



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DURANTE EL TRATAMIENTO
DE DIGESTATO PORCÍCOLA MEDIANTE MICROALGAS-BACTERIAS A DIFERENTES
IRRADIANCIAS SOLARES

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

PRESENTA:
ISAAC ZAHUANTITLA RAZO

TUTOR PRINCIPAL
DR. JULIÁN CARRILLO REYES, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTORAL
DRA. BLANCA LUCIA PRADO PANO, INSTITUTO DE GEOCIENCIAS
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:

DRA. BLANCA LUCÍA PRADO PANO, INSTITUTO GEOCIENCIAS UNAM

SECRETARIO:

DR. EDSON BALTAZAR ESTRADA ARRIAGA, INSTITUTO MEXICANO DE
TECNOLOGÍA DEL AGUA

VOCAL 1:

DR. SANTIAGO GUTIÉRREZ VARGAS, UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE
GUANAJUATO

VOCAL 2:

DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA UNAM

VOCAL 3:

DR. JULIÁN CARRILLO REYES, INSTITUTO DE INGENIERÍA UNAM

TUTOR DE TESIS:

Dr. Julián Carrillo Reyes

FIRMA

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA); Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería, de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla.

Se agradece al proyecto **IA211220** del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento para la realización de esta tesis.

Isaac Zahuantitla Razo agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (**787725**) para la realización de los estudios de posgrado en Ingeniería Ambiental.

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.

AGRADECIMIENTOS

Me complace extender mi más profundo agradecimiento al Dr. Julián Carrillo Reyes por volver a brindarme la oportunidad de ser su estudiante y de realizar el presente proyecto de tesis bajo su dirección y liderazgo. Agradezco su apoyo, paciencia, dedicación y por brindarme ánimos en todas las etapas de esta tesis.

A mi comité tutorial: Doctora Blanca Lucía Prado Pano, Doctor Germán Buitrón Méndez, Doctor Edson Baltazar Estrada Arriaga y Doctor Santiago Gutiérrez Vargas, por sus comentarios que enriquecieron de gran manera el presente proyecto.

Al Maestro en Ingeniería Julián Osvaldo Ovis Sánchez, por su invaluable amistad, apoyo, tiempo, constancia y conocimientos compartidos.

Al técnico académico del Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, de la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería, UNAM, el Maestro en Ciencias Jaime Treviña Pérez por el apoyo brindado.

A mis compañeros del posgrado: Javier Mares, Daniela Céspedes y Mauricio Carrillo.

A Liz por mostrarme que siempre hay algo bueno en todo, incluso en las situaciones más complicadas y por coincidir en cosas que tienen mucho significado para mí.

A Valeria, Marce, Agustín y Roberto por brindarme su increíble amistad y apoyarme en los momentos más pesados de mis experimentos.

A Karen por compartir conmigo increíbles momentos durante la Maestría, por todo su amor, comprensión y cariño.

