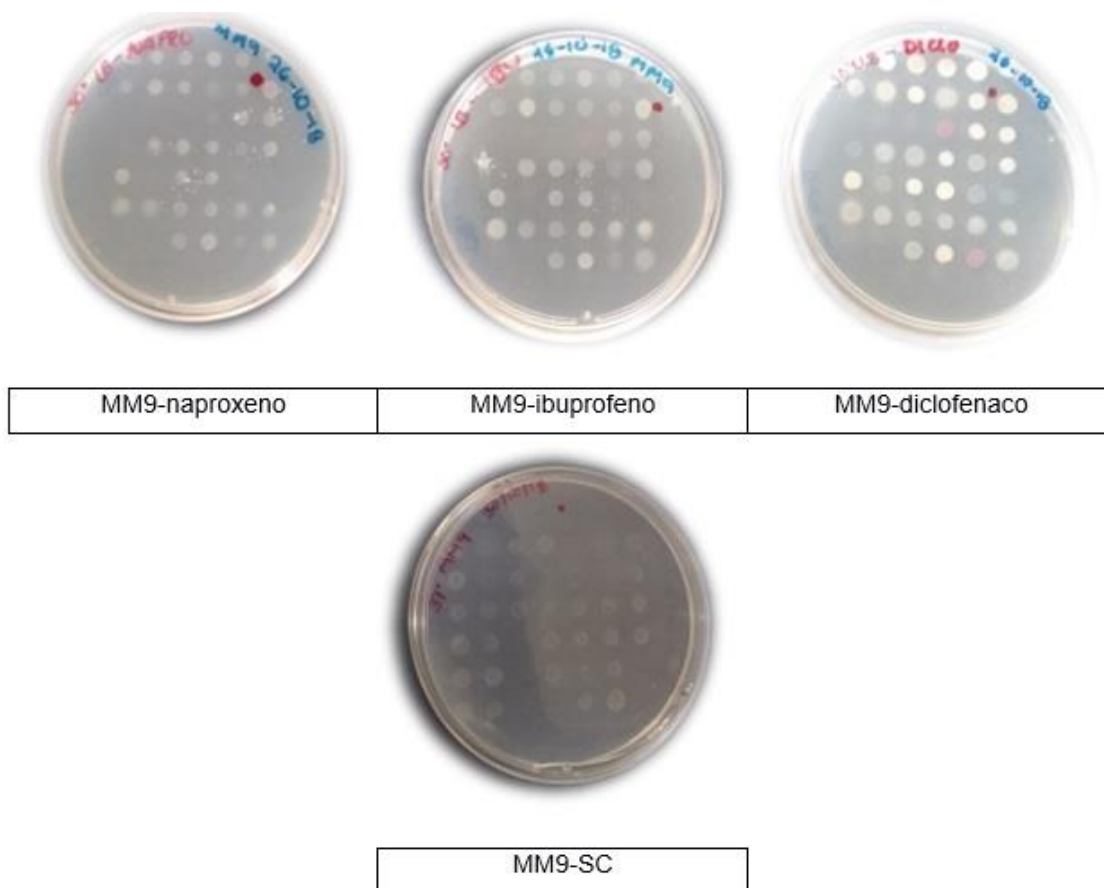


Figura 11. Crecimiento de los aislados en medio mínimo M9 con naproxeno, ibuprofeno o diclofenaco como fuente de carbono.

pero aun así los aislados bacterianos fueron capaces de crecer. Este resultado nos hizo cuestionar si el crecimiento observado de las figuras 10 y 11 se debió a los posibles nutrientes del agar o a los antiinflamatorios.

Para contestar este cuestionamiento se realizaron cultivos líquidos en medio mínimo M9 con diclofenaco como fuente de carbono y se determinó el crecimiento mediante el conteo de colonias bacterianas.

3.2 Crecimiento bacteriano en medio mínimo líquido M9 con diclofenaco como fuente de carbono.

Se evaluó el crecimiento de los aislados en medio líquido con diclofenaco comercial inyectable como fuente de carbono (MM9-DCF) con su respectivo control negativo, el cual consistió en un cultivo inoculado con su respectiva bacteria cuyo medio no contenía ninguna fuente de carbono (MM9-SC). De los treinta y cuatro aislados se seleccionaron diez cepas que presentaron actividad peroxidasa (descrito más adelante en la tabla 6 de la sección 3.3) para realizar los cultivos en medio líquido, cuyas curvas se presentan a continuación en las figuras 12 a la 21.

El crecimiento del cultivo del aislado HV1N se muestra en la Figura 12. En el panel “a” se graficó el logaritmo de las UFC/mL contra el tiempo. Se muestra el crecimiento del cultivo control sin fuente de carbono (MM9-SC) y del cultivo con 0.75 mM de diclofenaco grado inyectable. El número de bacterias en el cultivo sin fuente de carbono incrementó en un orden de magnitud en 72 h, mientras que en presencia de diclofenaco el número de bacterias aumentó casi dos órdenes de magnitud. El aumento del número de bacterias en el cultivo sin diclofenaco fue inesperado y se observó en la mayoría de los cultivos de los aislados. En el panel “b” de la Figura 12 se muestra el aumento de la turbidez como indicativo de crecimiento medido en densidad óptica. Para el cultivo sin fuente de carbono el

aumento de la densidad óptica fue nulo, pero significativo para los cultivos con diclofenaco.

Observando el incremento (el final menos el inicial) en log de UFC/mL el mayor fue para HV5N con 2.23 (Figura 16), HV12D con 2.26 (Figura 19) y HV10N (Figura 21) con 2.05 y el resto de las cepas fueron capaces de incrementar en al menos 1.5 el log de las UFC/mL. Respecto a la turbidez, las cepas que alcanzaron mayor densidad óptica a 600 nm en sus cultivos fueron las siguientes, HV10N con 2.59, la HV9D con 2.0 y la HV12D con 1.94.

Los resultados nos muestran que la densidad óptica solo nos da un indicio del crecimiento sin embargo no es un método tan confiable como el conteo de UFC para determinar crecimiento.

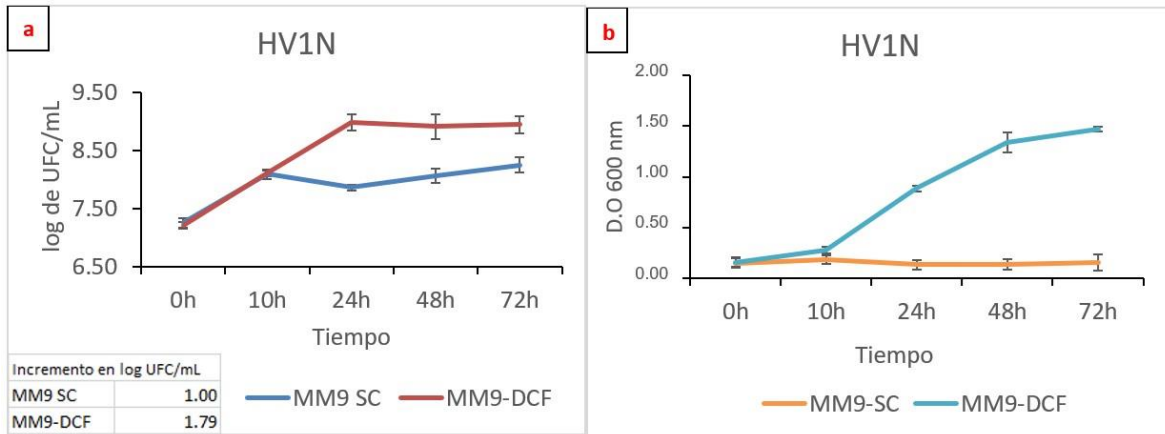


Figura 12. Crecimiento del aislado HV1N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco. a) Conteo de UFC/ mL hasta las 72 h de cultivo. b) Densidad óptica alcanzada hasta las 72 h de cultivo.

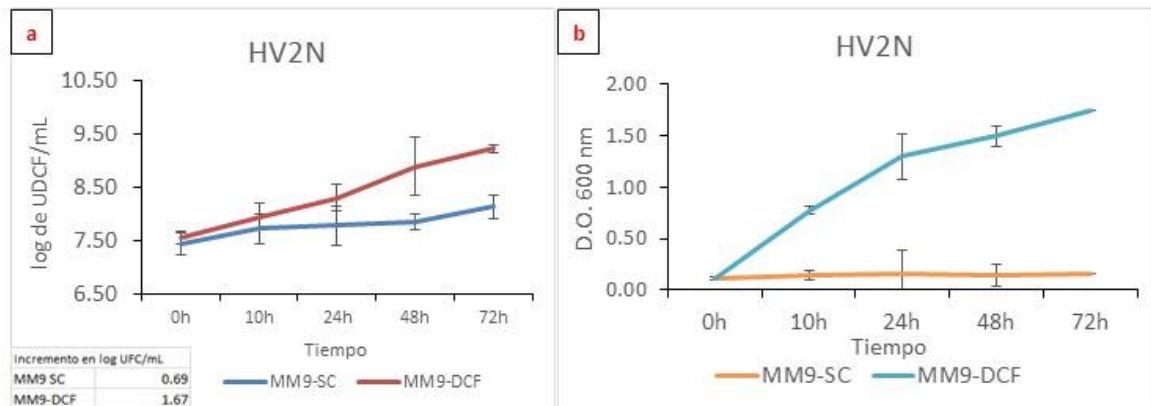


Figura 13. Crecimiento del aislado HV2N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco. a) Conteo de UFC/ mL hasta las 72 h de cultivo. b) Densidad óptica alcanzada hasta las 72 h de cultivo.

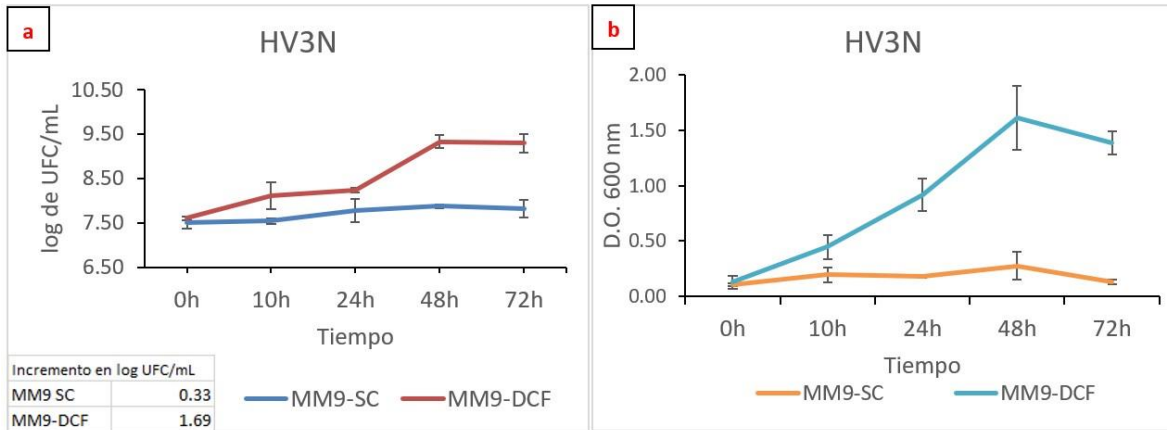


Figura 14. Crecimiento del aislado HV3N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco. a) Conteo de UFC/ mL hasta las 72 h de cultivo. b) Densidad óptica alcanzada hasta las 72 h de cultivo.

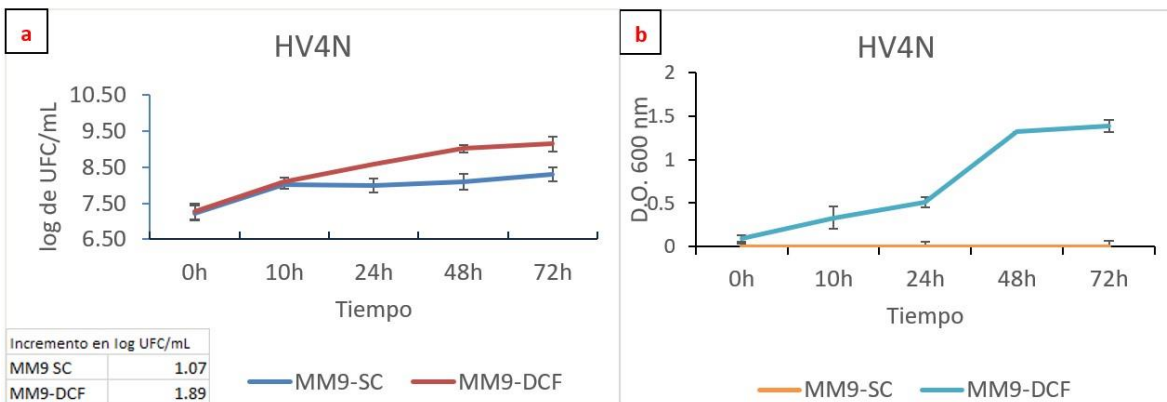


Figura 15. Crecimiento del aislado HV4N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco. a) Conteo de UFC/ mL hasta las 72 h de cultivo. b) Densidad óptica alcanzada hasta las 72 h de cultivo.

