



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

TÍTULO:

ANÁLISIS DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS
EN SISTEMAS MICROALGA-BACTERIA PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS
RESIDUALES

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA**

PRESENTA:

VÍCTOR DAVID PERERA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. JULIÁN CARRILLO REYES, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR

DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA
DR. EDSON BALTAZAR ESTRADA ARRIAGA, INSTITUTO MEXICANO DE
TECNOLOGÍA DEL AGUA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO. NOVIEMBRE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. German Buitrón Méndez

Secretario: Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga

Vocal 1: Dra. Maria Teresa Orta Ledesma

Vocal 2: Dr. Armando González Sánchez

Vocal 3: Dr. Julián Carrillo Reyes

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis
Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA).
Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de
México, Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, 76230 Querétaro, México.

TUTOR DE TESIS:

Julián Carrillo R

Dr. Julián Carrillo Reyes

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



Se agradece el financiamiento del presente trabajo de investigación al proyecto del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IA211220 (DGAPA UNAM).

Victor David Perera Pérez agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (897841) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría durante el periodo del 2020-1 al 2021-2.

Se agradece el apoyo técnico de la Mtra. Gloria Moreno Rodríguez, al Mtro. Jaime Pérez Trevilla y al Ing. Ángel A. Hernández Huerta para la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A toda mi familia por su apoyo incondicional.

A mi madre por su apoyo incondicional.

A todas esas personas que han representado un ejemplo para seguir con mis objetivos y en especial a los que con su negativa han redefinido mis metas para continuar con expectativas renovadas y energía inagotable.

A HPBM por estar en el lugar y tiempo indicado.

Al universo y a su primogénita la serendipia, por dejarme continuar en este camino lleno de eventos y experiencias inesperados, colmado de incertidumbre, éxtasis y felicidad.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	iii
DEDICATORIA.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ACRÓNIMOS	ix
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 La resistencia a los antibióticos β -lactámicos y su papel como contaminantes emergentes	4
2.2. Los mecanismos de transferencia de la resistencia a los antibióticos en el medio ambiente	5
2.3. Vías de propagación de la resistencia a antibióticos en PTAR	6
2.4. Los factores ligados al fenómeno de resistencia a los antibióticos en las PTAR.....	9
2.4.1. El mecanismo de “SOS” y la resistencia a los antibióticos.....	9
2.4.2 Las concentraciones sub-inhedorias de antibióticos en PTAR	9
2.4.3. Las biopelículas y el fenómeno de resistencia a los antibióticos en las PTAR.....	10
2.5 La detección y cuantificación de los GRA en PTAR	11
2.6 El potencial de los sistemas basados en agregados microalgas-bacterias (MABA).....	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS.....	17
5.1 Objetivo general	17
6. METODOLOGÍA.....	18
6.1 Área de estudio y reactores.....	18
6.2 Agua residual e inóculo	18
6.3 Operación de los reactores “raceway” en continuo	19
6.3.1 Prevalencia de GRA y comunidades microbianas.....	21
6.4 Cuantificación de GRA y caracterización de comunidades microbianas.....	22
6.4.1 Cuantificación de los genes de resistencia a los antibióticos	22
6.4.2 Caracterización de la comunidad microbiana.....	25

6.5 Métodos analíticos.....	25
6.5.2 Caracterización de los agregados microalga-bacteria	25
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
7.1 Operación del sistema microalga-bacteria.....	27
7.2 Operación en continuo.....	28
7.2.2 Monitoreo del desempeño de los reactores: eliminación de cargas orgánicas y nutrientes	29
7.2.2.1 Eliminación de la DQO y nutrientes.....	29
7.3 Caracterización morfológica de los agregados microalga-bacteria.....	32
7.3.1 Extracción y cuantificación de SPE	32
7.3.1.1 La fracción unida de las sustancias poliméricas extracelulares.....	33
7.4 Cuantificación de GRA por qPCR en los sistemas microalga-bacteria.....	35
7.4.1 Influencia de la comunidad microbiana en la eliminación de GRA.....	38
7.4.2 Las sustancias poliméricas extracelulares y su potencial para eliminar material genético.....	40
8. Conclusiones.....	45
9. Recomendaciones finales	46
10. Referencias bibliográficas	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de la interacción de los agregados microalga-bacteria....	12
Figura 2. Esquema de la estrategia experimental.	19
Figura 3. Diagrama general de la laguna microalgal de alta tasa, tipo “raceway”. 1. Entrada, 2. Clarificador, 3. Agua tratada.	20
Figura 4. Fotografía del sistema MAB ubicado en LIPATA, Querétaro.	27
Figura 5. Observaciones en el estereoscopio de una muestra representativa de ambos reactores.....	28
Figura 6. Estructura de las SPE; SPE ligeramente unidos, SPE estrechamente unidos, SPE unidos, SPE solubles. Tomado y adaptado de Wingender, et al., (1999).....	33
Figura 7. Abundancia relativa de procariotas en el sistema microalga-bacteria durante los tres periodos de operación a nivel filo.....	39
Figura 8. Matriz de correlación entre los GRA cuantificados y la comunidad microbiana. 41	
Figura 9. Matriz de correlación entre las SPE y la comunidad microbiana a nivel de filo..	42
Figura 10. Fotografía obtenida en el microscopio óptico con el aumento 100x.	43
Figura 11. Matriz de correlación entre las SPE y los GRA en el reactor..	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presencia de GRA β -lactámicos en sistemas de lodos activados en el mundo.	15
Tabla 2. Condiciones de operación la laguna microalgal de alta tasa, tipo “raceway”.	21
Tabla 3. Análisis en los diferentes puntos de muestro de los reactores raceway	28
Tabla 4. Iniciadores utilizados para la amplificación por PCR multiplex.....	29
Tabla 5. Caracterización fisicoquímica del agua residual.	35
Tabla 6. Caracterización fisicoquímica del efluente obtenido en los diferentes TRS evaluados en la operación del sistema microalga-bacteria, así como las eliminaciones obtenidas.....	36
Tabla 7. Valor p del análisis estadístico del efecto de los diferentes TRS sobre los parámetros fisicoquímicos evaluados.....	36
Tabla 8. Comparación de porcentaje de eliminación de nitrógeno y fósforo en tratamiento de aguas residuales con microalgas.....	30
Tabla 9. Parámetros ambientales monitoreados en los sistemas microalga-bacteria	39
Tabla 10. Valores promedio con su desviación estándar de las proteínas y carbohidratos de los SPE, así como la relación P: C, obtenidas a lo largo de la operación.....	41
Tabla 11. Valor p del análisis estadísticos del efecto del TRS sobre la concentración de proteínas y carbohidratos de los SPE	41
Tabla 12. Eliminación logarítmica de GRA β -lactámicos en diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales.	43
Tabla 13. Concentración de GRA y porcentaje de eliminación en el sistema microalga- bacteria.....	44
Tabla 14. Valor p para la concentración de los tres GRA (blaSHV, blaCTX-M, blaOXA-48) en el agua residual y efluente del reactor.	44

ACRÓNIMOS

ADN Ácido desoxirribunocleico

ADNe Ácido desoxirribunocleico extracelular

blaCTX-M β -lactamasa cefotaximasa

blaOXA-48 β -lactamasa oxacilinas

blaSHV β -lactamasa sulfihidrido variable

BRA Bacterias resistentes a los antibióticos

DQO Demanda química de oxígeno

DQOs Demanda química de oxígeno soluble

DDD Dosis diaria definida

EGM Elementos genéticos móviles

ESKAPE *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,
Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.

GRA Genes de resistencia a los antibióticos

MABA Agregados microalga-bacteria

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PTAR Planta de tratamiento de aguas residuales

SPE Sustancias poliméricas extracelulares

SPE-U Sustancias poliméricas extracelulares unidas

SPE-L Sustancias poliméricas extracelulares libres

TGH Transferencia genética horizontal

TRS Tiempo de retención de sólidos

TRH Tiempo de retención hidráulica

RESUMEN

Las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) son considerados “hotspots”, o vectores de liberación de bacterias resistentes a los antibióticos (BRA) y genes de resistencia a los antibióticos (GRA) al medio ambiente. Factores como la presencia de biopelículas, y condiciones de estrés durante la operación de PTAR promueven la transferencia genética horizontal (TGH) de GRA. Los agregados microalga-bacteria (MABA) son considerados plataformas sostenibles alternativas para el tratamiento de aguas residuales. En estos sistemas existe una relación simbiótica entre microalgas y bacterias, no obstante hasta el momento no existe una clara relación entre los MABA y el comportamiento de la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos. En este trabajo se implementaron y operaron dos reactores algales de alta tasa tipo raceway como réplicas. Los reactores se operaron con un desacoplamiento del tiempo de retención hidráulica (6 días) y se operó con tres tiempos de retención de sólidos diferentes durante un etapa de 30 días cada uno (12, 7, 9 días). La operación se realizó de Junio a Noviembre de 2020, con la finalidad de evaluar la persistencia de GRA β -lactámicos. De igual manera se realizó la extracción y cuantificación de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), así como la caracterización de la comunidad microbiana. Respecto a la cuantificación de GRA β -lactámicos en los tres TRS evaluados, solamente se observó remoción para los GRA blaOXA-48 y blaSHV (log 1.58 y 0.48) en el TRS de nueve días, respectivamente. La caracterización de la comunidad microbiana sugiere un efecto de las Cianobacterias y Planctomycetes en la remoción del gen blaOXA-48, debido a una correlación positiva de la abundancia de estos grupos taxonómicos con la remoción del gen ($p < 0.05$). A pesar de que el filo proteobacterias fue dominante durante los tres TRS evaluados, los géneros correspondiente al grupo *ESKAPE* (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, and *Enterobacter spp.*) fueron desplazados, lo que sugiere la baja presencia de bacterias resistentes a antibióticos en el efluente. En este sentido se ha identificado que la población microbiana tiene una gran importancia en la remoción de los GRA y bacterias de interés clínico. Este trabajo demuestra la importancia de controlar el tiempo de retención de sólidos para la remoción de genes de resistencia a antibióticos durante el tratamiento de aguas residuales domésticas con sistemas MABA.

1. INTRODUCCIÓN

La introducción de los antibióticos a la práctica clínica se considera un parteaguas en la optimización de los servicios médicos; actualmente se estima que el consumo mundial de antibióticos se encuentra entre 1, 000,000 y 2, 000,000 de toneladas al año (CDC, 2019). Solamente en México, representan el segundo lugar en ventas realizadas en farmacias (Dreser et al., 2012). La mayoría de los antibióticos utilizados en la medicina humana son metabolitos secundarios microbianos, producidos principalmente por actinomicetos. Los metabolitos secundarios se consideran no esenciales para el crecimiento normal y la replicación de los organismos productores (Cundliffe y Demain, 2010). Recientemente, se han asociado prácticas irresponsables en el consumo de antibióticos, como la prescripción médica injustificada de antibióticos en servicios públicos y privados de salud. Estas prácticas se relacionan con la presencia de concentraciones sub-inhedoras de antibióticos en plantas de tratamiento de aguas residuales, favoreciendo la aparición de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos, que han dado lugar a un fenómeno de diversas aristas conocido como la resistencia a los antibióticos (Llor y Bjerrum, 2014; Dreser et al., 2012). En este sentido, se estima que para el año 2050 en materia de salud pública, la mortalidad asociada a infecciones relacionadas con resistencia a los antibióticos incrementa 14 veces, es decir 10 millones de muertes más que en la actualidad, superando al cáncer como la principal causa de mortalidad a nivel global (O'Neill, 2016).

Estructuralmente hablando, la resistencia a los antibióticos en bacterias no juega un papel importante en las funciones metabólicas esenciales. Por el contrario, este fenómeno de resistencia se encuentra localizado en estructuras intracelulares autónomas denominados plásmidos, los cuales albergan genes (secuencia de ADN mínima de información funcional hereditaria) que permiten la sobrevivencia en ambientes con presión selectiva, como la presencia de antibióticos. De modo que, un gen de resistencia a los antibióticos (o factor de resistencia), es una herramienta que permite a una bacteria sobrevivir en ambientes con concentraciones de antibióticos superiores a la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés), o en el caso contrario, en ausencia de este gen, aumenta la susceptibilidad de la bacteria al antibiótico. Esta definición también incluye a los genes de resistencia cromosómica no móvil; como los integrones, los cuales se encuentran en el

cromosoma bacteriano, constituidos por un conjunto de genes no expresados capaces de ser recombinados y expresados en respuesta a situaciones de estrés ejercidos por el medio circundante, por ejemplo, antibióticos (Baquero et al., 2009).

Se ha señalado que los mecanismos de resistencia intrínseca que permiten combatir a los antibióticos se pueden encontrar en microbiomas ambientales libres de antibióticos, actuando como moléculas de señalización (Baquero et al., 2009; Davies et al., 2006); por otra parte se ha indicado en varias ocasiones que las actividades antropogénicas tales como el uso inadecuado de antibióticos en humanos y en la medicina veterinaria, las condiciones insalubres en el sector salud, entre otros, incrementan de manera exponencial el fenómeno de resistencia. Destacando el papel de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) como punto clave o “hotspot” de bacterias resistentes a los antibióticos (BRA) y genes de resistencia a antibióticos (GRA) al medio ambiente (Rizzo et al., 2013; Sanderson et al., 2019)

Se ha señalado que en las PTAR, la presencia de biopelículas, y el estrés causado por diferentes factores como compuestos contaminantes, antibióticos, metales pesados tratamiento terciarios, promueven la transferencia genética horizontal (TGH) a través de elementos genéticos móviles (EGM) (Novo et al., 2013; Christgen et al., 2015; Rizzo et al., 2013; Guo et al., 2018). La búsqueda de sistemas de tratamiento de aguas residuales eficientes, simples, rentables, robusto y sostenible para proporcionar una buena calidad de efluentes ha dado lugar a nuevas estrategias como los sistemas microalgas-bacterias (Quijano et al., 2017). En este sentido los sistemas microalga-bacteria son considerados plataformas sostenibles para el tratamiento de aguas residuales, ya que presentan una menor demanda de energía para el suministro de oxígeno debido a la producción fotosintética de oxígeno de microalgas, y al mismo tiempo aumentan la eficiencia de remoción de nutrientes por medio de bacterias heterótrofas, así como la posible recuperación de recursos de valor agregado como pigmentos, biofertilizantes, nutraceuticos, etc. (Quijano et al., 2017; Hernández et al., 2019).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 La resistencia a los antibióticos β -lactámicos y su papel como contaminantes emergentes

Recientemente se ha propuesto que la evolución y propagación de BRA y GRA se encuentra ampliamente extendido por todo el mundo, de gran relevancia es su rol en las PTAR's y como estas pueden convertirse en un puntos de liberación de bacterias resistentes al ambiente y convertirse en un problema de salud pública (Ashbolt et al., 2018; Roca et al., 2015; Spellberg y Gilbert, 2014; Wright 2014). Los antibióticos tienen tres aplicaciones generales: tratamiento empírico, tratamiento definitivo y tratamiento profiláctico o preventivo. No obstante, la práctica clínica condiciona, en muchas ocasiones el uso de tratamientos empíricos, los cuáles deben fundamentarse en datos epidemiológicos, la caracterización fenotípica del microorganismo (sensibilidad y resistencia antimicrobiana), el sitio de infección, la seguridad del antibiótico, el estado de salud del paciente, así como el costo del tratamiento. Dentro de la práctica clínica, el uso de los β -lactámicos representan más del 72% de los antibióticos utilizados, debido a su amplio espectro de actividad y baja toxicidad (ej. penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, inhibidores de β -lactamasas) (Llor y Bjerrum, 2014; Suarez y Gudiol, 2007).

En México, la situación sigue la misma tendencia que a nivel global, tal como se muestra en el informe anual de 2015 emitido por la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica, donde se ha reportado una alta prevalencia de microorganismos con elevados perfiles de resistencia a antibióticos (RHOV, 2015). De la misma manera el informe del Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) de 2018, expone que los antibióticos que tuvieron mayor consumo fueron los antibióticos de la familia de los β -lactámicos; cefalosporinas cefalotina, cefepime, cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona con 197.6 dosis definida diaria (DDD)/100 estancias; en segundo lugar, los carbapenémicos; ertapenem, imipenem y meropenem con 79.3 DDD/100 estancias, y en tercer lugar la vancomicina con 44.9 DD/100 estancias. Estos resultados se expresan con base a la DDD, que corresponde a la dosis de consumo diario en miligramos de antibiótico en adultos por cada 100 estancias en el área hospitalaria.

