

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA "SAN JUAN BOSCO"

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud

Departamento de Química



BÚSQUEDA DE CONSORCIOS BACTERIANOS CON CAPACIDAD DE UTILIZAR PENICILINA COMO FUENTE DE CARBONO Y ENERGÍA

Trabajo final para optar al título de la Licenciatura en Química

Directora: Dra. Pucci, Graciela

Alumna: Herrera, Leonela Muriel

Año 2023

CONTENIDO

RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Penicilina	5
1.2. Pared celular bacteriana	6
1.3. β-lactámicos e inhibición.....	7
1.4. Hidrólisis de Penicilina	8
1.5. Hidrólisis de Carbapenemasas	8
1.6. Diversidad bacteriana en la zona	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivo particular.....	11
3. METODOLOGÍA.....	11
3.1. Muestreo.....	11
3.2. Ensayo	11
3.3. Mineralización	12
3.4. Espectrofotometría UV-Vis	13
3.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	13
3.6. Recuento de bacterias heterótrofas cultivables	13
3.7. Búsqueda de β-lactamasas.....	13
3.8. Extracción de ácidos grasos de las cepas.....	14
3.9. Análisis de ácidos grasos	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1. <i>Consortio bacteriano</i>.....	15
4.1.1. Mineralización y Espectrofotometría UV-Vis.....	15
4.1.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	17
4.1.3. Recuento de bacterias heterótrofas cultivable	18
4.2. <i>Cepas obtenidas del consorcio bacteriano</i>	19
4.2.1. Morfología de las cepas.....	19
4.2.2. Espectrofotometría UV - Vis.....	19
4.2.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	21
4.2.4. Recuento de bacterias heterótrofas cultivables.....	23
4.2.5. Búsqueda de β -lactamasas.....	24

4.2.6. Análisis de ácidos grasos	28
5. DISCUSIÓN	33
6. CONCLUSIÓN	36
7. BIBLIOGRAFÍA.....	37

RESUMEN

En los últimos años, los antibióticos, se han considerado contaminantes emergentes debido a su continuo uso y su persistencia en el ecosistema acuático y sedimento, incluso en bajas concentraciones, lo que puede ocasionar un aumento de cepas con resistencia a los antibióticos.

El objetivo de este trabajo fue la búsqueda de consorcios bacterianos con capacidad de utilizar la penicilina como fuente de carbono y energía, y/o que los mismos secreten al medio compuestos enzimáticos que los neutralicen, utilizando suelos que poseen capacidad de degradación de sustancias complejas como residuos de petróleo de nuestra cuenca. Estas bacterias tienen capacidad de adaptarse y llegar a metabolizar sustancias con las que no habían tenido contacto anteriormente.

El trabajo se realizó con suelo contaminado con hidrocarburo al que se lo sometió a un medio de cultivo, penicilina solamente, para obtener un consorcio bacteriano que degradó al antibiótico. Se aislaron las cepas que componían ese consorcio y se identificaron por ácidos grasos de membrana (FAMES), en simultáneo se realizaron pruebas para identificar cuál de las cepas fue productora de enzimas capaces de hidrolizar al antibiótico.

Se obtuvo un consorcio bacteriano que fue capaz de utilizar a la penicilina como fuente de carbono y energía, con un consumo del antibiótico del 46,62%. Se aislaron 11 cepas, de las cuales se identificaron dos: *Serratia odorífera* y *Paenibacillus polymyxa*.

Las cepas obtenidas de este consorcio mostraron un aumento en el crecimiento en una unidad logarítmica después de 7 días, este aumento no se debió a expensas de la penicilina, sino a algún excipiente o contaminante, ya que no se trabajó con la droga de referencia. El espectro obtenido del FT-IR del consorcio evidenció la desaparición de los picos a 1673 cm^{-1} y 1106 cm^{-1} y sin modificaciones en las cepas aisladas.

En conclusión, el consorcio bacteriano obtenido pudo utilizar la penicilina como fuente de carbono y energía, pero las cepas por separado no lo lograron.

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los antibióticos a principios del siglo XX marcó el comienzo de la medicina moderna. Durante las últimas décadas, su uso continuo ha creado efectos duraderos no solo en la salud humana y animal, sino también en el medio ambiente. Las prácticas médicas y de cría de animales actuales dependen de la disponibilidad de antibióticos. Esta dependencia ha llevado a su uso intensivo y a veces imprudente. Debido a que los antimicrobianos a menudo dejan el organismo (sin sufrir alteraciones en su estructura química) los residuos de antibióticos, así como las bacterias resistentes a los antibióticos (ARB) y los genes (ARG), ingresan a los suelos y cuerpos de agua a través de la aplicación de estiércol en los campos agrícolas y a través del proceso de tratamiento de aguas residuales en las ciudades (Reis, et al., 2020). En la figura 1 se recogen los diferentes ecosistemas que pueden estar afectados por los PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Pollutants, por sus siglas en inglés) así como la gran variedad de fuentes posibles de contaminación.



Figura 1: Contaminación por PPCPs: fuentes y ecosistemas afectados: [1] Uso doméstico: (1a) Personas, (1b) Mascotas. Fuentes de PPCPs: Excreción del organismo (sustancias no metabolizadas o metabolitos), vertido incontrolado de medicamentos al desagüe, filtración al subsuelo desde el sistema de alcantarillado, (1c) abandono de cadáveres de animales que sirven de alimento

a carroñeros. [2] Vertido de residuos de hospitales a sumideros urbanos. [3] Liberación de efluentes líquidos de fosas sépticas (3a) y plantas depuradoras (3b) en aguas superficiales y/o acuíferos. [4] Transferencia de residuos sólidos a superficies: fertilización con abonos (ej. antibióticos), vertido de piensos medicamentosos, etc. [5] Liberación directa por baños, lavados. [6] Vertido controlado y clandestino de residuos industriales. [7] Compactación y enterramiento de residuos (domésticos, medicamentos, cementerios). [8] Liberación de aguas (medicadas y/o excretadas) empleadas en acuicultura, vertido de sustancias procedentes de cultivos transgénicos. [9] Liberación de agentes químicos empleados para desinfectación y desratización. [10] Transporte final al compartimiento acuoso (fototransformación, alteración físico-química, degradación, mineralización, volatilización, absorción por plantas, etc.). (Tomado de Benito Peña, 2006).

Los residuos de antibióticos están muy extendidos en el medio ambiente y se sabe que su presencia contribuye a la propagación de la resistencia a los antibióticos (Wang et al., 2021). Hace tiempo que se viene estudiando la resistencia de bacterias a ciertos antibióticos, pero poco sobre la degradación de esos antibióticos y si los mismos microbios lo pueden usar como fuente de carbono y energía, es decir, los antibiótrofos (Reis et al., 2020).

1.1. Penicilina

La penicilina fue el primer antibiótico usado clínicamente en 1941. Es el agente menos tóxico de la clase y es el primero en haber sido descubierto. Originalmente se obtuvo del hongo *Penicillium notatum*, pero la fuente actual es un mutante que la produce con mayor abundancia. El núcleo del antibiótico penicilina, es un anillo de tiazolidina y uno β -lactámico unidos a cadenas laterales por enlaces amida (Antibióticos betalactámicos, sf.). La penicilina G (Bencilpenicilina) es un antibiótico β -lactámico bactericida (fig. 2).

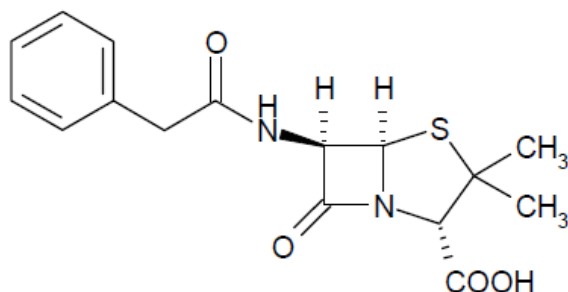


Figura 2. Penicilina G, ácido bencilpenicilánico, $C_{16}H_{18}N_2O_4S$, PM: 33.40 g.mol^{-1} (Tomado de Benito Peña, 2006).

Los principales productos de degradación son los que resultan de la apertura del sistema de β -lactama, lo que da lugar a derivados inactivos. En la figura 3, se indican algunos de ellos así como su formación a partir de la penicilina (Cirilo et al., 2013).

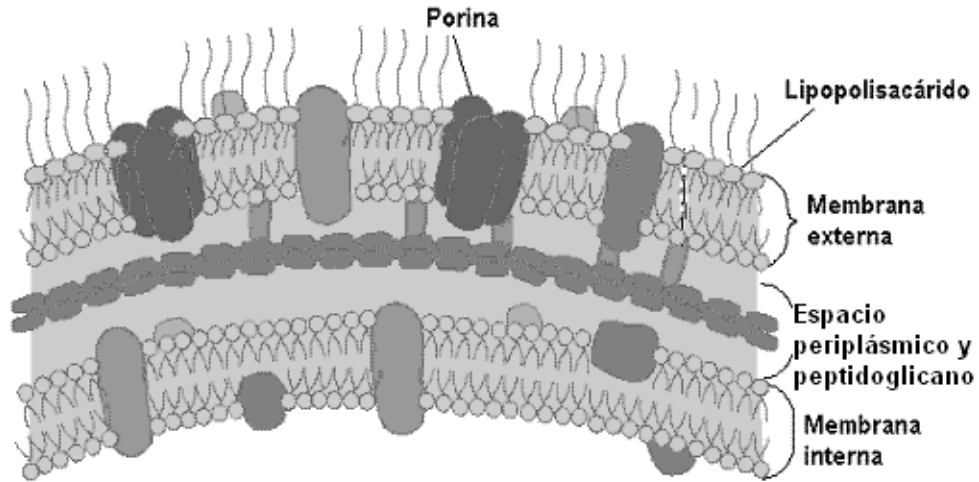


Figura 4. Pared celular Gram negativa (Tomado de *Envoltura de Gram Negativo*, sf.)

1.3. β -lactámicos e inhibición

Los antibióticos β -lactámicos inhiben las transpeptidasas (miembros de una gran familia de serina proteasas) y las uniones cruzadas no pueden formarse (fig. 5). Las β -lactamasas actúan rompiendo el enlace amídico del anillo β -lactámico, previa unión al grupo carboxilo, con lo que las β -lactamasas pierden la capacidad de unirse a las PBPs. Cuando la bacteria se divide y multiplica, pasa por varias etapas, en la tercera etapa o crecimiento logarítmico de la bacteria, ocurre la modificación si está en presencia de un antibiótico β -lactámico, se produce una pared deficiente. El exterior de la bacteria es hiperosmótico, las paredes deficientes permiten el ingreso de líquido, la bacteria se hincha y estalla. De esta manera los β -lactámicos ejercen su acción bactericida. Cuando los microorganismos se están multiplicando activamente, la síntesis de la pared celular es rápida y los antibióticos β -lactámicos son más letales en esta fase (antibióticos betalactámicos, sf.).

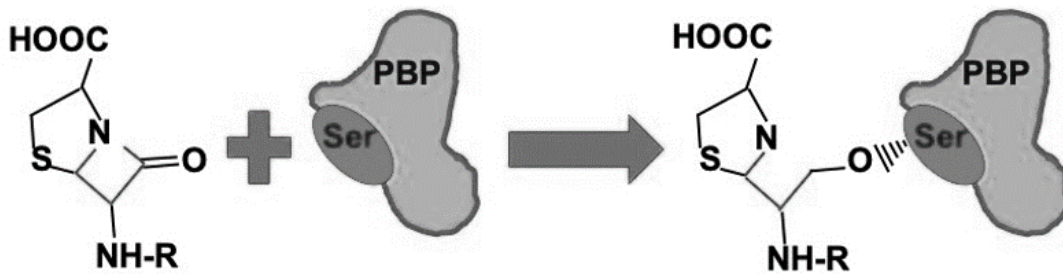


Figura 5. El anillo β -lactámico de la penicilina se liga de manera estable con el aminoácido serina (Ser) de la PBP inhibiendo la actividad transpeptidasa de esa molécula y la formación de la pared bacteriana (Tomado de Latorre-Barragan et al., 2019).

1.4. Hidrólisis de Penicilina

La resistencia a estos antibióticos se da a través de la hidrólisis del anillo β -lactámico por β -lactamasas y por formas mutadas de proteínas de unión a la penicilina (fig. 6) (Reis et al., 2020). Las β -lactamasas son enzimas bacterianas que hidrolizan el sistema de β -lactama. Son responsables de la aparición de cepas resistentes. Las causas de la resistencia frente a las penicilinas mostrada por las bacterias Gram-negativas son diversas. Además de la mayor abundancia de β -lactamasas en estas bacterias, la aparición de resistencias también parece depender de la propia naturaleza de su pared celular. Así, se sabe que el carácter Gram-negativo es consecuencia de la existencia de una barrera lipoproteica que impide la difusión de compuestos ionizados como la penicilina. Por otra parte, se ha relacionado también la resistencia de las bacterias Gram-negativas a las penicilinas con la presencia de una forma mutante de transpeptidasa insensible a la acción de las β -lactamasas.