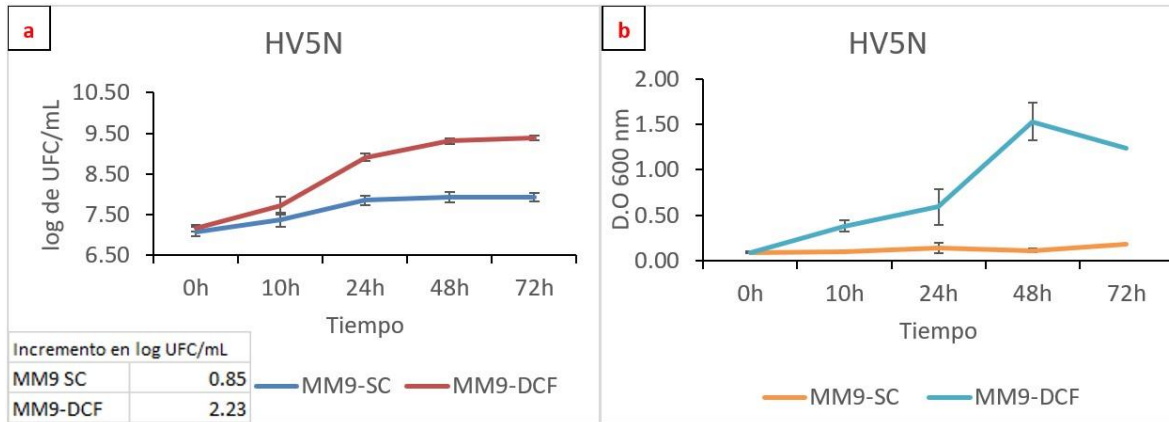


Figura 16. Crecimiento del aislado HV5N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco. a) Conteo de UFC/ mL hasta las 72 h de cultivo. b) Densidad óptica alcanzada hasta las 72 h de cultivo.

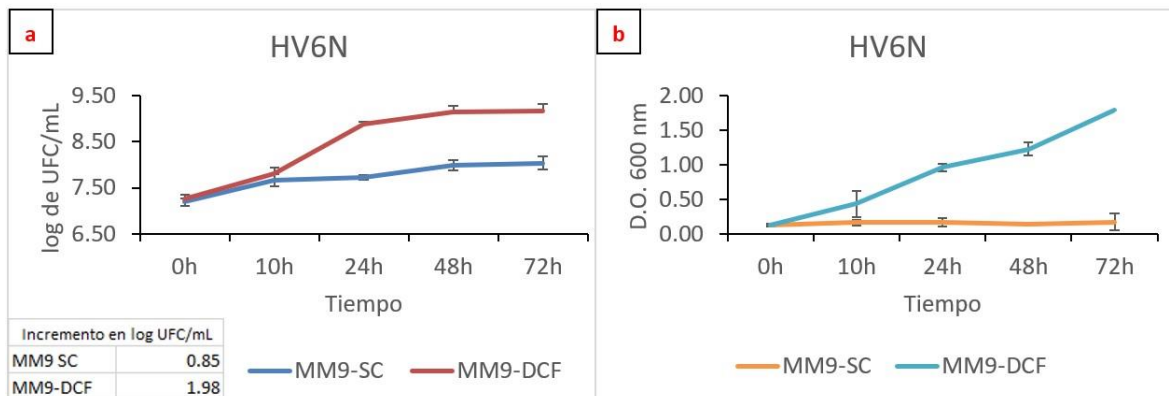


Figura 17. Crecimiento del aislado HV6N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco. a) Conteo de UFC/ mL hasta las 72 h de cultivo. b) Densidad óptica alcanzada hasta las 72 h de cultivo.

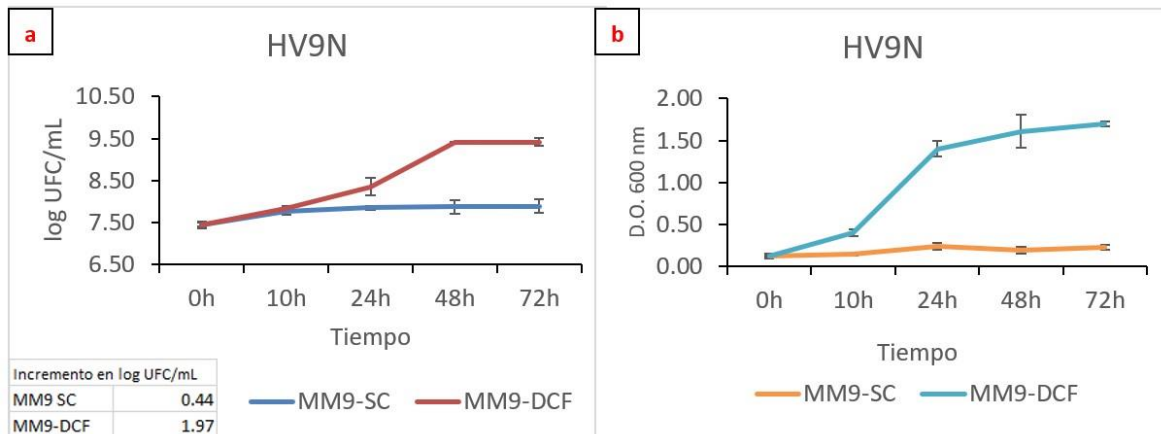


Figura 18. Crecimiento del aislado HV9N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco. a) Conteo de UFC/ mL hasta las 72 h de cultivo. b) Densidad óptica alcanzada hasta las 72 h de cultivo.

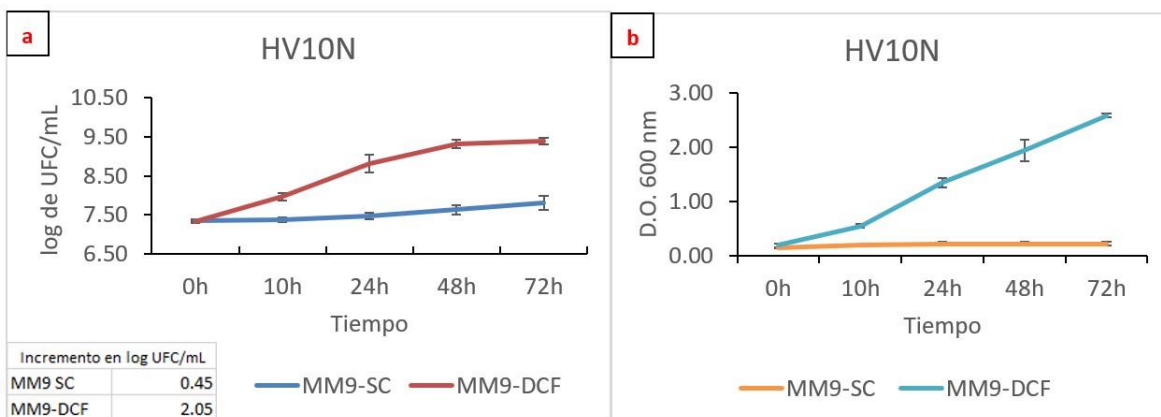


Figura 19. Crecimiento del aislado HV10N en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco. a) Conteo de UFC/ mL hasta las 72 h de cultivo. b) Densidad óptica alcanzada hasta las 72 h de cultivo.

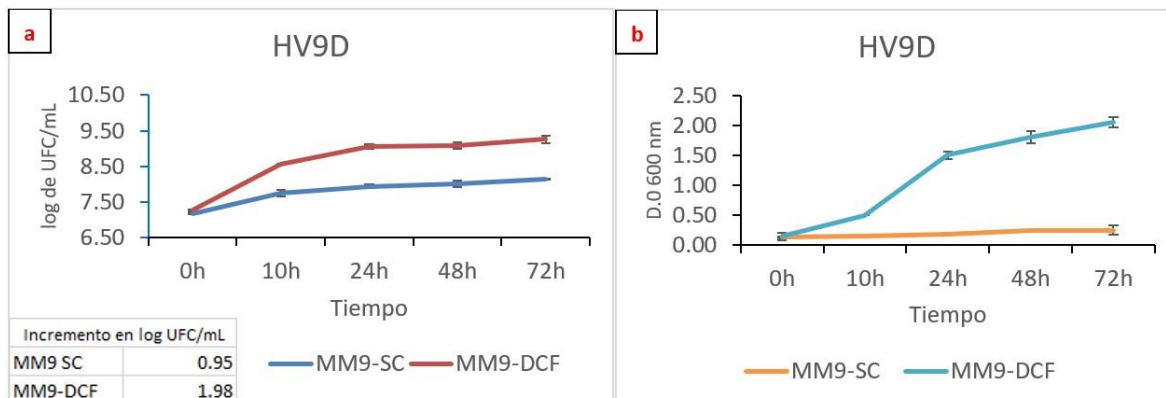


Figura 20. Crecimiento del aislado HV9D en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco. a) Conteo de UFC/ mL hasta las 72 h de cultivo. b) Densidad óptica alcanzada hasta las 72 h de cultivo.

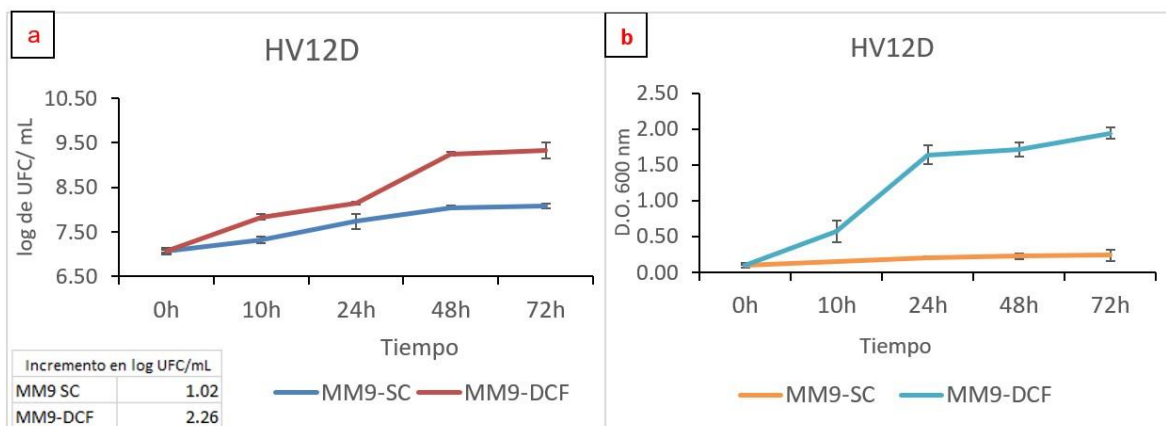


Figura 21. Crecimiento del aislado HV12D en medio mínimo M9 líquido con diclofenaco 0.75 mM o sin diclofenaco. a) Conteo de UFC/ mL hasta las 72 h de cultivo. b) Densidad óptica alcanzada hasta las 72 h de cultivo.

El aumento en el número de bacterias observado en las curvas de crecimiento sugiere que las bacterias aisladas podrían estar metabolizando el diclofenaco utilizándolo como fuente de carbono. Si esto fuera así, entonces la concentración de diclofenaco en el medio de cultivo debería disminuir con el transcurso de la fermentación. Para comprobar lo anterior, se analizó la concentración de diclofenaco a las 0 h, 10 h, 24 h, 48 h y 72 h de cultivo mediante HPLC.

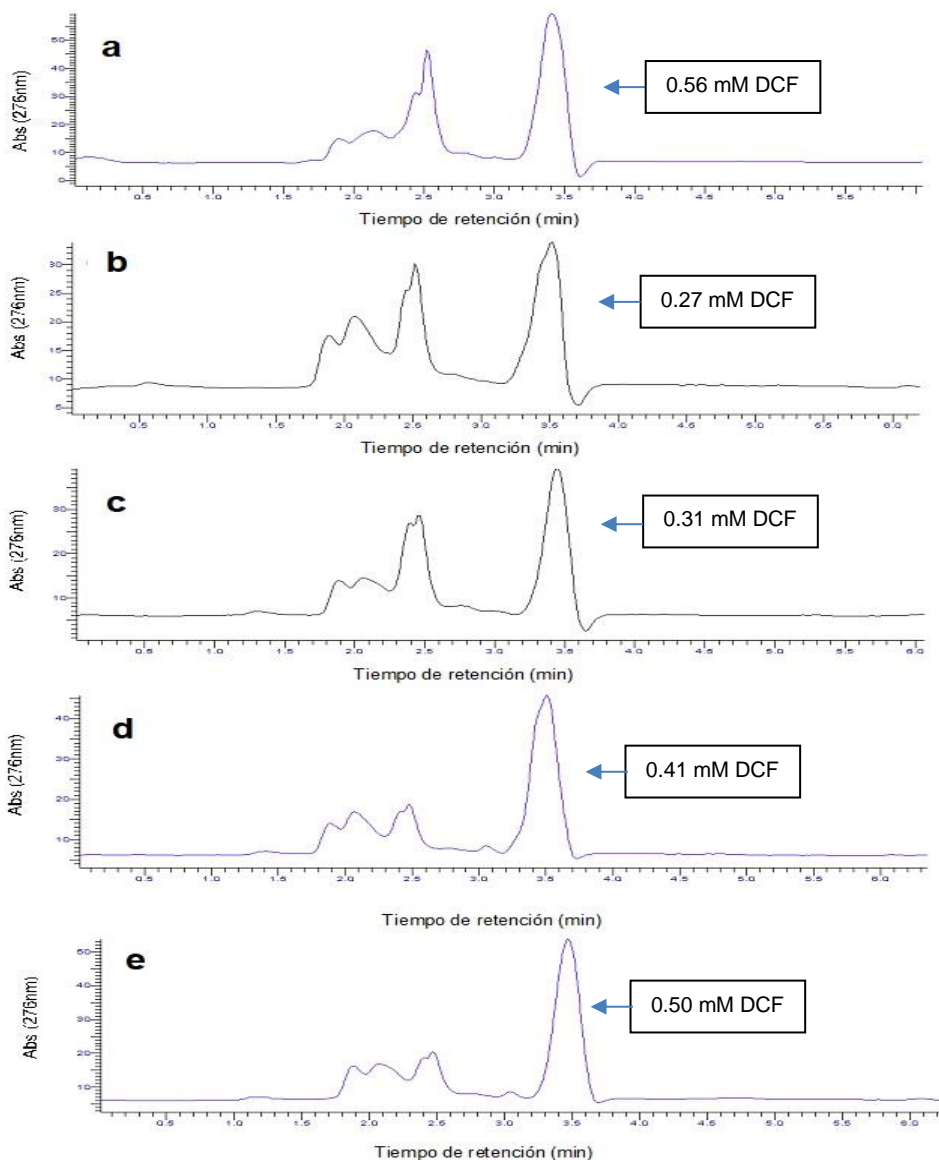


Figura 22. Cromatogramas del sobrenadante del cultivo del aislado HV1N en medio mínimo M9 con diclofenaco a) 0 h, b) 10 h, c) 24 h, d) 48 h y e) 72 h. El pico con tiempo de retención 3.41-3.52 min corresponde al diclofenaco.