La presencia de bacterias resistentes a antibióticos β -lactámicos, comúnmente cuentan con enzimas beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs), las cuales son de gran preocupación en la industria alimentaria. Founou et al (2016), identificaron altos niveles de perfiles BLEE en productos provenientes de la industria porcina en países como Tailandia y Holanda. Sin embargo, como se muestra Kümmerer (2009), los antibióticos β -lactámicos son fácilmente hidrolizados a temperatura ambiente y por lo tanto pierden su actividad terapéutica, no obstante representaron el mayor porcentaje de antibióticos encontrados en sitios de descargas de aguas residuales (Watkinson et al., 2009). En este sentido es de gran importancia señalar que la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos β -lactámicos juega un papel preponderante en la proliferación a estos antibióticos en el ambiente y su eventual contacto con la población humana (Kümmerer 2009).

2.2. Los mecanismos de transferencia de la resistencia a los antibióticos en el medio ambiente

La aparición y aumento de la resistencia a los antibióticos en las poblaciones microbianas son parte inherente de su evolución (Baquero et al., 2009), este fenómeno se debe en gran medida a la transferencia de material genético entre bacterias. Este proceso puede ocurrir por dos mecanismos; por herencia “vertical” (de “padre” a “hijo”), entre organismos estrechamente relacionados; o por transferencia “horizontal”, donde el ADN donado puede ser intercambiado entre especies, inclusive de diferentes dominios, como; bacteria, arquea y eucarionte (Courvalin, 2016). La transferencia horizontal confiere a los microorganismos de nuevos mecanismos de protección, incrementando de forma exponencial la resistencia a los antibióticos desde el inicio de la era de los antibióticos, a partir del descubrimiento de la penicilina (Davies, 2010).

La transferencia de genes horizontal (TGH) en las bacterias puede ocurrir por tres mecanismos; transformación, transducción y conjugación. La transformación se refiere a la asimilación de ADN por una célula bacteriana competente y su integración estable en el genoma bacteriano, mientras que el mecanismo de transducción es mediado por un bacteriófago que se ha replicado dentro de un microorganismo diferente del organismo receptor y ha recolectado fragmentos de ADN del cromosoma donante (Sørensen et al.,

2005). Por otro lado, el mecanismo de conjugación implica el contacto directo de célula a célula, mediante la formación de pares de apareamiento y el intercambio de ADN mediado por una maquinaria de conjugación bacteriana conocida como sistema de secreciones tipo IV (T4SS), el cual actúa como una máquina proteica similar a una jeringa (pilus conjugativo) que puede transportar material genético directamente a otra célula adyacente (Sørensen et al., 2005). El mecanismo de conjugación está caracterizado por la presencia de elementos genéticos móviles (EGM), los cuales son donados por una célula bacteriana y asimilados por una célula receptora (Courvalin, 2016), los cuales pueden ser plásmidos, integrones (Gillings et al., 2014; Di Cesare et al., 2016), y otros elementos genéticos. Estos EGM son capaces de moverse dentro de o entre genomas, lo que permite la adquisición y pérdida de información genética, alterando radicalmente la forma de vida de una bacteria (Courvalin, 2016).

Los EGM como los plásmidos, presentan amplios rangos de hospederos (grupos de incompatibilidad) que le permiten transferir material genético entre especies y en algunos casos, entre reinos (eucariotas y procariotas), pero en menor frecuencia, siendo este mecanismo de gran importancia para su estudio en PTAR, donde podemos encontrar un consorcio microbiano *sui-generis* (Petrovich et al., 2018; You et al., 2021). Se ha propuesto que la transferencia del plásmido conjugado que viaja a través de la síntesis de pilus y el sistema de secreción tipo IV contribuye al contacto íntimo célula a célula, facilitando la formación y el crecimiento de biopelículas y la prevalencia de GRA en las PTAR (Baharoglu y Mazel, 2014).

Respecto a la resistencia a los antibióticos β -lactámicos, se ha reportado que los genes involucrados en la síntesis de β -lactamasas (genes *bla*, responsables de inactivar el anillo β -lactámico), están ampliamente distribuidos en plásmidos. Estos genes están ampliamente distribuidos en la naturaleza, aunque su origen exacto se desconoce, se ha señalado que participan en la síntesis y el metabolismo de la pared celular, y por lo tanto proceden de un ancestro común con las bacterias patógenas portadoras de genes de β -lactamasas. De esta manera, se ha propuesto que el uso extendido e irresponsable de los β -lactámicos en el campo clínico durante los últimos 70 años, han permitido y aumentado la movilización de genes cromosómicos *bla* en bacterias ambientales (e.j. *Kluyvera* spp.), y su eventual transferencia a bacterias patógenas, por medio de plásmidos (Cantón, 2008).

2.3. Vías de propagación de la resistencia a antibióticos en PTAR

Si bien, se ha establecido que la principal vía de exposición de los seres humanos a patógenos resistentes a los antibióticos es por medio de otros individuos, ya sea dentro de clínicas o a través de la interacción entre individuos en comunidades. Hasta el momento no existen parámetros que determinen con precisión las rutas de propagación y los factores que determinan la supervivencia de los GRA y/o BRA en las rutas de transmisión en el medio ambiente y su relación con los seres humanos y/o los animales (Bengtsson-Palme et al., 2017).

Las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) se consideran puntos críticos importantes para la propagación de la resistencia a los antibióticos (Rizzo et al., 2013). De hecho, los genes de resistencia se encuentran ampliamente distribuidos en aguas residuales hospitalarias, industriales y municipales (tabla 1), siendo estas últimas las de mayor importancia, asociado en gran medida a la prescripción irresponsable de antibióticos en la población y al co-tratamiento de aguas residuales hospitalarias en PTAR municipales (Ashbolt et al., 2018; Karkman et al., 2018).

Generalmente el tratamiento de aguas residuales implica tres etapas: tratamiento primario, secundario y terciario. En el tratamiento primario, los sólidos se eliminan mediante operaciones unitarias (en su mayoría físicas). En el tratamiento secundario, los procesos biológicos y fisicoquímicos se utilizan para eliminar la mayor parte de la materia orgánica. En el tratamiento terciario o avanzado, se utilizan procesos adicionales (remoción de nutrientes, componentes tóxicos orgánicos e inorgánicos, de sólidos suspendidos fijos) para eliminar componentes residuales del tratamiento secundario (Petrovich et al., 2018). El tratamiento convencional de aguas residuales se basa principalmente en tanques de lodos activados y un tanque secundario de sedimentación de recirculación para reducir la carga orgánica del efluente primario para su descarga en el medio ambiente (Manaia et al., 2018). Los sistemas de lodos activados se caracterizan por las altas densidades bacterianas que contribuyen a la formación de estructuras como biopelículas, por medio de la interacción entre sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y otros componentes como células, ácidos nucleicos, y otros compuestos orgánicos.

Tabla 1. Presencia de GRA β-lactámicos en sistemas de lodos activados en el mundo.

GRA	Tipo de agua residual ^a	Sitio de muestreo (Sistema de lodos activados)			País	Detección por técnicas de biología molecular	Referencia
		Influyente	Efluente	Licor mezclado			
blaCTX-M	1,2,3	+	+ ↓	NA	Canada	qPCR	Neudorf et al., 2017
		NA	+	NA	España		
blaIMP-2	1 y 2	NA	+	+	Canada	Métodos de microbiología y microarreglos de ADN	Biswal et al., 2014
		-	-	NA			
blaOXA	1y 3	+	+ ↓	+	Portugal	Métodos de microbiología y PCR	Amador et al., 2015
		+	+ ↑	NA			
blaOXA-48	1 y 2	NA	+	+	Alemania	Métodos de microbiología y PCR	Szczepanowski et al., 2009
		NA	NA	+	Suecia		
blaSHV	1,2,3	NA	+	NA	España	qPCR	Marti et al., 2013
		NA	+	NA	Irlanda		
blaTEM	1,2,3	NA	+	NA	España	qPCR	Marti et al., 2013
		NA	+	NA	Irlanda		
blaVIM-1	1	+	+ ↑	NA	Alemania	Métodos de microbiología y PCR	Alexander et al., 2015

N.a. No analizado; a; 1, doméstica; 2, hospitalaria; 3, industrial. + presente; - ausente, ↑ aumento, ↓ disminución.

Si bien se ha sugerido que la abundancia de nutrientes y la presencia de diferentes factores; como antibióticos, metales pesados, biocidas, son los principales factores que permiten y aumentan de manera exponencial el fenómeno de resistencia a los antibióticos en los sistemas de lodos activados (Rizzo et al., 2013). Hay que destacar el papel del microbioma de las aguas residuales, donde los elementos genéticos móviles (EGM), y el material genético de las residuales (resistoma), permiten incrementar exponencialmente el fenómeno de la resistencia a los antibióticos en los sistemas de lodos activados (Manai et al., 2018).

De esta manera se considera que el tratamiento de lodos activados es un proceso que alberga las condiciones necesarias para la transmisión de GRA entre bacterias patógenas y no patógenas, por medio de EGM como los plásmidos (Sørensen et al., 2005; Rizzo et al., 2013). En diferentes publicaciones se ha sugerido que el ADN liberado de células al ambiente puede contribuir a la transmisión de GRA entre bacterias, un mecanismo que hasta el momento se había considerado casi inexistente (Zhang et al., 2018), esto por la fácil degradación del ADN. Se ha sugerido que el principal mecanismo por el cual los GRA son eliminados en el tratamiento secundario del tren de tratamiento es por adsorción y sedimentación en la materia orgánica. Sin embargo es posible que el ADN extracelular pueda ser asimilado en los biosólidos y resguardado de nucleasas dentro de las biopelículas por medio de las SPE, o en soportes naturales inorgánicos u orgánicos (sustancias húmicas), como sugiere Pinjin, et al., (2019).

2.4. Los factores ligados al fenómeno de resistencia a los antibióticos en las PTAR

2.4.1. El mecanismo de “SOS” y la resistencia a los antibióticos

El mecanismo de SOS (del inglés, socorro) es una respuesta bacteriana al estrés inducida cuando una concentración anormal de ADN de una sola cadena (del inglés, single strand DNA) está presente en la célula (Baharoglu y Mazel, 2012). Por ejemplo, cuando las células intentan replicar ADN dañado, después de la irradiación UV o después de haber sido expuestas a concentraciones letales de antibióticos (Sørensen et al., 2005). Se ha reportado que al momento de ser asimilados los plásmidos transferidos por TGH, y no ser completamente integrados en el genoma bacteriano de la célula receptora pueden inducir mecanismos de SOS, por medio de mutaciones puntuales o reordenamientos causados por integrones (Baharoglu y Mazel, 2012). De esta manera, se puede considerar que el mecanismo SOS es una estrategia empleada por los microorganismos para convertir el estrés ejercido por factores ambientales a su favor, como es el caso del aumento de su patogenicidad y la formación de biopelículas (Baharoglu y Mazel, 2012).

2.4.2 Las concentraciones sub-inhedorias de antibióticos en PTAR

Al contrario de lo que podría pensarse, los hospitales no representan el primer lugar en el uso de antibióticos, si no las zonas residenciales. Por lo tanto, la descarga de los mismos al sistema de alcantarillado en los complejos habitacionales contribuyen en mayor medida al aumento de residuos de antibióticos (Kümmerer, 2009). En promedio más del 70% de los antibióticos siguen siendo metabólicamente activos después de ser excretados, y por lo tanto pueden ejercer una presión selectiva en las comunidades bacterianas receptoras de estas aguas residuales con residuos de antibióticos, como las PTAR (Kümmerer, 2009). Las concentraciones sub-inhedorias se caracterizan por ejercer un efecto de hormesis, donde las respuestas biológicas a las señales o estrés ambientales se caracterizan por relaciones bifásicas de dosis-respuesta, esto es una estimulación en dosis bajas e inhibición a dosis altas de la sustancia efectora (e.j. antibiótico) (Davies, 2006).

En este sentido, se ha reportado que en las PTAR existe la presencia de antibióticos residuales en concentraciones sub-inhedorias como; cefalosporinas, fluoroquinolonas, lincosamida, macrólidos, sulfonamidas y tetraciclinas (Kumari et al., 2017; Sharma et al., 2017), los cuales se ha señalado, pueden encontrarse en residuos humanos fecales, ya sea en su forma original (compuesto activo) y/o en residuos metabólicos activos (Kumari et al., 2017). En particular, hay que destacar que debido a su estructura molecular, los antibióticos β -lactámicos, son fácilmente hidrolizados y por lo tanto inactivados, como se reporta en Leung, et al (2012). No obstante hay que recordar que es posible que bacterias BLEEs en PTAR's puedan entrar en contacto con bacterias susceptibles, propagando la resistencia a los antibióticos por medio de plásmidos. En este sentido los efluentes de PTAR's son un problema de salud pública latente, debido a que albergan bacterias resistentes a los antibióticos que pueden llegar a nichos ambientales y entrar en contacto con la población humana.

2.4.3. Las biopelículas y el fenómeno de resistencia a los antibióticos en las PTAR

Las biopelículas se definen como agregados bacterianos de alta densidad con la propiedad inherente de adherirse a las superficies y establecerse dentro de una matriz polimérica extracelular. Se ha reportado que alrededor del 90% de la biomasa de las

biopelículas se compone de SPE, compuestos principalmente por proteínas, lípidos, ácidos nucleicos como el ADN extracelular, fosfolípidos, polisacáridos, y otros compuestos orgánicos. Dicha matriz de SPE confiere firmeza mecánica a las biopelículas debido a sus características viscoelásticas. Además, las SPE son parte crucial en la formación de vínculos sociomicrobiológicos, debido a su capacidad de albergar subpoblaciones con perfiles de resistencia y plásmidos que participan en la transferencia de material genético como GRA (Madsen et al., 2012).

Cabe destacar, que la principal función de la matriz de SPE es proteger a los microorganismos de agentes antimicrobianos a través de la captación de los antibióticos por medio de interacciones electrostáticas (Vasudevan et al., 2019). Sin embargo, al mismo tiempo que brindan protección, poseen un amplio repertorio de mecanismos que confieren resistencia a los antibióticos en las bacterias en las biopelículas como; las bombas de expulsión, enzimas modificadoras de antibióticos (β -lactamasas) (Høiby et al., 2010), la presencia de subpoblaciones con rasgos fenotípicos únicos (persistencia) (Vasudevan et al., 2019).

Así mismo, la matriz de SPE puede actuar como un hospedero de GRA, en particular de ADN extracelular (ADNe) y plásmidos. Respecto al ADNe se ha propuesto la quelación de los iones multivalentes en la biopelícula mediante la secreción activa de ADNe, como mecanismo de tolerancia a los antibióticos en la población microbiana (Vasudevan et al., 2019). En cambio, los plásmidos se consideran unidades independientes que confieren nuevos rasgos a sus hospederos (resistencia a los antibióticos) y al mismo tiempo participan activamente en la formación de biopelículas (Madsen et al., 2012).

2.5 La detección y cuantificación de los GRA en PTAR

Para la detección de GRA en matrices complejas, las técnicas de biología molecular como la qPCR (por sus siglas en inglés, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo), plantean una alternativa novedosa con ventajas superiores a los métodos convencionales como los medios de cultivos. En este sentido, las técnicas microbiológicas convencionales tienen una limitada capacidad para examinar las comunidades microbianas, donde solo entre

el 1-10% de las bacterias son cultivables (Che et al., 2019). Adicionalmente, los genes transferidos solo pueden ser expresados por un reducido número de hospederos, y requieren un gran tiempo de preparación y conllevan altos costos para análisis adecuados de post-aislamiento (Rizzo et al., 2013). La qPCR es una variante de la PCR punto final, donde es posible monitorear los resultados en tiempo real, y por lo tanto, cuantificar los GRA (Lamas et al., 2016).