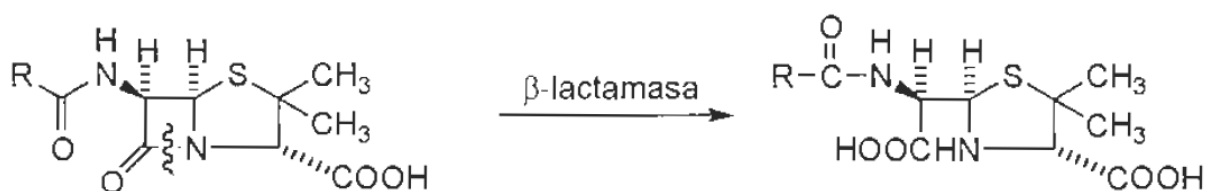


Figura 6. Hidrólisis mediada por las β -lactamasas (Tomado de Cirilo et al., 2013).

Los tipos más relevantes y alarmantes de β -lactamasas son las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que hidrolizan a la mayoría de las penicilinas (Reis et al., 2020).

1.5. Hidrólisis de Carbapenemasas

Las carbapenemasas, son agentes β -lactámicos recientemente incorporados a la terapéutica antibacteriana. Son agentes bicíclicos, similares a las penicilinas (fig. 7), cuya estructura básica difiere de las mismas en que poseen un carbono en reemplazo del azufre en el anillo pentagonal que se une al anillo β -lactámico (Malgor – Valsecia, sf). Es por esta similitud en la estructura que los carbapenémicos son los antibióticos β -lactámicos dotados de mayor espectro, actividad y resistencia a las β -lactamasas. Poseen un amplio espectro de actividad y son altamente potentes contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

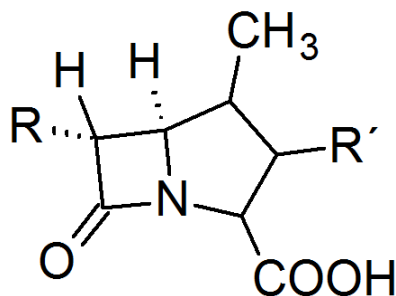


Figura 7. Estructura química de Carbapenemes.

Los carbapenémicos al igual que los demás β -lactámicos muestran una elevada afinidad por las diferentes enzimas, PBPs, que participan en el ensamblaje del peptidoglucano, estructura esencial en la pared celular de las bacterias. Estas enzimas, según su función, se clasifican en transglicosilasas, transpeptidasas y carboxipeptidasas. Cada antibiótico β -lactámico presenta una afinidad diferente por cada PBP. Se conoce que en bacterias Gram-negativas los carbapenémicos muestran una elevada afinidad por PBPs de alto peso molecular y la diferencia de esta afinidad es lo que determina la capacidad antimicrobiana de cada carbapenémico. Para que el carbapenémico pueda ejercer su función debe llegar a su sitio blanco. En el caso de las bacterias Gram-negativas debe primero atravesar la membrana externa a través de porinas inespecíficas denominadas OMPs (outer membrane protein, por sus siglas en inglés). Una vez en el sitio son capaces de inhibir la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación, ya que al unirse a residuos de serina que forman parte de las PBPs impiden que la pared bacteriana se ensamble adecuadamente dando como resultado el debilitamiento de ésta y en última instancia la lisis de la célula bacteriana.

Las bacterias y hongos con capacidad de utilizar antibióticos en procesos de biodegradación y biotransformación son de diversos géneros y varían entre los diferentes tipos de antibióticos, algunas se relacionan con la degradación de sulfonamidas, otras con degradación de quinolonas y/o degradación de β -lactámicos (Moreno, 2013).

1.6. Diversidad bacteriana en la zona

En la Patagonia por estar presente la industria extractiva del gas y el petróleo, es muy común encontrar suelos contaminados con hidrocarburos, de los cuales se han aislado consorcios bacterianos compuestos por géneros diversos como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Paracoccus*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* (Acuña et al., 2014; Acuña et al., 2010; Cambarieri et al., 2021, Pichl y Pucci 2020). Estos son géneros bacterianos que también son publicados con capacidad de

biodegradar antibióticos (Al-Ahmad et al., 1999; Crofts et al., 2018; Minerdi et al., 2015), que están adaptados a condiciones ambientales adversas y a degradar hidrocarburos en condiciones climáticas de la Patagonia. La diversidad del consorcio bacteriano en zonas contaminadas es grande y ha sido estudiada en los suelos, sedimentos y aguas de la Patagonia (Pucci et al., 2012). Aunque la biorremediación es un proceso relativamente lento y cuyo grado de éxito depende de una serie de factores como el pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno y nutrientes, entre otras, el contar con microorganismos que ya estén adaptados a las condiciones climáticas colabora enormemente con la degradación. Son por estos motivos, que ante la ausencia de estudios que planteen algún entrecruzamiento entre los consorcios degradadores de hidrocarburos y los que están dirigidos hacia los antibióticos, se busca averiguar si este consorcio compuesto por bacterias y hongos también podría utilizar a los antibióticos como fuente de carbono y energía.

La finalidad de este estudio es obtener cepas de bacterias hidrocarbonoclasticas capaces de ejercer un potencial de degradación sobre la penicilina, extraídas de suelos patagónicos impactados con petróleo, utilizando como fuente de carbono y energía a la Penicilina G (fig. 8).

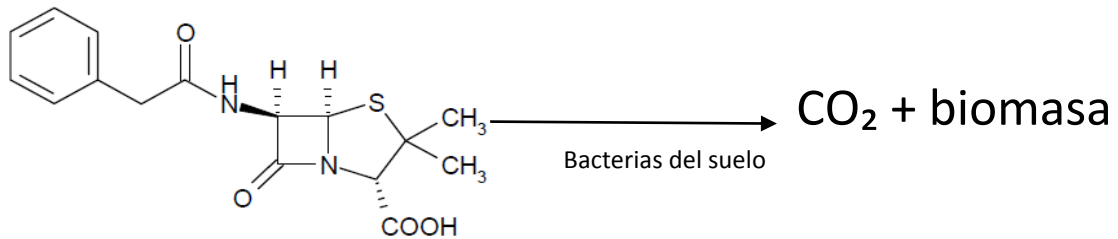


Figura 8. Penicilina como fuente de carbono y energía.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Búsqueda de consorcio bacteriano con capacidad de utilizar penicilina como fuente de carbono y energía.

2.2. Objetivo particular

- Caracterizar los consorcios bacterianos con capacidad de desarrollar en presencia de penicilina.
- Realizar las curvas de desarrollo utilizando el antibiótico como fuente de carbono y energía.
- Aislar los miembros bacterianos del consorcio.
- Analizar los perfiles de ácidos grasos de las bacterias aisladas.

3. METODOLOGÍA

3.1. Muestreo

Conorcio bacteriano:

Una muestra de 10 g de suelo patagónico contaminado con residuos de la industria del petróleo proveniente de biopilas de repositorios de la cuenca del Golfo San Jorge, se mezcló con 90 mL de medio mineral Bushnell modificado, MMB (Cl_2C 0,01 g/L, Cl_3Fe 0,005 g/L, $\text{PO}_3\text{H}_2\text{K}$ 0,5 g/L, PO_4HK_2 0,5 g/L, SO_4Mg 0,2 g/L, $\text{NO}_3(\text{NH}_2)$ 1 g/L, extracto de levadura 0,025 g/L y pluripeptona 0,025 g/L) y 200 ppm del antibiótico Penicilina G. Se realizaron 10 repiques hasta obtener un consorcio que solo creció a expensas del antibiótico.

Cepas aisladas del consorcio:

Del mismo consorcio que pudo crecer a expensas del antibiótico, se hizo una siembra en medio R2A (Extracto de levadura 0,5 g/L, peptona proteasa 0,5 g/L, ácido casamino 0,5 g/L, glucosa 0,5 g/L, Almidón 0,5 g/L, Acetato de sodio 0,3 g/L, PO_4HK_2 0,3 g/L, $\text{SO}_4 \text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L y Agar 15 g/L a pH 7) se aislaron e identificaron las colonias.

3.2. Ensayo

Se prepararon 3 Erlenmeyer con 95 mL de medio mineral, MM (Cl_2Ca 0,01 g/L, Cl_3Fe 0,005 g/L, $\text{PO}_3\text{H}_2\text{K}$ 0,5 g/L, PO_4HK_2 0,5 g/L, SO_4Mg 0,1 g/L, $\text{NO}_3(\text{NH}_2)$ 1 g/L, extracto de levadura 0,025 g/L y peptona 0,025 g/L), a los cuales se adicionaron 5 ml de una mezcla del consorcio de penicilina con una

concentración inicial de penicilina de 200 ppm para que se realice un proceso de degradación abiótica. Para asegurar que las 3 repeticiones contengan exactamente el mismo sistema, se prepararon 300 mL de solución madre para repartirlo en 3 sistemas con el MM y el antibiótico en concentración de 200 ppm con agitación constante durante 24 hs a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se añadió el consorcio de Penicilina y se repartió en 3 frascos con el mismo volumen final de 100 mL. Los sistemas fueron seguidos por mineralización (acumulación de CO₂), lecturas en el espectrofotómetro, recuentos bacterianos y mediciones en el FT-IR.

3.3. Mineralización

Para capturar el CO₂ liberado se utilizaron guarda cepas plásticos que contenían 1,5 mL de NaOH 3M teniendo cuidado que al colgarse del lado interno de la tapa del frasco, no entre en contacto con el sistema. Los sistemas se mantuvieron a temperatura ambiente, con agitaciones constantes y cerradas de forma hermética.

El CO₂ generado se determinó mediante titulación diaria del NaOH 3M dentro del tubo durante un período de 7 días (fig. 9). Para la misma se empleó HCl (0,119 M) y un doble sistema de indicadores de pH como fueron fenolftaleína y heliantina. La muestra se preparó colocando 10 ml de agua destilada hervida y enfriada con 0,5 mL del NaOH 3M de la muestra. El tiempo total en el que se controlaron las titulaciones fue de 1 semana con un total de 5 mediciones.

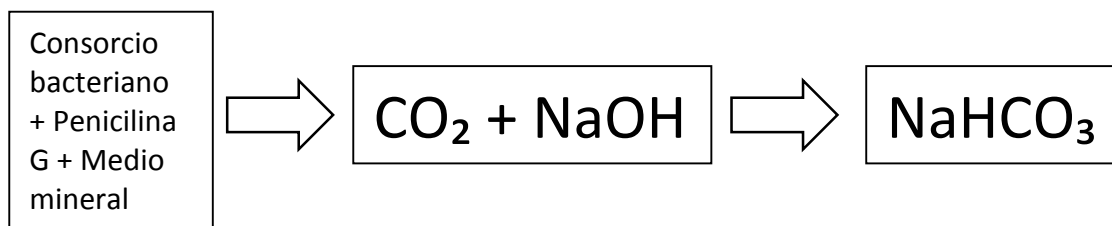


Figura 9. Producción de CO₂ y captura del mismo.

Ensayo de las cepas aisladas del consorcio

Se prepararon frascos transparentes con 29 mL de MM, a los cuales se adicionaron 1 mL de una suspensión de una cepa expuesta a la penicilina en cantidad suficiente para alcanzar una concentración de 1 Mc Farland y una concentración inicial de penicilina de 20 ppm. Para asegurar que las 2 repeticiones contengan exactamente el mismo sistema, se prepararon 60 mL de solución madre para repartirlo en 2 sistemas con el MM y el antibiótico en concentración de 20 ppm con agitación constante durante 24 hs. Pasado el tiempo se añadió el consorcio de penicilina y se repartió en 2 frascos con el mismo volumen

final de 30 mL. Se realizó un seguimiento por medio de recuento bacteriano, espectrofotometría, FT-IR y pH.

3.4. Espectrofotometría UV-Vis

Se realizaron lecturas de absorbancia a 600 nm para evaluar crecimiento bacteriano por turbidez y a 245 nm para evaluar degradación del antibiótico.

3.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Al inicio y al final de los ensayos se colocaron 300 μ L del consorcio bacteriano expuesto a la penicilina, previamente filtrados, en disco de Zn/Cn. Se dejaron en desecador por 24 hs y luego se realizó la lectura a una resolución de 4, 20 scanner.

3.6. Recuento de bacterias heterótrofas cultivables

Se realizaron recuentos bacterianos realizando diluciones seriadas 1/10 con solución fisiológica y luego se procedió a diseminar en superficie con espátula de Drigalsky en medio R2A (extracto de levadura 0,5 g; peptona proteasa 0,5 g; casamino ácido 0,5 g; glucosa 0,5 g; almidón 0,5 g; piruvato de sodio 0,3 g; K_2HPO_4 0,3 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 g; agar 15 g; agua destilada 1000 mL), al inicio y al final de la mineralización para poder comparar cuantitativamente los consorcios.

3.7. Búsqueda de β -lactamasas

Método de sinergia del doble disco para detección BLEE (β -lactamasas de espectro extendido) (Lezameta, et al., 2010): Ésta se realizó siguiendo el método de Jarlier (Comité de la Sociedad Francesa de Microbiología). En esta prueba se utilizaron placas con medio de cultivo Müller Hinton inoculadas con las cepas, con una turbidez de 0,5 Mc Farland. Se colocó un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) en el centro de una placa de Petri, y alrededor de este se colocaron discos de Cefotaxima (CAZ), Ceftriaxona (CRO) y Aztreonam (AZT) a 20 mm de distancia del disco central. Se leyó a las 24 – 48 hs de incubación a 28°C.