CONTENIDO

Resumen	9
Introducción	10
1. Marco teórico	12
1.1 Antibióticos.....	12
1.2 Genes de resistencia a antibióticos y mecanismos de resistencia	13
1.3 Resistencia a antibióticos como contaminante ambiental emergente	16
1.4 Aguas residuales porcícolas.....	18
1.5 Tratamiento de aguas residuales porcícolas	20
1.5.1 Digestato porcino	21
1.6 Sistemas de tratamiento basados en microalgas-bacterias (MABA).....	23
1.6.1 Factores operacionales de los sistemas MABA	25
1.6.2 Remoción de contaminantes emergentes y patógenos en sistemas MABA.....	27
1.7 Uso de microalgas para el tratamiento de efluentes porcinos.....	28
1.7.1 Remoción de resistencia a antibióticos en aguas residuales porcinas y municipales mediante microalgas.....	29
2. Justificación	31
3. Objetivo general.....	32
4. Metodología	33
4.1 Etapa 1, muestreo y caracterización de efluentes	34
4.2 Etapa 2, desarrollo del inóculo	35
4.3 Etapa 3, efecto de la irradiancia solar.....	36
4.4 Etapa 4, determinación de BRA a diferentes tiempos.....	37
4.5 Determinación de bacterias resistentes a antibióticos (BRA).....	38
4.6 Extracción de ADN, secuenciación y análisis bioinformático	39
4.7 Análisis fisicoquímicos.....	40
4.8 Análisis estadísticos	40
5. Resultados y discusión.....	41
5.1 Caracterización de efluentes porcinos.....	41
5.2 Desarrollo de inóculo microalgas-bacterias	43
5.3 Efecto de la irradiancia en el tratamiento de digestato porcino	45
5.3.1 Cuantificación de BRA durante el tratamiento de digestato.	49
5.4 Cuantificación BRA a diferentes tiempos de incubación	51
5.5 Efecto de condiciones ambientales en la prevalencia de resistencia a antibióticos	53
5.6 Remoción de GRA durante el tratamiento de digestato porcino	55

5.7 Identificación de bacterias resistentes a antibióticos presentes en el efluente del sistema MABA.....	58
6. Conclusiones.....	633
Bibliografía.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistencia a antibióticos	15
Figura 2. Movimiento de GRA y BRA a través de diferentes entornos	18
Figura 3. Estrategia	33
Figura 4. Diagrama de puntos de muestreo de efluentes en granja porcina	34
Figura 5. Ilustración de estación de trabajo con fotobiorreactores de placa plana al exterior	37
Figura 6. Caracterización de agua residual porcina cruda y digestato porcino	42
Figura 7. Cuantificación de bacterias resistentes a diferentes antibióticos	42
Figura 8. Desarrollo de biomasa de microalgas-bacterias	43
Figura 9. Determinación de fisicoquímicos a inicio y final del desarrollo de inóculo	44
Figura 10. Fotobiorreactores de placa plana	45
Figura 11. Factores operacionales obtenidos por condición experimental	46
Figura 12. Análisis fisicoquímicos a las diferentes irradiancias evaluadas	47
Figura 13. Caracterización física de la biomasa MABA	48
Figura 14. Cuantificación de UFC de bacterias resistentes ante diferentes condiciones de irradiancia	49
Figura 15. Cuantificación de UFC de bacterias resistentes a diferentes tiempos de tratamiento con IM	52
Figura 16. Análisis estadístico multivariado empleando condiciones ambientales y BRA	54
Figura 17. Cuantificación de genes de resistencia a diferentes antibióticos en el digestato y efluente durante el tratamiento con IM	56
Figura 18. Identificación de las BRA que crecieron en el medio de cultivo R2A adicionado con antibióticos	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales ejemplares de antibióticos y sus dianas en la célula bacteriana	13
Tabla 2. Composición de agua residual porcícola	19
Tabla 3. Composición de digestato porcino típico	23
Tabla 4. Condiciones operacionales durante el desarrollo del inóculo de microalgas-bacterias	43
Tabla 5. Géneros identificados en las muestras metagenómicas de BRA	59