Se selecciono el aislado HV1N para el análisis de metabolitos mediante HPLC (Figura 22). En los cromatogramas de la Figura 22 se observa un pico con tiempo de retención de 3.41-3.52 min que corresponde al diclofenaco. Los resultados del análisis en HPLC indican que la concentración de diclofenaco al inicio y final del cultivo son prácticamente iguales lo cual sugiere que no se está degradando y posiblemente el aumento en UFC observado en las Figuras 12 a la 21 se debe a que el excipiente del diclofenaco inyectable contiene alcohol bencílico y propilenglicol que podrían ser usados como fuente de carbono (Basu, Dixit, & Phale, 2003).

Para determinar si los componentes del excipiente del diclofenaco inyectable (e. g. alcohol bencílico y propilenglicol) estaban contribuyendo al aumento del número de bacterias en los cultivos en medio líquido, se decidió realizar triplicados de un cultivo en medio mínimo del aislado HV1N y HV9D usado a 0.75 mM diclofenaco grado reactivo (Sigma CAS:15307-79-6). Los resultados del aislado HV1N se muestran en la Figura 23.

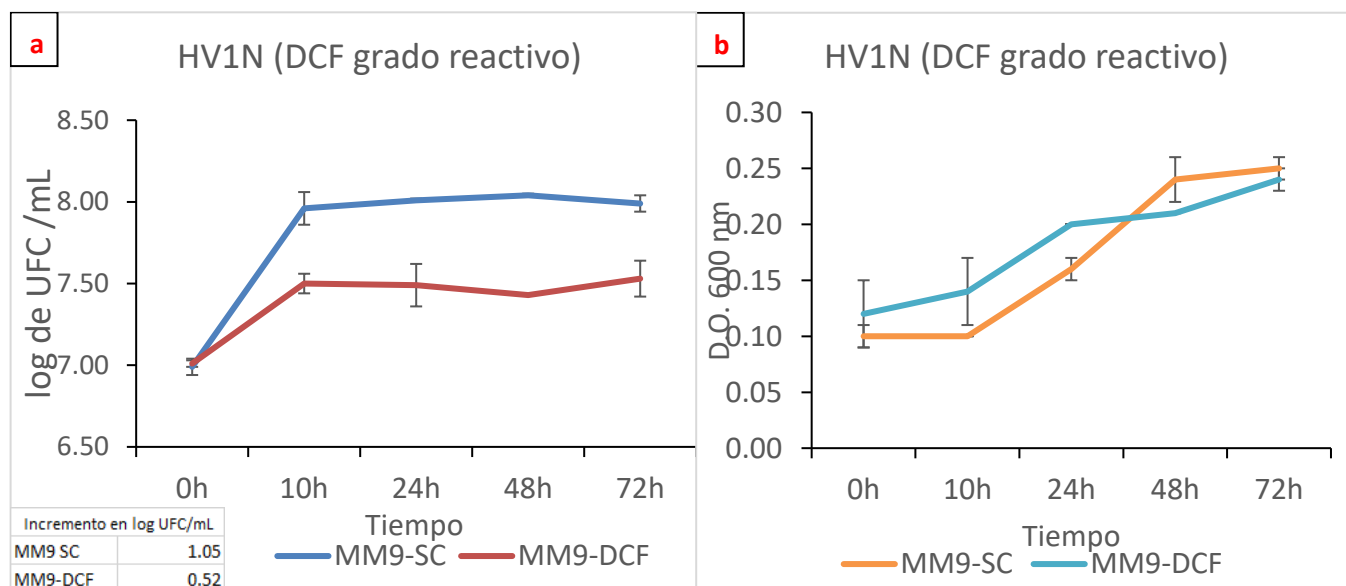


Figura 23. Conteo de UFC/mL del cultivo en medio líquido M9 del aislado HV1N con diclofenaco grado reactivo como única fuente de carbono. a) Conteo de UFC hasta las 72 h de cultivo. b) Densidad óptica del cultivo hasta las 72 h.

El número de UFC/mL en el cultivo del aislado HV1N con diclofenaco grado reactivo (Figura 23) no aumentó tanto como lo hizo con el diclofenaco inyectable (Figura 12), lo cual sugiere que el diclofenaco inyectable contiene algún componente que promueve un mayor crecimiento. Algo inesperado fue que el número de UFC/mL en el cultivo control (cultivo sin fuente de carbono de la Figura 23), al igual que el cultivo control de la figura 12, aumento las UFC/mL en un orden de magnitud en 72 h de cultivo. Posiblemente el agua destilada que se usó contenía materia orgánica suficiente para causar dicho efecto, y habría que realizar otros experimentos para explicar lo observado.

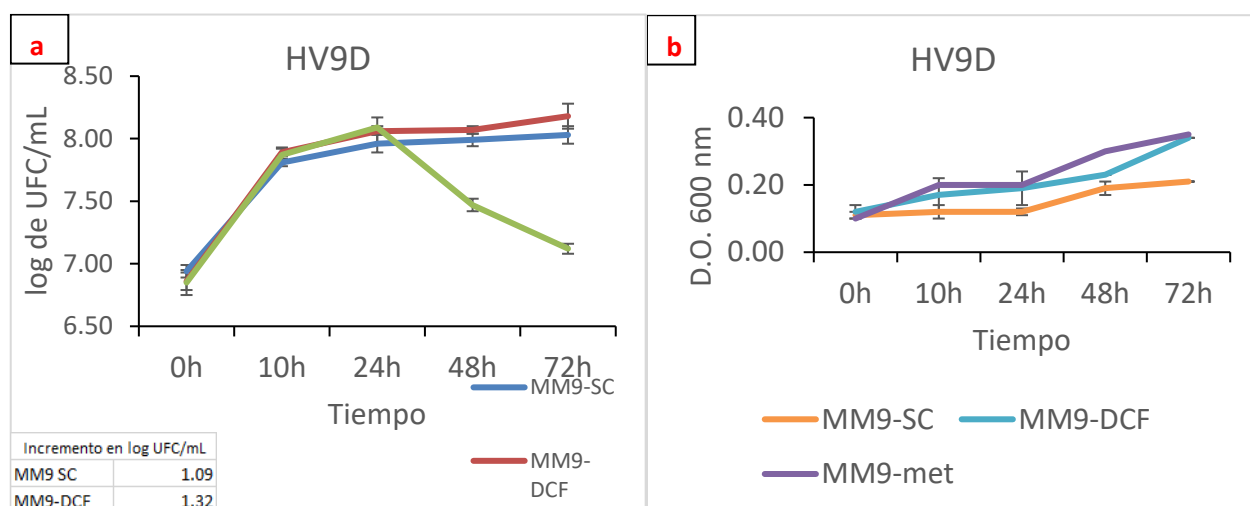


Figura 24. Conteo de UFC/mL del cultivo en medio líquido M9 del aislado HV9D con diclofenaco grado reactivo como única fuente de carbono. a) Conteo de UFC hasta las 72 h de cultivo. b) Densidad óptica del cultivo hasta las 72 h.

También se realizó un cultivo con el aislado HV9D (Figura 24) utilizando diclofenaco grado reactivo en medio líquido (MM9-DCF). En este caso tanto el cultivo con diclofenaco como control negativo (cultivo sin fuente de carbono) incrementaron en un poco más de un orden de magnitud UFC/mL. En este caso el tener una fuente de carbono (diclofenaco grado reactivo) no produjo ninguna ventaja en crecimiento ya que tanto en el control negativo (sin fuente de carbono)

como en el cultivo con diclofenaco crecieron igual. Para el cultivo aislado HV9D se incluyó un segundo control negativo utilizando metanol (MM9-met) a la misma concentración usada para disolver el diclofenaco en el cultivo MM9-DCF (Figura 24). Con metanol las UFC/mL aumentan las primeras 24 h, pero luego disminuyen hacia el final del cultivo. La densidad óptica para los tres cultivos no aumento más de 0.1 unidades en 72 h; a diferencia de los cultivos con diclofenaco inyectable que alcanzaban 1.4 unidades de densidad óptica.

El mínimo crecimiento de los aislados en medio líquido con diclofenaco grado reactivo (Figuras 23 y 24) y los resultados de HPLC sugerían la no utilización del diclofenaco como fuente de carbono, pero pensamos que tal vez era posible que las bacterias tuviesen la capacidad de modificar la molécula del diclofenaco en una molécula menos tóxica para ellas. Así que se decidió realizar un barrido de absorbancia para generar un espectro de absorción UV-Vis de la molécula del diclofenaco grado reactivo a los distintos tiempos de cultivo (Figura 25a). Los espectros de absorción cambian con el tiempo, sugiriendo una transformación de la molécula del diclofenaco. Como era esperado por lo reportado en la literatura, la máxima absorbancia se observó a los 276 nm (Figura 25a). La absorbancia a 276 nm de las muestras de sobrenadante del cultivo disminuye con el tiempo (Figura 25b) sugiriendo que el diclofenaco está siendo degradado. Dicha disminución en la absorbancia no se debe a efectos de degradación por la incubación o temperatura ya que el control (diclofenaco en medio líquido incubado a 37°C por 72 horas) no presentó ningún cambio en la absorbancia a 276 nm (línea azul Figura 25b).

Otros microorganismos como *Klebsiella sp.* KSC y *Enterobacter hormaechei* D15 pueden degradar el diclofenaco en un lapso de 72 h y 48 h, con concentraciones de 0.23 y 0.33 mM, respectivamente (Aissaoui, Ouled-Haddar, Sifour, Harrouche, & Sghaler, 2017; Stylianou, Hapeshi, Vasquez, Fatta-kassinou, & Vyrides, 2018). En el caso del aislado HV9D parece haber degradación a las 24 h y 48 h, pero la absorbancia tiende a subir a las 72 h (Figura 26) tal vez esto sea porque el aislado está produciendo algún compuesto que este absorbiendo a esta longitud de onda.

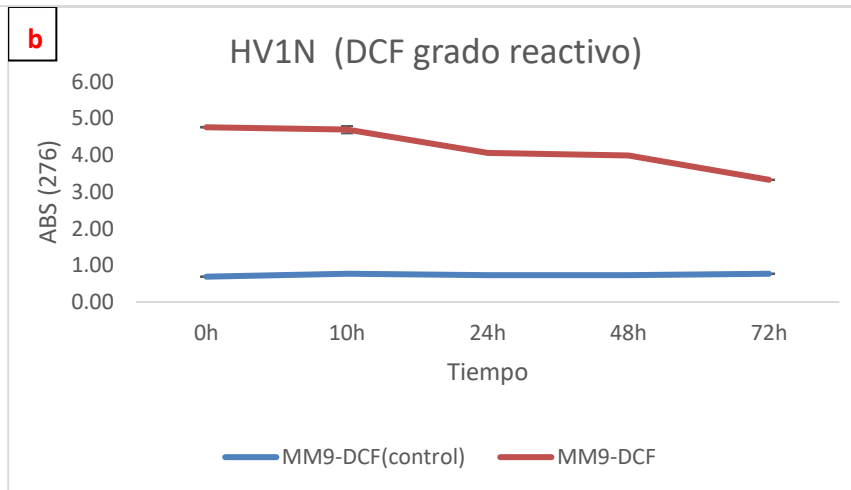
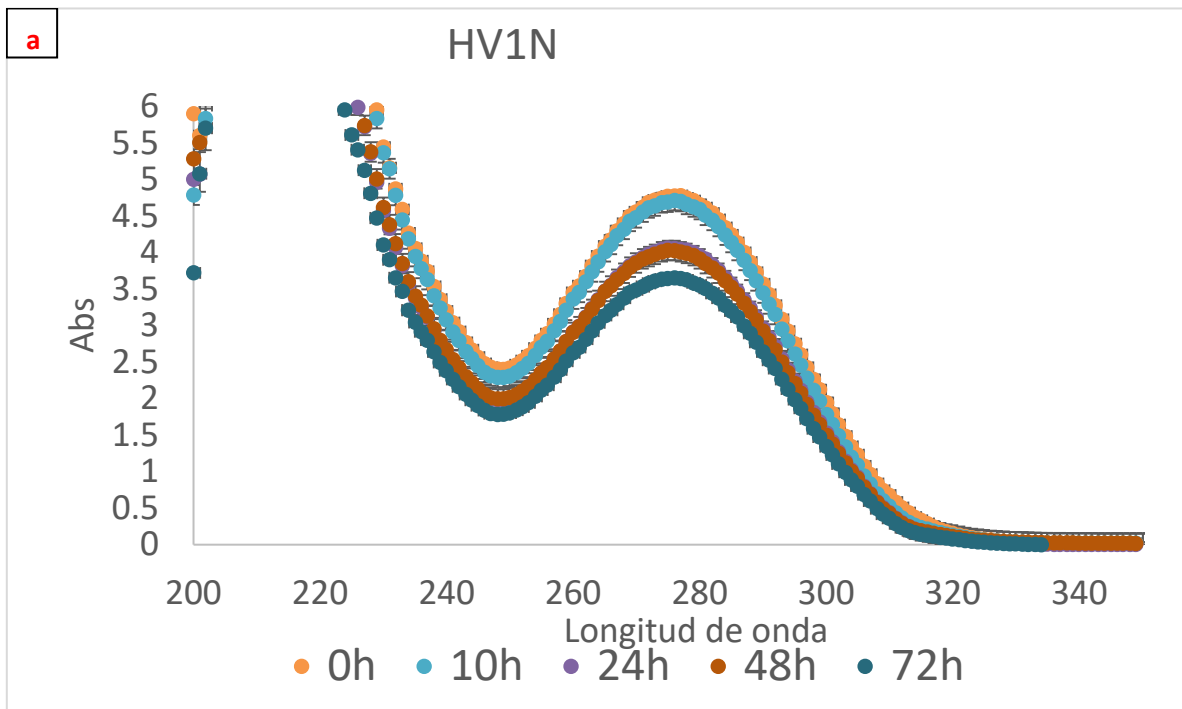