Método para detección de MBL (metaló- β -lactamasas) productoras de carbapenemasas (Sánchez, et al., 2008): Se inocularon las placas según las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, por sus siglas en inglés) para la prueba de difusión por disco. De la misma manera que en la prueba anterior, se utilizaron placas con medio de cultivo Müller Hinton y se inocularon

con una suspensión de la cepa con una turbidez 0,5 Mc Farland, luego se colocaron discos conteniendo Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y discos comerciales conteniendo Ceftazidima (CAZ), Imipenem (IMI) y Meropenem (MERO), a 15 mm de distancia de centro a centro, del primero. Se leyó a las 24 – 48 hs de incubación a 28°C.

3.8. Extracción de ácidos grasos de las cepas

La extracción de ácidos grasos se realizó por tratamiento de 40 mg (peso húmedo) de células crecidas en la tercera estría a las 24 horas. El segundo paso fue efectuar una saponificación con una solución preparada con 150 mL de alcohol metílico, 150 mL de agua y 45 g de hidróxido de sodio. Luego se realizó una metilación con ácido clorhídrico 6 N y alcohol metílico (46 % v/v).

En seguida se realizó una extracción con n-hexano-metil terbutil eter (1:1) y lavado con hidróxido de sodio en agua (1,2 % p/v) de acuerdo con el procedimiento del sistema de identificación SHERLOCK (MIDI Newark, Del., USA).

3.9. Análisis de ácidos grasos

Los ácidos grasos se determinaron como metil ésteres por cromatografía gaseosa, usando una columna capilar Ultra 2 de 25 m de longitud, 0,2 mm de diámetro. El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo HP 6890 GC series II GC (inyección «splitless»; presión inicial 10 psi; programa de temperatura: 170-260°C a 5°C/min, 260-310°C a 40°C/min, 1,5 min. de permanencia a 310°C) detector por ionización de llama controlado por HP 3365 (Hewlett Packard). La integración de los picos se efectuó mediante el software HP 10.01 Chem Station. Los ácidos grasos se identificaron con estándares Agilent «Calibration standards kit for the microbial identification system», el sistema es automático, de autocalibración. La composición en ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área de pico.

4. RESULTADOS

4.1. Consorcio bacteriano

4.1.1. Mineralización y Espectrofotometría UV-Vis

La concentración inicial de penicilina en el medio de cultivo fue de 176 ppm, en el final de la experiencia se obtuvo una degradación relativa de penicilina del 46,62%. Este valor se obtuvo de una curva de calibración ya existente en el laboratorio.

Al transcurrir los días, el consorcio bacteriano utilizó el antibiótico como fuente de carbono y energía, generando la curva de crecimiento que se siguió en el espectro a 600 nm (fig. 10). El antibiótico se midió a 245 nm, donde se observó una disminución del mismo (fig. 10,11).

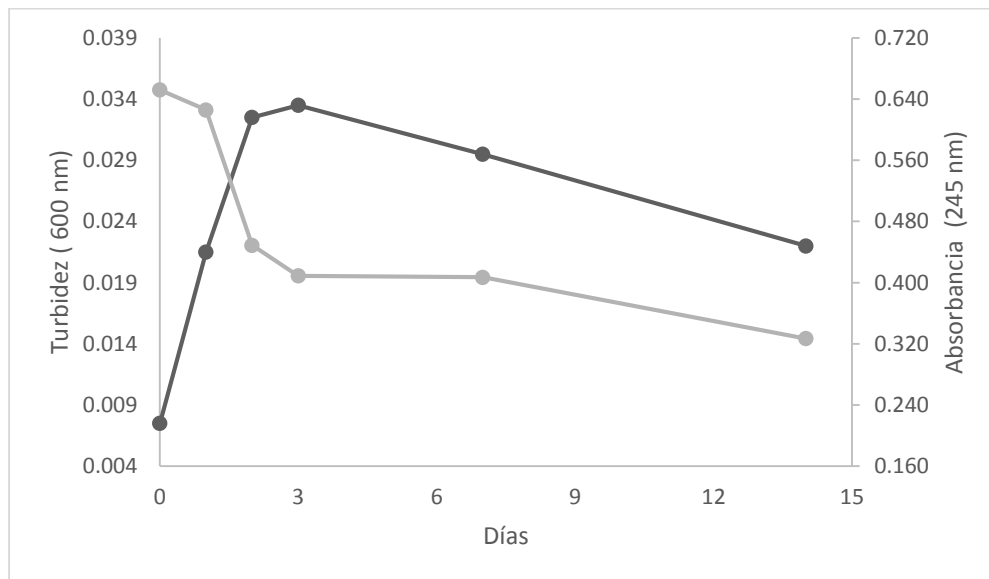


Figura 10. Mineralización del consorcio bacteriano.

El seguimiento de la mineralización, de CO₂ acumulado por el consorcio bacteriano, obtuvo un valor de 289,50 mg/L al día catorce (fig. 11), con un aumento sostenido de la cantidad de CO₂ acumulado.

Al comparar las mediciones del antibiótico a 245 nm y la acumulación de CO₂ en el sistema, (fig. 11) se observó una relación inversa en los datos, donde a medida que aumenta la cantidad de CO₂, va disminuyendo la cantidad de antibiótico presente en el sistema.

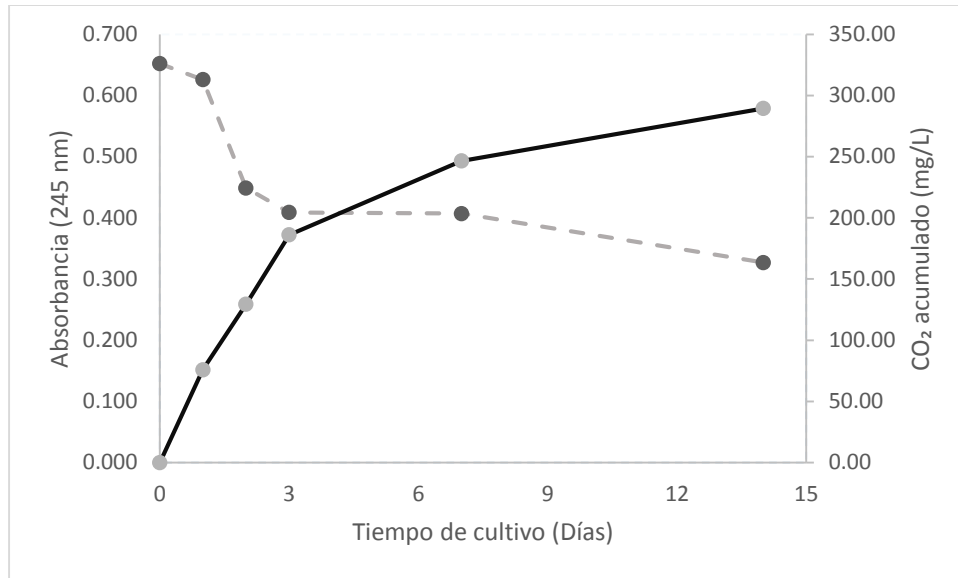


Figura 11. Acumulación de CO₂ liberado por el consorcio bacteriano y consumo de penicilina.

Se realizó la derivada primera de las medidas de absorción a 245 nm (fig. 12), en donde se demostró que el día uno es el máximo de absorbancia de la solución que contiene los sistemas, con un valor de 0,177, evidenciando que fue el día con mayor consumo de antibiótico. En cambio, el mayor día de producción de CO₂ fue el día 0 con un valor de 75,93, que corresponde al día de adaptación al nuevo entorno del consorcio bacteriano.

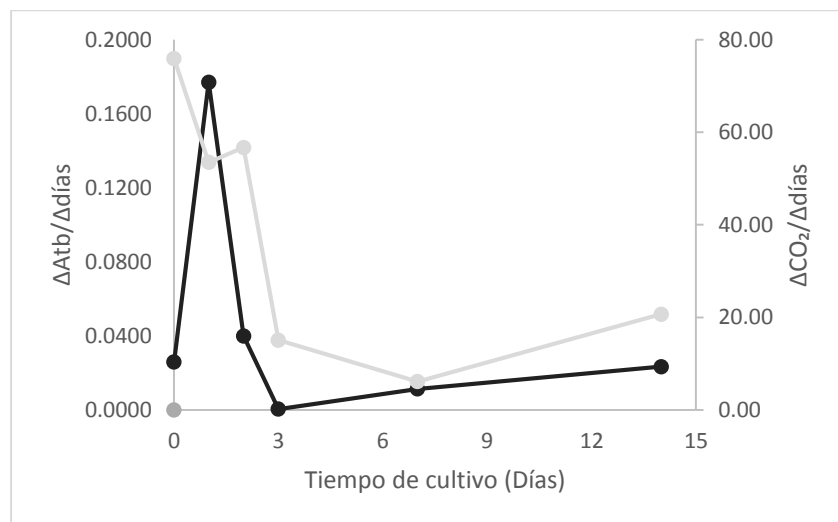


Figura 12. Derivada primera de la absorbancia en función del tiempo.

4.1.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

El análisis FT-IR del antibiótico de penicilina G con una concentración de 200 ppm (fig. 13), presenta las siguientes bandas de absorción:

- A 3207 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento O-H del -COOH.
- A 3088 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento C-H del anillo aromático.
- A 1768 cm^{-1} , una banda característica del estiramiento del enlace C=O presente en el anillo β -lactámico.
- A 1649 cm^{-1} , se observó una banda de absorción que se debe a la deformación del enlace N-H en el grupo funcional amida de la penicilina G.
- A 1354 cm^{-1} , una banda correspondiente al estiramiento del enlace C-N en el anillo β -lactámico.
- A 1114 cm^{-1} , se observó flexión C-CO-N de las C=O.
- A 950 cm^{-1} , una banda que representa el estiramiento C-O-H del -COOH.

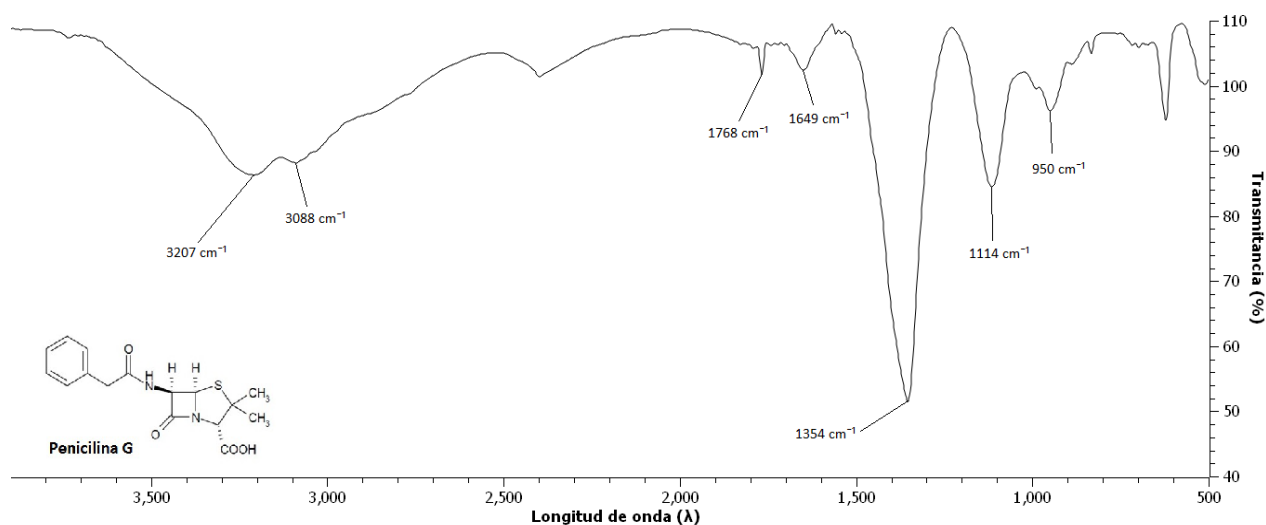


Figura 13. FTIR de penicilina G, concentración 200 ppm.

El análisis FT-IR de los sistemas a diferentes días (fig. 14), registraron las siguientes bandas de absorción:

- A 3165 cm^{-1} correspondiente al estiramiento O-H del grupo funcional -COOH.
- A 3040 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C-H del anillo aromático.

- A 1765 cm^{-1} , una banda característica del estiramiento del enlace C=O presente en el anillo β -lactámico.
- A 1673 cm^{-1} , una banda de absorción que se debe a la deformación del enlace N-H en el grupo funcional amida de la penicilina G.
- A 1338 cm^{-1} , una banda correspondiente al estiramiento del enlace C-N en el anillo β -lactámico.
- A 1106 cm^{-1} , una banda que se observó en la flexión C-CO-N del grupo funcional C=O.
- A 953 cm^{-1} , una banda que representa el estiramiento C-O-H del grupo funcional -COOH.

Se observó que la intensidad de las bandas a 3165 cm^{-1} , 3040 cm^{-1} , 1765 cm^{-1} , 1673 cm^{-1} , 1338 cm^{-1} y 953 cm^{-1} disminuyó en el día 14 en comparación con las bandas obtenidas en los días 1 y 7, lo cual indica un cambio en la estructura de la penicilina. También se evidenció que desapareció la banda a 1106 cm^{-1} , banda que representa la flexión C-CO-N del grupo funcional C=O lo cual evidencia que se produjo una hidrólisis del antibiótico penicilina G.