RESUMEN

La resistencia a antibióticos se ha convertido en una problemática ambiental y de salud. Los sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales no fueron diseñados para la remoción de contaminantes emergentes y se considera que son un entorno que favorece la resistencia a antibióticos por lo tanto se requiere de investigación y desarrollo en procesos que pueden remover contaminantes tanto químicos como emergentes. Las aguas residuales porcinas presentan una problemática al ser ricas en demanda química de oxígeno (DQO) y nutrientes, además de una elevada carga en bacterias resistentes a antibióticos (BRA) y genes de resistencia a antibióticos (GRA), debido al suministro recurrente de antibióticos que se proporciona a los porcinos junto con su alimentación para evitar enfermedades. Los sistemas de tratamiento basados en consorcios de microalgas-bacterias presentan una posible solución para remover la DQO y nutrientes durante la producción de biomasa, mientras que, de manera conjunta con factores operacionales como la irradiación solar, nivel de pH, oxígeno disuelto y temperatura pueden llevar a cabo la remoción de BRA y GRA. La irradiación solar es un factor relevante debido a su rol en el proceso fotosintético de las microalgas, y en la inactivación de patógenos resistentes a antibióticos y GRA. El presente proyecto de investigación se enfoca en estudiar la resistencia a antibióticos durante el tratamiento de digestato porcino mediante un consorcio de microalgas-bacterias en fotobiorreactores de placa plana expuestos a 3 diferentes niveles de irradiación solar promedio 60 ± 9 , 212 ± 9 y 373 ± 21 W/m². Las condiciones generadas por la exposición a las irradiaciones solares de 212 ± 9 y 373 ± 21 W/m² favorecen la remoción de resistencia a antibióticos mientras que al disminuir la exposición a un valor de 60 ± 9 W/m² se promueve la propagación de resistencia a antibióticos. No obstante, la alta remoción de GRA y BRA en el digestato porcino, se registró la supervivencia de géneros bacterianos resistentes a antibióticos, los cuales agrupan especies patógenas: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Shigella* y *Vibrio*. En cuanto a la remoción de resistencia, analizada por técnicas metagenómicas, se alcanzó una remoción promedio del 85% del total de GRA

después del tratamiento, lo que comprueba la efectividad del sistema para remover estos contaminantes emergentes.

INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes son compuestos generados o propiciados a partir de actividades antropogénicas que están presentes en concentraciones traza (ng/L o µg/L) en ambientes como: agua, suelos, comida y tejidos humanos/animal (Rodriguez-Narvaez *et al.*, 2017). Son contaminantes que se han descubierto recientemente en el ambiente o son materiales que pueden haber permanecido en el medio desde hace tiempo, pero que recientemente han generado preocupación (Olatunde *et al.*, 2020), debido a que tienen impactos dañinos en la salud de los seres vivos (tanto acuáticos como terrestres) y en el ambiente (Gogoi *et al.*, 2018). Dentro de los contaminantes emergentes se encuentran; productos farmacéuticos, de cuidado personal, surfactantes, plastificantes, retardantes de llamas, pesticidas, fertilizantes, micro plásticos, nanomateriales (Rout *et al.*, 2021), bacterias resistentes a antibióticos (BRA) y genes de resistencia a antibióticos (GRA) (Philip *et al.*, 2018). Los contaminantes emergentes no han sido regulados por las leyes o reglamentos ambientales vigentes (Gao, 2022).

El 28 de septiembre de 1928 Alexander Fleming descubrió el primer antibiótico utilizado por la humanidad contra bacterias patógenas, la penicilina (Tan & Tatsumura, 2015). Desde la segunda guerra mundial los antibióticos se han utilizado ampliamente, salvando millones de vidas. El periodo de 1945 a 1960 es considerado como el inicio de la era dorada del descubrimiento de nuevas clases de antibióticos (Phoon *et al.*, 2020). Millones de toneladas métricas de nuevas clases de antibióticos han sido producidas en las últimas décadas desde su descubrimiento, además el incremento en la demanda de antibióticos por diversos sectores ha permitido que su costo disminuya. Se estima que al año a nivel global se consumen $1 \times 10^5 - 2 \times 10^5$ toneladas de antibióticos (Becker *et al.*, 2016).