2.6 El potencial de los sistemas basados en agregados microalgas-bacterias (MABA)

Las lagunas microalgales de alta tasa (del inglés, high rate algal pond; HRAP), son sistemas de tratamiento de aguas residuales competitivo por su bajo costo de operación y remoción de nutrientes, debido a la interacción mutualista que existe entre algas y bacterias. En este sentido, las microalgas como microorganismos fotosintéticos poseen la habilidad de asimilar nitrógeno y fósforo inorgánico, y producir oxígeno bajo la presencia de luz solar, el cual es asimilado por las bacterias para la remoción de nutrientes y materia orgánica produciendo CO_2 , que será fijado por las microalgas (figura 1). Adicionalmente, el cultivo de microalgas es una plataforma de tratamiento de aguas residuales energéticamente sustentable, mediante la obtención de productos de valor agregado como biogás por medio de la digestión anaerobia de los MABA (Carrillo-Reyes et al., 2021, Quijano et al., 2017).

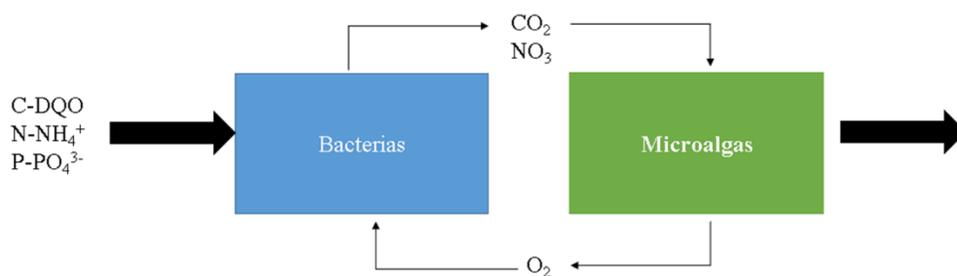


Figura 1. Representación gráfica de la interacción de los agregados microalga-bacteria.

Los sistemas MABA han logrado reemplazar el uso de tecnologías como la centrifugación, la flotación y la filtración empleadas en la recolección de biomasa microalgal,

las cuales representan un alto grado de consumo de energía, resultando en procesos costosos y con sub-productos contaminantes. En este sentido, las SPE son cruciales en el proceso de biofloculación que permiten la formación de los agregados microalga-bacteria. Es posible aumentar la producción de SPE a partir de la implementación de operaciones ingenieriles en los HRAP, como la recirculación de la biomasa por medio de un sedimentador, al mantener y reintroducir especies de microalgas filamentosas, lo que permite aumentar la formación de los agregados MABA por medio del aumento de las SPE, aumentar la sedimentabilidad de los MABA y al mismo tiempo mejorar la remoción de materia orgánica, sólidos y nutrientes como el $N-NH_4^+$ del efluente final (Gutiérrez et al., 2016).

Los MABA empleados en el tratamiento de aguas residuales domésticas, se componen en su mayoría de microalgas (*Scenedesmus sp.*, *Stigeoclonium sp.*) y bacterias del filo Bacteroidetes y Proteobacteria (Quijano et al., 2017), y una amplia diversidad de componentes inorgánicos involucrados en la formación de los agregados. Las SPE que participan en la formación y estabilidad de los agregados, están compuestos por macromoléculas como carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y otros compuestos poliméricos se secretan activamente o se generan a partir de la lisis celular (Taobat et al., 2019; Faust, 2014).

Hasta el momento, no se tiene bien establecido el mecanismo por el cual los GRA o de igual manera el material genético, son reciclados en las SPE de los consorcios MABA. En cambio, en lodos activados, Pinjin, et al. (2019) mencionan que los GRA pueden estar asociados a las fracciones de SPE (unidas, fuertemente unidas, o libres, y un pellet ubicado en el núcleo), y por lo tanto tener un mayor grado de libertad de movimiento. De igual manera, hay que destacar la ausencia de publicaciones relacionadas al evaluar la influencia del TRS en la prevalencia de GRA en lodos activados; sin embargo se ha encontrado que al incrementar el TRS aumenta la concentración de GRA en la parte sólida del efluente final (Zhang et al., 2018). Por otro lado, Walston (2013) señala que al aumentar el TRS se seleccionan bacterias susceptibles sobre las bacterias con perfiles de resistencia, mejorando la capacidad de remoción de materia orgánica en el sistema, sin embargo no se descarta la presencia BRA al aumentar el TRS en menor proporción. No obstante, los consorcios microbianos, son muy versátiles y desarrollan estrategias de sobrevivencia rápidamente,

como menciona Hu et al. (2019), donde se encontró que las SPE son capaces de retener antibióticos, de tal manera que las bacterias dentro de la biopelícula no se vean afectadas. De igual manera, Wang et al. (2018) reportó que existe una sobreproducción de SPE en presencia de antibióticos, y en última instancia la unión de los antibióticos a la matriz de SPE, disminuye el efecto sobre la comunidad microbiana.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente el incremento de la prevalencia de los genes y bacterias resistentes a antibióticos, en particular la presencia de GRA β -lactámicos en aguas residuales municipales, es considerado un problema emergente de salud pública tanto para los humanos como para el medio ambiente. Estos GRA favorecen la proliferación de bacterias resistentes a los tratamientos convencionales de antibióticos β -lactámicos, lo que genera cuadros infecciosos más resistentes, sin olvidar las implicaciones económicas que conlleva las estancias hospitalarias (O'Neill, 2016).

En este sentido, se ha señalado que las plantas de tratamiento de aguas residuales, en particular los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales como los sistemas de lodos activados en las PTAR, permiten la transferencia horizontal de GRA entre las comunidades bacterianas encargadas de eliminar la materia orgánica (Rizzo et al., 2013). Al mismo tiempo, estas comunidades contribuyen a la formación de biopelículas, por medio de la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), en donde es posible la transferencia de EGM (como plásmidos) que albergan GRA. De esta manera, la resistencia a los antibióticos β -lactámicos, puede aumentar de manera exponencial con la proliferación de bacterias con perfiles de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) en PTAR, suponiendo una problema de salud pública emergente, debido a que hasta el momento los GRA son denominados contaminantes emergentes que no se encuentran dentro de la normativa mexicana, y por lo tanto su impacto en el medio ambiente y en la salud humana es de reciente preocupación

Los agregados MABA son un complejo sistema simbiótico entre bacterias y microalgas, donde su interacción está mediada por diferentes factores como la carga orgánica, temperatura, irradiancia, pH, TRH y TRS, comunidad microbiana, entre otros. En los sistemas MABA para el tratamiento de aguas residuales, es posible optimizar las eliminaciones de materia orgánica a partir de la implementación de una recirculación de la biomasa (en HRAP); es decir, una configuración de desacoplamiento de TRH y TRS, donde el TRH se encarga de controlar la concentración de nutrientes, mientras que el TRS se encarga de controlar el crecimiento celular (Quijano et al., 2017). En este sentido, es posible obtener mejores producciones de SPE al aumentar el TRS, si bien se ha planteado que las

condiciones de estrés como el déficit de nutrientes disponibles aumenta la producción de SPE y por lo tanto mejora la sedimentabilidad de los agregados microalga-bacteria, también se han reportado que la dinámica de la población microbiana influye en la producción de SPE, en este sentido se ha propuesto que el TRS es un parámetro de gran importancia en la obtención de agregados con mejor sedimentabilidad (Coronado-Apodaca, 2021). Como se ha señalado es posible que los flóculos de lodos activados actúen como hospederos de GRA, permitiéndoles mayor movilidad dentro de los sistemas convencionales y al mismo tiempo protección a las comunidades bacterianas de xenobióticos (Pinjin et al., 2019), de igual manera se puede inferir que este mismo comportamiento pueda ocurrir en los sistemas MABA. En este sentido, se espera una disminución de la concentración de GRA (β -lactámicos) en el sistema MABA mediante la implementación el desacoplamiento del TRH y TRS.

4. HIPÓTESIS

El tiempo de retención de sólidos en el sistema de microalgas-bacterias para el tratamiento de aguas residuales domésticas tendrá una correlación positiva entre la concentración de las sustancias poliméricas extracelulares de los agregados microbianos, lo cual favorecerá la remoción de genes de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, durante el tratamiento de aguas residuales domésticas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto del tiempo de retención de sólidos en la prevalencia de genes de resistencia a los antibióticos (GRA) y la correlación con las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) en sistemas microalga-bacterias (MABA) para el tratamiento de aguas residuales domésticas.

Objetivos Específicos:

1. Determinar la correlación entre la formación y composición de los SPE con el tiempo de retención de sólidos y la prevalencia de GRA en un sistema de MABA para el tratamiento de aguas residuales domésticas.
2. Correlacionar la población microbiana presente (microalgas y bacterias) con la persistencia de los GRA.

6. METODOLOGÍA

6.1 Área de estudio y reactores

El sistema de tratamiento de aguas residuales domésticas con agregados microalga-bacterias que se utilizó se ha descrito anteriormente en Arcila y Buitrón, (2017). El cual consistió en dos lagunas microalgal de alta tasa, reactores tipo “raceway”, hechos de fibra de vidrio con una capacidad total de 80 L (50 L de volumen de trabajo), y un área de superficie de 0.26 m². El nivel de agua en el reactor se mantuvo a una altura de 16 cm y fueron mezclados por una turbina que consta de seis impulsores, a un velocidad de 10 rpm (Cole Parmer, EE.UU.), que genera una velocidad de líquido de 0.2 ms⁻¹.

El sistema se operó a la intemperie, cubierto por un malla de invernadero de nylon, la cual se empleó para disminuir la irradiancia en el sistema como se reporta en previas investigaciones (Arcila y Buitrón, 2017). Los reactores tipo raceways se instalaron en el Laboratorio de Investigación de Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) en el campus UNAM, ubicado en la ciudad de Querétaro, México (20 ° 42 N, 100 ° 26 W), situado a 1900 m sobre el nivel del mar. La operación de reactores tipo “raceway” se realizó de Junio a Noviembre del 2020. Los reactores contaron con un monitoreo de pH, oxígeno disuelto, temperatura e irradiancia, con adquisición de datos en línea con la interface LabQuest Mini (Vernier, Beaverton, EUA).

6.2 Agua residual e inóculo

Durante la operación de los reactores en continuo, se alimentaron con agua residual proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales ubicada en la delegación de Santa Rosa Jauregui, Querétaro, México. Las muestras de agua residual se recolectaron después de un pre-tratamiento de cribado grueso, sedimentación primaria y cribada fina, en bidones de polietileno de 20 L, y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Antes de alimentar los reactores, el agua residual se tamizó (Tyler No. 65, 210 µm) para remover sólidos de gran tamaño, y fue alimentada sin pre-tratamiento adicional.

Previo a la inoculación, los reactores fueron lavados hasta no observar residuos de algas o contaminantes (larvas, pulgas de agua, etc.). El inóculo empleado fue lodo activado obtenido directamente de los tanques de aireación de la planta de tratamiento de aguas residuales Santa Rosa Jauregui. Se agregaron 10 L de licor mezclado como inóculo en cada reactor y se aforaron los reactores a una altura/profundidad de 16 cm empleando efluente secundario proveniente de la misma planta. Para el desarrollo del inóculo, esta mezcla de licor mezclado y efluente secundario se mantuvo en lote por un periodo de 28 días, en donde los lodos activados se enriquecen con microalgas nativas.

6.3 Operación de los reactores “raceway” en continuo

Un esquema global de la estrategia experimental se muestra en la Figura 1.

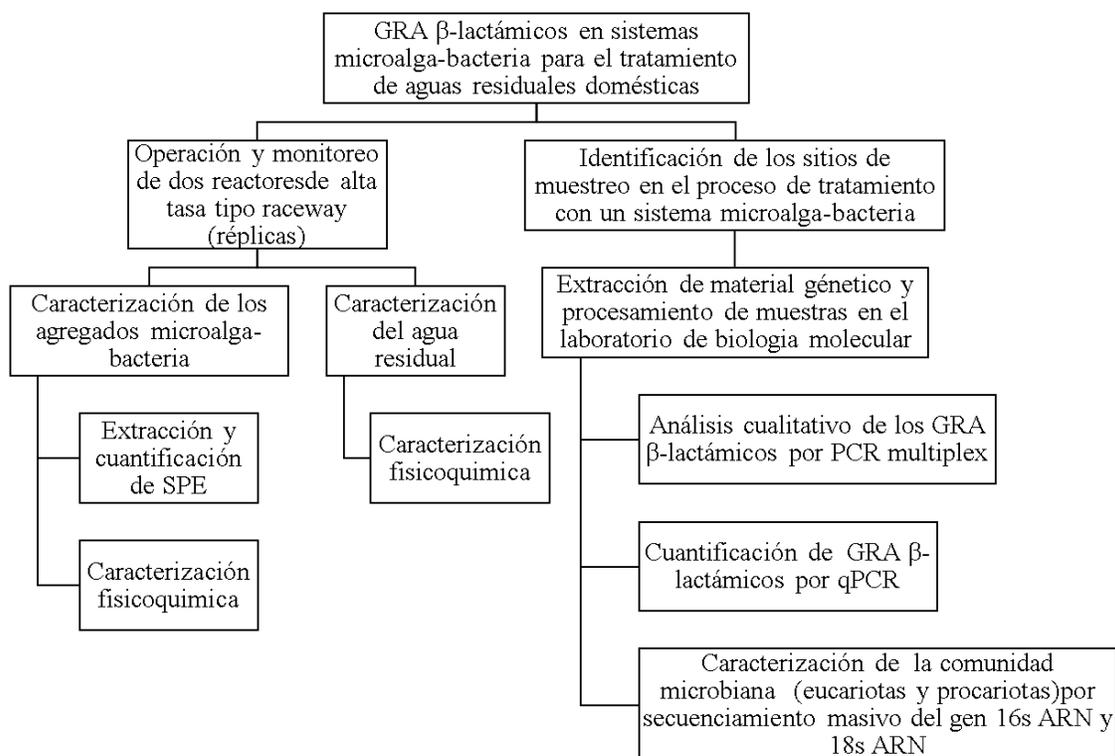


Figura 2. Esquema de la estrategia experimental.

Posterior al desarrollo del inóculo se inició la operación en continuo de los reactores, alimentando agua residual a un TRH de 6 días. El esquema general de uno de los reactores

se muestra en la figura 2. Los dos reactores se operaron como réplica, manteniendo las mismas condiciones operaciones entre ellos a lo largo del tiempo. Se establecieron 3 etapas de operación, evaluando tres diferentes TRS, 12, 7 y 9 días, durante 32 días de duración cada uno, de manera consecutiva. Las condiciones de operación y ambientales se resumen en la Tabla 1. El TRS se controló mediante la recirculación de sólidos al reactor calculada a partir de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el reactor, SSV en el sedimentador, y el TRS de acuerdo con la ecuación 1 (Gutiérrez et al., 2016):

Ecuación 1

$$Q_R = \frac{Q * SSV_{HRAP}}{SSV_S} - \frac{V * SSV_{HRAP}}{TRS * SST_S}$$

Donde, Q_R es el caudal de recirculación de lodo (L/d), Q es caudal del influente (L/d), SSV_{HRAP} son los sólidos suspendidos volátiles dentro del raceway (g/L), SSV_S son los sólidos suspendidos volátiles del sedimentador (fracción sólida, lodo) (g/L), TRS es tiempo de residencia de sólidos establecido o deseado (d) y V es el volumen de operación del raceway (L). La tasa de recirculación se determinó de manera semanal, conforme al contenido de sólidos existentes en el reactor y sedimentador. Para evaluar el desempeño del reactor, de manera semanal se cuantificó la eliminación de nutrientes ($N-NH_4^+$, $P-PO_4^{3-}$) y materia orgánica (DQO) del efluente; así como sólidos (SSV) como medida indirecta del crecimiento de biomasa en los reactores.