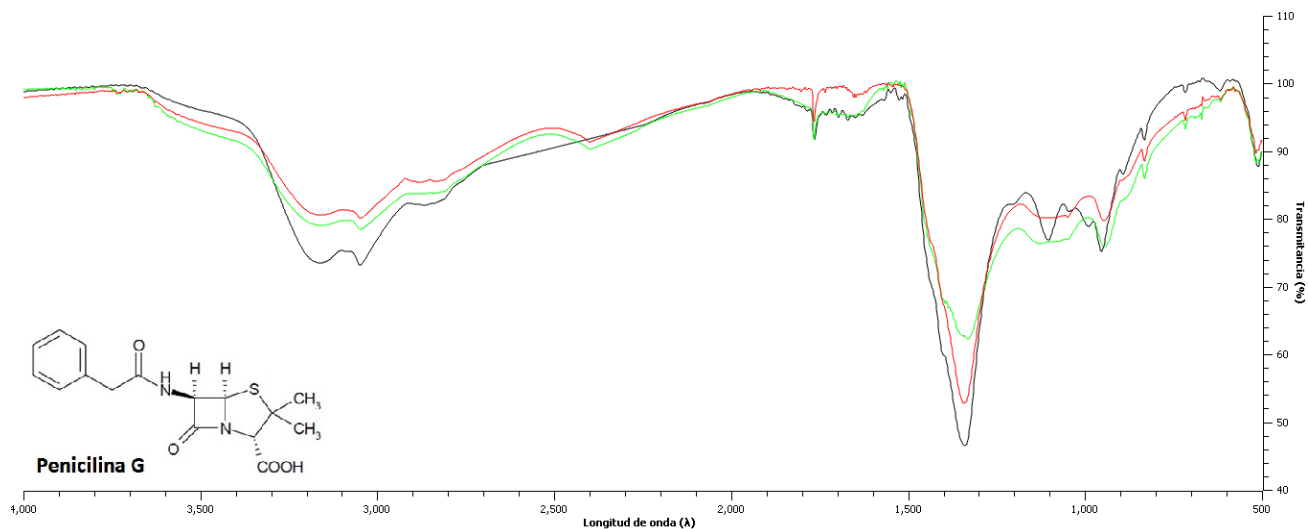


Figura 14. FTIR del consorcio bacteriano para los días 0 (—), día 7(—) día 7 y día 14(—).

4.1.3. Recuento de bacterias heterótrofas cultivable

En el día 0, se obtuvo un recuento de bacterias de $2,89 \times 10^7$ UFC/mL, al séptimo día el recuento fue de $2,99 \times 10^8$ UFC/mL y a los 14 días el recuento fue de $2,71 \times 10^8$ UFC/mL.

4.2. Cepas obtenidas del consorcio bacteriano

4.2.1. Morfología de las cepas

A partir del consorcio se pudieron aislar, obtener la morfología e identificar 11 cepas (Tabla 1).

Tabla 1. Características de las cepas.

Cepas	Forma	Elevación	Margen	Tamaño	Textura	Color y características ópticas	Coloración Gram
1- PG1	Redonda	Si	Entero	Chica	Mantecosa	Crema brillante	Bacilo (-)
2- PG2	Redonda	Si	Entero	Chica	Mantecosa	Blanca brillante	Bacilo (-)
3- PG3	Redonda	Si	Entero	Chica	Mantecosa	Amarilla opaca	Cocobacilo (-)
4- PG4	Redonda	No	Entero	Puntillosa	Mantecosa	Crema opaca	Bacilo (-)
5- PG5	Redonda	No	Entero	Chica	Mantecosa	Amarilla opaca	Cocobacilo (-)
6- P15	Redonda	Si	Entero	Puntillosa	Mantecosa	Transparente Brillante	Cocobacilo (-)
7- P1	Redonda	Si	Entero	Puntillosa	Mantecosa	Transparente brillante	Cocobacilo (-)
8- P2	Redonda	Si	Entero	Chica	Seca	Verde tornasolada	Bacilo (-)
9- P3	Redonda	Si	Entero	Puntillosa	Seca	Blanca brillante	Cocobacilo (-)
10- P4	Redonda	No	Entero	Puntillosa	Mantecosa	Amarilla opaca	Cocobacilo (-)
11- P5	Redonda	Si	Entero	Chica	Mantecosa	Manteca brillante	Cocobacilo (-)

Al realizar la mineralización de cada una de las cepas, se obtuvo una concentración medida del antibiótico de entre 16 – 75 ppm. Al transcurrir los días las cepas crecieron obteniéndose una curva de crecimiento (fig. 15), leída en el espectro a 600 nm. Las cepas se incubaron por 7 días.

4.2.2. Espectrofotometría UV - Vis

Como se observa en las imágenes (las cepas se agruparon de a dos) desarrollaron una curva de crecimiento a partir de los datos de la absorbancia medida a 600 nm con respecto a los días de incubación (fig. 15).

En los gráficos se observó que todas las cepas registraron una fase de latencia de 1 día. Las cepas 2, 8, 9 y 10 tuvieron una fase exponencial máxima de 2 días, seguida de una fase estacionaria que duró 3 días. En el caso de las cepas 2 y 8, después de la fase estacionaria, se observó un aumento en la curva, indicando que las bacterias continúan utilizando el antibiótico como fuente de carbono y energía. Sin embargo, no sucedió lo mismo con las cepas 9 y 10, ya que después de la fase estacionaria se observó una disminución en la curva, indicando la disminución de la población bacteriana.

Las cepas 1 y 5 presentaron un crecimiento exponencial que duró 2 días. Después de la fase exponencial, la curva mostró una disminución, lo que indica que no hubo una fase estacionaria, sino que

sólo se observó una disminución en la población bacteriana. Esto demostró que hubo una limitación en el crecimiento bacteriano.

En cuanto a las cepas 3, 4 y 6 la fase exponencial duró 4 días, pero tampoco se observó una fase estacionaria, sino que pasó directamente a una disminución de la población bacteriana.

Por último, las cepas 7 y 11, presentaron una fase exponencial de 1 día, que fue un tiempo menor que en las cepas anteriores, y luego se presentó una fase de disminución poblacional. En el caso de la cepa 7, hubo una disminución en el crecimiento que duró 1 día, pero durante 3 días se mantuvo constante antes de comenzar la lisis.

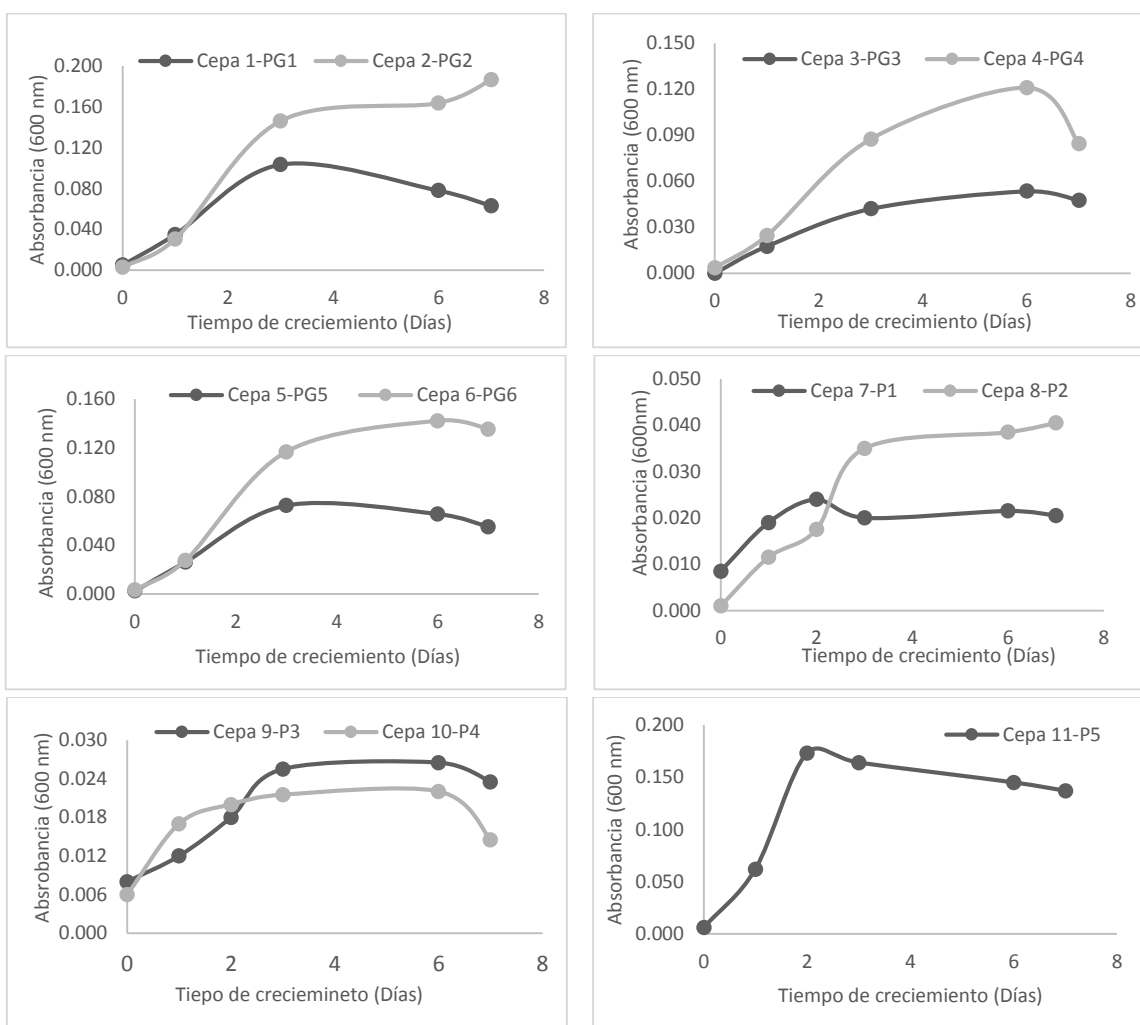


Figura 15. Curvas de crecimiento de las distintas cepas.

4.2.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Al realizar el análisis FT-IR de la mineralización de las cepas, se observó que sólo 4 cepas presentaban una variación en las bandas de absorción comparando el día 0 con respecto al día 7. Las demás cepas presentaron el mismo espectro ambos días.

En este trabajo, sólo se presentarán los gráficos en donde se indicaron cambios:

- En el análisis de la cepa 1 – PG1 (fig. 16), la banda de absorción a 1655 cm^{-1} , que se debe a la deformación del enlace N-H en el grupo funcional amida de la penicilina, en el día 7 desaparece y los demás estiramientos siguen apareciendo pero con menor intensidad comparado con el día 0. Se evidenció un posible cambio en la estructura de la penicilina.

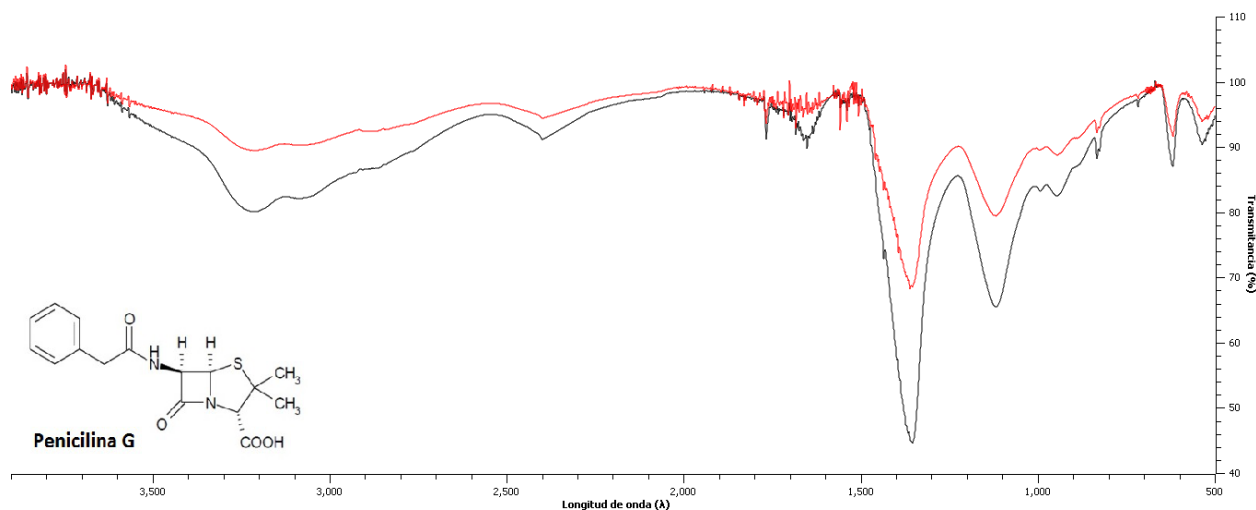


Figura 16. FTIR cepa 1 - PG1, día 0 (—) y día 7 (—).