Figura 25. a) Barrido de absorbancia de los sobrenadantes del cultivo HV1N conteniendo 0.75 mM de diclofenaco b) Medición de absorbancia a 276 nm de los sobrenadantes del cultivo del aislado HV1N y control a distintos tiempos de incubación.

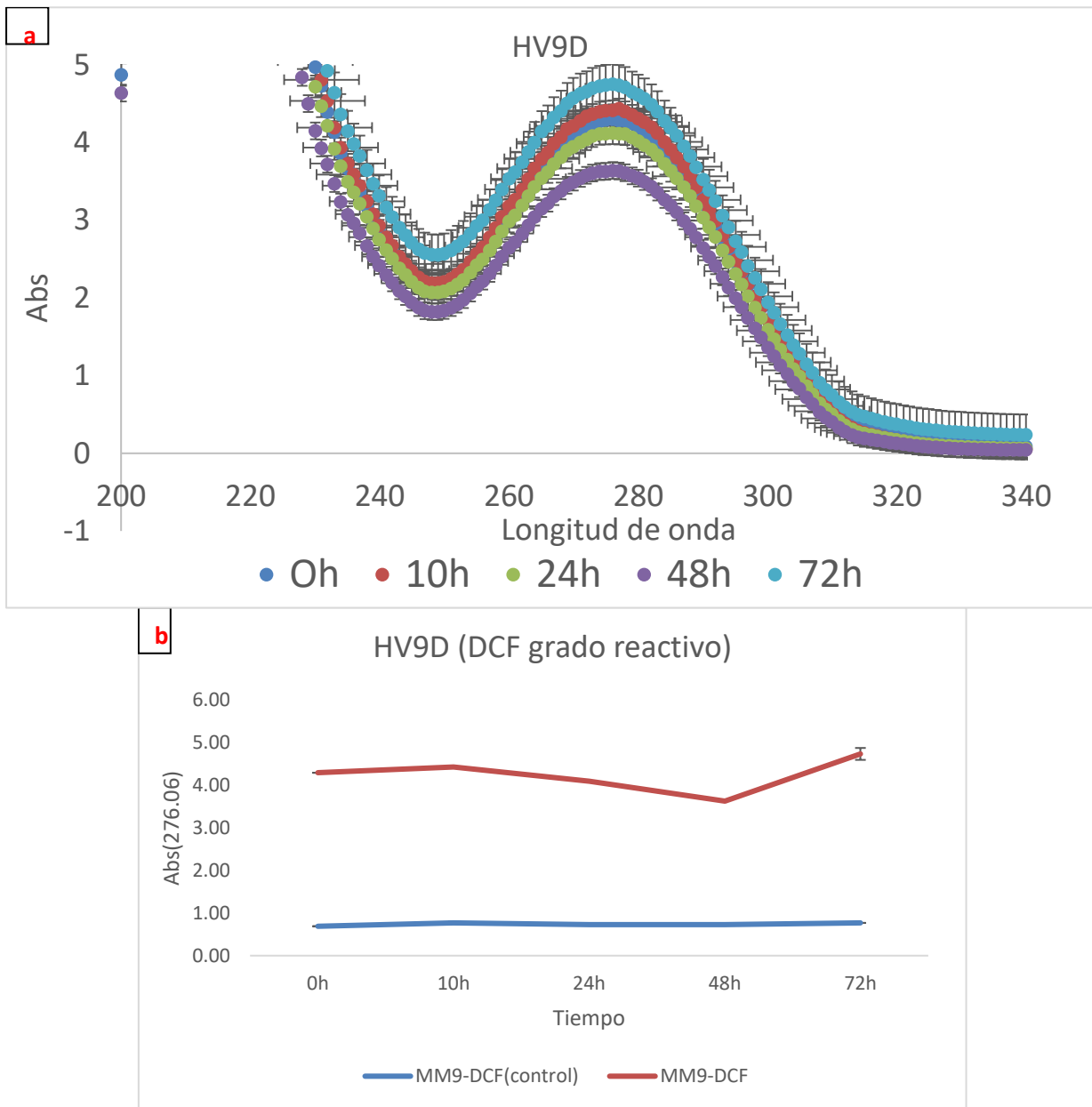


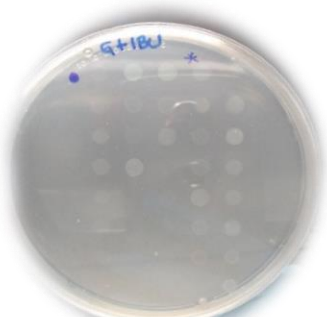
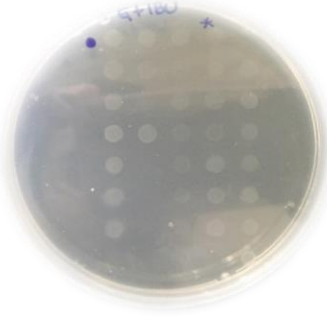
Figura 26. a) Barrido de absorbancia del sobrenadante del cultivo HV9D conteniendo 0.75 mM de diclofenaco. b) Medición de absorbancia a 276 nm de los sobrenadantes del cultivo del aislado HV9D y control a distintos tiempos de incubación.

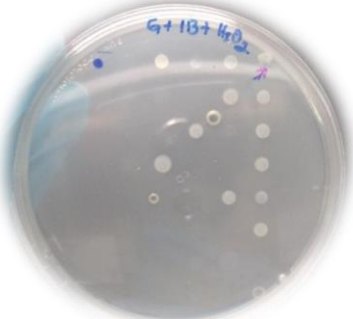
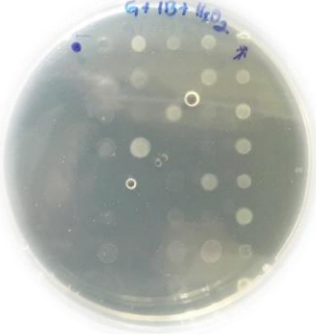
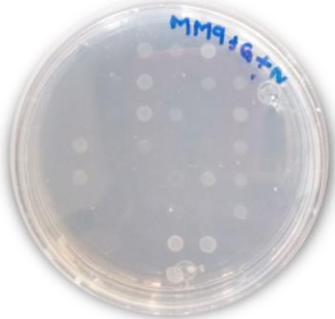
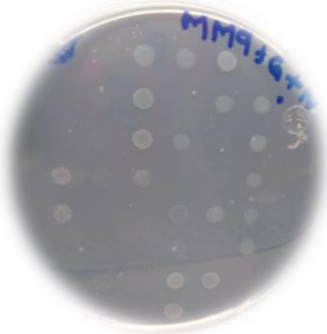
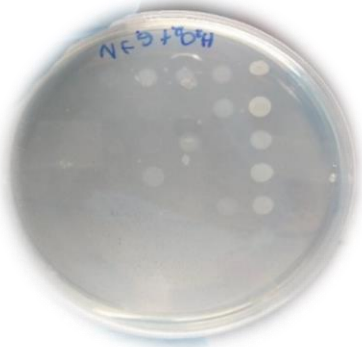
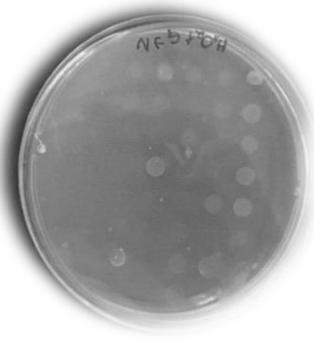
3.3. Determinación de actividad peroxidasa de forma cualitativa en agar.

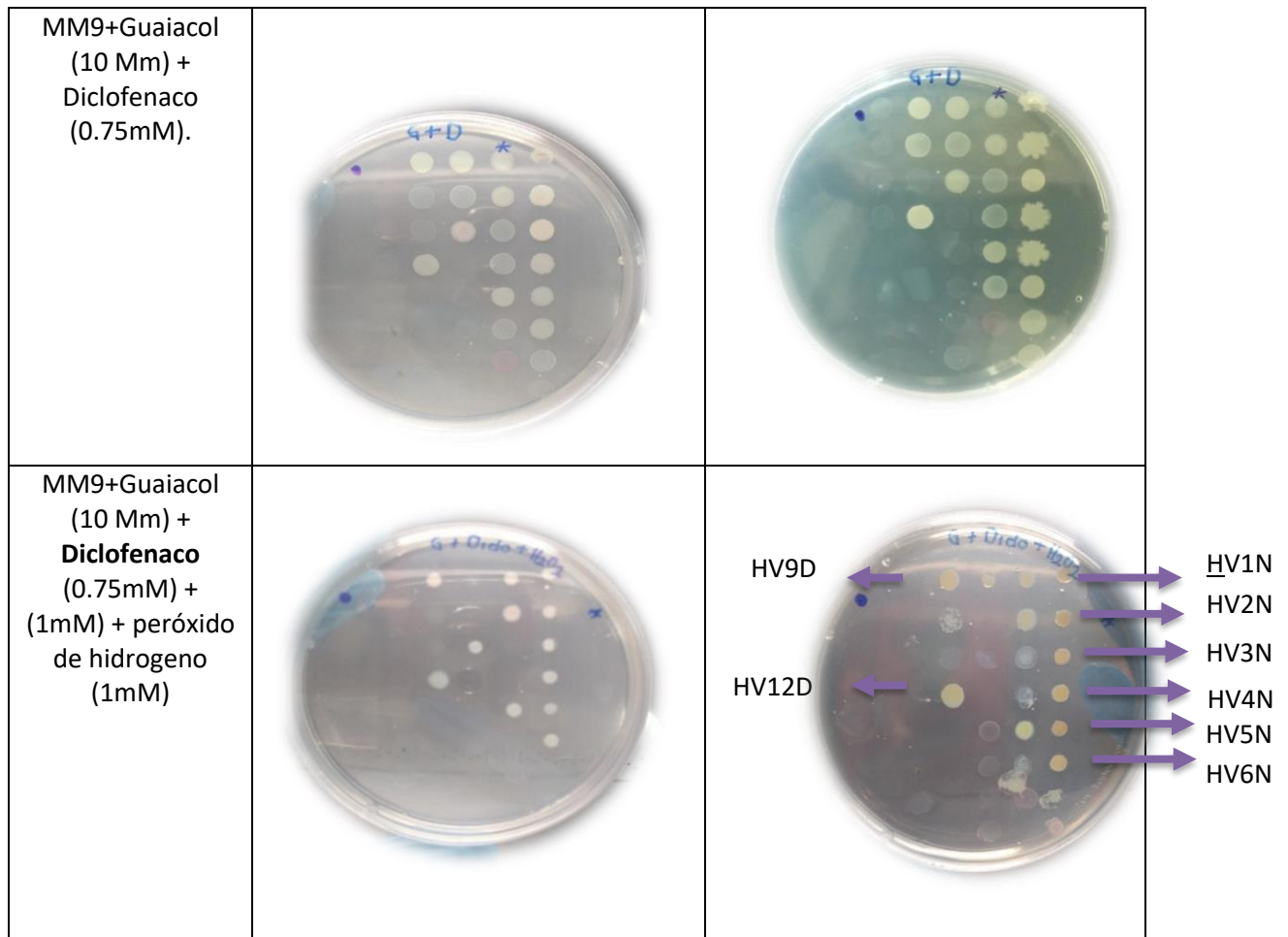
Ya que se contaba con treinta y cuatro aislados capaces de crecer en presencia de 0.75 mM de diclofenaco, naproxeno o ibuprofeno en medio mínimo M9, y algunos de ellos tenían el potencial de modificar la estructura de la molécula del diclofenaco, se decidió evaluar si alguno de ellos tenía actividad peroxidasa en presencia de cada analgésico. Para este ensayo de peroxidasa en placa de Petri (Tabla 6) se trabajó con medio mínimo M9 con 0.75 mM de diclofenaco, naproxeno o ibuprofeno.