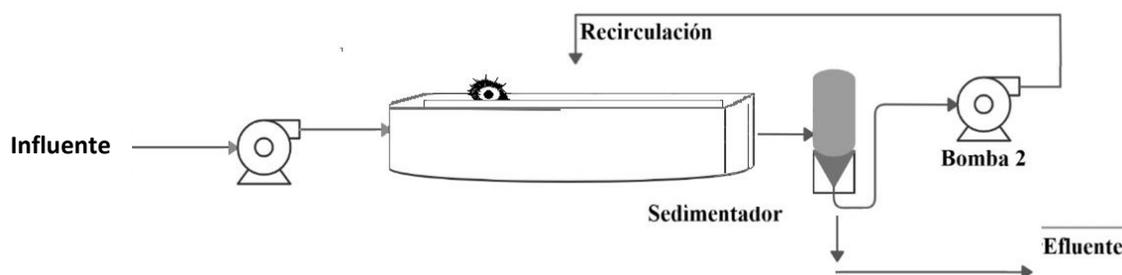


Figura 3. Diagrama general de la laguna microalgal de alta tasa, tipo “raceway”. 1. Entrada, 2. Clarificador, 3. Agua tratada.

Tabla 2. Condiciones de operación la laguna microalgal de alta tasa, tipo “raceway”.

Parámetro	Valor		
Volumen de trabajo (l)	50		
TRH (d)	6		
TRS (d)	12	7	9
Periodo de operación (d)	32	32	32
Agitación (rpm)	10		
Carga orgánica (mgDQO/L ⁻¹ d ⁻¹)	39±19	38±17	40±23
Irradiancia máxima (μmol/m ² s ⁻¹)	580-900		
Temperatura (°C)	12-24		
pH	7-9		

6.3.1 Prevalencia de GRA y comunidades microbianas

Se identificaron tres puntos de muestreo necesarios, influente, agregados MABA y efluente, para identificar la prevalencia de los GRA durante la operación de los reactores raceway, así como la caracterización de la comunidad microbiana y su relación con las SPE (Tabla 2). Adicionalmente, con el fin de identificar la morfología de los agregados MABA y la presencia de posibles depredadores en el sistema, se realizaron observaciones al microscopio de manera semanal.

Tabla 3. Análisis en los diferentes puntos de muestro de los reactores raceway

Puntos de muestreo	Comunidad microbiana		GRA	SPE	Objetivo de los análisis
	Bacterias (gen 16s rADN)	Eucariontes (gen18s rADN)			
Influente	X		X		Analizar los GRA y comunidad bacteriana en el influente.
Agregados MABA	X	X	X	X	Evaluar la dinámica de los GRA del influente a los agregados MABA, y el efecto de las SPE.
Efluente	X	X	X		Evaluar la capacidad de eliminación de GRA del sistema MABA

Los muestreos para analizar GRA, SPE y la comunidad microbiana se realizaron semanalmente, las dos últimas semanas de cada TRS evaluado, en ambos reactores considerados réplicas. La selección de GRA está basado en su importancia clínica y ambiental (Bogaerts et al. 2013; Monstein, et al., 2007) así como por sus características que

permiten la resistencia a las principales familias de antibióticos β -lactámicos; *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaOXA-48*, como se muestra en la tabla 4.

6.4 Cuantificación de GRA y caracterización de comunidades microbianas

La extracción de ADN genómico se realizó con el Kit DNeasy PowerWater (Qiagen, Alemania), de las muestras de agua residual, agregados microalga-bacteria y efluente, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se evaluó la calidad y cantidad de ADN utilizando un espectrofotómetro de luz UV (Nanodrop 2000, Thermofisher).

Tabla 4. Iniciadores utilizados para la amplificación por PCR multiplex.

GRA	Secuencia (5'-3')	Amplicón (bp)	Referencia
<i>blaOXA48</i>			
Forward	ATGCGTGTATTAGCCTTATCG	265	(Bogaerts et al. 2013)
Reverse	CATCCTTAACCACGCCCAAATC		
Programa: 94 °C por 5 min y 30 ciclos (94°C por 30 s, 51°C por 30 s, 72°C por 60 s)			
<i>bla-SHV</i>			
Forward	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	747	(Monstein et al., 2007)
Reverse	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA		
Programa: 94 °C por 5 min y 30 ciclos (94°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 60 s)			
<i>blaCTX-M</i>			
Forward	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	593	(Monstein et al., 2007)
Reverse	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG		
Programa: 94 °C por 5 min y 30 ciclos (94°C por 30 s, 58°C por 30 s, 72°C por 60 s)			

6.4.1 Cuantificación de los genes de resistencia a los antibióticos

Para la detección de los genes *bla-SHV*, *blaCTX-M* y *blaOXA-48* se amplificó un fragmento de los genes por medio de la técnica de PCR multiplex. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μ L que contiene: 0.22 μ L de Platinum Taq pol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US), 2.75 μ L de PCR10x (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US), 2.2 μ L de MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US), 0.5 μ L de dNTP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US), 0.5 μ L de cada iniciador (10 pmol) y 1.5 μ L de ADN genómico.

Posteriormente para la validación de cada GRA amplificado, se realizaron tres ensayos de amplificación de PCR individuales. El tamaño del amplicón correspondiente a cada gen se analizó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%. Posteriormente los amplicones se purificaron con el Kit de purificación de PCR PureLink™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) y se cuantificó con el equipo NANODrop 2000 (Thermo Scientific, USA) para utilizarse como control en la curva de calibración de la qPCR.

Dichos genes se cuantificaron del ADN genómico extraído de las muestra descritas anteriormente (sección 6.3.2), mediante qPCR en el equipo StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando una de reacción mezcla comercial (Power SYBR Green PCR Master Mix, AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) y cebadores específicos (tabla 3). El número de copias genéticas se calculó por el valor C_T y la curva estándar (ecuación 2). Cada muestra se probó por duplicado para cada ensayo.

Ecuación 2

$$\text{Copias por reacción} = \text{Eficiencia}^{(\text{Intercepto} - C_t \text{ experimental})} * \text{Factor dilución}$$

Donde la eficiencia se calcula como el exponente de la eficiencia obtenida a partir de la curva estándar, de igual manera el intercepto se obtiene partir de la curva estándar, mientras que el valor C_T se obtiene a partir del ensayo realizado, mientras que el factor de dilución. El límite de detección (LOD), está definido como la concentración más baja a la que se detecta el 95% de las muestras positivas, en la ecuación 3 se muestra la fórmula que se utilizó.

Ecuación 3

$$\text{LOD} = \frac{3.3 * (\text{Desviación estándar del intercepto de la regresión lineal})}{\text{Pendiente de la regresión lineal}}$$

En donde 3.3 es una constante, la *desviación estándar del intercepto de la regresión lineal* se obtiene a partir del análisis de regresión lineal de la curva estándar de cada GRA analizado, y de igual manera la *pendiente de la regresión lineal* se obtiene al hacer la regresión lineal de la curva estándar del GRA analizado. La curva estándar correspondiente

de cada ensayo de qPCR se consideró efectiva, si presentaba una eficiencia de amplificación entre 83.9% – 105.8% y valores R^2 entre 0.98 - 0.99 (Bustin, et al., 2008).

Los valores de copias por reacción cuantificadas (Ecuación 2), se utilizaron para normalizar los resultados de las copias de GRA por mililitro de influente o efluente, así como por g SSV (ecuaciones 4 y 5).

Ecuación 4

$$\text{Copias por mililitro} = \frac{\frac{\text{copias}}{\text{ml}} * 55}{\text{ml muestra filtrada}}$$

Donde, *copias/ml* son las copias del gen de interés por mililitro, *55 es un factor de conversión*, y *ml de muestra filtrada* son los mililitros de muestra recolectada que fueron filtrados en el kit de extracción para su posterior análisis molecular.

Ecuación 5

$$\text{Copias por mg SSV} = \frac{\frac{\text{copias}}{\text{ml}}}{\frac{\text{SSV (mg/ml)}}{1000}}$$

Donde, *copias/ml* son las copias del gen de interés por mililitro, y *SSV* son los sólidos suspendidos volátiles (mg/ml) correspondientes al día de recolección de muestra para los análisis de biología molecular y análisis fisicoquímicos.

Para calcular los valores de eliminación del gen de interés en el sistema, se utilizó una serie de operaciones que nos permite calcular la magnitud del cambio en el número de células, en otras palabras una escala logarítmica. Esta escala nos permite tomar el valor logarítmico de un número grande, como el número de células o en este caso el número del gen de interés por mililitro y se transforma en uno más pequeño, apropiado para realizar los cálculos necesarios. En este sentido se calcularon las reducciones logarítmicas como la diferencia entre las concentraciones logarítmicas del influente y el efluente.

6.4.2 Caracterización de la comunidad microbiana

El ADN metagenómico de los agregados MABA a las diferentes condiciones evaluadas (sección 6.3.1) se envió al laboratorio de recursos integrados de microbioma (IMR) de la Universidad de Dalhousie (Halifax, Canadá) y se secuenciaron utilizando la plataforma Illumina MiSeq. Las comunidades microbianas se determinaron a partir de la secuenciación del gen 16s ADNr para bacterias y 18s ADNr para microalgas. Las regiones objetivo se amplificaron utilizando los cebadores 28F (GAGTTTGATCNTGGCTCAG) -388R (TGCTGCCTCCCGTAGGAGT) y EukA7F (AACCTGGTTGATCCTGCCAGT) - Euk516R (ACCAGATTGCCCTCC) para 16s y 18s, respectivamente.

6.5 Métodos analíticos

6.5.1. Análisis fisicoquímicos

El análisis de N-NH₄⁺, P-PO₄⁻³ y DQO en el influente y efluente se determinó por los métodos HACH, 8000, 10127 y 10031, respectivamente. Las concentraciones de SST y SSV se determinaron de acuerdo a los métodos estándar (APHA, 2005).

6.5.2 Caracterización de los agregados microalga-bacteria

Los agregados MABA se observaron al microscopio en campo claro (Nikon H550L, Nikon Instruments, Melville, NY. EUA), y se recolectaron evidencias fotográficas (Nikon DS-Ri1, Nikon Instruments, Melville, NY. EUA). La concentración de los SPE en los agregados MABA se calculó como la suma del contenido de proteínas y polisacáridos. Se evaluaron dos tipos de SPE; SPE unidos (SPE-U) y SPE libres (SPE-L) como se muestra en la figura 3. Los SPE-U están firmemente unido a las células, mientras que SPE-L se encuentran débilmente unido a las células o presentes en el medio líquido (Arellano-Badillo et al, 2014). La determinación se realizó de acuerdo a lo reportado por Arellano-Badillo, et al. (2014), como se describe a continuación. Para la determinación de los SPE-L se agregaron 50 ml de una muestra del reactor que contenía los agregados MABA y se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de vidrio GF/A (poro de 1.6 µm). El filtrado se utilizó para medir proteínas libres y polisacáridos. Los pellets obtenidos a partir de centrifugación se diluyeron en una solución salina isotónica (0.9%

NaCl) y se calentaron durante 1 h a 80 °C. A continuación, la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos. Luego, se filtró a través de un filtro de vidrio GF/A, y se midieron la proteína y los polisacáridos de SPE-U. Las proteínas y los polisacáridos se midieron de acuerdo con Lowry et al., (1951), y Dubois et al., (1956), respectivamente.

6.5 Análisis estadísticos

El efecto estadístico de los diferentes TRS a diferentes variables de respuesta (valor- $p < 0.05$) se determinó mediante un análisis de varianza. Inicialmente se realizó una prueba de Bartlett para evaluar la homocedasticidad de los datos (valor- $p < 0.05$) y la prueba de Shapiro Wilks para evaluar la normalidad (valor- $p < 0.05$). De acuerdo a los resultados de los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para datos paramétricos o Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, según correspondió. De igual manera se empleó una prueba de Tukey (HSD), o en su caso un prueba de Dunn para datos no-paramétricos, con la finalidad de evaluar las diferencias significativas (valor- $p < 0.05$). Adicionalmente se calcularon los valores del coeficiente de correlación de Spearman (datos no paramétricos) para evaluar si existían correlaciones estadísticamente significativas (valor- $p < 0.05$) entre las concentraciones totales de GRA y la comunidad microbiana. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando R 3.1.1 (R Core Team, 2014).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Operación del sistema microalga-bacteria

Para el proceso de selección de inóculo y arranque de la operación se adoptó la estrategia reportadas por Arcila y Buitrón (2017), donde se utiliza como inóculo una mezcla de efluente primario y licor mezclado de una planta de tratamiento de aguas residuales. Posteriormente se procedió a operar en lote durante 28 días, de esta manera se permite la estabilización del proceso, logrando la formación de agregados, para continuar la operación en continuo. Se monitoreó la concentración de N-NH_4^+ a partir del día 5 hasta el día 15, ya que se ha observado que la falta de este nutriente esencial detiene el proceso de proliferación de microalgas, en el caso de que se observara una disminución de NH_4^+ (menor a $60 \text{ mg de N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$), se añadió 1 L de una solución stock de 10 g de urea/L a cada reactor (Coronado-Apodaca, 2021).



Figura 4. Fotografía del sistema MABA ubicado en LIPATA, Querétaro.

Después de 28 días de operación en lote, fue posible observar flóculos de coloración verde (figura 4). Al final de este periodo la concentración de biomasa dentro del reactor fue de $379 \pm 65 \text{ mg SSV/L}$, con una concentración residual de $38 \pm 7 \text{ mg/L de N-NH}_4^+$.

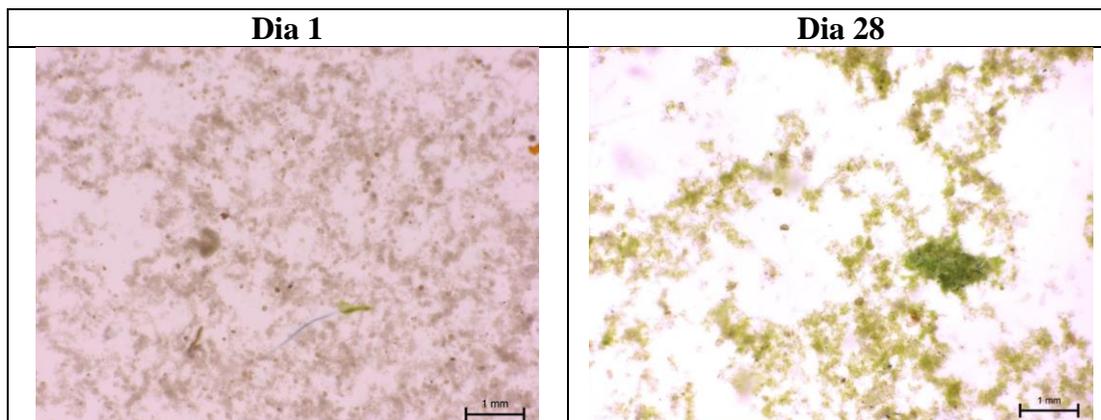


Figura 5. Observaciones en el estereoscopio de una muestra representativa de ambos reactores, en el día 1 que corresponde al arranque de la operación y en el 28, que corresponde al último día de operación en lote.

7.2 Operación en continuo

7.2.1 Características fisicoquímicas del efluente primario

Para la operación en continuo se recolectó semanalmente efluente primario de la planta de tratamiento de agua residual ubicada en Santa Rosa Jauregui. La caracterización promedio del efluente primario utilizado en los diferentes TRS evaluados se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Caracterización fisicoquímica del agua residual.

TRS (d)	DQOs (mg L ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹) 1)	P-PO ₄ ⁻³ (mg L ⁻¹)	pH
12	239 ± 193	41 ± 26	17 ± 13	7.5 ± 0.5
7	512 ± 131	75 ± 2	30 ± 0.3	7.9 ± 0.8
9	368 ± 268	63 ± 18	35 ± 5.0	7.4 ± 0.3

Como se observa en la tabla 5, se utilizó la DQO soluble como parámetro de medición de materia orgánica, como se reporta en Su et al., (2012) para sistemas biológicos con microalgas para el tratamiento de agua residual municipal. De igual manera se monitoreó

semanalmente las concentraciones de N-NH_4^- , P-PO_4^{-3} y el nivel de pH (valor óptimo: 7.5) en estos sistemas, los cuales nos permiten evaluar el desempeño de eliminación de nutrientes.