- En el análisis de la cepa 5 – PG5 (fig. 17), se observó una variación en la intensidad en el día 0 con respecto al día 7 presente en todos los estiramientos. En el día 7, la banda de absorción a 1668 cm^{-1} que es característico del estiramiento C=O presente en el anillo β -lactámico, presentó un poco más de intensidad que en el día 0 cuando quizás tendría que haber sucedido al revés. Se evidenció que no hubo un cambio en la estructura de la penicilina y que el cambio presentado en el gráfico se puede deber a interferencias en el equipo o excipientes presentes en la muestra.

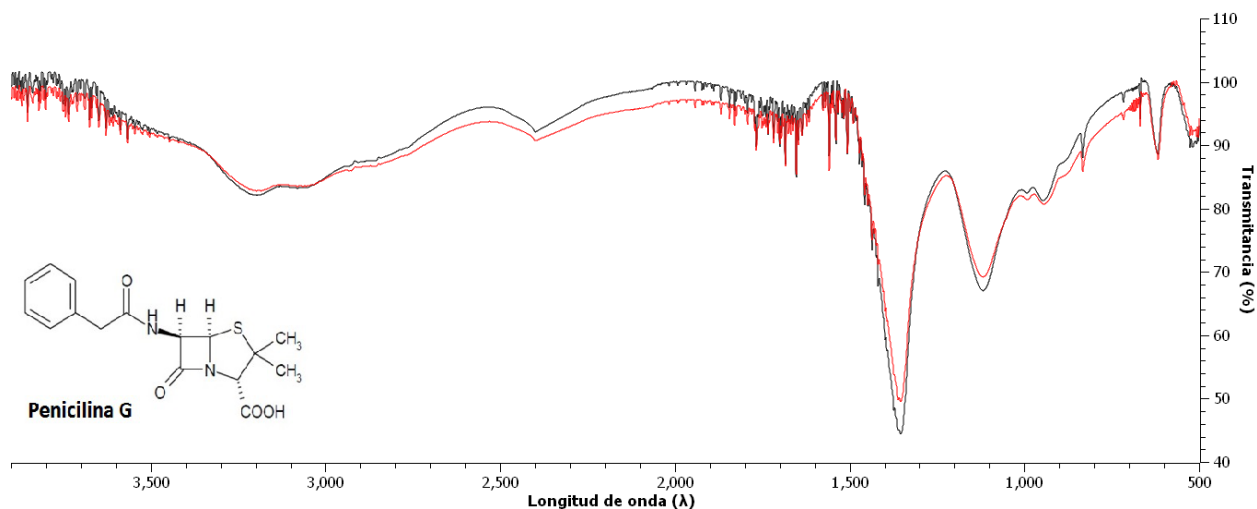


Figura 17. FTIR cepa 5 – PG5, días 0(—) y día 7(—).

- En el análisis de la cepa 8 – P2 (fig. 18), se observó una variación en la intensidad en el día 0 con respecto al día 7 presente en todos los estiramientos. En el día 7, la banda de absorción a 1354 cm^{-1} que es característico del estiramiento del enlace C-N en el anillo β -lactámico y el estiramiento a 1114 cm^{-1} que representa la flexión C-CO-N de las C=O, presentó un poco más de intensidad que en el día 0 cuando quizás tendría que haber sucedido al revés. Se evidenció que no hubo un cambio en la estructura de la penicilina y que el cambio presentado en el gráfico podría ser causado por interferencias en el equipo o excipientes presentes en la muestra.

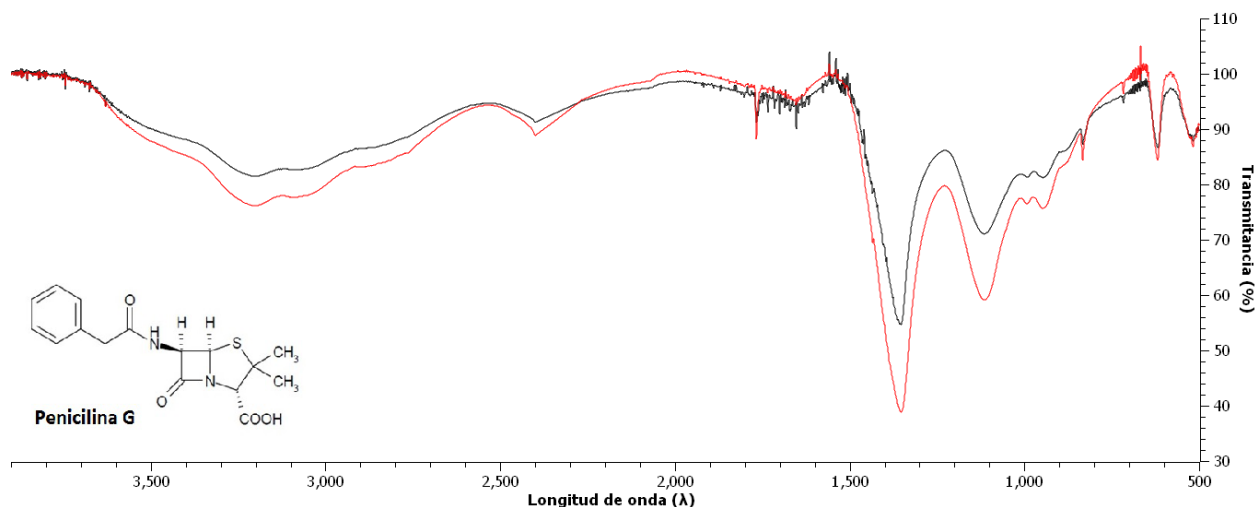


Figura 18. FTIR mineralización cepa 8 - P2, día 0 (—) y día 7(—).

- En el análisis de la cepa 10 – P4 (fig. 19), se observó una variación en la intensidad de los distintos picos, presentando un poco más de intensidad en los estiramientos del día 7 con respecto al día 0. Se evidenció que no hubo un cambio en la estructura de la penicilina y que el cambio presentado en el gráfico podría ser causado por interferencias en el equipo o excipientes presentes en la muestra.

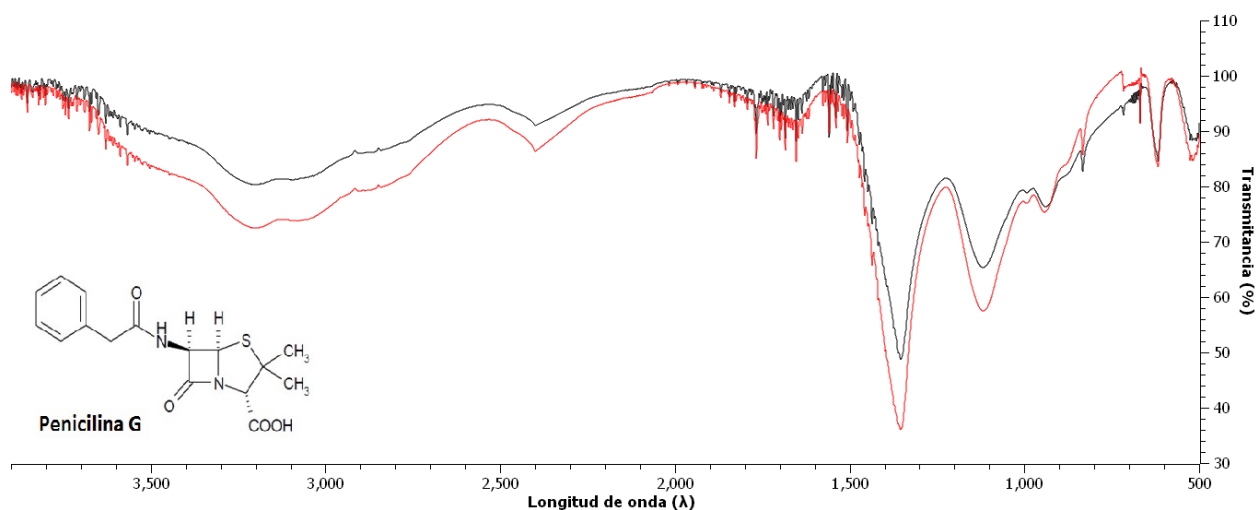


Figura 19. FTIR mineralización cepa 10 - P 4, día 0 (—) y día 7 (—).

4.2.4. Recuento de bacterias heterótrofas cultivables

Las concentraciones obtenidas de las cepas son las que se muestran en la siguiente tabla (Tabla 2), en todos los casos se observó que luego de una semana los valores aumentan en una unidad logarítmica.

Tabla 2. Crecimiento obtenido al día 7.

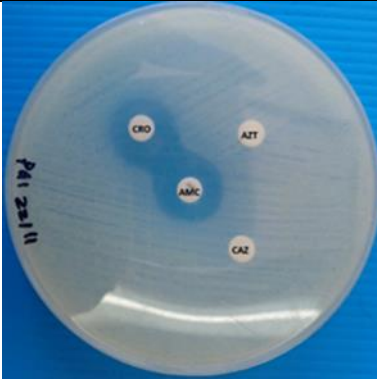
Cepas	Día 0	Día 7
1- PG1	5,19 x 10 ⁷ UFC/mL	2,15 x 10 ⁸ UFC/mL
2- PG2	3,12 x 10 ⁷ UFC/mL	5,14 x 10 ⁸ UFC/mL
3- PG3	8,00 x 10 ⁷ UFC/mL	2,05 x 10 ⁸ UFC/mL
4- PG4	2,26 x 10 ⁷ UFC/mL	3,98 x 10 ⁸ UFC/mL
5- PG5	1,24 x 10 ⁷ UFC/mL	3,24 x 10 ⁸ UFC/mL
6- P15	1,24 x 10 ⁷ UFC/mL	3,98 x 10 ⁸ UFC/mL
7- P1	5,35 x 10 ⁷ UFC/mL	1,85 x 10 ⁸ UFC/mL
8- P2	3,60 x 10 ⁷ UFC/mL	1,82 x 10 ⁸ UFC/mL
9- P3	2,90 x 10 ⁷ UFC/mL	5,03 x 10 ⁸ UFC/mL
10- P4	2,49 x 10 ⁷ UFC/mL	1,68 x 10 ⁸ UFC/mL
11- P5	9,70 x 10 ⁷ UFC/mL	2,18 x 10 ⁸ UFC/mL

4.2.5. Búsqueda de β-lactamasas

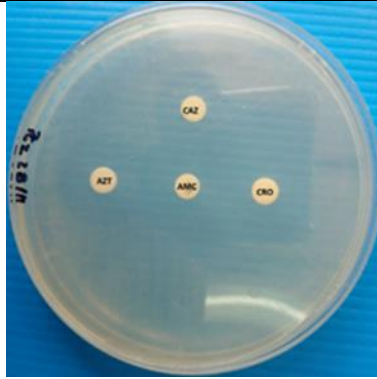
Para determinar la presencia de BLEE (β-lactamasas de espectro extendido), se utilizó el método de Jarlier, donde se evidenció por el efecto sinérgico del inhibidor y los discos que las cepas BLEE positivas fueron las cepas 1, 2, 3, 7, 8, 9 y 10 (Figura 20) (Tabla 3). Los resultados se interpretaron positivos cuando se observó una ampliación del halo de inhibición, efecto de huevo o cola de pez.

Tabla 3. Método de Jarlier de doble disco para identificación de BLEE (β-lactamasas de espectro extendido). Cro (ceftriaxona), Caz (ceftazidima), Azm (aztreonam) y Amc (amoxicilina/ ac. clavulánico).

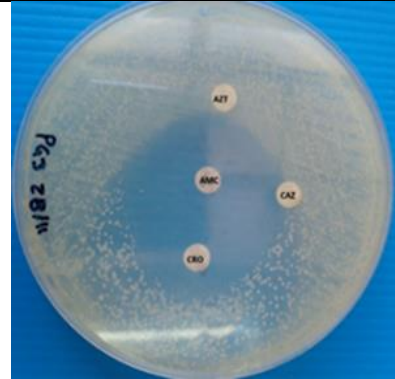
Cepas	Cro	Caz	Azm	Amc	Resultado	Formación de pigmento
1 - PG1	0,3 cm	-	-	0,5 cm	Blee (+)	No
2 - PG2	0,8 cm	0,7 cm	0,7 cm	0,7 cm	Blee(+)	No
3 - PG3	1,4 cm	-	-	0,5 cm	Blee (+)	No
4 - PG4	0,2 cm	-	-	0,3 cm	Blee (-)	No
5 - PG5	-	-	-	0,5 cm	Blee (-)	No
6 - P15	-	-	-	-	Blee (-)	No
7 - P1	-	0,1 cm	1,9 cm	-	Blee (+)	Verde
8 - P2	-	-	1 cm	-	Blee (+)	Verde
9 - P3	-	-	0,7 cm	-	Blee (+)	Verde
10 - P4	0,1 cm	-	1 cm	-	Blee (+)	Verde
11 - P5	-	-	1cm	-	Blee(-)	Verde



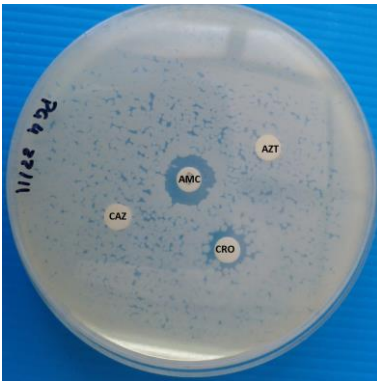
Cepa 1 - PG 1: Se observó una deformación (sinergia) de los halos de cro y amc, BLEE (+)