Durante una entrevista para The New York Times en 1945, Fleming advirtió que el uso incorrecto de la penicilina podría resultar en la selección de bacterias resistentes al fármaco (Rosenblatt-Farrell, 2009). Actualmente se conoce que los

antibióticos naturales han existido durante miles de millones de años, proporcionando un beneficio selectivo para los microorganismos productores al inhibir o eliminar bacterias que compiten por el sustrato (Von Wintersdorff *et al.*, 2016). Sin embargo, las bacterias también han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir a su exposición, esta resistencia a antibióticos también ha estado codificada en el ADN de los microorganismos desde hace millones de años. Este proceso de resistencia se ha acelerado por actividades antropogénicas, como el amplio uso de antibióticos en tratamientos médicos y en el área agropecuaria (Martínez, 2012; Zaman *et al.*, 2017). Los efluentes de estas actividades llegan a las plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales, las cuales pueden promover la propagación de BRA y GRA, por lo tanto es imprescindible realizar investigación en tecnologías de tratamiento alternas que puedan remover estos contaminantes emergentes (Grehs *et al.*, 2021). Una posible solución a esta problemática es el tratamiento de efluentes mediante un consorcio de microalgas-bacterias (Nölvak *et al.*, 2018), en el cual se enfocará el presente proyecto de investigación.

Este proyecto de tesis es el primer estudio donde se comprueba el potencial de tratamiento que tiene un sistema MABA para remover conjuntamente BRA y GRA en digestato porcino. Específicamente, se evalúa el efecto generado por 3 diferentes irradiancias solares durante la remoción de BRA y GRA, debido a que este factor ambiental es importante para el proceso fotosintético del sistema MABA y subsecuentemente para la variación en el nivel de pH, temperatura y OD.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ANTIBIÓTICOS

El término antibiótico es utilizado para describir una sustancia que tiene capacidad de matar bacterias o inhibir su crecimiento, puede ser producida o no por un microorganismo (Singh *et al.*, 2018); Selman Waksman, el descubridor de la estreptomicina utilizó por primera vez este término (Davies, 1996). Los antibióticos han salvado millones de vidas y han supuesto una revolución en la medicina ya que han contribuido de forma significativa al progreso diversos campos como los trasplantes de órganos, la supervivencia de neonatos prematuros y personas inmunodeprimidas, etc.; en resumen la introducción de los antibióticos en la práctica clínica es un factor que ha contribuido en el aumento de la esperanza de vida de la población (Crispín Pérez, 2008). Las diferencias estructurales entre las células bacterianas y las células superiores hacen que los antibióticos tengan mayor afinidad por las dianas procariontas que por las dianas eucariotas, disminuyendo así el riesgo de efectos adversos en los humanos y animales a los cuales se administra el fármaco, cuando las dosis son adecuadas. Estas diferencias de las células procariontas con respecto a las eucariotas son: a) existencia de un único cromosoma bacteriano que no está cubierto por una membrana nuclear (fácil acceso para los antibióticos), b) presencia de ribosomas del tipo 70S y c) presencia de una pared celular con peptidoglucano, estructura que confiere forma y rigidez a la bacteria (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

Los antibióticos han sido utilizados de manera rutinaria en granjas de producción de animales desde el año 1950, con el objetivo de mantener sanos a los animales e incrementar la productividad (Cromwell, 2002; Lekagul *et al.*, 2019), además en la literatura se ha reportado que la administración del antibiótico Tilosina (macrólido) en la alimentación de porcinos promueve el crecimiento muscular (Yan, 2020). Muchas clases de antibióticos usados por humanos también son utilizadas por animales criados para alimentación: penicilinas, tetraciclinas, amino penicilinas, doxiciclina, sulfonamida, trimetoprima, macrólidos, fluoroquinolonas y cefalosporinas (Lekagul *et al.*, 2019). La Tabla 1 presenta información acerca de los principales antibióticos y su mecanismo de acción.

Tabla 1. Principales ejemplares de antibióticos y sus dianas en la célula bacteriana.