Si los aislados tenían actividad peroxidasa lo esperado era encontrar colonias que viraran a un color marrón que es el color producido por la reacción del sustrato guaiacol con peróxido, en este ensayo se pudo observar diez aislados sobre la placa que viraron de color, a un color marrón en presencia de diclofenaco. Algunos otros autores han utilizado medio mínimo adicionándole solamente el sustrato guaiacol o alcohol veratrílico, para encontrar bacterias capaces de producir peroxidasa (Falade, Eyisi, Mabinya, Nwodo, & Okoh, 2017). Los diez aislados que dieron positivo a peroxidasa fueron seleccionados para la identificación molecular del género. Cabe mencionar que este experimento de actividad peroxidasa se realizó sólo una vez y sería conveniente realizar experimentos confirmatorios.

Tabla 6. Ensayo de actividad peroxidasa en agar con antiinflamatorios (Ibuprofeno, naproxeno o diclofenaco)

Composición del medio sólido.	Primer día	Quinto día
MM9+ Guaiacol (10 Mm) + Ibuprofeno (0.75mM)		

<p>MM9+Guaiacol (10 Mm) + Ibuprofeno (0.75mM) + Peróxido de hidrogeno (1mM)</p>		
<p>MM9+Guaiacol (10 Mm) + Naproxeno (0.75mM)</p>		
<p>MM9+Guaiacol (10 Mm) + Naproxeno (0.75mM) + peróxido de hidrogeno (1mM)</p>		



3.4 Identificación molecular.

Para identificar el género de los diez aislados que dieron positivo a la prueba de peroxidasa, se realizó un cultivo de cada una de ellas en medio LB-DCF para obtener el ADN (Figura 27). Utilizando los oligos universales descritos en la sección de materiales y métodos se amplificó el gen 16s ADNr de cada uno de los aislados. Se amplificó un fragmento aproximado a las 1400 pb (Figura 28) y se mandó a secuenciar. Solo ocho secuencias de las diez, tuvieron calidad suficiente para continuar con el estudio. Se realizó un alineamiento del ADNr del 16s de cada una de las ocho secuencias contra la secuencia de *Pseudomonas putida* KT2440 (Figura 29).

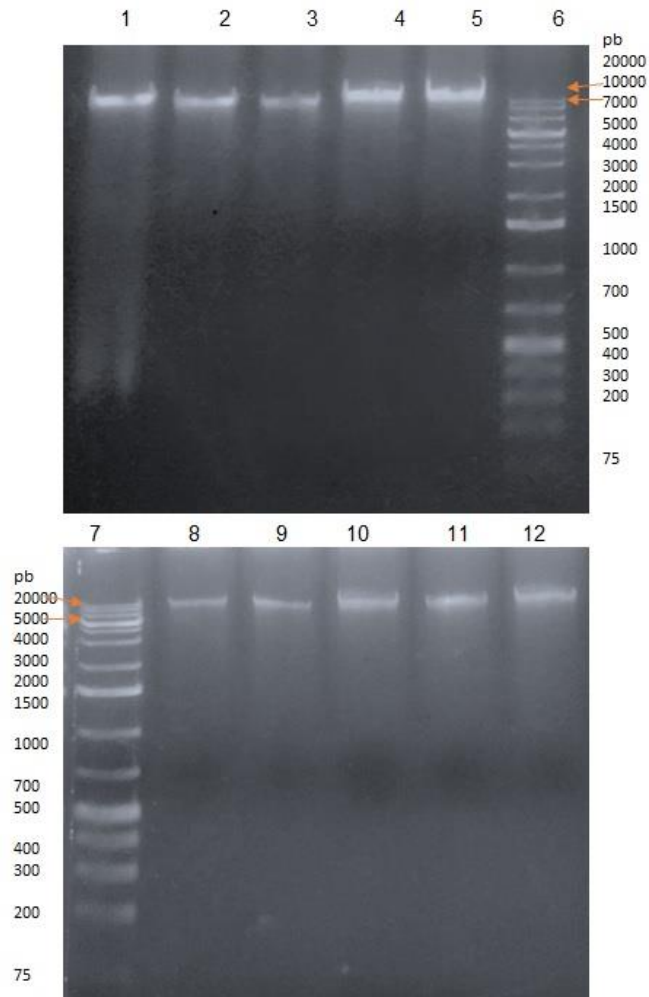


Figura 27. Electroforesis del ADN extraído de cada uno de los diferentes aislados. Carril 1: aislado HV1N, carril 2: aislado HV2N, carril 3: aislado HV4N, carril 5: aislado HV5N, carril 6 y 7: marcador de peso molecular de 1 kb plus, carril 8: aislado HV6N, carril 9: aislado HV9N, carril 10: aislado HV10N, carril 11: aislado HV9D y carril 12: aislado HV12D

El alineamiento en Clustal Omega de las secuencias del gen 16s ADNr de los aislados HV10N, HV9D y HV4N resultó con un alto porcentaje de identidad con *Pseudomonas putida* KT2440, 99.92%, para HV6N, HV1N y HV12D es de un 99.85%, para HV5N es de 99.84%, para la HV2N es de 99.61%, demostrando que los aislados pertenecen al género *Pseudomonas*.

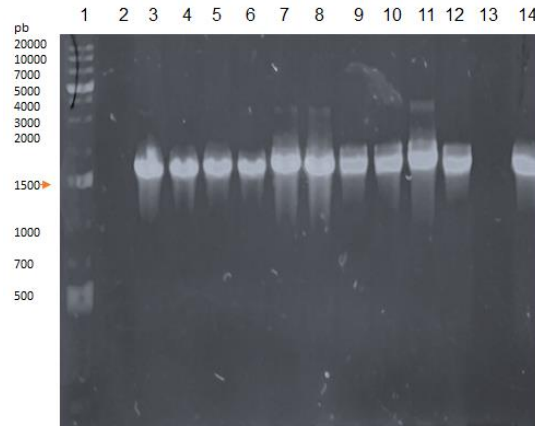


Figura 28. Electroforesis de los productos de PCR del gen 16 ADNr de los diferentes aislados. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb plus, carril 2: control negativo (sin ADN), carril 3: aislado HV1N, carril 4: aislado HV2N, carril 5: aislado HV3N, carril 6: aislado HV4N, carril 7: aislado HV5N, carril 8: aislado HV6N, carril 9: aislado HV9N, carril 10: aislado HV10N, carril 11, aislado HV9D, carril 12: aislado HV12D, carril 13: vacío, carril 14: control positivo (*Pseudomonas putida* KT2440).

Este resultado es congruente a lo que se ha reportado previamente, ya que se sabe que el género *Pseudomonas* alberga microorganismos cosmopolitas capaces de tolerar diversas condiciones físicas, pudiendo vivir en diferentes nichos como como en agua, suelo y en tejidos vegetales (Stanier, Palleroni, Doudoroff, Dooren, & Jong, 1966). Además en un trabajo relacionado con la diversidad microbiana de suelo de un humedal artificial, se señala que el género *Pseudomonas* es uno de los más predominantes en ese hábitat (Bai, Liang, Liu, Hu, & Qu, 2014).

		°n	%
NC_002947.4:	ATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACG	60	100
HV10N	-----GTCGAGCGGATGACG	15	99.92
HV9D	-----GTCGAGCGGATGACG	15	99.92
HV4N	-----GTCGAGCGGATGACG	15	99.92
HV6N	-----GTCGAGCGGATGACG	15	99.85
HV1N	-----GTCGAGCGGATGACG	15	99.85
FHV12D	-----GTCGAGCGGATGACG	15	99.85
HV5N	-----GTCGAGCGGATGACG	15	99.84
HV2N	-----GTCGAGCGGATGACG	15	99.61

NC_002947.4:	GGAGCTTGCTCCTTGATTTCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTA	120	
HV10N	GGAGCTTGCTCCTTGATTTCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTA	75	
HV9D	GGAGCTTGCTCCTTGATTTCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTA	75	
HV4N	GGAGCTTGCTCCTTGATTTCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTA	75	
HV6N	GGAGCTTGCTCCTTGATTTCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTA	75	
HV1N	GGAGCTTGCTCCTTGATTTCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTA	75	
FHV12D	GGAGCTTGCTCCTTGATTTCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTA	75	

HV5N	GGAGCTTGCTCCTTGATTACAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTA	75
HV2N	GGAGCTTGCTCCTTGATTACAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTA *****	75
NC_002947.4:	GTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAG	180
HV10N	GTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAG	135
HV9D	GTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAG	135
HV4N	GTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAG	135
HV6N	GTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAG	135
HV1N	GTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAG	135
FHV12D	GTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAG	135
HV5N	GTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAG	135
HV2N	GTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAG *****	135
NC_002947.4:	GGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT	240
HV10N	GGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT	195
HV9D	GGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT	195
HV4N	GGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT	195
HV6N	GGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT	195
HV1N	GGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT	195
FHV12D	GGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT	195
HV5N	GGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT	195
HV2N	GGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT *****	195
NC_002947.4:	AATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA	300
HV10N	AATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA	255
HV9D	AATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA	255
HV4N	AATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA	255
HV6N	AATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA	255
HV1N	AATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA	255
FHV12D	AATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA	255
HV5N	AATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA	255
HV2N	AATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA *****	255
NC_002947.4:	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCCGA	360
HV10N	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCCGA	315
HV9D	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCCGA	315
HV4N	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCCGA	315
HV6N	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCCGA	315
HV1N	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCCGA	315
FHV12D	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCCGA	315
HV5N	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCCGA	315
HV2N	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCCGA *****	315
NC_002947.4:	AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAA	420
HV10N	AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAA	375
HV9D	AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAA	375
HV4N	AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAA	375
HV6N	AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAA	375
HV1N	AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAA	375
FHV12D	AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAA	375
HV5N	AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAA	375
HV2N	AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAA *****	375
NC_002947.4:	GTTGGGAGG-AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAG	479
HV10N	GTTGGGAGG-AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAG	434
HV9D	GTTGGGAGG-AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAG	434
HV4N	GTTGGGAGG-AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAG	434
HV6N	GTTGGGAGG-AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAG	434
HV1N	GTTGGGAGG-AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAG	434
FHV12D	GTTGGGAGG-AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAG	434
HV5N	GTTGGGAGG-AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAG	434
HV2N	GTTGGGAGG-AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAG *****	434
NC_002947.4:	CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	539

HV10N	CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	494
HV9D	CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	494
HV4N	CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	494
HV6N	CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	494
HV1N	CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	494
FHV12D	CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	494
HV5N	CGCCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	494
HV2N	CACCGGCTAGGTCGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	494
	* * * * *	
NC_002947.4:	TTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	599
HV10N	TTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	554
HV9D	TTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	554
HV4N	TTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	554
HV6N	TTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	554
HV1N	TTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	554
FHV12D	TTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	554
HV5N	TTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	554
HV2N	TTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	554
	* * * * *	
NC_002947.4:	AACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC	659
HV10N	AACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC	614
HV9D	AACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC	614
HV4N	AACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC	614
HV6N	AACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC	614
HV1N	AACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC	614
FHV12D	AACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC	614
HV5N	AACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC	614
HV2N	AACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC	614
	* * * * *	
NC_002947.4:	CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGACCACCT	719
HV10N	CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGACCACCT	674
HV9D	CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGACCACCT	674
HV4N	CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGACCACCT	674
HV6N	CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGACCACCT	674
HV1N	CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGACCACCT	674
FHV12D	CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGACCACCT	674
HV5N	CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGACCACCT	674
HV2N	CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGACCACCT	674
	* * * * *	
NC_002947.4:	GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG	779
HV10N	GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG	734
HV9D	GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG	734
HV4N	GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG	734
HV6N	GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG	734
HV1N	GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG	734
FHV12D	GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG	734
HV5N	GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG	734
HV2N	GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG	734
	* * * * *	
NC_002947.4:	TAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCA	839
FHV12D	TAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCA	794
HV10N	TAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCA	794
HV9D	TAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCA	794
HV4N	TAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCA	794
HV6N	TAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCA	794
HV1N	TAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCA	794
HV5N	TAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCA	794
HV2N	TAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCA	794
	* * * * *	
NC_002947.4:	GCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCAAATGAAT	899
HV10N	GCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCAAATGAAT	854
HV9D	GCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCAAATGAAT	854
HV4N	GCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCAAATGAAT	854
HV6N	GCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCAAATGAAT	854
HV1N	GCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCAAATGAAT	854