7.2.2 Monitoreo del desempeño de los reactores: eliminación de cargas orgánicas y nutrientes

7.2.2.1 Eliminación de la DQO y nutrientes

Se obtuvieron eliminaciones promedio de DQOs, N-NH_4^+ y P-PO_4^{-3} de hasta 86%, 99% y 14%, respectivamente; con variaciones dependiendo del TRS evaluado (Tabla 6). El análisis estadístico no mostro una diferencia significativa debido al TRS en la remoción de DQO, ni por el efecto del reactor, lo que corrobora que ambos se comportaron como réplicas (Tabla 7). La remoción de DQO en los sistemas implementados fue 10% menor de los reportado por Arcila y Buitrón, 2017. Esta variación puede deberse a diferente composición del influente o condiciones ambientales.

Tabla 6. Caracterización fisicoquímica del efluente obtenido en los diferentes TRS evaluados en la operación del sistema microalga-bacteria, así como las eliminaciones obtenidas

TRS (d)	Caracterización del efluente				Eliminaciones		
	DQOs (mg L^{-1})	N-NH_4^- (mg L^{-1})	P-PO_4^{-3} (mg L^{-1})	SSV (mg L^{-1})	DQOs (%)	N-NH_4^- (%)	P-PO_4^{-3} (%)
12	48 ± 27	1 ± 0.6	12 ± 52	372 ± 108	78.7 ± 2.85	97.4 ± 1.3	14.6 ± 41.3
7	67 ± 10	9 ± 7	26 ± 5	651 ± 156	86.3 ± 3.9	87.8 ± 9.3	10.4 ± 15.3
9	56 ± 30	0.05 ± 0.1	34 ± 3	687 ± 102	74.4 ± 23.2	99.9 ± 0.1	0.46 ± 14.2

Tabla 7. Valor p del análisis estadístico del efecto de los diferentes TRS sobre los parámetros fisicoquímicos evaluados

Eliminación de parámetros	Shapiro wilks	Bartlett's test	ANOVA	Kruskal-Wallis	Tukey's test	Dunn test
DQOs (%)	0.081	0.002	0.491	N.a.	N.a.	
N-NH_4^- (%)	0.001	$5.7e^{-6}$	N.a.	0.015		9≠7 12=7 12=9
P-PO_4^{-3} (%)	0.216	0.140	0.75	N.a.	N.a.	

N.a., no aplica.

Como se observa en la tabla 8, en general las eliminaciones de nitrógeno son comparables con trabajos anteriores, destacando el trabajo de Arcila y Buitrón, (2017), del cual se adoptaron medidas de control de las condiciones ambientales para mejorar los rendimientos de eliminación de nutrientes.

Tabla 8. Comparación de porcentaje de eliminación de nitrógeno y fósforo en tratamiento de aguas residuales con microalgas.

Configuración	Medio de cultivo	Microalgas y tipo de agregación	Eliminación de nitrógeno (%)	Eliminación de fósforo (%)	Referencia
Reactores en lote (2 L)	Agua residual doméstica	Consorcio dominado por <i>Desmodesmus sp.</i>	84	60	Komolafe et al., 2014
Reactor de alta tasa (12 m³)	Efluente de cultivo pecuario	Agregados microalgas-bacterias	31	64	Van de Hende et al. 2014
Reactor secuencial en lote (4 L)	Agua residual de industria alimenticia	Agregados microalgas-bacterias	58	89	Van de Hende et al. 2014
Reactor de alta tasa (30 L)	Agua residual doméstica	Consorcio dominado por <i>Scenedesmus obliquus</i>	56	83	Rodríguez, 2017
Reactor de alta tasa (50 L)	Agua residual doméstica	Agregados microalgas-bacterias	95	30	Arcila et al., 2017
Fotobioreactor (3 L)	Purines de cerdo	Consorcio dominado por <i>C. minutissim</i> , <i>A. obliquus</i> y <i>Aphanothece sp.</i>	83	91	Posadas et al. 2013
Botellas serológicas de 4 L	Lixiviados y agua residual doméstica	Consorcio dominado por <i>Desmodesmus spp.</i> Y <i>Scenedesmus obliquus</i>	95	40	Hernández-García et al., 2019
Reactor de alta tasa (50 L)	Agua residual doméstica	Agregados microalgas-bacterias	99	14	Este trabajo

De igual manera a partir de Coronado-Apodaca, (2021), se adoptaron la estrategia del desacoplamiento del TRS y TRH con la finalidad de mejorar la formación de los agregados microalga-bacteria por medio de la recuperación de la biomasa del sedimentador secundario.

Respecto a la eliminación de nitrógeno, en procesos aerobios, el amonio puede ser removido de las aguas residuales de tres maneras: asimilación, nitrificación y volatilización a) asimilación: utilización del nitrógeno para procesos celulares (transformación de NH_4^+ a N orgánico), b) nitrificación: llevado a cabo por bacterias autótrofas nitrificantes que transforman en amonio en nitritos y nitratos, los cuales se ven favorecidos por TRH mayores a seis días (Arcila y Buitrón, 2017) y c) volatilización, cuando el pH es superior a 8.5 unidades, ya que el amonio es convertido a amoníaco (gas) y se libera a la atmósfera. En este sentido se obtuvieron porcentajes de eliminación superior al 90% en los tres TRS evaluados (Tabla 5), y al mismo tiempo se realizaron acciones de control y medición de pH con la finalidad de mantener el pH menor a 9, por lo que se atribuye la eliminación del nitrógeno a la vía biológica.

Por otro lado, las microalgas, requieren fósforo, principalmente para la producción de fosfolípidos, ATP y ácidos nucleicos. Las algas asimilan el fósforo como ortofosfato inorgánico, en forma de H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , donde el proceso de absorción es activo, es decir, requiere energía. Por otra parte, las microalgas son capaces de asimilar el fósforo en exceso, dentro de las células en forma de gránulos de polifosfato. Otra vía de remoción de fósforo en los sistemas de microalgas es la abiótica, en donde el aumento del pH debido a la actividad fotosintética causa que el fósforo se precipite con cationes disponibles para formar fosfatos metálicos, donde los fosfatos de calcio son los más comunes (Larsdotter, 2006). Se ha señalado que rendimientos bajo de remoción de fósforo por procesos biológicos está relacionada con la concentración de nitrógeno, siendo a relación N: P 30:1, la óptima para la absorción máxima de nitrógeno y fósforo en cultivos de consorcios microalgales-bacterianos (Su et al., 2011). Sin embargo, la relación de nitrógeno a fósforo fue inferior a 3 en este estudio. Como se observa en la tabla 8, no se observaron valores de pH superiores a 9 en la operación, y por ende, se asume que el fósforo eliminado ocurrió por asimilación en las células microalgales mayoritariamente, es decir en forma muy lenta ocasionado por la

ausencia de microalgas con capacidad para asimilar el fósforo en forma de fosfato, al contrario de la precipitación química que ocurre más rápido. En la última fase de operación, al TRS de 9 d, se observó una disminución en la remoción de fósforo, atribuida a la presencia de contaminación por crustaceos, que pudieron afectar el desempeño del reactor. Sin embargo, este efecto negativo no se observó para la remoción de nitrógeno o la DQO.

En la tabla 9 se resumen los parámetros ambientales de importancia para el cultivo de microalgas en los reactores operados a la intemperie, por lo que estos parámetros estuvieron sujetos a las variaciones de las condiciones ambientales. La temperatura en los reactores osciló entre 14°C y 23°C; en este caso, se ha señalado que la temperatura óptima depende de la especie, sin embargo hay que recordar que los sistemas microalga-bacteria son consorcios mixtos y por lo tanto a condiciones ambientales existe una gran diversidad de microorganismos involucrados en la formación de los agregados. Por otra parte, los niveles de oxígeno disuelto son un indicador de la actividad fotosintética de las microalgas, siendo este rango los valores registrados durante el ciclo día/noche, es decir los valores oscilan entre el valor más bajo registrado (noche) y el valor más alto que corresponde al ciclo de luz. Por último, los valores de irradiancia registrados en la tabla 10 coinciden con los valores reportados en Arcila y Buitrón, (2017), cuando se instaló la malla sombra para reducir los efectos inhibitorios de la exposición de las microalgas altas irradiancias, fenómeno conocido como fotoinhibición.

Tabla 9. Parámetros ambientales monitoreados en los sistemas microalga-bacteria

TRS (d)	Irradiancia máxima ($\mu\text{mol}^2\text{m}^2\text{s}^{-1}$)	Oxígeno disuelto (mg L⁻¹)	pH	Temperatura (°C)
12	899 ± 33	2.8-14.2	-	14-23
7	592 ± 24	3.4-7.4	7.1-7.7	12-23
9	915 ± 240	2.6-7.4	6.9-7.8	10-22

7.3 Caracterización morfológica de los agregados microalga-bacteria

7.3.1 Extracción y cuantificación de SPE

La formación de los agregados microalga-bacteria está correlacionado con diferentes factores; como las características fisicoquímicas del agua residual, la configuración y operación de los reactores, y aspectos medioambientales como la irradiancia (Arcila y Buitrón, 2017; Faust. 2014). Es aceptado que las proteínas son el componente mayoritario en las SPE de biopelículas de lodos activados y otros tipos de biopelículas (Faust. 2014). De acuerdo a Wingender et al. (1999), las SPE se pueden clasificar en SPE solubles y SPE unidos; estos últimos se clasifican en SPE ligeramente unidos y SPE estrechamente unidos (Figura 6). La nomenclatura es muy diversa y difícil de unificar, de modo que, para este experimento se distinguen dos fracciones (unidas y libres) como reportan Arcila y Buitrón (2017) para agregados microalgas-bacterias.

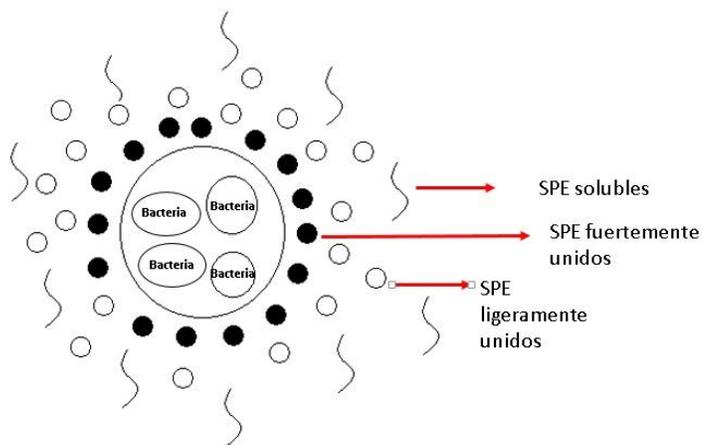


Figura 6. Estructura de las SPE; SPE ligeramente unidos, SPE estrechamente unidos, SPE unidos, SPE solubles. Tomado y adaptado de Wingender, et al., (1999).

7.3.1.1 La fracción unida de las sustancias poliméricas extracelulares

Se ha planteado que los carbohidratos son más susceptibles a desprenderse de los agregados por fuerzas mecánicas resultado de la agitación constante y por esta razón, contribuir al incremento de carbohidratos en las SPE libres. Por el contrario, se ha encontrado que las proteínas de la fracción unida, por su alto contenido de aminoácidos, son de mayor importancia en el proceso de agregación en flóculos de lodos activados, debido a que están

estrechamente relacionados con la formación de enlaces electrostáticos con iones multivalentes como calcio y magnesio, y, por lo tanto, desempeñar un papel más importante en el proceso de biofloculación que los polisacáridos. En algunos casos se ha señalado que el aumento del TRS puede incrementar la concentración de proteínas debido al incremento de la actividad metabólica microbiana (Faust, 2014).

En la tabla 10, se muestran los valores obtenidos la extracción y cuantificación de proteínas y carbohidratos en las diferentes fracciones y TRS. En este sentido, a diferencia de lo reportado por Faust (2014), en este trabajo los menores TRS produjeron la mayor cantidad de SPE y sus diferentes fracciones. El análisis estadístico mostró que el TRS tuvo un efecto significativo en las diferentes fracciones y componentes de las SPE (Tabla 11).

Tabla 10. Valores promedio con su desviación estándar de las proteínas y carbohidratos de los SPE, así como la relación P: C, obtenidas a lo largo de la operación.

TRS (d)	Proteínas (mg gSSV ⁻¹)		Carbohidratos (mg gSSV ⁻¹)		Relación P:C* Unidas
	unidas	libres	unidos	libres	
12	31.0 ± 9.9	15.4 ± 7.6	17.8 ± 2.8	20.1 ± 5.7	1.82
7	48.2 ± 19.3	46.5 ± 14.3	34.6 ± 16.3	33.0 ± 2.7	1.39
9	59.9 ± 21.0	10.1 ± 3.8	32.3 ± 5.6	20.9 ± 1.3	1.85

* P: C, proteínas: carbohidratos. La relación P: C está dada por los valores de Proteínas y Carbohidratos unidos.

Hay que establecer que hasta el momento el efecto del TRS sobre la composición de las SPE en lodos activados requiere más investigación, sin embargo podemos sugerir que la composición de los SPE este regida por la diversidad de la comunidad microbiana y su cambio durante la operación de los reactores. En este sentido se ha sugerido que los SPE son de origen intracelular en condiciones fisiológicas normales y en condiciones de estrés (Delattre, et al., 2016). Por lo tanto es de gran importancia categorizar el efecto de los factores de estrés que promueven la producción de SPE en los sistemas MABA y en última instancia desarrollar estrategias para mejorar los procesos de recuperación de la biomasa de los sistemas MABA.

Tabla 11. Valor p del análisis estadísticos del efecto del TRS sobre la concentración de proteínas y carbohidratos de los SPE

Parámetro (mg gSSV ⁻¹)	Shapiro wilks	Bartlett's test	ANOVA	Kruskal- Wallis	Tukey's test	Dunn test
Proteínas						
Libres	0.001	0.220	N.a.	0.001	N.a.	9≠7 12≠7 12=9 9=7
Unidas	0.015	6.4e ⁻⁶	N.a.	0.001	N.a.	12≠7 12≠9
Carbohidratos						
Libres	0.270	0.518	0.001	N.a.	9=7 12≠7 12=9	N.a.
Unidos	0.001	0.001	N.a.	0.009	N.a.	9=7 12≠7 12=9

N.a., no aplica.

Un factor importante en la caracterización de los SPE es la relación P: C (Tabla 9). Previamente Trebuch et al., (2020) establecieron un rango de 1.2 a 6.9, que indica que al aumentar la concentración de proteínas y por lo tanto la relación P: C, se favorece la disminución de las cargas negativas en la superficie de la célula, y por lo tanto disminuye la repulsión electrostática entre células permitiendo la agregación. En este experimento, la relación P: C se mantuvo entre 1.39-1.85, junto con las observaciones microscópicas se puede concluir que la formación de agregados fue constante a lo largo de la operación de los reactores.

7.4 Cuantificación de GRA por qPCR en los sistemas microalga-bacteria

Las plantas de tratamiento de aguas residuales han sido clasificadas como *hotspots* o vectores de liberación de GRA al ambiente, debido a la presencia de comunidades microbianas y mecanismos intracelulares como respuestas a condiciones de estrés, y concentraciones sub-inhedoras de antibióticos (Rizzo et al., 2013). En la tabla 13 se

resumen los trabajos recopilados de Ashbolt et al., (2018), en particular los valores de eliminación logarítmica de GRA β -lactámicos en sistemas de lodos activados. Para estos GRA, en lodos activados se pueden encontrar eliminaciones logarítmicas de 1-3 orden de magnitud (Tabla 12), mientras que en el tratamiento terciario (cloración y desinfección por UV) se han reportado eliminaciones logarítmicas de 2-5 orden de magnitud (Ashbolt et al., 2018).