Clase de antibiótico	Ejemplo	Objetivo en la célula bacteriana
Betalactámicos Penicilinas	Penicilina G, penicilina V, cloxacilina, oxacilina, meticilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, piperacilina, mezlocilina	Afecta la biosíntesis de peptidoglicano, inhibición de la síntesis de la pared bacteriana.
Betalactámicos Cefalosporinas	Cefazolina, cefalotina, cefuroxima, cefoxitina, cefotetán, cefaclor, cefamandol	Afecta la biosíntesis de peptidoglicano, inhibición de la síntesis de la pared bacteriana.
Polimixinas	Polimixina B, polimixina E	Alteración de la membrana citoplásmica
Péptidos catiónicos	Daptomicina	Afecta la membrana celular
Aminoglucósidos	Gentamicina, estreptomina, espectinomina, tobramicina, amicacina, netilmicina	Afecta el proceso de traducción en síntesis proteica
Glucopéptidos	Vancomicina, teicoplanina	Afecta la biosíntesis de peptidoglicano
Tetraciclinas	Minociclinas, tigeciclina	Afecta el proceso de traducción en síntesis proteica
Macrólidos	Eritromicina, azitromicina	Afecta el proceso de traducción en síntesis proteica
Lincosamidas	Clindamicina	Afecta el proceso de traducción en síntesis proteica
Estreptograminas	Synercid	Afecta el proceso de traducción en síntesis proteica
Oxazolidinonas	Linezolid	Afecta el proceso de traducción en síntesis proteica
Quinolonas	Ciprofloxacina	Afecta la replicación de ADN, alteración del metabolismo o la estructura de ácidos nucleicos.
Diaminopirimidinas	Trimetoprima Ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam	Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos, inhibidores de b-lactamasas
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	Bloqueo secuencial de la cadena metabólica
Rifamicinas	Rifampin	Afecta el proceso de transcripción genética
Lipopéptidos	Daptomicina	Afecta la membrana celular

*(Davies, 1996; Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

1.2 GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA

La resistencia bacteriana es utilizada por algunos microorganismos como mecanismo de defensa; es un fenómeno que existía antes del descubrimiento y uso de los antibióticos, pero al ser empleados en el tratamiento de enfermedades infecciosas la resistencia se ha intensificado debido al fenómeno denominado

“presión selectiva”, considerado como uno de los factores más importantes para la aparición y diseminación de la resistencia a antibióticos (Rodríguez-Noriega *et al.*, 2014). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud en el año 2020, el uso incorrecto de antibióticos en humanos y animales, ha acelerado el proceso de resistencia causando los siguientes problemas: i) que las infecciones como neumonía, tuberculosis, gonorrea y salmonelosis, actualmente sean más difíciles de tratar y los medicamentos disponibles son menos efectivos, ii) la resistencia a antibióticos genera que los pacientes pasen mayor tiempo de estadía en hospitales, iii) altos costos médicos, iv) incrementa la mortalidad (WHO, 2020). En el año 2014 hubo 700,000 muertes a nivel global causadas por infecciones de microorganismos antibiótico-resistentes y se proyecta que para el año 2050 el número ascienda a 10 millones (He *et al.*, 2020). La resistencia a antibióticos ocurre vía mutación genética, en donde los genes mutados (genes de resistencia a antibióticos, GRA) conferirán al microorganismo la capacidad de sobrevivir al antibiótico (bacterias resistentes a antibióticos, BRA), dicha capacidad puede ser transferida verticalmente y/o horizontalmente a otros microorganismos (Zaman *et al.*, 2017).

En este sentido, cuando una población de bacterias se expone a un antibiótico, un subconjunto de células puede sufrir mutaciones en genes, confiriéndoles características que les permitan sobrevivir a la actividad del fármaco. Por lo tanto, se eliminará a la población celular que todavía es susceptible y prevalecerán las bacterias que son resistentes. Las mutaciones que producen resistencia alteran la acción del antibiótico a través de uno de los siguientes mecanismos (Kapoor *et al.*, 2017; Mahizan *et al.*, 2019; Munita *et al.*, 2016; Peterson & Kaur, 2018; Pinilla *et al.*, 2012): i) modificaciones de dianas microbianas, disminuyendo la afinidad por el fármaco; ii) degradación o modificación enzimática del fármaco mediante acetilación, fosforilación o adenilación; iii) disminución de la absorción del fármaco, al modificarse la permeabilidad de la pared celular y la membrana citoplasmática; iv) activación de mecanismos de salida para expulsar la molécula que es dañina a la bacteria, mediante bombas de eflujo; y v) secuestro del fármaco por parte de proteínas antes de que este alcance su diana (Figura 1).