FHV12D	GCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAAT	854
HV5N	GCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAAT	854
HV2N	GCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAAT *****	854
NC_002947.4:	TGACGGGGGGCCCGCACAAGC-GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAAC	958
HV10N	TGACGGGGGGCCCGCACAAGC-GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAAC	913
HV9D	TGACGGGGGGCCCGCACAAGC-GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAAC	913
HV4N	TGACGGGGGGCCCGCACAAGC-GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAAC	913
HV6N	TGACGGGGGGCCCGCACAAGC-GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAAC	913
HV1N	TGACGGGGGGCCCGCACAAGC-GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAAC	913
FHV12D	TGACGGGGGGCCCGCACAAGC-GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAAC	913
HV5N	TGACGGGGGGCCCGCACAAGC-GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAAC	913
HV2N	TGACGGGGGGCCCGCACAAGC-GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAAC *****	914
NC_002947.4:	CTTACCAGGCCTTGACATGCAGAG-AACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAC	1017
HV10N	CTTACCAGGCCTTGACATGCAGAG-AACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAC	972
HV9D	CTTACCAGGCCTTGACATGCAGAG-AACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAC	972
HV4N	CTTACCAGGCCTTGACATGCAGAG-AACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAC	972
HV6N	CTTACCAGGCCTTGACATGCAGAG-AACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAC	972
HV1N	CTTACCAGGCCTTGACATGCAGAG-AACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAC	972
FHV12D	CTTACCAGGCCTTGACATGCAGAG-AACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAC	972
HV5N	CTTACCAGGCCTTGACATGCAGAG-AACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAC	972
HV2N	CTTACCAGGCCTTGACATGCAGAG-AACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAC *****	973
NC_002947.4:	CTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCAGATGTTGGGTTAAGTCCC	1077
HV10N	CTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCAGATGTTGGGTTAAGTCCC	1032
HV9D	CTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCAGATGTTGGGTTAAGTCCC	1032
HV4N	CTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCAGATGTTGGGTTAAGTCCC	1032
HV6N	CTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCAGATGTTGGGTTAAGTCCC	1032
HV1N	CTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCAGATGTTGGGTTAAGTCCC	1032
FHV12D	CTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCAGATGTTGGGTTAAGTCCC	1032
HV5N	CTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCAGATGTTGGGTTAAGTCCC	1032
HV2N	CTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCAGATGTTGGGTTAAGTCCC *****	1033
NC_002947.4:	GTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGA	1137
HV10N	GTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGA	1092
HV9D	GTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGA	1092
HV4N	GTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGA	1092
HV6N	GTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGA	1092
HV1N	GTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGA	1092
FHV12D	GTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGA	1092
HV5N	GTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGA	1092
HV2N	GTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGA *****	1093
NC_002947.4:	CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC	1197
HV10N	CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC	1152
HV9D	CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC	1152
HV4N	CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC	1152
HV6N	CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC	1152
HV1N	CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC	1152
FHV12D	CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC	1152
HV5N	CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC	1152
HV2N	CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC *****	1153
NC_002947.4:	CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGC	1257
HV10N	CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGC	1212
HV9D	CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGC	1212
HV4N	CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGC	1212
HV6N	CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGC	1212
HV1N	CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGC	1212
FHV12D	CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGC	1212
HV5N	CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGC	1212
HV2N	CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGC *****	1213

NC_002947.4:	TAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG	1317
HV10N	TAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG	1272
HV9D	TAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG	1272
HV4N	TAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG	1272
HV6N	TAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG	1272
HV1N	TAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG	1272
FHV12D	TAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG	1272
HV5N	TAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG	1272
HV2N	TAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG	1273

NC_002947.4:	GAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATAC	1377
HV10N	GAATCGCTAGTAATCGCGAATCA-----	1295
HV9D	GAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG-----	1296
HV4N	GAATCGCTAGTAATCGCG-----	1290
HV6N	GAATCGCTAGTAATCGCGAATC-----	1294
HV1N	GAATCGCTAGTAATCGCGAATC-----	1294
FHV12D	GAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG-----	1296
HV5N	GAATCGCTAGTAATCGCG-----	1290
HV2N	GAATCGCTAGTAATCGCG-----	1291

NC_002947.4:	ACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGGG	1437
HV10N	-----	1295
HV9D	-----	1296
HV4N	-----	1290
HV6N	-----	1294
HV1N	-----	1294
FHV12D	-----	1296
HV5N	-----	1290
HV2N	-----	1291
NC_002947.4:	GACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGG	1497
HV10N	-----	1295
HV9D	-----	1296
HV4N	-----	1290
HV6N	-----	1294
HV1N	-----	1294
FHV12D	-----	1296
HV5N	-----	1290
HV2N	-----	1291
NC_002947.4:	AACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTA	1522
HV10N	-----	1295
HV9D	-----	1296
HV4N	-----	1290
HV6N	-----	1294
HV1N	-----	1294
FHV12D	-----	1296
HV5N	-----	1290
HV2N	-----	1291

Figura 29. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del gen 16s ADNr de las cepas aisladas de un humedal vertical. Se utilizó como referencia para el alineamiento la secuencia del 16s ADNr de *Pseudomonas putida* KT2440 (NC_002947.4). El símbolo * significa que en esa posición el nucleótido es idéntico en todas las secuencias. La columna con el símbolo °n indica el número de nucleótido de la secuencia de cada gen correspondiente. La columna con el símbolo % Id y números en negrita indica el porcentaje de identidad que tienen las secuencias de las cepas aisladas del humedal vertical con respecto a la secuencia del gen 16s ADNr de *Pseudomonas putida* KT2440.

3.5 Identificación morfológica.

Para observar la morfología macroscópica de los diez aislados positivos a peroxidasas, se sembraron en medio LB-diclofenaco (0.75 mM), las colonias de estas cepas crecen de forma convexa, son amarillentas, con bordes irregulares, brillantes y mucoides en este medio (Figura 30).

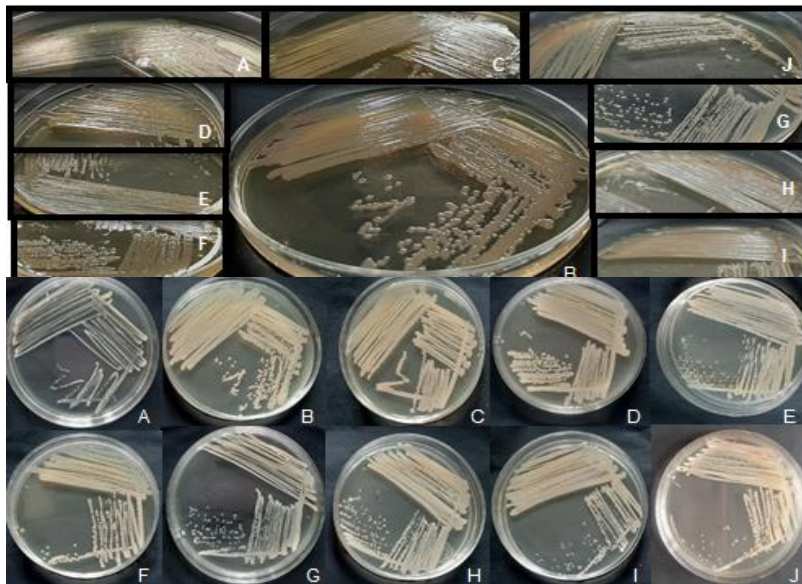


Figura 30. Morfología macroscópica de las diez cepas utilizadas en este trabajo. A) HV1N, B) HV2N, C) HV3N, D) HV4N, E) HV5N, F) HV6N, G) HV9N, H) HV10N, I) HV9D, J) HV12D.

Se realizaron tinciones de Gram (Figura 31), de los diez aislados. Los resultados mostraron bacilos Gram negativos en parejas o en cadenas, coincidiendo con lo ya reportado en el manual de Bergey (Garrity, G., Staley, JT, Boone, DR, De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, FA, ... & Schleifer, 2006), en donde menciona que el género *Pseudomonas* es un bacilo Gram negativo.

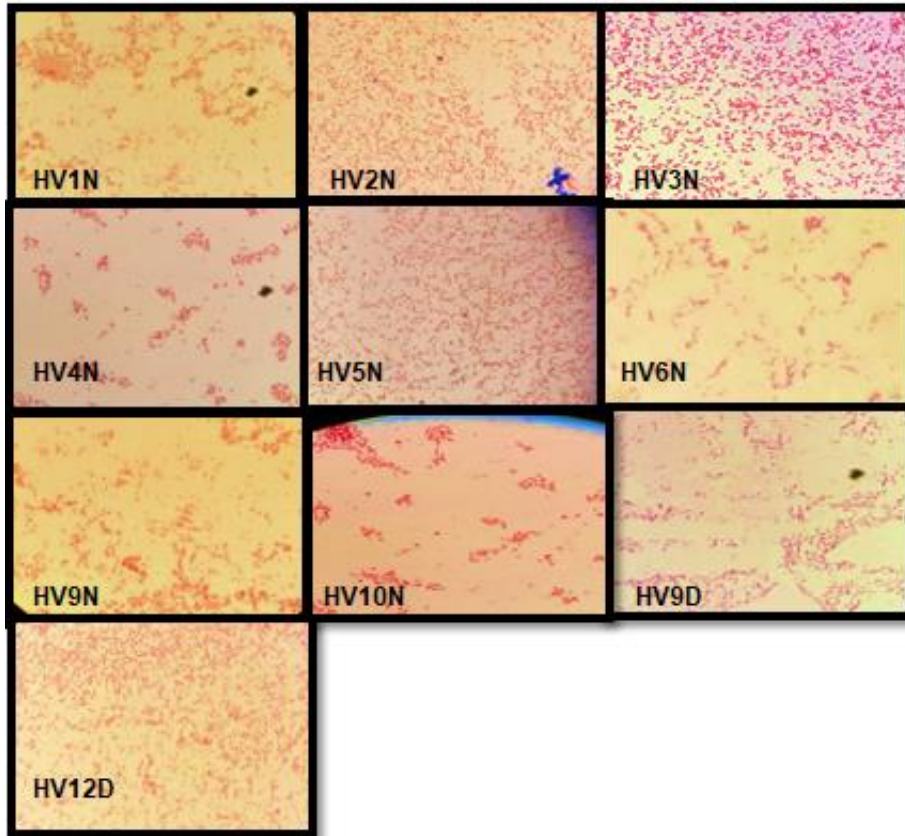


Figura 31. Tinciones de Gram de las diez cepas aisladas en este trabajo.

Otra característica de algunas especies del género *Pseudomonas* es la capacidad de producir algunos pigmentos como la pioverdina de color amarillo-verdoso que al exponerse a luz UV presenta fluorescencia. La pioverdina es soluble en agua y funciona como un sideróforo, además es un marcador para la diferenciación bacteriana (Meyer, 2000). Algunas especies que producen pioverdina son *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. syringae* (Palleroni, 1984). El agar centramida es uno de los medios que se utiliza para inducir la producción de pioverdina (Peekate, Sigalo, & Basil, 2018), así que los diez aislados se sembraron en agar centramida y los diez generaron fluorescencia demostrando que son capaces de producir pioverdina (Figura 32).

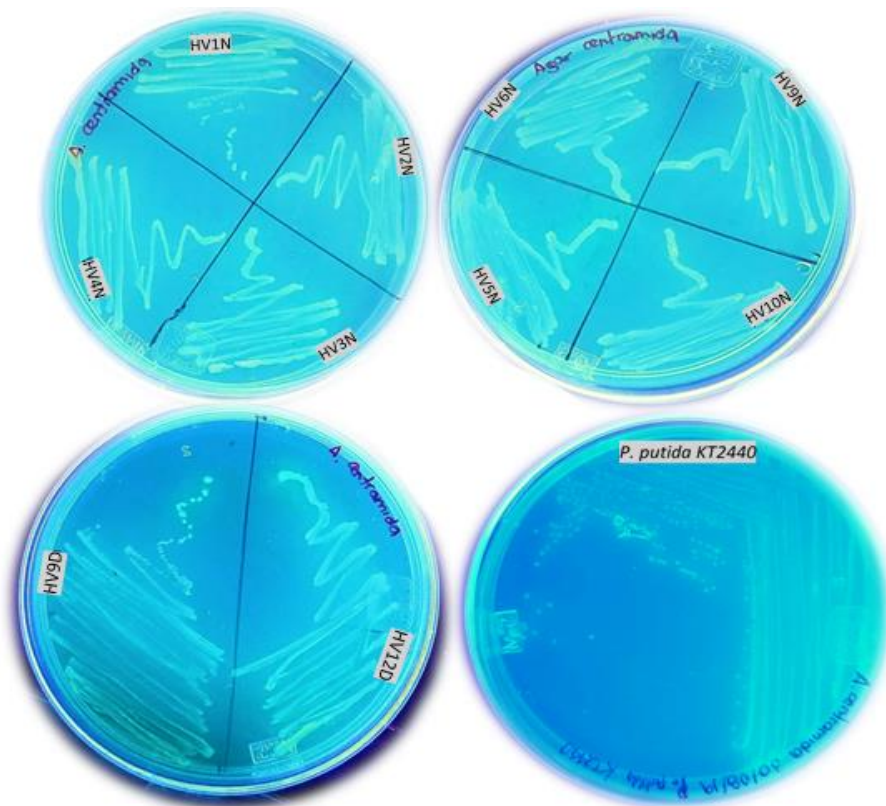


Figura 32. Crecimiento de las diez cepas en agar centramida.

Pseudomonas es un género de microorganismos con una amplia versatilidad metabólica lo que le permite crecer en diferentes ambientes y nutrientes, es por esto por lo que son capaces de crecer en citrato o benzoato como una única fuente de carbono. En la Figura 33 se observa el crecimiento los diez aislados en citrato o benzoato. Se sabe que el género *Pseudomonas* crece con citrato como única fuente de carbono siendo esta una característica de este género (Palleroni, 1984) y algunas cepas de *Pseudomonas* (Hernández Arranz, 2014; Palleroni, 1984; Stanier et al., 1966) son capaces de utilizar el benzoato para degradarlo. Con estos resultados es posible confirmar que las cepas aisladas en este proyecto pertenecen al género *Pseudomonas* y que probablemente se encuentran muy relacionadas con la especie con *Pseudomonas putida* KT2440.