Tabla 12. Eliminación logarítmica de GRA β -lactámicos en diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Tipo de tratamiento	Tipo agua residual ^a	Ubicación	GRA	AR (copias/ml)	EF (copias/ml)	Eliminación Log	Referencia
Lodos activados	1 y 2	Italia	blaCTX-M	4.8E+2	<LOQ	≤ 2.68	Di Cesare et al., 2015
Lodos activados	1 y 3	China	blaCTX-M	2.6E+5	1.5E+5	0.23	Wen et al., 2016
Lodos activados y tratamiento químico	1	Italia	blaCTX-M	1.9E+3	N.D.	≤ 3.28	Di Cesare et al., 2015
Lodos activados y tratamiento químico)	1 y 2	Italia	blaCTX-M	4.6E+4	<LOQ	≤ 4.55	Di Cesare et al., 2015
N.R.	N.R.	España	blaCTX-M	2.0E+3	1.58E+2	3.26	Colomer-Lluch et al., 2011
Agregados microalga-bacteria	1	México	blaCTX-M	2.4E+0	3.1E+1	-1.11	Este trabajo
			blaOXA-48	2.1E+0	4.0E-1	1.58	
			blaSHV	6.0E+1	1.0E-1	0.48	

N.R., no reportado. AR, agua residual. EF, efluente. N.D., no detectado. LOQ, por debajo del límite de cuantificación. ^a, 1, doméstica; 2, hospitalaria; 3, industrial.

En este trabajo, los resultados de remoción de GRA β -lactámicos tuvieron un efecto más claro a TRS de 7 y 9 días para los genes blaOXA-48 y blaSHV, con eliminaciones del

97.3% y 67%, respectivamente, no así para el gen blaCTX-M, el cual aumentó en los tres TRS evaluados (Tabla 12). El análisis estadístico mostró que el tratamiento del agua residual comparado con el efluente, tuvo un efecto significativo en los TRS evaluados (Tabla 15). En términos de remoción logarítmica, el sistema MABA alcanzó valores de 1.58 y 0.48, para los genes blaOXA-48 y blaSHV respectivamente en el TRS de 9 días, los cuales son comparables con los sistemas de lodos activados (tabla 12). Diversos trabajos han destacado la dificultad para detectar y cuantificar los GRA β -lactámicos en ambientes acuáticos y en agua residual recibida por PTAR's, así como los biosólidos generados a partir de las aguas residuales, en particular blaCTX-M, blaSHV, blaTEM, hasta el momento no se tiene claro las causas de este comportamiento (Wen et al., 2016).

Tabla 13. Concentración de GRA y porcentaje de eliminación en el sistema microalga-bacteria.

TRS(d)	GRA	AR (copias/ml)	LM (copias/ml)	EF (copias/ml)	% eliminación*
12	blaCTX-M	66.4 \pm 74.7	133.3 \pm 71.9	354.5 \pm 47.3	-433.2
	blaOXA-48	0.002 \pm 0.002	1.6 \pm 2.2	0.0 \pm 0.0	-473.5
	blaSHV	0.2 \pm 0.0	0.9 \pm 0.5	0.6 \pm 0.0	-255.4
7	blaCTX-M	65.6 \pm 19.0	381.2 \pm 124.9	354.5 \pm 47.3	-439.8
	blaOXA-48	0.04 \pm 0.01	0.2 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0001	82.5
	blaSHV	11.5 \pm 14.1	2.7 \pm 2.0	0.6 \pm 0.0	94.4
9	blaCTX-M	2.4 \pm 0.2	402.8 \pm 83.8	31.2 \pm 5.5	-1197.7
	blaOXA-48	2.1 \pm 2.6	0.2 \pm 0.1	0.4 \pm 0.5	97.3
	blaSHV	0.3 \pm 0.0	86.8 \pm 112.5	0.1 \pm 0.0	67.0

AR: agua residual; LM: licor mezclado; EF: efluente. * Valores negativos de eliminación indican un aumento en la concentración del gen en el efluente, comparado con el influente.

En este sentido, para las muestras que mostraron un cuantificación positiva pero por debajo del límite de detección definido por la curva de calibración, el gen analizado se consideró presente pero no cuantificable (Bustin et al., 2009). Para mejorar dicho límite de detección, se recomienda utilizar primers específicos para otras variantes reportadas en la literatura para los GRA β -lactámicos, diferentes a los genes analizados en este trabajo. Hay que recordar los resultados reportados en Pinjin et al., (2019), donde se sugiere que los GRA poseen un cierto grado de movilidad entre los flóculos de lodos activados, en este sentido es posible que los GRA como blaCTX-M y otros de la familia de los β -lactámicos no sean fácilmente detectables y cuantificables, por lo tanto es necesario implementar metodologías

que permitan discernir entre la capacidad de las fracciones de SPE (libres y unidos) para albergar GRA en plásmidos y/o microorganismos en los sistemas MAB en futuras investigaciones.

Tabla 14. Valor p para la concentración de los tres GRA (blaSHV, blaCTX-M, blaOXA-48) en el agua residual y efluente del reactor.

GRA	Shapiro wilks	Bartlett's test	Kruskal-Wallis	Dunn test
blaCTX-M	9.59e ⁻⁵	2.94e ⁻⁷	0.01	AR≠EF
blaOXA-48	3.17e ⁻⁶	0.001	0.03	AR≠EF
blaSHV	4.08e ⁻⁶	1.43e ⁻⁹	0.03	AR≠EF

7.4.1 Influencia de la comunidad microbiana en la eliminación de GRA

Un factor importante en la remoción de GRA es la comunidad microbiana en el sistema de tratamiento de aguas residuales. Como se observa en la figura 6, a pesar de que el filo proteobacterias se mantuvo como el filo dominante durante los tres TRS evaluados, los géneros correspondiente al grupo ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, and *Enterobacter spp.*) fueron desplazados por interacciones alelopáticas como sugiere Dar et al., (2019). Las bacterias patógenas del grupo ESKAPE son microorganismos que han desarrollado fenotipos multidrogo resistentes, distribuidos ampliamente en sectores hospitalarios y PTAR's (Rizzo et al., 2013). Dar et al., (2019) establece que estas bacterias patógenas humanas como *E. Coli* al entrar en contacto con los microalgas, son eliminadas por cuatro posibles mecanismos; competencia por nutrientes, aumento del pH y oxígeno disuelto, producción de toxinas microalgales y por fenómenos físicos. En primer lugar se sugiere una relación con el aumento del pH, el oxígeno disuelto y la irradiancia en un proceso denominado fotooxidación, resultando en la producción de especies reactivas de oxígeno (del inglés, ROS) que al entrar en contacto con las células bacterianas provocan daño a nivel del ADN. Respecto a los fenómenos físicos explica que las bacterias al entrar en contacto con las microalgas pueden unirse en forma de agregados por medio de las SPE, y es gracias a esta proximidad que se puede dar un remoción de bacterias por la producción de ROS (peróxido de hidrógeno) y la secreción de toxinas

(microcistinas) y por lo tanto reducir la presencia de bacterias patógenas. Hasta el momento este comportamiento sigue siendo objeto de debate, sin embargo no se descarta que estos fenómenos estén ocurriendo en los sistemas microalga-bacteria.

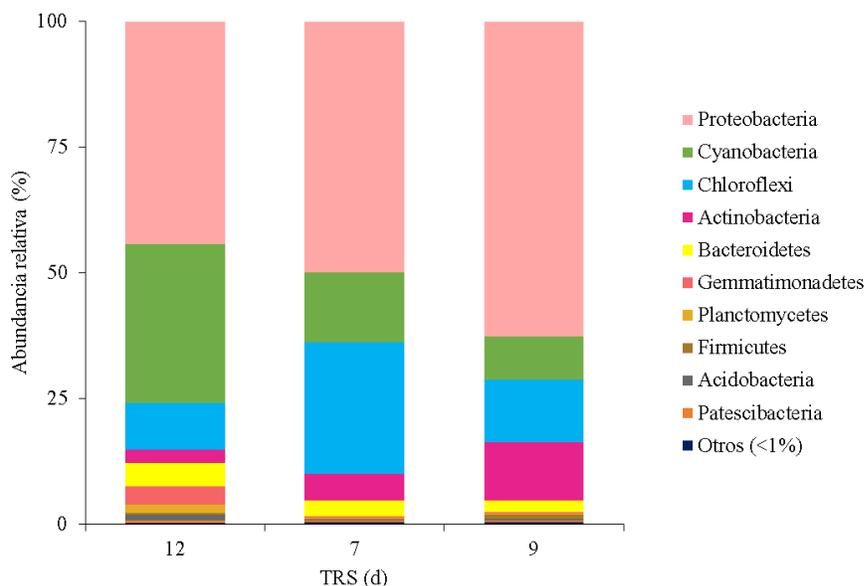


Figura 7. Abundancia relativa de procariotas en el sistema microalga-bacteria durante los tres periodos de operación a nivel filo.

A pesar de que es posible reducir los niveles de bacterias del grupo ESKAPE pertenecientes al filo de las proteobacterias hospederos de GRA en los sistemas microalga-bacteria, recientemente, Zhiyuan et al., (2020), menciona la participación de las cianobacterias como hospederos de GRA, en donde se sugiere que al ser responsables de florecimientos algales en la región de Taihu en China (foco de importantes descargas industriales y domésticas), pueden albergar e incrementar la frecuencia de la transferencia de GRA a través de plásmidos en estos consorcios de microorganismos. Este comportamiento se pudo observar en el presente trabajo, donde un análisis de correlación mostró que la abundancia de cianobacterias tienen una correlación positiva ($p < 0.05$, $r^2 = -0.64$) con la remoción del gen blaOXA-48 (Figura 7). Este comportamiento coincide con la abundancia relativa del filo cianobacterias en los 3 TRS evaluados (figura 7), en donde se puede observar que es en el TRS de 7 días donde se observa una disminución del filo cianobacterias y un

aumento en la remoción del gen blaOXA-48. De esta manera, se puede señalar a las cianobacterias como un potencial hospedero de GRA en los sistemas microalga-bacteria. Recientemente se ha sugerido que es posible una transferencia horizontal de materia genético entre eucariotas y procariotas pero en menor frecuencia, siendo la presencia de cloroplastos (eucariotas fotosintéticos) y mitocondrias (eucariotas heterótrofos) la principal prueba fehaciente de un evento de transferencia de material genético entre reinos. En última instancia esto podría dar respuesta a la presencia de bombas de expulsión de arsénico y enzimas reductoras de mercurio en microalgas, debido a eventos de TGH con procariotas (Zhiyuan et al., 2021; Xiuqi et al., 2021).

De igual manera, se encontró un comportamiento similar positivo con el filo Planctomycetes (figura 7), el cual se ha identificado como un potencial hospedero de GRA en PTAR (Wenjun et al., 2020). Las bacterias del filo Planctomycetes, se caracterizan por ser intrínsecamente resistentes a las antibióticos β -lactámicos y normalmente están distribuidos en diversos ambientes (acuáticos, microbioma humano, ambientes hipersalinos) (Drancourt et al., 2014; Godinho et al., 2019).

7.4.2 Las sustancias poliméricas extracelulares y su potencial para eliminar material genético

Las biopelículas están compuestas de SPE en aproximadamente un 90%, el cual a su vez están compuestos principalmente por proteínas, lípidos, ácidos nucleicos como el ADN extracelular, fosfolípidos, polisacáridos, y otros compuestos orgánicos. Dicha matriz de SPE confiere firmeza mecánica a las biopelículas debido a sus características viscoelásticas (Gebreyohannes et al., 2019). En los sistemas de los lodos activados, las SPE representan entre el 50-90% de la materia orgánica (Pinjin et al., 2019). En los sistemas MABA diversos autores han señalado la influencia del TRH, TRS, pH, intensidad de luz, relación microalga: bacteria y el uso de diferentes bacterias y microalgas en la formación de agregados, demostrando la influencia de estos en la secreción de SPE y por lo tanto en la formación de los MABA (Arcila y Buitrón, 2017; Van de Hende, 2014; Su et al., 2012). Hay que destacar, que se ha señalado que cuando la formación de agregados es llevada a cabo mediante SPE

secretadas por algas, los agregados poseen una pobre estabilidad, por lo que consideran que la clave para la obtención de flóculos con mejor estabilidad, mayor velocidad de sedimentación y una eficiente degradación de nutrientes, es la presencia de SPE bacterianas (Quijano et al., 2017).

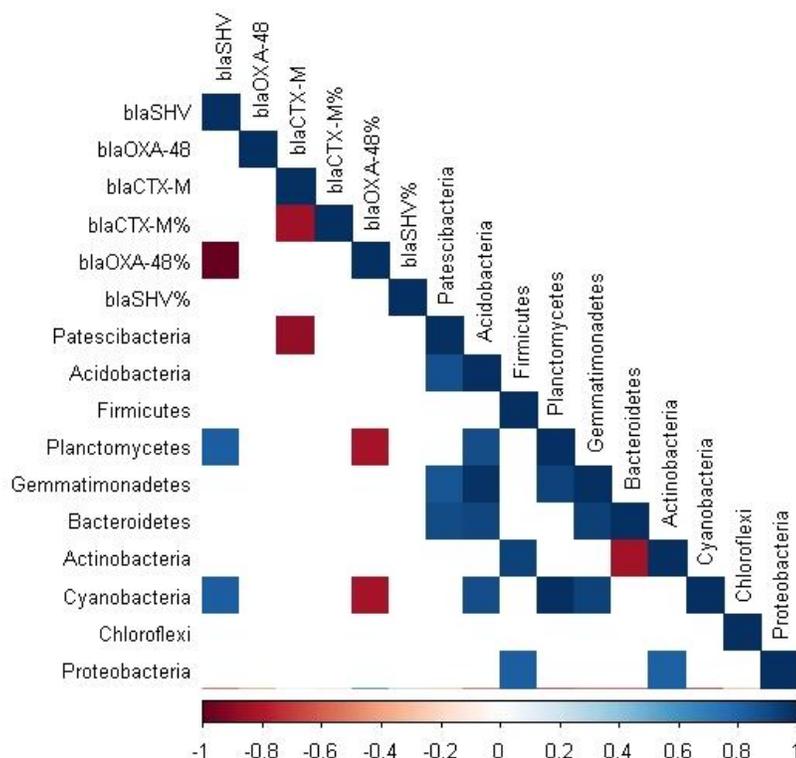


Figura 8. Matriz de correlación entre los GRA cuantificados y la comunidad microbiana. Los colores rojo y azul indican una correlación negativa y positiva significativa ($p < 0.05$), respectivamente. BlaCTX-M, blaOXA-48, blaSHV corresponden a los valores de concentración de los genes en el reactor (copias/mL). BlaCTX-M%, blaOXA-48%, blaSHV% corresponden a los valores del porcentaje de eliminación.

De acuerdo a Cai, (2020), las Proteobacterias son el filo dominante en flóculos de lodos activados, siendo las β -Proteobacterias la clase más abundante, por su papel preponderante en la producción de SPE, así como en la degradación de la materia orgánica en los flóculos, también se ha reportado la presencia de los filos α , γ , δ -Proteobacterias, Actinobacterias, Bacteroidetes, Firmicutes, Chloroflexi pero en menor abundancia. En este experimento, aunque el filo Proteobacteria fue el más abundante en los TRS evaluados

(Figura 7), su participación en la producción de SPE no fue claro, resultando en una correlación negativa con la concentración de proteínas y carbohidratos unidos (figura 9).

Se ha reportado que TRS largos promueven una mejor sedimentabilidad de la biomasa (Park et al., 2011), debido a un aumento en el dominio y el tamaño de algas de fácil sedimentación. Durante su investigación ellos observaron que el aumentar el TRS mediante la recirculación de biomasa se lograba una mayor abundancia de *Pediastrum sp.*, dicho comportamiento fue posible observarlo en los sistemas MABA (figura 10).