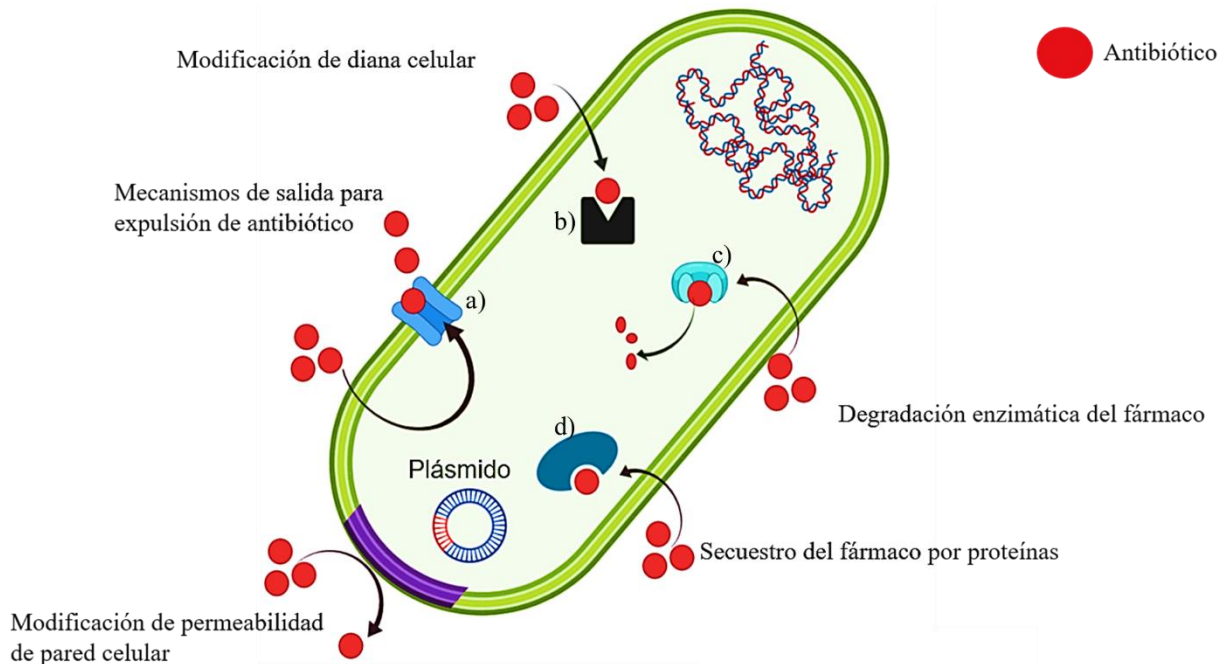


Figura 1. Mecanismos de resistencia a antibióticos. Mahizan *et al.*, 2019. a) Bomba de eflujo, b) modificación de la proteína blanco de penicilina, c) enzima inactivadora, d) proteínas de unión a antibióticos.

La transferencia horizontal de genes (THG) es el proceso de transferencia de información genética entre organismos, que no están directamente relacionados y es uno de los mecanismos de propagación de GRA entre bacterias, que en última instancia puede resultar en la resistencia a antibióticos. La THG es ampliamente reconocida como un mecanismo de adaptación en bacterias y arqueas (Soucy *et al.*, 2015).