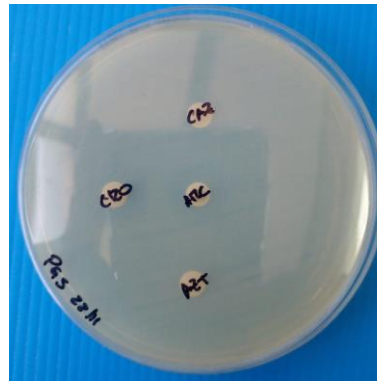
Cepa 2 - PG2: Se encontró un efecto de sinergia entre amc con cro, caz y azt, BLEE (+)



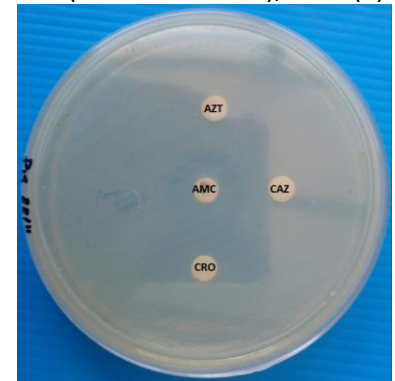
Cepa 3 - PG3: Se observó una deformación en el halo de inhibición de amc inducida por azt (forma de huevo), BLEE (+)



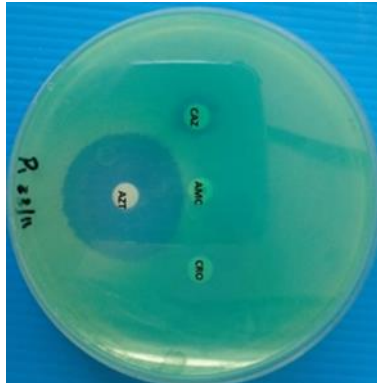
Cepa 4 - PG4: No se observó sinergia entre los discos, BLEE(-)



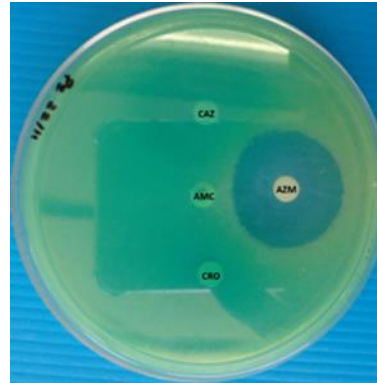
Cepa 5 - PG5: No se observó sinergia entre los discos, BLEE(-)



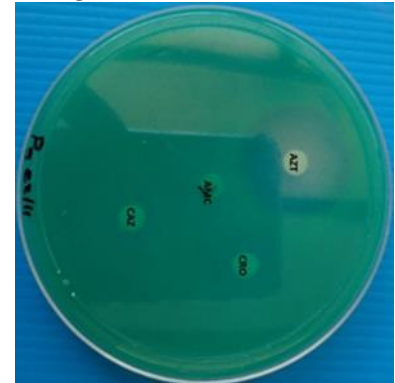
Cepa 6 - P15: No se observó sinergia entre los discos, BLEE(-)



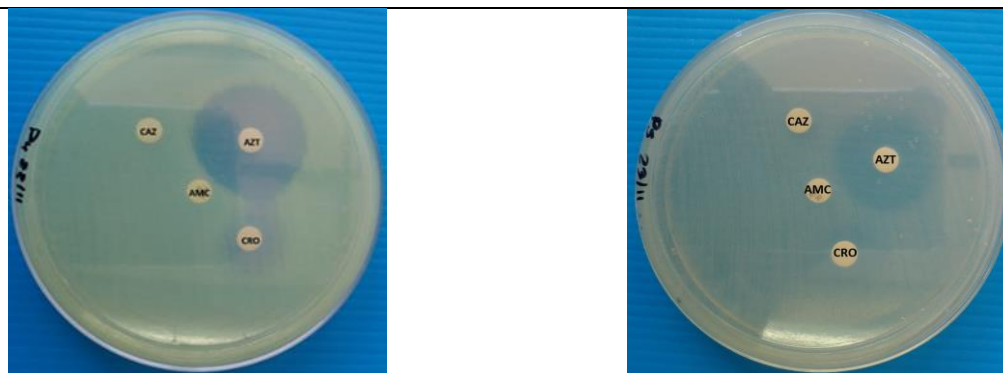
Cepa 7 - P1: Se observó una deformación del halo de azt inducida por amc (forma de huevo), BLEE(+)



Cepa 8 - P2: Se observó una deformación del halo de azt inducida por amc (forma de huevo), BLEE(+)



Cepa 9 - P3: Se observó una deformación del halo de azt inducida por amc (forma de huevo), BLEE(+)



Cepa 10 – P4: Se observó una deformación del halo azt inducido por cro (efecto de huevo), BLEE (+)

Cepa 11 – P5: No se observó sinergia entre los discos, BLEE(-)

Figura 20. Antibiogramas para la detección de cepas productoras de Blee.

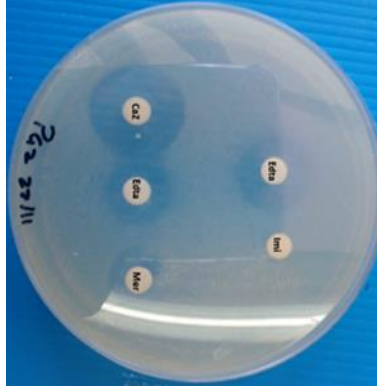
De la misma manera, se procedió a la identificación de las cepas productoras de MBL (Metallo- β -lactamasas). Se demostró un resultado positivo presentado por la sinergia entre los discos de imi – edta o caz – edta – mer. se observó que las MBL positivas son las cepas 1, 2, 5, 7, 8, 10 y 11 (Figura 21) (Tabla 4).

Tabla 4. Método para detección de MBL (metaló – β Lactamasas) productoras de carbapenemasas. Imi (imipenem), Edta (ácido etilendiaminatetraacético), Caz (ceftazidima), Mer (meropenem).

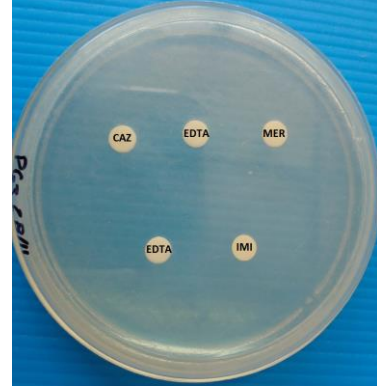
Cepas	Imi	Edta	Caz	Edta	Mer	Resultado	Formación de pigmento
1 - PG1	-	0,6 cm	1,1 cm	0,7 cm	1 cm	MBL (+)	No
2 - PG2	-	0,4cm	0,8cm	0,4cm	0,4cm	MBL (+)	No
3 - PG3	-	0,4 cm	-	0,4 cm	-	MBL (-)	No
4 - PG4	-	0,3 cm	-	0,3 cm	-	MBL (-)	No
5 - PG5	-	0,4cm	-	0,4cm	-	MBL(+)	No
6 - P15	-	0,3cm	-	0,3cm	-	MBL(-)	No
7 - P1	-	0,6cm	-	0,6cm	0,7cm	MBL(+)	Verde
8 - P2	-	-	0,1cm	-	0,9cm	MBL (+)	Verde
9 - P3	-	-	-	-	0,6cm	MBL(-)	Verde
10 - P4	-	-	0,2cm	-	0,8cm	MBL (+)	Verde
11 - P5	-	0,2cm	0,3cm	-	0,8cm	MBL (+)	Verde



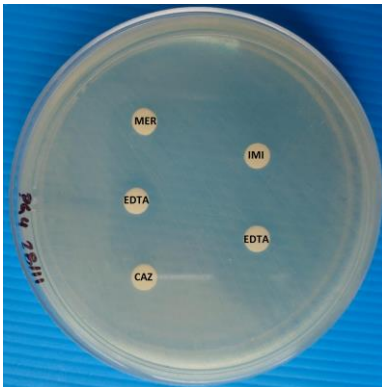
Cepa 1 – PG1: Se observa un efecto de sinergia entre el halo de inhibición de Imi que fue inducido por Edta y los alos de caz y mer inducido por Edta, MBL(+)



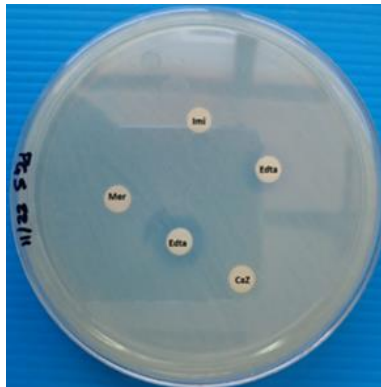
Cepa 2 – PG2: Se observó una deformación en el halo de inhibición de caz inducido por Edta, MBL(+)



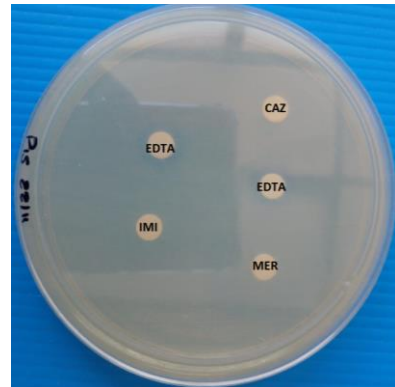
Cepa 3 – PG3: No se observó sinergia entre los discos, MBL(-)



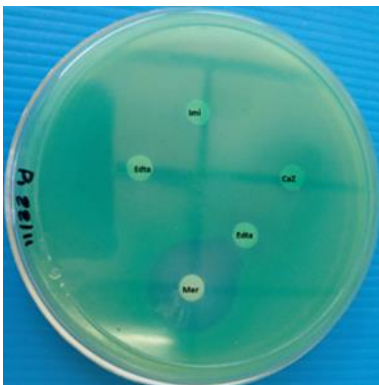
Cepa 4 – PG4: No se observó sinergia entre los discos, MBL(-)



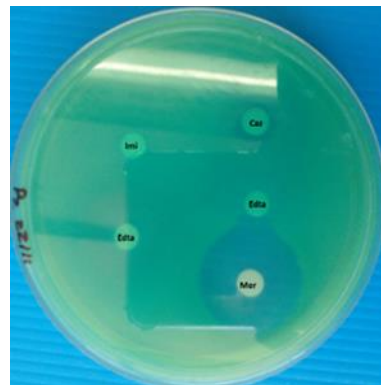
Cepa 5 – PG5: Se observó una sinergia entre el halo de Edta y mer, MBL(+)



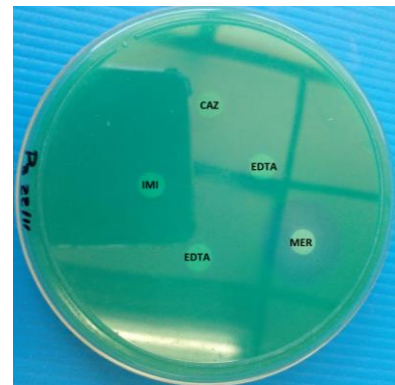
Cepa 6 – P15: No se observó sinergia entre los discos, MBL(-)



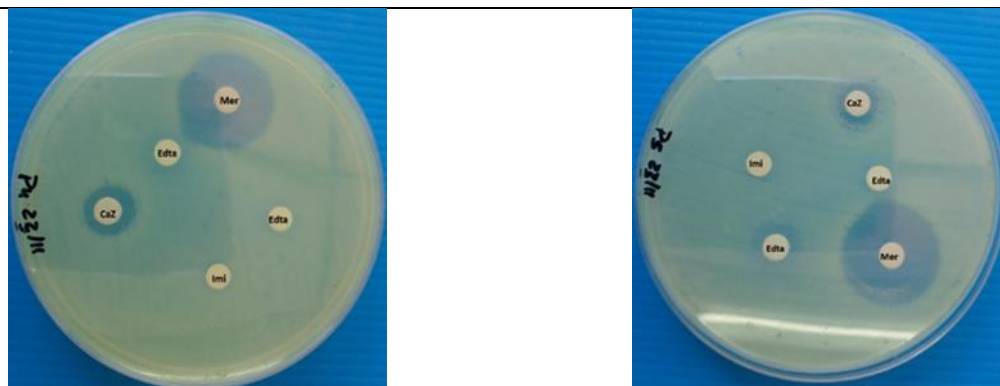
Cepa 7 – P1: Se observó una deformación del halo de inhibición de mer inducido por Edta, MBL(+)



Cepa 8 – P2: Se observó una deformación del halo de inhibición de mer inducido por Edta, MBL(+)



Cepa 9 – P3: No se observó sinergia entre los discos, MBL(-)



Cepa 10 – P4: Se observó una deformación del halo de inhibición de mer inducido por Edta, MBL(+)

Cepa 11 – P5: Se observó una deformación del halo de inhibición de mer inducido por Edta, MBL(+)

Figura 21. Antibiogramas para la detección de cepas productoras de MBL

Se realizó una comparación (Tabla 5) entre las cepas productoras de BLEE y las cepas productoras de MBL y se registra que 5 de las cepas son productoras de ambas enzimas. Las demás cepas sólo producen una enzima o ninguna.