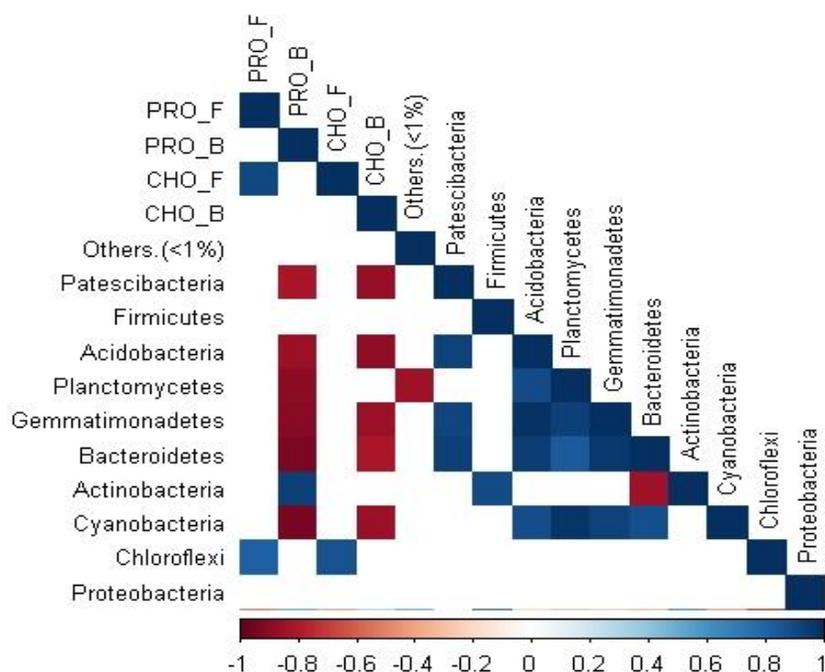


Figura 9. Matriz de correlación entre las SPE y la comunidad microbiana a nivel de filo. Los colores rojo y azul indican una correlación negativa y positiva significativa ($p < 0.05$), respectivamente. PRO, proteínas; CHO, carbohidratos; B, unidos; F, libres.

Se ha señalado que las SPE son parte crucial en la formación de vínculos sociomicrobiológicos, es decir, una asociación simbiótica entre los plásmidos y la formación de las biopelículas con cualidades sinérgicas, capaces de conferir nuevos rasgos a sus hospederos (la transferencia y adquisición de material genético y en última instancia, la resistencia a los antibióticos) y al mismo tiempo formar nuevas estructuras de transferencia de información genética (Madsen et al., 2012; Baharoglu y Mazel, 2012). En este sentido, se

puede sugerir que las SPE pueden actuar como hospederos de material genético (ej. GRA) en los agregados microalga-bacteria. Hay que recordar que uno de los componentes principales de las biopelículas son los ácidos nucleicos, y es que diversos experimentos demuestran que la aplicación de DNasas pueden disgregar las biopelículas y por lo tanto contribuir al desarrollo de estrategias anti-películas en enfermedades humanas (Okshevsky y Louise-Meyer, 2013).

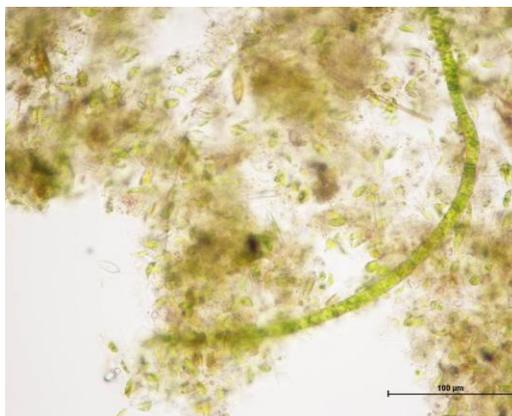


Figura 10. Fotografía obtenida en el microscopio óptico con el aumento 100x (Nikon H550L (Nikon Instruments, Melville, NY. USA), donde se observa una microalga filamentosa (*Pediastrum sp.*), en el día 65 de operación.

Como se observa en la figura 11, se encontró una correlación negativa entre la concentración del gen blaOXA-48 en el reactor y las proteínas y carbohidratos de la fracción unida de las SPE en el reactor (valor $p < 0.05$, $r^2 = -0.62$). Los GRA asociados a la resistencia de antibióticos de la familia de los β -lactámicos, están caracterizados por estar alojados en plásmidos (Cantón, 2008), los cuales están relacionados con la formación de biopelículas (Madsen et al., 2012). Si bien, estos resultados no muestran una relación con la capacidad de los sistemas microalga-bacteria para eliminar GRA, sino al contrario es posible que puede estar ocurriendo este mecanismo de retroalimentación positiva entre los plásmidos y las biopelículas, y por lo tanto promueva la conservación y transferencia de material genético (GRA).

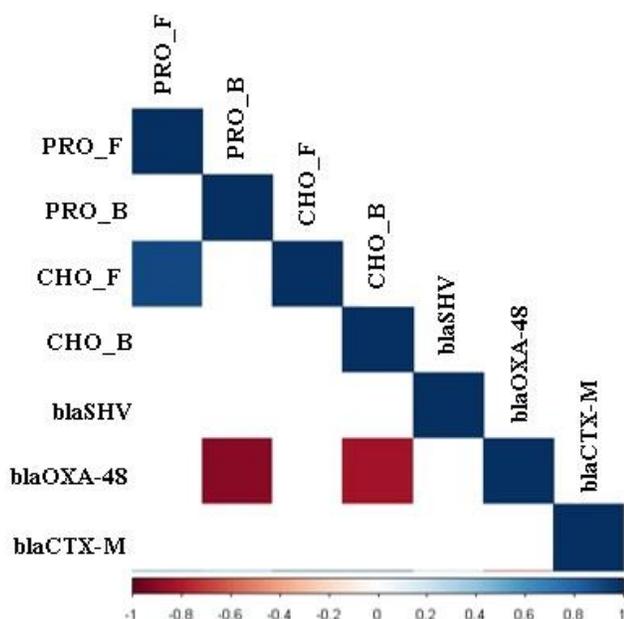


Figura 11. Matriz de correlación entre las SPE y los GRA en el reactor. Los colores rojo y azul indican una correlación negativa y positiva significativa ($p < 0.05$), respectivamente. PRO, proteínas; CHO, carbohidratos; B, unidos; F, libres.

En sistemas de lodos activados, se ha reportado que el ADN extracelular puede encontrarse entre 4.0- 5.2 mg/g-SSV en PTAR's (Pinjin et al., 2019), junto con los plásmidos (Rizzo et al., 2013), son de gran relevancia en la transferencia de GRA por medio de mecanismos como la transformación y conjugación, respectivamente. El ADN extracelular puede ser liberado activamente por células bacterianas por vías aún desconocidas que participan en la formación de las biopelículas, o por medio de la lisis celular por las condiciones de estrés (ej. pH, temperatura, presencia de xenobióticos), que permiten la activación del estado de competencia, responsable de la asimilación de ADNe.

También se ha reportado que es posible encontrar β -lactamasas, participando activamente en la degradación de antibióticos en las biopelículas (Høiby et al., 2010), junto con la con la participación de los plásmidos en la formación de biopelículas (Madsen et al., 2012), plantean una red de actividades aun no caracterizadas completamente, que permiten a los microorganismos adaptarse rápidamente a las condiciones de estrés.

8. Conclusiones

En los sistemas microalga-bacteria, la eliminación de los genes de resistencia a los antibióticos β -lactámicos fue diferencial dependiendo del gen evaluado, y el tiempo de retención de sólidos. En todas las condiciones evaluadas el gen blaCTX-M aumentó su concentración en el efluente; mientras que los genes blaOXA-48 y blaSHV fueron eliminados en un 67 a 97%, respectivamente. La caracterización de la comunidad microbiana sugiere un efecto de las Cianobacterias y Planctomycetes en la eliminación del gen blaOXA-48, debido a una correlación positiva de la abundancia de estos grupos taxonómicos con la eliminación del gen ($p < 0.05$). Esto sugiere el rol de estas bacterias como hospederos de genes de resistencia a los antibióticos. Respecto a bacterias no fotosintéticas, el filo Proteobacteria fue el más abundante pero su participación en la producción de sustancias poliméricas extracelulares no fue significativa, a diferencia de los filos Chloroflexi y Actinobacteria.

Al contrario de lo que ocurre con la comunidad microbiana, se encontró una correlación negativa entre la concentración del gen blaOXA-48 dentro del reactor y las proteínas y carbohidratos de la fracción unida de las sustancias poliméricas extracelulares de los agregados microalga-bacteria (valor $p < 0.05$, $r^2 = -0.62$). Lo anterior sugiere que existen otros mecanismos aún no establecidos que ocurren dentro de la matriz de SPE que promueven la conservación de material genético como GRA.

A pesar de que el filo proteobacterias fue dominante durante los tres TRS evaluados, los géneros correspondiente al grupo *ESKAPE* (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, and *Enterobacter spp.*) fueron desplazados posiblemente por interacciones alelopáticas, lo que sugiere la baja presencia de bacterias resistentes a antibióticos en el efluente.

Este trabajo demuestra que controlar el tiempo de retención de sólidos entre valores de 7 y 9 d en sistemas de microalgas bacterias, es una estrategia operacional potencial para remover genes de resistencia a antibióticos durante el tratamiento de aguas residuales domésticas.

9. Recomendaciones finales

En México, el tema de los contaminantes emergentes es de reciente preocupación, en particular la presencia de GRA. Existen pocos trabajos respecto la presencia de GRA en diversos nichos ambientales (Lueneberg Rodríguez, 2013; Rosas, et al., 2011). Considerando esta oportunidad de investigación, se sugiere considerar los siguientes:

1. Los contaminantes emergentes y la ausencia de legislación: Junto con el descubrimiento de nuevos xenobióticos de importancia en materia de salud pública (ej. GRA), y la ausencia de armonización de parámetros necesarios que permitan dar luz a la presencia y propagación de GRA. Es deseable la implementación del monitoreo de GRA por técnicas de biología molecular (qPCR, Resistoma) y herramientas de bioinformática en PTAR's, para el desarrollo de estrategias ingenieriles, que permita la operación de PTAR's con la finalidad de eliminar la presencia de GRA (Larsson, et al., 2018).
2. La estrategia ONE HEALTH y su integración a futuras líneas de investigación: De acuerdo a ONE HEALTH (“una salud”); para diseñar e implementar programas, políticas, legislaciones e investigación con mejores resultados en materia de salud pública, es necesario reconocer e integrar los múltiples sectores (Sector Hospitalario, Seguridad alimentaria, Control de enfermedades zoonóticas, Gestión Ambiental, Resistencia antimicrobiana) que integran la red de control y monitoreo de salud pública de las naciones. De esta forma es necesario integrar en las siguientes investigaciones un enfoque multidisciplinario con el fin de establecer nuevos vínculos que permitan implementar estas recomendaciones de la estrategia “ONE HEALTH” (WHO, 2015).
3. La persistencia de GRA en agregados MABA sugiere la necesidad de adoptar estrategias complementarias para su mitigación, como por ejemplo la digestión anaerobia de dichos agregados (Youngquist, et al., 2016).
4. El ADN es un componente principal en la formación de las biopelículas, destacando el papel del ADN extracelular, y su papel en los mecanismos de transferencia horizontal genética; como por ejemplo la importancia de los plásmidos. Es deseable establecer protocolos para la identificación y cuantificación del ADN extracelular, permitiendo vislumbrar su participación en la transferencia de GRA en matrices complejas como PTAR's y MABA (Zainon, et al., 2021).

10. Referencias bibliográficas

- Alexander, J., Bollmann, A., Seitz, W., Schwartz, T., 2015. Microbiological characterization of aquatic microbiomes targeting taxonomical marker genes and antibiotic resistance genes of opportunistic bacteria. *Sci. Total Environ.* 512–513, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.046>.
- Amador, P.P., Fernandes, R.M., Prudencio, M.C., Barreto, M.P., Duarte, I.M., 2015. Antibiotic resistance in wastewater: occurrence and fate of Enterobacteriaceae producers of class A and class C β -lactamases. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 50 (1), 26–39. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.964602>
- APHA. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (21 ed.). Washington DC: American Public Health Association.
- Arcila, J.S., Buitrón, G., 2017. Influence of solar irradiance levels on the formation of microalgae-bacteria aggregates for municipal wastewater treatment. *Algal Research.* 27,190-197.
- Arellano-Badillo, M., Moreno-Andrade, I., Buitrón, G., 2014. Effect of the Organic Matter to Ammonia Ratio on Aerobic Granulation during 4-Chlorophenol Degradation in a Sequencing Batch Reactor, *Clean Soil Air Water.* 20, 428-433.
- Ashbolt, N., Pruden, A., Miller, J., Riquelme, M.V. and Maile-Moskowitz, A. 2018. Antimicrobial Resistance: Fecal Sanitation Strategies for Combatting a Global Public Health Threat. In: J.B. Rose y B. Jiménez-Cisneros, (eds) *Global Water Pathogen Project*.
- Baharoglu, Zeynep & Mazel, Didier. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS microbiology reviews.* 38. [10.1111/1574-6976.12077](https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077).
- Baquero, F., Alvarez-Ortega, C., & Martinez, J. L. (2009). Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environmental Microbiology Reports*, 1(6), 469–476. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00053.x>
- Bengtsson-Palme, J., Hammarén, R., Pal, C., Östman, M., Björleinius, B., Flach, C.F., Fick, J., Kristiansson, E., Tysklind, M., Larsson, D.G.J., 2016. Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics. *Sci. Total Environ.* 572, 697–712. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.228>.
- Bengtsson-Palme, Johan & Kristiansson, Erik & Larsson, Joakim. (2017). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews.* 42. [10.1093/femsre/fux053](https://doi.org/10.1093/femsre/fux053).
- Biswal, B.K., Mazza, A., Masson, L., Gehr, R., Frigon, D., 2014. Impact of wastewater treatment processes on antimicrobial resistance genes and their co-occurrence with

- virulence genes in *Escherichia coli*. *Water Res.* 50, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.11.047>.
- Bogaerts, Pierre & Rezende de Castro, Roberta & De Mendonça, Ricardo & Huang, Te-Din & Denis, Olivier & Glupczynski, Y. (2013). Validation of carbapenemase and extended-spectrum -lactamase multiplex endpoint PCR assays according to ISO 15189. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 68. 10.1093/jac/dkt065.
- Bustin, Stephen & Benes, Vladimir & Garson, Jeremy & Hellemans, Jan & Huggett, Jim & Mueller, Reinhold & Nolan, Tania & Shipley, Gregory & Vandesompele, Jo & Wittwer, Carl. (2010). *The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. CHINESE VERSION.* *Overseas Laboratory Medicine.* 3. 15-24.
- Cantón, Rafael. (2008). Epidemiology and Evolution of Beta-Lactamases. In: F. Baquero, C. Nombela, G. H. Cassell, and J. A. Gutiérrez (eds). *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens.*
- Carrillo-Reyes, Julian & Buitrón, Germán & Arcila, Juan Sebastian & López-Gómez, Matías. (2021). Thermophilic biogas production from microalgae-bacteria aggregates: biogas yield, community variation and energy balance. *Chemosphere.* 275. 129898. [10.1016/j.chemosphere.2021.129898](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129898).
- Cai Y-M (2020) Non-surface Attached Bacterial Aggregates:A Ubiquitous Third Lifestyle. *Front. Microbiol.* 11:557035. doi: 10.3389/fmicb.2020.557035
- CDC. *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019.* Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
- Che, You & Xia, Yu & Liu, Lei & Li, Andong & Yang, Yu & Zhang, Tong. (2019). Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing. *Microbiome.* 7. 10.1186/s40168-019-0663-0.
- Colomer Lluçh, Marta & Jofre, Juan & Muniesa, Maite. (2011). Colomer-Lluçh M, Jofre J, Muniesa M.. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* 6: e17549. *PloS one.* 6. e17549. [10.1371/journal.pone.0017549](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017549).
- Coronado-Apodaca, Karina G. (2021). Tratamiento de aguas residuales mediante sistemas microalga-bacteria. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Courvalin, Patrice. (2016). Why is antibiotic resistance a deadly emerging disease?. *Clinical Microbiology and Infection.* 22. 10.1016/j.cmi.2016.01.012.