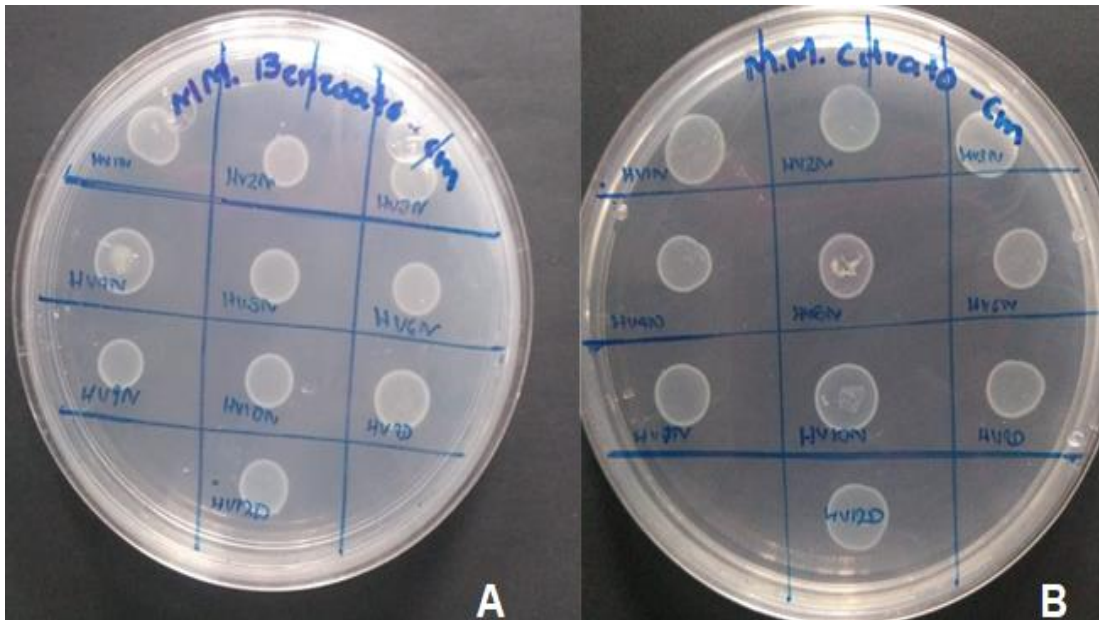


Figura 33. Las diez cepas aisladas en benzoato y citrato como fuentes de carbono A) medio mínimo M9-Benzoato, cloranfenicol (100 μ /ml) B) medio mínimo M9-Citrato, cloranfenicol (100 μ /ml).

3.6 Búsqueda *in silico* de enzimas con potencial para la degradación del diclofenaco.

En la ruta de degradación del diclofenaco presentada por Moreira, 2018 para el género *Labrys*, las enzimas que se encargan de iniciar la degradación del diclofenaco son la citocromo P450 mono y dioxigenasas. Los resultados del gen 16s ADNr de las diez cepas aisladas en este trabajo sugieren que en nuestros aislados hay dos especies diferentes de *Pseudomonas*; *P. mosselli* NG1 y *P. putida* 25; en base a esto se procedió a buscar la citocromo P450 monooxigenasa en estas cepas en particular, sin embargo, no se encuentran secuenciados los genomas completos de estas dos cepas. Así que se procedió a buscar las secuencias de las monooxigenasas tanto en los genomas de la especie *mosselli* como *putida*. Se encontraron las secuencias de la citocromo P450 monooxigenasa tanto en *Pseudomonas mosselli* como *Pseudomonas putida* (Tabla 7), sugiriendo

que probablemente puedan existir citocromo P450 monooxigenasas en los genomas de nuestros aislados.

Tabla 7. Secuencias de citocromo P450 monooxigenasas encontradas en *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas mosselli*.

Microrganismos	Acceso en NCBI
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	PP_1955
<i>Pseudomonas putida</i> HBC17	AWY38668.
<i>Pseudomonas putida</i> CBF10-2	AYO28_RS01825
<i>Pseudomonas putida</i> 1312	OUM37574.1
<i>Pseudomonas putida</i> G1	P00183.2
<i>Pseudomonas mosselli</i> SC006	WP_138217711.1

CONCLUSIONES.

Con los resultados obtenidos en este proyecto se llegan a las siguientes conclusiones.

- 1). Las cepas aisladas a partir de suelo de un humedal vertical capaces de crecer en presencia de antiinflamatorios resultaron pertenecer al género *Pseudomonas*, lo cual es un resultado congruente dada la capacidad de colonización de estos microorganismos en este tipo de hábitat (suelo).
- 2). Al crecer los diez aislados en medio líquido M9 con diclofenaco inyectable las UFC aumentaron hasta dos órdenes de magnitud, pero al analizarlas las muestras de los cultivos en HPLC se demostró que no se estaba consumiendo el diclofenaco. Sin embargo, al usar diclofenaco grado reactivo como única fuente de carbono en un cultivo del aislado HV1N se observó por el método espectrofotométrico que el aislado HV1N biotransformó el diclofenaco presente en el medio de cultivo.
- 3). Al buscar las secuencias de la enzima citocromo P450 monooxigenasa en los genomas de *Pseudomonas mosselli* y *Pseudomonas putida* se encontraron algunas secuencias; lo que sugiere que estas enzimas posiblemente se encuentren en los genomas de nuestros aislados.

PERSPECTIVAS.

- 1). Identificar a nivel de especie nuestros aislados utilizando genes de mantenimiento para este género como *rpoB*, *rpoD*, *gyrB*, *oprI*, *oprB*. De esta manera hacer una búsqueda más dirigida de enzimas que podrían estar involucradas en la degradación del diclofenaco.
- 2). Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de diclofenaco sobre el crecimiento celular para determinar la concentración máxima de diclofenaco a la que son tolerante las cepas. Ya que un crecimiento óptimo podría mejorar la velocidad y el porcentaje degradación del antiinflamatorio.
- 3). Una vez determinada la concentración máxima de diclofenaco a la que son tolerantes las cepas, se podría adicionar una fuente alterna de carbono ya que se ha visto que el antiinflamatorio es degradado casi al 100% y en menor tiempo cuando existe co-metabolismo.
- 4). Evaluar la degradación de otros microcontaminantes con las capas aisladas ya que se ha visto que *Pseudomonas* es un género que ha sido utilizado en biorremediación y es capaz de utilizar múltiples fuentes de carbono.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abdessemed, D., Nezzal, G., & Ben Aïm, R. (1999). Treatment of wastewater by ultrafiltration. *Desalination*, 126(1–3), 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(99\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(99)00149-6)
- Acuña, V., Ginebreda, A., Mor, J. R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., & Barceló, D. (2015). Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environment International*, 85, 327–333. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2015.09.023>
- Aissaoui, S., Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Harrouche, K., & Sghaler, H. (2017). Metabolic and Co-Metabolic Transformation of Diclofenac by Enterobacter hormaechei D15 Isolated from Activated Sludge. *Current Microbiology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1190-x>
- Akpor, O. B., & OTohinoyi, D. A. (2014). Pollutants in Wastewater Effluents: Impacts and Remediation Processes. *International Journal of Environmental Research and Earth Science*, 27(44), 249–253. <https://doi.org/10.1007/s10162-014-0441-4>
- Badhe, N., Saha, S., Biswas, R., & Nandy, T. (2014). Role of algal biofilm in improving the performance of free surface, up-flow constructed wetland. *Bioresource Technology*, 169, 596–604. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.050>
- Bai, Y., Liang, J., Liu, R., Hu, C., & Qu, J. (2014). Metagenomic analysis reveals microbial diversity and function in the rhizosphere soil of a constructed wetland. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 35(20), 2521–2527. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.911361>
- Bansal, N., & Kanwar, S. S. (2013). Peroxidase(s) in environment protection. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 714639. <https://doi.org/10.1155/2013/714639>
- Basu, A., Dixit, S. S., & Phale, P. S. (2003). Metabolism of benzyl alcohol via catechol ortho-pathway in methyl-naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* CSV86. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(5–6), 579–585. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1305-8>
- Bravo, B. J. (2009). Contaminantes emergentes en el agua. *Revista UNAM*, 10, 1–6.
- CONAGUA. (2015). Inventario Nacional De Plantas Municipales De Potabilización Y De Tratamiento De Aguas Residuales En Operación. Diciembre 2014. *Comisión Nacional Del Agua*, 274. Retrieved from <https://agua.org.mx/biblioteca/catalogo-plantas-tratamiento-aguas-residuales-ptar-2016/>

- Consejo Nacional de Población. (2013). Proyecciones de la población de México 2010-2050. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/63977/Documento_Metodologico_Proyecciones_Mexico_2010_2050.pdf
- Corral, Lugo, A., Morales, García, Y. E., Pazos, Rojas, Laura, A., Ramírez, Valverde, A., Martínez, Contreras, Rebeca, D., & Muñoz, Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo.” *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14, 147–156.
- Das, S., Ray, N. M., Wan, J., Khan, A., Chakraborty, T., & Ray, M. B. (2017). Micropollutants in Wastewater: Fate and Removal Processes. In *Physico-Chemical Wastewater Treatment and Resource Recovery* (IntechOpen, pp. 76–98). Ontario.
- Delgadillo, O., Camacho, A., & Andrade, M. (2010). *Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales*. Bolivia.
- Deng, Y., & Zhao, R. (2015). Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment. *Current Pollution Reports*, 1(3), 167–176. <https://doi.org/10.1007/s40726-015-0015-z>
- Eibes, G., Debernardi, G., Feijoo, G., Moreira, M. T., & Lema, J. M. (2011). Oxidation of pharmaceutically active compounds by a ligninolytic fungal peroxidase. *Biodegradation*, 22(3), 539–550. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9426-0>
- Facey, S. J., Nebel, B. A., Kontny, L., Allgaier, M., & Hauer, B. (2018). Rapid and complete degradation of diclofenac by native soil microorganisms. *Environmental Technology and Innovation*, 10, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2017.12.009>
- Falade, A. O., Eyisi, O. A. L., Mabinya, L. V, Nwodo, U. U., & Okoh, A. I. (2017). Peroxidase production and ligninolytic potentials of fresh water bacteria *Raoultella ornithinolytica* and *Ensifer adhaerens*. *Biotechnology Reports*, 16(March), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.10.001>
- Fatta-Kassinos, D., Hapeshi, E., Achilleos, A., Meric, S., Gros, M., Petrovic, M., & Barcelo, D. (2011). Existence of Pharmaceutical Compounds in Tertiary Treated Urban Wastewater that is Utilized for Reuse Applications. *Water Resources Management*, 25(4), 1183–1193. <https://doi.org/10.1007/s11269-010-9646-4>
- Garrity, G., Staley, JT, Boone, DR, De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, FA, ... & Schleifer, K. (2006). *bacteriología sistemática: volumen dos: las proteobacterias*. (segunda). Springer Science & Business Media.
- Gregory, J., & Dhond, R. V. (1972). Wastewater treatment by ion exchange. *Water*

Research, 6(6). [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(72\)90183-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(72)90183-2)

- Haap, T., Triebkorn, R., & Köhler, H.-R. (2008). Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: Immobilisation and hsp70-induction. *Chemosphere*, 73(3), 353–359. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2008.05.062>
- Hamid, M., & Khalil-ur-Rehman. (2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115(4), 1177–1186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.035>
- Harrington, C., & Scholz, M. (2010). Assessment of pre-digested piggery wastewater treatment operations with surface flow integrated constructed wetland systems. *Bioresource Technology*, 101(20), 7713–7723. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.147>
- Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., & Nishida, T. (2010). Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation. *Biodegradation*, 21(5), 681–689. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9334-3>
- Hernández Arranz, S. (2014). Regulación del metabolismo del carbono en *pseudomonas putida*: Estrategia del sistema regulador formado por la proteína crc y los srnas crcz y crcy, 1. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=70212>
- Hernando, M. D., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A. R., & Barceló, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69(2), 334–342. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2005.09.037>
- Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M. J., Liers, C., & Lundell, T. (2010). New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 871–897. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2633-0>
- Ibáñez, J. J. (2016). Humedales y Suelos Hídricos: Aspectos Básicos y Necesidad de Investigación | Un Universo invisible bajo nuestros pies. Retrieved October 4, 2019, from <https://www.madrimasd.org/blogs/universo/2016/06/06/147080>
- Kadlec, R., & Wallace, S. (2008). *Treatment Wetlands, Second Edition*. <https://doi.org/10.1201/9781420012514>
- Lapworth, D. J., Baran, N., Stuart, M. E., & Ward, R. S. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.034>
- Lee, J., Ji, K., Lim Kho, Y., Kim, P., & Choi, K. (2011). Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5), 1216–1225. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2011.03.014>

- León, A. K. G. (2015). *Uso de cloroperoxidasa para la oxidación de fármacos como contaminantes emergentes*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Letzel, M., Metzner, G., & Letzel, T. (2009). Exposure assessment of the pharmaceutical diclofenac based on long-term measurements of the aquatic input. *Environment International*, 35(2), 363–368. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2008.09.002>
- Lonappan, L., Brar, S. K., Das, R. K., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2016). Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. *Environment International*, 96, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.014>
- Lundell, T. K., Mäkelä, M. R., & Hildén, K. (2010). Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of Basic Microbiology*, 50(1), 5–20. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900338>
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G., & Vicent, T. (2010). Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1–3), 836–842. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.112>
- Meyer, J. (2000). Pyoverdines : pigments , siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species, 135–142.
- Morales, L. (2016). *Humedales híbridos contruidos para el tratamiento terciario de aguas municipales*. Universidad Autonoma de Puebla.
- Moreira, I. S., Bessa, V. S., Murgolo, S., Piccirillo, C., Mascolo, G., & Castro, P. M. L. (2018). Biodegradation of Diclofenac by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 152(September 2017), 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.040>
- Muñoz, Rojas, J., Morales, García, Yolanda, E., Baez, Rogelio, A., Quintero, Hernández, V., Urbalejo, Rivera, America, P., & Pérez y Terrón, R. (2016). Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. In 2016 Science Associated Editors (Ed.), *Instituciones de Educación Superior La labor investigadora e innovadora en México* (pp. 67–80). Mexico.
- Navarro A., Herrera J., & B. J. (2006). Determinación de alquibencenos lineales y alquifenoles en aguas residuales en la subcuenca del río Nexapa. In *Memorias del V Congreso Internacional y XI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales*. Morelos, México.
- Navarro A., & H. J. (2006). Contaminantes antropogénicos en descargas de aguas residuales. In *Memorias, del XXVII Congreso Latinoamericano de Química*. Habana, Cuba.