Tabla 5. Cepas y producción de enzimas BLEE y MBL

Cepas	1 - PG1	2 - PG2	3 - PG3	4 - PG4	5 - PG5	6 - P15	7 - P1	8 - P2	9 - P3	10 - P4	11 - P5
BLEE	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
MBL	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+

4.2.6. Análisis de ácidos grasos

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos mediante cromatografía gaseosa, que representan con detalle los porcentajes de ácidos grasos junto con su respectivo tiempo de retención, para cada una de las cepas investigadas. Estos datos proporcionan, la composición lipídica de la pared celular de las cepas analizadas, mostrando las diferencias y similitudes en la distribución de los ácidos grasos a lo largo del tiempo de retención.

Tabla 6. Tiempo de retención y porcentaje de ácidos grasos de cada cepa, obtenidos a partir de cromatografía gaseosa. TR: tiempo de retención, AG: ácidos grasos.

TR	AG	Porcentaje (%)										
		1-PG1	2-PG2	3-PG3	4-PG4	5-PG5	6-P15	7-P1	8-P2	9-P3	10-P4	11-P5
1.334	Sum In Feature 2								0,97			
1.431	10:0 3OH					1,47						
1.547	12:0								1,76			
1.715	13:0 anteiso						3,34					
1.947	14:0 iso									2,05		
2.040	14:0			6,06	4,36	1,31	3,11	7,48	2,50	4,88		
2.175	15:1 iso G									0,41		
2.199	15:1 anteiso A									0,79		
2.218	15:0 iso	22,66		7,39		1,15	2,28			10,10		
2.247	15:0 anteiso	43,88		11,82		1,98	3,19		1,84	48,49		
2.297	15:1 w5c				0,37							
2.368	14:0 iso 3OH					0,64						
2.392	14:0 2OH							2,74				
2.475	Sum In Feature 2			4,38			8,27	8,84	2,38	0,38		
2.490	16:0 N alcohol			4,66		0,94	1,28					
2.511	16:0 iso					0,81				7,91		
2.543	16:0 anteiso									1,72		
2.554	16:1 w9c				2,18							
2.574	Sum In Feature 3			19,45	28,73	19,62	11,94	27,81	19,04	0,29		
2.618	16:0	20,35	Muestra sin procesar	14,84	24,25	21,87	23,79	28,32	20,00	9,16	Muestra sin procesar	Muestra sin procesar
2.667	15:0 iso 3OH									0,34		
2.699	15:0 2OH									0,23		
2.763	Sum In Feature 9			6,92	0,47	2,43	5,62		4,40			
2.808	17:0 iso						1,55		2,35	0,73		
2.838	17:0 anteiso								4,22	8,02		
2.859	17:1 w8c				1,73		1,84					
2.891	17:0 cyclo			3,73			3,60	3,32		0,39		
2.916	17:0				0,95		1,16	0,82				
2.975	16:0 iso 3OH									0,22		
3.039	17:0 10-methyl				0,28							
3.097	18:3 w6c (6,9,12)			6,47			2,09					
3.142	Sum In Feature 5							1,67	3,25	2,16		
3.156	18:1 w9c				26,77					0,66		
3.171	Sum In Feature 8	13,11		10,38		42,19	11,78	12,76	36,05			
3.220	18:0				0,99	1,96	3,45	3,41	2,21	0,40		
3.280	17:0 iso 3OH					2,00	1,45					
3.334	18:0 10-methyl, TBSA				8,41							
3.386	17:0 3OH						8,53			0,23		

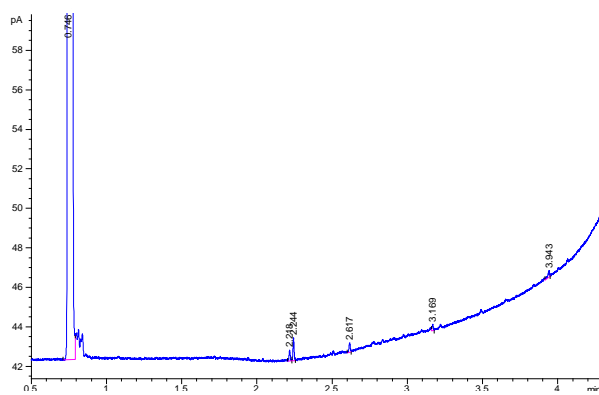
3.448	Sum In Feature 6	0,32	1,75
3.493	19:0 cyclo w8c	3,91	
3.513	19:0		1,07
3.580	18:1 2OH	0,19	0,76
3.656	20:4 w6,9,12,15c	1,63	
3.686	18:0 3OH		0,42

Se pudieron identificar 2 cepas (Tabla 7) mediante el análisis de los ácidos grasos presentes en su pared celular, con un índice de identificación del 0,5. Cabe destacar que el cromatógrafo gaseoso usado posee un sistema de autocalibración.

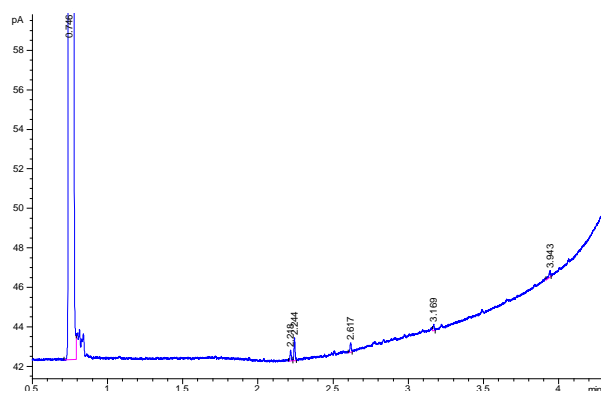
Tabla 7. Identificación de cepas

Cepas	Identificación
7 – P1	<i>Serratia odorífera</i>
9 – P3	<i>Paenibacillus polymyxa (Bacillus)</i>

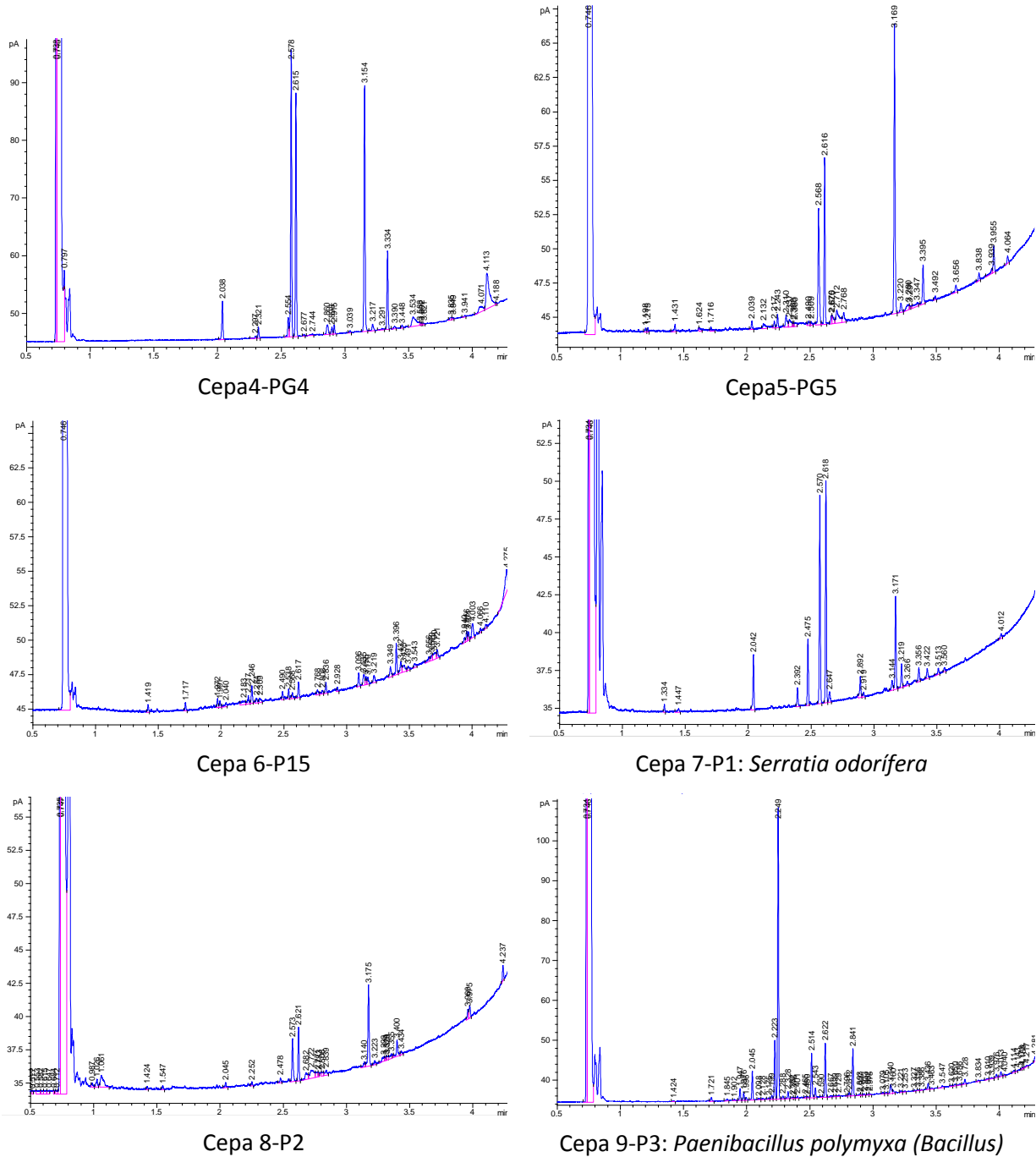
La composición en ácidos grasos de cada cepa fue calculada como porcentaje del área del pico obtenido en los cromatogramas correspondientes (fig. 22). Este enfoque permitió una caracterización de los perfiles lipídicos de las cepas, revelando las proporciones relativas de los distintos ácidos grasos presentes en su composición.



Ceba 1-PG1



Ceba 3-PG3



A partir de los datos obtenidos en la tabla 6, se generó el dendograma de las cepas (fig.23) para determinar las similitudes o diferencias entre las cepas estudiadas.

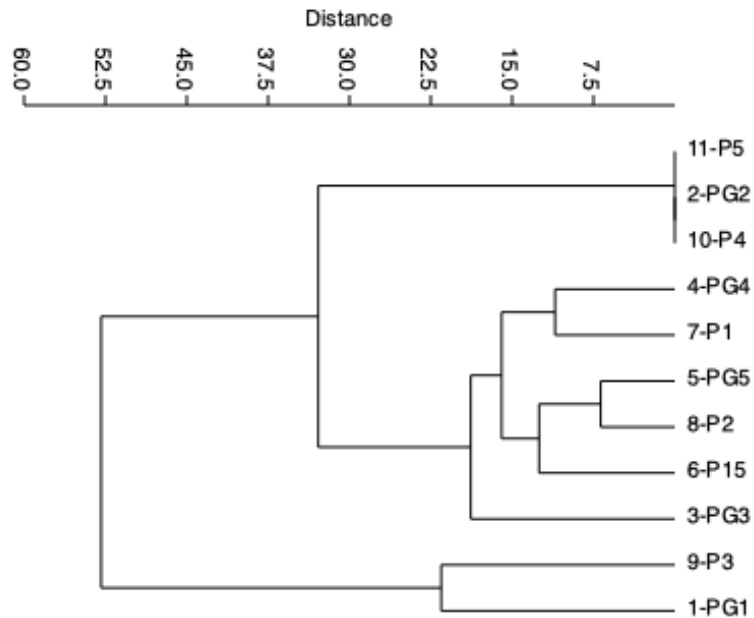


Figura 23. Dendograma

Se observa que se obtienen tres conglomerados, el primer conglomerado (arriba), se compone de las cepas 2-PG2, 10-P4 y 11-P5, son las cepas que no fueron procesadas por el cromatógrafo. El segundo conglomerado (medio) se compone de seis cepas, las cuales son: 3-PG3, 4-PG4, 5-PG5, 6-P15, 7-P1 y 8-P2, lo que nos indica que tienen un nivel de similitud entre ellas de 20 aproximadamente. El tercer conglomerado se compone de dos cepas que son 1-PG1 y 9-P3, con un nivel de similitud de 23 aproximadamente. Los conglomerados dos y tres tienen una similitud de 25 aproximadamente.

En el conglomerado dos, las cepas 4-PG4 y 7-P1 son similares, al igual que con las cepas 5-PG5 y 8-P2, al mismo tiempo estas dos últimas tienen una similitud con la cepa 6-P15.

5. DISCUSIÓN

La biodegradación de antibióticos en el medio ambiente, se lleva a cabo mediante el uso de microorganismos y enzimas. Por lo general, no causa contaminación secundaria, se puede utilizar en una variedad de entornos y es un método de eliminación respetuoso con el medio ambiente (Liu et al., 2021). Al utilizar a la penicilina G como fuente de carbono y energía se observaron resultados diferentes entre el consorcio bacteriano y las cepas individuales, el consorcio degradó a la penicilina mientras que las cepas individuales no lo hicieron. En el consorcio bacteriano, la presencia de turbidez a 600 nm, indicó que hubo un desarrollo bacteriano y que este aumentó su número en una unidad logarítmica (Fiallos Núñez, 2017). La absorbancia a 245 nm, permitió realizar un seguimiento de la presencia de grupos químicos de la penicilina por el espectrofotómetro. La biodegradación o utilización de este antibiótico produce mineralización (Poppo Trujillo, 2009) y esto puede utilizarse para realizar pruebas de este proceso (Martínez Pérez, 2007).