La presencia de concentraciones sub inhibitorias de antibióticos y/o ambientes ricos en bacterias resistentes a antibióticos como los excrementos de porcinos, promueven la transferencia de genes de resistencia a antibióticos de parte de las BRA hacia la comunidad bacteriana no resistente THG (Lima *et al.*, 2020). La propagación de GRA, mediante THG puede ocurrir por alguno de los siguientes procesos (Burmeister, 2015): i) transformación, las bacterias toman el ADN del medio ambiente; ii) conjugación, las bacterias transmiten genes directamente a otra célula mediante una estructura denominada pili sexual; iii) transducción, bacteriófagos (virus específicos de bacterias) mueven genes de una célula a otra.

En el año 2019 el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América publica un reporte en el cual menciona la situación actual de la resistencia a antibióticos y los ejemplares bacterianos que son una amenaza para la salud pública, que requieren acción urgente, entre ellos menciona al género *Acinetobacter* resistente a carbapenémicos, *Clostridioides difficile*, *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos, *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter*, *Enterococci* resistente a vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa* multi resistente, *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, *Bordetella pertussis* (CDC, 2019). Informes recientes que utilizan datos de estudio de vigilancia en hospitales, así como de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América han comenzado a referirse a un grupo de patógenos nosocomiales como “patógenos ESKAPE” acrónimo del grupo de bacterias que engloba a las especie *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*, las cuales provocan infecciones potencialmente mortales entre personas gravemente enfermas e inmunodeprimidas y se caracterizan por poseer resistencia a antibióticos (Santajit & Indrawattana, 2016).

1.3 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS COMO CONTAMINANTE AMBIENTAL EMERGENTE

La resistencia a antibióticos puede ser encontrada en diferentes organismos y ambientes (Figura 2). La THG está restringida o promovida por factores ecológicos y ambientales. Los factores ecológicos incluyen disponibilidad de recursos, densidad y diversidad de población. Por otro lado los factores ambientales pueden ser divididos en dos categorías, factores abióticos: temperatura, pH, contenido de humedad, disponibilidad de micro nutrientes, disponibilidad de macro nutrientes, superficies y oxígeno; mientras que los factores bióticos son: depredación, antagonismo, competencia, así como la presencia de organismos y plantas sinantrópicas (Sanderson *et al.*, 2016).

Los antibióticos pueden ingresar a las plantas de tratamiento a través de aguas residuales municipales, agropecuarias, industriales y hospitalarias. Las plantas de

tratamiento de aguas residuales son consideradas un entorno que favorece la propagación de BRA y GRA. Esto es debido a la presión selectiva que ejercen los residuos de antibióticos (concentraciones sub inhibitorias), sobre la alta densidad y diversidad de microorganismos presentes (Pazda *et al.*, 2019). Se ha reportado que los lodos de purga provenientes de las plantas de tratamiento de aguas residuales que comúnmente son empleados como fertilizante para los suelos de agricultura; aumentan la actividad microbiana y la biomasa del suelo, así como la abundancia de GRA y elementos genéticos móviles, lo que representa un riesgo de diseminación de la resistencia a los antibióticos (Urre *et al.*, 2019). Los excrementos son otro reservorio importante de BRA y GRA, los cuales pueden ser introducidos a suelos mediante las prácticas de compostaje, promoviendo la transferencia de GRA en tierras de uso agrícola (Tripathi & Tripathi, 2017).

Los ambientes de aguas dulces son susceptibles a contaminación por antibióticos residuales que son lanzados a través de diferentes fuentes, como escorrentías agrícolas, descargas de aguas residuales y lixiviados de granjas cercanas, por lo tanto el nivel de BRA es extremadamente alto en muchos de los sistemas de ríos (arriba del 98% del total de bacterias detectadas), seguido por lagos (arriba del 77% del total de bacterias detectadas), esto representa un gran problema debido a que la resistencia a antibióticos es persistente y se preserva en estos cuerpos de agua, pudiendo llevarse a cabo una directa transmisión de los contaminantes emergentes hacia los animales y humanos, donde puede ocurrir una inserción en la microbiota (Figura 2) (Nnadozie & Odume, 2019).