- Navarro F. A. E., Montufar S E., Ramírez G. M., Téllez V. A., Rodríguez., & H. C. J. A. (2005). Contaminantes antropogénicos en las descargas de aguas residuales de Izúcar de Matamoros y Atlixco, Puebla. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 728–733.
- NCBI. (2019). Diclofenaco sódico. Retrieved October 8, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac-sodium>
- Norton, S. (2014). *Removal Mechanisms in Constructed Wastewater Wetlands*. Retrieved from <http://home.engineering.iastate.edu/~tge/ce421-521/stephen.pdf>
- Oh, S. T., Kim, J. R., Premier, G. C., Lee, T. H., Kim, C., & Sloan, W. T. (2010). Sustainable wastewater treatment: How might microbial fuel cells contribute. *Biotechnology Advances*, 28(6), 871–881. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.07.008>
- Palleroni, N. J. (1984). Gram negative aerobic rods and cocci, family I: Pseudomonadaceae. Vol. 1. In N. R. Krieg & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (pp. 141–199). Williams and Wilkins, Baltimore.
- Peekate, L. P., Sigalo, B., & Basil, N. P. (2018). Comparing the Efficacy of Kings B , Cetrimide and Chloramphenicol-nutrient Agar Medium in the Isolation of Pseudomonas Species. *Asian Journal the Biological Science*, 3, 141–151. <https://doi.org/10.3923/ajbs.2018.145.151>
- Poduval, P. B., & Ghadi, S. C. (2017). Bacterial Degradation of Algal Polysaccharides in Marine Ecosystem, 189–203. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1044-6>
- Rai, U. N., Tripathi, R. D., Singh, N. K., Upadhyay, A. K., Dwivedi, S., Shukla, M. K., ... Nautiyal, C. S. (2013). Constructed wetland as an ecotechnological tool for pollution treatment for conservation of Ganga river. *Bioresource Technology*, 148, 535–541. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.005>
- Ratola, N., Cincinelli, A., Alves, A., & Katsoyiannis, A. (2012). Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. *Journal of Hazardous Materials*, 239–240, 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2012.05.040>
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J. A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M. J., ... Fernández-Alba, A. R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, 44(2), 578–588. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2009.07.004>
- Saeed, T., & Sun, G. (2012). A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on

environmental parameters, operating conditions and supporting media. *Journal of Environmental Management*, 112, 429–448. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2012.08.011>

Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., von Gunten, U., & Wehrli, B. (2006). The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science*, 313(5790), 1072–1077. <https://doi.org/10.1126/science.1127291>

Stanier, B. Y. R. Y., Palleroni, N. J., Doudoroff, M., Dooren, D. L. E. D. E. N., & Jong, D. E. (1966). The Aerobic Pseudomonads : a Taxonomic Study. *Microbiology*, 43(1), 159–271.

Stottmeister, U., Wießner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kästner, M., Bederski, O., ... Moormann, H. (2003). Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 22(1–2), 93–117. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2003.08.010>

Stylianou, K., Hapeshi, E., Vasquez, M., Fatta-kassinou, D., & Vyrides, I. (2018). Diclofenac biodegradation by newly isolated *Klebsiella* sp. KSC: Microbial intermediates and ecotoxicological assessment. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.052>

Sugawara, K., Nishihashi, Y., Narioka, T., Yoshida, T., Morita, M., & Sugano, Y. (2017). Characterization of a novel DyP-type peroxidase from *Streptomyces avermitilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(4), 425–430. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.12.001>

Ternes, T. (2007). The occurrence of micropollutants in the aquatic environment: a new challenge for water management. *Water Science and Technology : A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 55(12), 327–332. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17674867>

Thomaidis, N. S., & Asimakopoulos, A. G. (2012). Emerging Contaminants: a Tutorial Mini-Review. *Global NEST Journal*, 14(1), 72–79. Retrieved from [https://journal.gnest.org/sites/default/files/Journal Papers/72-79_823_Thomaidis_14-1.pdf](https://journal.gnest.org/sites/default/files/Journal%20Papers/72-79_823_Thomaidis_14-1.pdf)

Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. In *Journal of Eukaryotic Microbiology* (Vol. 46, pp. 327–338). Society of Protozoologists. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>

UNESCO-IHP International Initiative on Water Quality. (2014). Emerging Pollutants in Water and Wastewater. Retrieved from <https://en.unesco.org/emergingpollutants>

Vieno, N., & Sillanpää, M. (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater

treatment plant — A review. *Environment International*, 69, 28–39.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.021>

Walker, J. J., & Pace, N. R. (2007). Phylogenetic composition of rocky mountain endolithic microbial ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3497–3504. <https://doi.org/10.1128/AEM.02656-06>

Weber, K. P., & Legge, R. L. (2013). Comparison of the catabolic activity and catabolic profiles of rhizospheric, gravel-associated and interstitial microbial communities in treatment wetlands. *Water Science and Technology*, 67(4), 886–893. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.637>

William, D. (1999). *An Introduction to Wastewater Treatment in Wetlands*. Florida, U.S. Retrieved from <https://leachate.co.uk/main/wastewater-treatment-in-wetlands/>

Wu, H., Zhang, J., Ngo, H. H., Guo, W., Hu, Z., Liang, S., ... Liu, H. (2015). A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation. *Bioresource Technology*, 175, 594–601.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.068>

Yalcuk, A., & Ugurlu, A. (2009). Comparison of horizontal and vertical constructed wetland systems for landfill leachate treatment. *Bioresource Technology*, 100(9), 2521–2526. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2008.11.029>

ANEXO 1.

Composición del medio Luria Bertani (LB).

Peptona.....	10g/L
Extracto de levadura.....	5g/L
Cloruro de sodio.....	10g/L
Agar bacteriológico.....	16 g/L

Nota: En caso de ser medio líquido no se agrega agar bacteriológico.

ANEXO 2.

Composición del medio mínimo M9.

1. **FeCl₃ 1 ml/L**
2. **Goodies 2.5 ml/L**
3. **10XM9**
4. **MgSO₄ 1 ml/L**
5. **Antinflamatorio (0.75 mM DCF)**

1 FeCl₃ 6g/L

2. Goodies

- ZnCl₂ 50mg/L

- MnCl₂ 4H₂O 30 mg/L

- B₃O₃ 300 mg/L,

- CoCl₂ 2H₂O 10 mg/L

- NiCl₂ 6H₂O 20 mg/L

- NaMoO₄ 2H₂O 30 mg/L

3. 10XM9

- NaHPO₄ 70g/L

- KH₂PO₄ 30g/L,

-NaCl 5 g/L

- NH₄Cl 10g/L

4. MgSO₄ 1M

Nota: en caso de ser medio líquido no se agrega agar bacteriológico.

ANEXO 3.

Composición del Agar Centramida.

Peptona	20 g/L
Cloruro de magnesio.....	1.4 g/L
Sulfato potásico.....	10 g/L
N-cetil-N, N, N-trimetilamonio (centramida).....	0.3 g/L
Agar bacteriológico.....	13.6 g/L
Glicerina.....	10 ml/L

ANEXO 4.

Gráfica y cromatogramas y de la curva de calibración de diclofenaco para el análisis en HPLC.

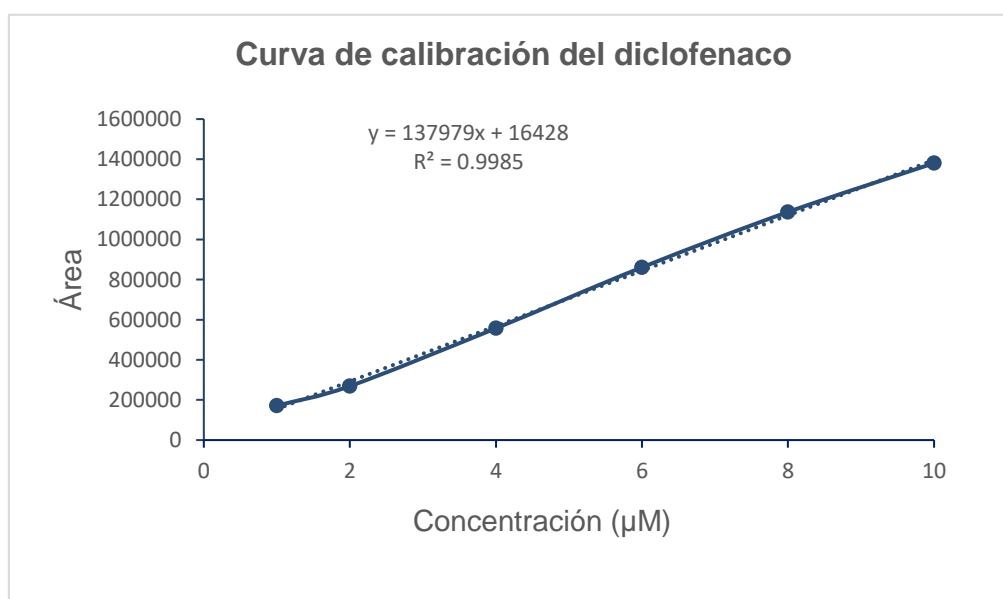


Figura 34. Curva de calibración del diclofenaco para análisis de muestras en HPLC. Para construir la gráfica de calibración se utilizaron las siguientes concentraciones 1 μM , 2 μM , 4 μM , 6 μM , 8 μM , 10 μM .

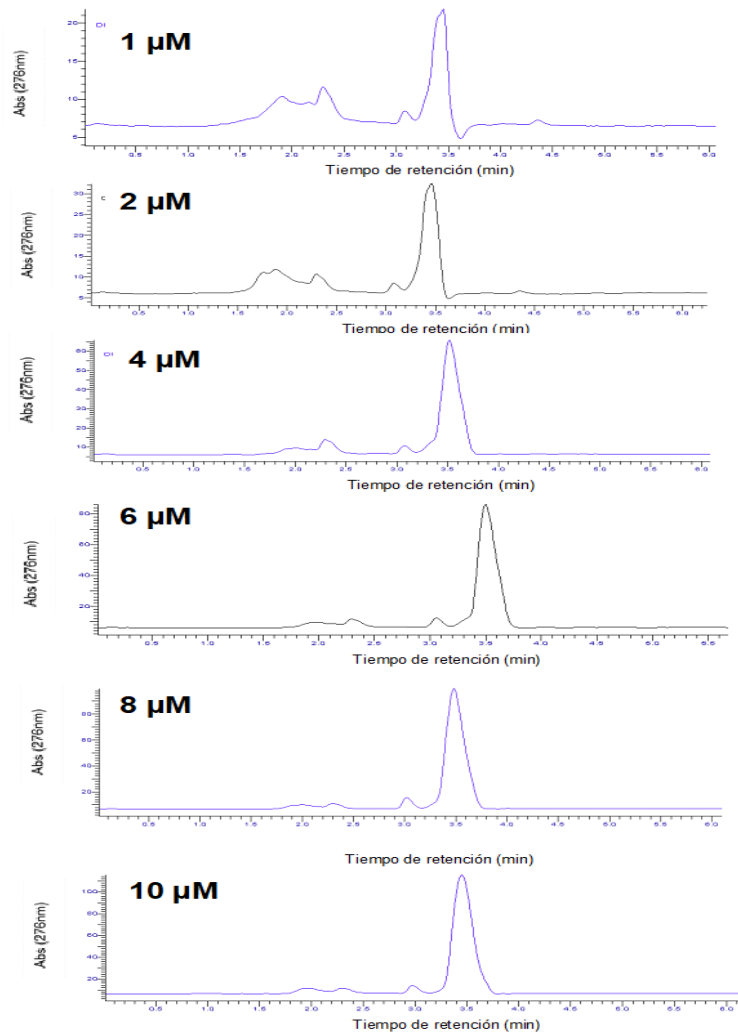


Figura 35. Cromatogramas de HPLC de las diferentes concentraciones utilizadas para la curva de calibración del diclofenaco.