El seguimiento de la evolución del CO₂ acumulado por el consorcio bacteriano mostró un mayor desarrollo durante las primeras 24 horas. Se trabajó con frascos cubiertos con papel aluminio e incubación con agitación constante a oscuras para evitar la foto degradación que se da en los 150 minutos (Quin et al., 2021). Esta acumulación es la que nos demuestra una biodegradación de la penicilina, medida mediante la prueba de desprendimiento de CO₂ en recipientes cerrados (Martínez Pérez, 2007). Resultados similares se observaron en estudios previos pero para cezfatacidima, demostrando que los consorcios bacterianos provenientes de sitios contaminados también pueden desarrollarse con otros compuestos complejos como son los antibióticos (Gutiérrez et al., 2022).

El consorcio bacteriano estaba integrado por 11 cepas cultivables, las cuales tuvieron el mismo tratamiento que el consorcio, se les realizó una mineralización de penicilina G. Sin embargo, a diferencia de lo que sucedió con el consorcio bacteriano, se encontró que las cepas no utilizaban el antibiótico. Aunque se observó un crecimiento bacteriano, no se evidenció una degradación clara del antibiótico en los espectros de FT-IR, lo que no concordó con el modelo de mineralización (Martínez Pérez, 2007).

Al analizar los espectros del FT-IR del consorcio bacteriano, se observó un cambio en la estructura de la penicilina. En el día 14, en comparación con los días 1 y 7, se evidenció una disminución en la banda a 3165 cm⁻¹, estiramiento que representa el enlace O-H del grupo funcional -COOH (ácido carboxílico), disminuye. A 3040 cm⁻¹, la banda característica del enlace C-H del anillo aromático también disminuyó en

intensidad. A 1765 cm^{-1} la banda característica del estiramiento del enlace C=O (cetona) presente en el anillo β -lactámico, también mostró una disminución en su intensidad, al igual que la banda a 1338 cm^{-1} que representa el enlace de C-N en el anillo β -lactámico.). La banda de absorción a 1673 cm^{-1} , que corresponde a la deformación del enlace N-H del grupo funcional amida de la estructura de penicilina, también disminuye su intensidad. Se observó otra disminución de intensidad en la banda a 953 cm^{-1} que representa el estiramiento del C-OH del grupo funcional -COOH (ácido carboxílico). La banda de absorción que desapareció fue la que se presentaba a 1106 cm^{-1} , que representa la flexión del enlace C-CO-N del grupo funcional de C=O (cetona) del anillo β -lactámico. La desaparición de esta banda de absorción sugiere que se produjo una hidrólisis del antibiótico por la presencia de β -lactamasas, que se encontraron en algunas de las bacterias aisladas, evidenciando que las β -lactamasas actúan rompiendo el enlace amídico del anillo β -lactámico, previa unión al grupo carboxilo (antibióticos betalacámicos, sf.). En el trabajo de Reis et al., (2020), parte II, informan sobre la degradación de la penicilina por medio de hidrólisis y fotólisis medida por materia orgánica, pero que principalmente la degradación sucede por hidrólisis del anillo β -lactámico lo que genera productos de degradación que a menudo se encuentran en concentraciones más altas que la forma original, ese producto sería el ácido penicílico (Cirilo et al., 2013).

En los espectros obtenidos del FT-IR de cada cepa, sólo se observó un cambio significativo en el espectro de la muestra 1 – PG1 que es muy parecido al que se dio en el consorcio bacteriano. En los espectros de las demás cepas, se observaron cambios en las intensidades de las bandas, pero estos cambios no correspondieron a alteraciones en la estructura de la Penicilina G, lo que sugiere que no hubo una hidrólisis del antibiótico. Es posible que haya ocurrido cometabolismo (Kenner-Veiga et al 2022), en el cual los productos resultantes son semejantes estructuralmente a los compuestos originales y suelen acumularse. En este caso de cometabolismo, otro material orgánico fue utilizado como fuente primaria de carbono y energía (Martínez Pérez, 2007).

Los microorganismos pueden producir enzimas que degradan los antibióticos, como las β -lactamasas, que pueden escindir los anillos β -lactámicos de las cianotoxinas y las cefalosporinas. Según la especificidad de sustrato de las β -lactamasas, se pueden dividir aproximadamente en tres categorías: penicilinasas, cefalosporinasas y cefalosporinasas de tipo oxime (Singh et al., 2023). Las enzimas de penicilina descomponen fácilmente los antibióticos de penicilina, mientras que las enzimas de cefalosporina tienen una mayor actividad en la descomposición de los antibióticos de cefalosporina, y las enzimas de oxima cefalosporina tienen un efecto de descomposición tanto en la penicilina como en la cefalosporina, pero son especialmente buenas para descomponer la oxima cefalosporina. Para degradar

eficazmente los antibióticos, se pueden construir sistemas enzimáticos (Liu et al 2021). Estos son inmovilizados sobre nanopartículas magnéticas Fe_3O_4 (Gao et al., 2017b) para inmovilizar la β -lactamasa para degradar la penicilina.

La presencia de BLEE positivo se observó en siete de las once cepas, y siete con capacidad productora de metalo- β -carbamepenasas. Estas bacterias que hidrolizan a la penicilina G por medio de las enzimas β -lactamas o carbamepenasas, son resistentes a ese antibiótico, pero pueden utilizarlo como fuente de carbono y energía cuando se encuentran asociadas junto a otras bacterias. En el estudio de las bacterias aisladas se encontró que varias poseían la capacidad de producir de β -lactamasas, esto coincide con la biodegradación de cefalosporinas en sedimentos lacustres y suelos (Reis et al., 2020).

6. CONCLUSIÓN

A partir de la experiencia realizada, se concluye que se obtuvo un consorcio bacteriano de una muestra de suelo patagónico, contaminada con residuos de la industria del petróleo proveniente de biopilas de repositorios de la cuenca del Golfo San Jorge. Este consorcio bacteriano demostró ser capaz de utilizar a la penicilina como fuente de carbono y energía, lo cual se evidenció mediante la generación de CO₂, indicando que el antibiótico fue mineralizado y utilizado como fuente de carbono y energía.

A partir de ese consorcio, se aislaron cepas y se observó que estas cepas no son capaces de mineralizar la penicilina de manera individual, lo que sugiere que su capacidad de utilizar a la penicilina como fuente de carbono y energía se da en forma grupal.

Es importante destacar que el análisis de los perfiles de los ácidos grasos permitió identificar únicamente dos cepas aisladas, las cuales fueron identificadas como *Paenibacillus polymyxa* y *Serratia odorífera*.

7. BIBLIOGRAFÍA

Acuña, A., Cambarieri L., Pucci O., Pucci G. (2014). Remediación de fondos de tanque por utilización de microorganismos autóctonos. eDUTecne.

Acuña, A., Pucci G., Morales, M. J., Pucci, O. (2010). Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. p. 29-36.

Al-Ahmad, A., Daschner, F. D. y Kümmerer, K. (1999). Biodegradabilidad de cefotiam, ciprofloxacina, meropenem, penicilina G y sulfametoxazol e inhibición de bacterias de aguas residuales. Archivos de contaminación ambiental y toxicología, 37, 158-163.

Antibióticos betalactámicos, sf. <http://www.odn.unne.edu.ar/atbbetal.pdf>.

Benito Peña, M. E. (2006). Desarrollo y validación de métodos analíticos basados en nuevos elementos de reconocimiento molecular para la determinación de antibióticos-lactámicos en muestras de interés agroalimentario y medioambiental. Universidad Complutense. Madrid.

Cambarieri, L., Pucci, G. N. and Acuña, A. J. (2021). Optimización de un proceso de bioestimulación en un suelo de Río Gallegos, Argentina, para su utilización en biorremediación de hidrocarburos. Ecosistemas. 30(1), 2084-2093.

Cirilo, A., LLombart, C. y Tamargo, J. (2013). Introducción a la química terapéutica (2° edición). Diaz de Santos. Barcelona.

Crofts T. S., Wang B., Spivak A., Gianoulis T. A., Fosberg K. J., Gibson M. K., et. Al (2018). Shared strategies for β -lactam catabolism in the soil microbiome. Nature Chemical Biology. p. 556-564.

Envoltura de Gram Negativo, sf. <https://consejoscelular.blogspot.com/2019/08/pared-celular-de-las-bacterias-gram.html>

Fiallos Núñez, J. E. (2017). Determinación de la correlación entre métodos visuales ópticos y difusión en placa en el crecimiento de Escherichia coli (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica).

Gao, X. J., Fan, X. J., Chen, X. P., & Ge, Z. Q. (2018). Immobilized β -lactamase on Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for degradation of β -lactam antibiotics in wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15, 2203-2212

Gutierrez, M. E., Acuña, A., & Pucci, G. N. Utilización de ciprofloxacina como única fuente de carbono. 7° encuentro de investigadores de la Patagonia Austral. Octubre 2022.

Kennes-Veiga, D. M., González-Gil, L., Carballa, M., & Lema, J. M. (2022). Enzymatic cometabolic biotransformation of organic micropollutants in wastewater treatment plants: A review. *Bioresource Technology*, 344, 126291.

Latorre-Barragana, M. F., Zurita-Lealc, A. C., & Gomezjuradod, M. E. G. (2019). Resistencia de los antibióticos β -lactámicos en países latinoamericanos. *Medwave*, 19(10).

Lezameta, L., Gonzáles, E., y Tamariz, J. (2010). Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. Vol. 27. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342010000300006.

Lin B., Lyu J., Lyu X., Yu H., Hu Z., Lam J. C. W., et al. (2015). Caracterización de la capacidad de degradación de cefalexina de dos cepas de *Pseudomonas* aisladas de lodos activados. *J Hazard Mater*. 282:158–64. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.080>.

Liu, C., Tan, L., Zhang, L., Tian, W., & Ma, L. (2021). A review of the distribution of antibiotics in water in different regions of China and current antibiotic degradation pathways. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 692298.

Martínez Pérez, M. D. L. Á. (2007). Diseño de una prueba de biodegradabilidad anóxica de compuestos orgánicos en medio líquido. Universidad autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Centro de investigaciones químicas.

Minerdi, D., Zgrablic, I., Castrignanò, S., Catucci, G., Medana, C., Terlizzi, M. E., & Sadeghi, S. J. (2016). *Escherichia coli* overexpressing a baeyer-villiger monooxygenase from *acinetobacter* radioresistens becomes resistant to imipenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(1), 64-74.

Moreno, K. (2013). Carbapenémicos: Tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica LXX (608)* 599-605. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2013/rmc134i.pdf>

Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M (2014). *Microbiología Clínica* (7° edición). Elsevier.

Pichl, G., Pucci G. N., (2020). Bacterial diversity from bottoms tanks. *International Journal of Science and Research (IJSR)* Volume 9, Issue 6, June 2020. ISSN (Online): 2319-7064.

Poppo Trujillo, D. (2009). Aplicación del test de generación de CO₂ por Head Space en el estudio de la biodegradación aerobia del Diazinon en lodos activados.

Pucci, G. N., Acuña, A. J., Nohra, N. Y. y Pucci, O. H. (2012). Cambios en las comunidades bacterianas del suelo después de la contaminación con hexadecano. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. ISSN 1561-0837. 19(1)111-112.

Qin, K., Zhao, Q., Yu, H., Xia, X., Li, J., He, S. y An, T. (2021). A review of bismuth-based photocatalysts for antibiotic degradation: Insight into the photocatalytic degradation performance, pathways and relevant mechanisms. *Environmental Research*, 199, 111360.

Reis, A. C., Kolvenbach, B. A., Nunes, O. C., & Corvini, P. F. (2020). Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants—part I. *New biotechnology*, 54, 34-51.

Reis, A. C., Kolvenbach, B. A., Nunes, O. C. y Corvini, P. F. (2020). Biodegradación de antibióticos: los nuevos determinantes de resistencia, parte II. *Nueva biotecnología*, 54, 13-27.

Sánchez, D., Marcano, D., Spadola, E., León, L., Payares, D., Ugarte, C., Salgado, N., Maggi, G., Guevara, A., Torres, S., Rodríguez, J., Flores, A., Tarazona, B. (2008). Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos en *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales de Venezuela. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Vol. 39. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772008000200004

Sección V, Capítulo 30: Antibióticos betalactámicos, Sf. https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/cap30_betalact.pdf

Singh, A., Chaurasia, D., Khan, N., Singh, E., & Bhargava, P. C. (2023). Efficient mitigation of emerging antibiotics residues from water matrix: Integrated approaches and sustainable technologies. *Environmental Pollution*, 121552.

Topp, E., Renaud, J., Sumarah, M. y Sabourin, L. (2016). Persistencia reducida de los antibióticos macrólidos eritromicina, claritromicina y azitromicina en suelo agrícola después de varios años de exposición en el campo. *Ciencia del Medio Ambiente Total*, 562, 136-144.

Wang, Q., Zhang, Z., Xu, G. y Li, G. (2021). Pirólisis de residuos y lodos de fermentación de penicilina para producir biocarbón: destrucción de genes de resistencia a antibióticos y aplicación de biocarbón en la adsorción de penicilina en agua. *Diario de materiales peligrosos*, 413, 125385.