- Cundliffe, Eric & Demain, Arnold. (2010). Avoidance of suicide in antibiotic-producing microbes. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 37. 643-72. 10.1007/s10295-010-0721-x.
- Dar, Rouf & Sharma, Nishu & Kaur, Karamjeet & Phutela, Urmila. (2019). Feasibility of Microalgal Technologies in Pathogen Removal from Wastewater. 10.1007/978-3-030-13913-1_12.
- Davies, Julian. (2006). Are antibiotics naturally antibiotics?. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 33. 496-9. 10.1007/s10295-006-0112-5.
- Davies, Julian & Davies, Dorothy. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 74. 417-33. 10.1128/MMBR.00016-10.
- Delattre, Cédric & Pierre, Guillaume & Laroche, Céline & Michaud, Philippe. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*. 34. 10.1016/j.biotechadv.2016.08.001.
- Di Cesare, Andrea & Eckert, Ester & D'Urso, Silvia & Bertoni, Roberto & Gillan, David & Ruddy, Wattiez & Corno, Gianluca. (2016). Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Research*. 94. 10.1016/j.watres.2016.02.049.
- Drancourt, M & Prebet, Thomas & Aghnatiou, R & Sophie, Edouard & Cayrou, Caroline & Henry, M & Blaise, D & Raoult, D. (2014). Planctomycetes DNA in Febrile Aplastic Patients with Leukemia, Rash, Diarrhea, and Micronodular Pneumonia. *Journal of clinical microbiology*. 52. 10.1128/JCM.01207-14.
- Dresler, Anahi & Vázquez Vélez, Edna & Treviño, Sandra & Wirtz, Veronika. (2012). Regulation of antibiotic sales in Mexico: An analysis of printed media coverage and stakeholder participation. *BMC public health*. 12. 1051. 10.1186/1471-2458-12-1051.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*. 28, 350-356.
- Faust, Lena. (2014). Bioflocculation of Wastewater Organic Matter at Short Retention Times. (PhD thesis). Wageningen University, Wageningen, NL.
- Founou, Luria Leslie & Founou Zangue, Raspail Carrel & Essack, Sabiha. (2016). Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology*. 7. 10.3389/fmicb.2016.01881.
- Galvin, S., Boyle, F., Hickey, P., Vellinga, A., Morris, D., Cormican, M., 2010. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent

- from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4772–4779. <https://doi.org/10.1128/AEM.02898-09>.
- Gebreyohannes, Gebreselema & Nyerere, Andrew & Bii, Christine & Sbhatu, Desta. (2019). Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon.* 5. e02192. 10.1016/j.heliyon. 2019.e02192.
- Gillings, Michael & Gaze, William & Pruden, Amy & Smalla, Kornelia & Tiedje, James. (2014). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME journal.* 9. 10.1038/ismej.2014.226.
- Godinho, Ofélia & Calisto, Rita & Øvreås, Lise & Quinteira, Sandra & Lage, Olga. (2019). Antibiotic susceptibility of marine Planctomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek.* 112. 10.1007/s10482-019-01259-7.
- Guo, J., Li, J.-W., Shen, Z.-Q., Jin, M., Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant, *Water Research* (2018), doi: 10.1016/j.watres.2018.02.036.
- Gutierrez, R.; Ferrer, I.; González-Molina, A.; Garcia, J.; Uggetti, E.. Microalgae recycling improves biomass recovery from wastewater treatment high rate algal ponds. *Water research* 106, 539-549
- Hernandez, Andrea & Velasquez, Sharon & Novelo, Eberto & Yañez, Isaura & Monje, Ignacio & Ledesma, M.T.. (2019). Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 174. 435-444. 10.1016/j.ecoenv.2019.02.052.
- Hu, X., Kang, F., Yang, B., Zhang, W., Qin, C., & Gao, Y. (2019). Extracellular polymeric substances acting as a permeable barrier hinder the lateral transfer of antibiotic resistance genes. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00736>
- Karkman, Antti & Do, Thuy & Walsh, Fiona & Virta, Marko. (2017). Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology.* 26. 10.1016/j.tim.2017.09.005.
- Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part II. 2009 *Chemosphere*; 75:435–41.
- Komolafe, Oladapo, Sharon B. Velasquez Orta, Ignacio Monje-Ramirez, Isaura Yañez Noguez, Adam P. Harvey, and Maria T. Orta Ledesma. 2014. “Biodiesel Production from Indigenous Microalgae Grown in Wastewater.” *Bioresource Technology* 154. Elsevier Ltd:297–304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.048>.

- Lamas, Alexandre & Franco, Carlos & Regal, Patricia & Miranda, Jose & Vazquez, Beatriz & Cepeda, Alberto. (2016). High-Throughput Platforms in Real-Time PCR and Applications. 10.5772/65760.
- Larsdotter, Karin. (2006). Microalgae for phosphorus removal from wastewater in a Nordic climate. A doctoral thesis from the School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.
- Larsson, Joakim & Andreumont, Antoine & Bengtsson-Palme, Johan & Brandt, Kristian & de Roda Husman, Ana Maria & Fagerstedt, Patriq & Fick, Jerker & Flach, Carl-Fredrik & Gaze, William & Kuroda, Makoto & Kvint, Kristian & Laxminarayan, Ramanan & Manaia, Celia & Nielsen, Kaare & Plant, Laura & Ploy, Marie-Cécile & Segovia, Carlos & Simonet, Pascal & Smalla, Kornelia & Wernersson, Ann-Sofie. (2018). Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environment international*. 117. 10.1016/j.envint.2018.04.041.
- Llor, Carl & Bjerrum, Lars. (2014). Antimicrobial resistance: Risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Therapeutic advances in drug safety*. 5. 229-241. 10.1177/2042098614554919.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *JBiolChem*. 193, 265-275.
- Lueneberg Rodríguez, Kathia Constance. (2013). Efecto del riego con agua residual y de la acumulación de antibióticos en la dispersión de genes de resistencia en diferentes micrombientes del suelo (Maestra en ciencias biológicas). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lurling, M., 2003. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Ann. Limnol.-Int. J. Limnol.* 39,85-101. doi:10.1051/limn/2003014
- Maddela Naga Raju, Sheng Binbin, Shasha Yuan, Zhongbo Zhou, Ronald Villamar-Torres, Fangang Meng, Roles of quorum sensing in biological wastewater treatment: A critical review, *Chemosphere* (2019), doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.064
- Madsen, Jonas & Burmølle, Mette & Hansen, Lars & Sørensen, Søren. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS immunology and medical microbiology*. 65. 183-95. 10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x.
- Manaia, Célia & Rocha, Jaqueline & Scaccia, Nazareno & Marano, Roberto & Elena, Radu & Biancullo, Francesco & Cerqueira, Francisco & Fortunato, Gianuario & C. Iakovides, Iakovos & Zammit, Ian & Kampouris, Ioannis & Vaz-Moreira, Ivone &

- Nunes, Olga. (2018). Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment international*. 115. 312-324. [10.1016/j.envint.2018.03.044](https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.044).
- Marti, E., Jofre, J., Balcazar, J.L., 2013. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PLoS One* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078906>.
- Monstein, Hans-Jürg & Östholm Balkhed, Åse & Nilsson, M.V. & Dornbusch, K & Nilsson, Lennart. (2008). Multiplex PCR amplification assay for the detection of bla SHV, bla TEM and bla CTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 115. 1400-8. [10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x).
- Nagler, Magdalena & Insam, Heribert & Pietramellara, Giacomo & Ascher-Jenull, Judith. (2018). Extracellular DNA in natural environments: features, relevance and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102. [10.1007/s00253-018-9120-4](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9120-4).
- K.D., Huang, Y.N., Ragush, C.M., Yost, C.K., Jamieson, R.C., Truelstrup Hansen, L., 2017. Antibiotic resistance genes in municipal wastewater treatment systems and receiving waters in Arctic Canada. *Sci. Total Environ*. 598, 1085–1094. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.151>.
- Niels Høiby, Thomas Bjarnsholt, Michael Givskov, Søren Molin, Oana Ciofu. Antibiotic resistance of bacterial biofilms, a critical review. (2010). *International Journal of Antimicrobial Agents* 35 (2010) 322–332.
- O'Neill, J. (2016) Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Review on Antimicrobial Resistance. Wellcome Trust and HM Government.
- Okshevsky, Mira & Meyer, Rikke. (2013). The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical reviews in microbiology*. 41. [10.3109/1040841X.2013.841639](https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.841639).
- Petrovich, Morgan & Rosenthal, Alex & Griffin, James & Wells, George. (2018). Spatially Resolved Abundances of Antibiotic Resistance Genes and intI1 in Wastewater Treatment Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*. 116. [10.1002/bit.26887](https://doi.org/10.1002/bit.26887).
- Pinjing He, Yizhou Zhou, Liming Shao, Jinghua Huang, Zhan Yang, Fan Lü. (2019). The discrepant mobility of antibiotic resistant genes: Evidence from their spatial distribution in sewage sludge flocs. *Science of the Total Environment* 697.
- Ponce de León, S. et. al. Programa Universitario de Investigación en Salud. Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y Consumo de antibióticos. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Agosto 2018

- Posadas Esther, David Marín, Saúl Blanco, Raquel Lebrero, Raúl Muñoz. 2017. Simultaneous Biogas upgrading and centrate treatment in an outdoors pilot scale high rate algal pond. *Bioresource Technology* 232. Elsevier. Ltd: 133-41.
- Quijano, Guillermo, Arcila, Juan Sebastian & Buitrón, Germán. (2017). Microalgal-bacterial aggregates: Applications and perspectives for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*. 35. 10.1016/j.biotechadv.2017.07.003.
- Rebelo, Ana-Rita, Bortolaia, Valeria, Kjeldgaard, Jette, Pedersen, Susanne, Pimlapas Leekitcharoenphon, et al.. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, European Centre for Disease Prevention and Control, 2018, 23 (6), pp.1-11. (10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672). (anses-01707901)
- Rizzo, Luigi & Manai, C.M. & Merlin, Christophe & Schwartz, Thomas & Dagot, C & Ploy, Marie-Cecile & Michael, I & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban Wastewater Treatment Plants as Hotspots for Antibiotic Resistant Bacteria and Genes Spread into the Environment: A Review. *The Science of the total environment*. 447C. 345-360. 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.
- Rosas, Irma & Salinas, Eva & Martínez, Leticia & Cruz Córdova, Ariadna & González-Pedrajo, Bertha & Espinosa, Norma & Amábile-Cuevas, Carlos. (2015). Characterization of *Escherichia coli* Isolates from an Urban Lake Receiving Water from a Wastewater Treatment Plant in Mexico City: Fecal Pollution and Antibiotic Resistance. *Current microbiology*. 71. 10.1007/s00284-015-0877-8.
- Rodríguez Muñoz, Verónica. (2017). Tratamiento de agua residual y lixiviado mediante el cultivo de microalgas en un reactor de alta tasa. UNAM
- Sharma, Virender & Johnson, Natalie & Cizmas, Leslie & McDonald, Thomas & Kim, Hyunook. (2016). A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere*. 150. 10.1016/j.chemosphere.2015.12.084.
- Shulian Wang, Bin Ji, Meng Zhang, Yingqun Ma, Jun Gu, Yu Liu. (2020). Defensive responses of microalgal-bacterial granules to tetracycline in municipal wastewater treatment. *Bioresource Technology* 312.
- Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., & Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: A critical review. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 700–710. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1232>

- Su, Yanyan & Mennerich, Artur. (2011). Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water research*. 45. 3351-8. 10.1016/j.watres.2011.03.046.
- Su, Yanyan & Mennerich, Artur. (2012). Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios. *Bioresource technology*. 105. 67-73. 10.1016/j.biortech.2011.11.113.
- Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K.H., Gutzkow, T., Eichler, W., Puhler, A., Schlüter, A., 2009. Detection of 140 clinically relevant antibiotic- resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology* 155, 2306–2319. <https://doi.org/10.1099/mic.0.028233-0>.
- Taobat Adekilekun, Jimoh & Olajide, Keshinro & Cowan, Ashton. (2019). Microalgal–Bacterial Flocs and Extracellular Polymeric Substances: Two Essential and Valuable Products of Integrated Algal Pond Systems. *Water, Air, & Soil Pollution*. 230. 10.1007/s11270-019-4148-3.
- Trebuch, Lukas & Oyserman, Ben & Janssen, Marcel & Wijffels, René & Vet, Louise & Fernandes, Tania. (2020). Impact of hydraulic retention time on community assembly and function of photogranules for wastewater treatment. *Water Research*. 173. 115506. 10.1016/j.watres.2020.115506.
- Vasudevan, Sahana & Joseph, Harold Abraham & Sugumar Swamy, Shogan & Princy, Adline. (2019). Antibiotic Resistance in Biofilms. 10.1021/bk-2019-1323.ch010.
- Van Den Hende, S., Laurent, C., & Begue, M. (2015). Anaerobic digestion of microalgal bacterial flocs from a raceway pond treating aquaculture wastewater: need for a biorefinery. *Bioresour Technol*, 196, 184-193. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.058
- Wang, L., Li, Y., Wang, L., Zhang, H., Zhu, M., Zhang, P., & Zhu, X. (2018). Extracellular polymeric substances affect the responses of multi-species biofilms in the presence of sulfamethizole. *Environmental Pollution*, 235(December), 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.060>
- Walston, Stefan Eugene. (2013). Does Increasing Solids Retention Time During the Wastewater Treatment Process Affect the Persistence of Antibiotic Resistance Genes? (M.S. thesis). University of Arizona. Arizona, Az
- Watkinson, Andrew & Murby, E.J. & Kolpin, Dana & Costanzo, Simon. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *The Science of the total environment*. 407. 2711-23. 10.1016/j.scitotenv.2008.11.059.

- Wehr, J.D., Sheath, R.G. 2015. *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Academic, Amsterdam. 918 p.
- Wen, Qinxue & Yang, Lian & Duan, Ruan & Chen, Zhiqiang. (2016). Monitoring and evaluation of antibiotic resistance genes in four municipal wastewater treatment plants in Harbin, Northeast China. *Environmental Pollution*. 212. 34-40. 10.1016/j.envpol.2016.01.043.
- Wenjun Li, Haochang Su, Yucheng Cao, Linglong Wang, Xiaojuan Hu, Wujie Xu, Yu Xu, Zhuojia Li, Guoliang Wen. (2020). Antibiotic resistance genes and bacterial community dynamics in the seawater environment of Dapeng Cove, South China. *Science of the Total Environment* 723. 138027.
- World Health Organization. *Global Action Plan for Antimicrobial Resistance*. 2015.
- Wingender, J., Neu, T. R. and Flemming, H. C. (1999) In *Microbial extracellular polymeric substances - Characterization, Structure and Function* (Eds, Wingender, J., Neu, T. R. and Flemming, H. C.) Springer.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 5(3), 175–186. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1614>
- Xiuqi You, Nan Xu, Xi Yang, Weiling Sun (2021). Pollutants affect algae-bacteria interactions: A critical review. *Environmental Pollution*, 276, 283–292
- Youngquist, Caitlin & Mitchell, Shannon & Cogger, Craig. (2016). Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistance during Digestion and Composting: A Review. *Journal of Environment Quality*. 45. 537. 10.2134/jeq2015.05.0256.
- Zainon Noor, Zainura & Rabiun, Zainab & Sani, Mohd & Fatah, Abdul & Farizal Kamaruddin, M. & Perez, María & Dib, Julian & Fatima, Huma & Sinha, Rajeshwari & Khare, Sunil & Zakaria, Zainul. (2021). A Review of Bacterial Antibiotic Resistance Genes and Their Removal Strategies from Wastewater. *Current Pollution Reports*. 10.1007/s40726-021-00198-0.
- Zhang J, Yang M, Zhong H, Liu M, Sui Q, Zheng L, Tong J, Wei Y. Deciphering the factors influencing the discrepant fate of antibiotic resistance genes in sludge and water phases during municipal wastewater treatment. *Bioresour Technol*. 2018 Oct;265:310-319. doi: 10.1016/j.biortech.2018.06.021. Epub 2018 Jun 9. PMID: 29909361.
- Yan Zhang, Aolin Li, Tianjiao Dai, Feifei Li, Hui Xie, Lujun Chen, and Donghui Wen. (2019). Cell-free DNA: A Neglected Source for Antibiotic Resistance Genes Spreading from WWTPs. *Science of the Total Environment* 697, 134-176.

Zhou, S., Jiang, X., Ma, X., & Liu, C. (2018). Robust performance of a membrane bioreactor for removing antibiotic resistance genes exposed to antibiotics: Role of membrane foulants. *Water Research*, 130, 139–150.

Zhiyuan Wang, Qiuwen Chena, Jianyun Zhang, Tiesheng Guan, Yuchen Chena, Wenqing Shi. (2020). Critical roles of cyanobacteria as reservoir and source for antibiotic resistance genes.