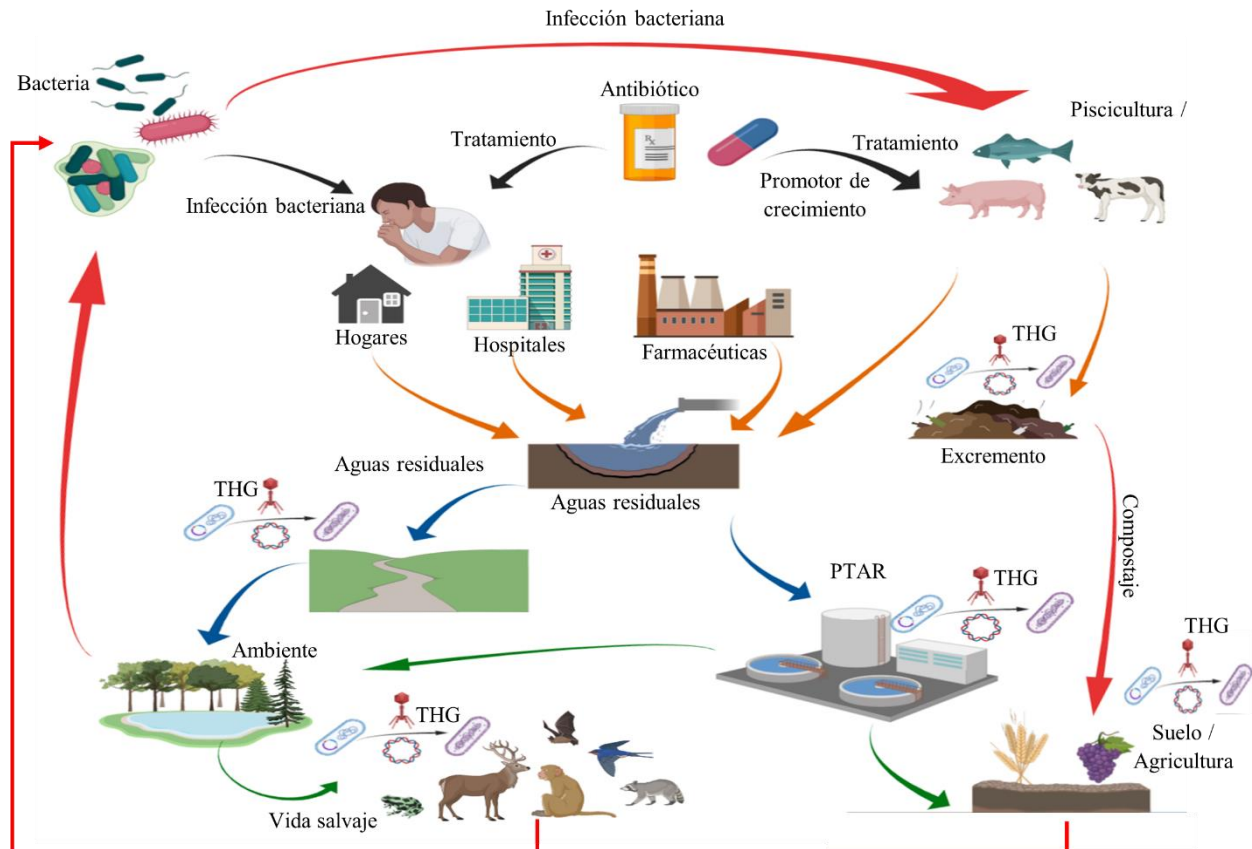


Figura 2. Movimiento de GRA y BRA a través de diferentes entornos. THG: Transferencia horizontal de Genes, PTAR: Plantas de tratamiento de aguas residuales.

1.4 AGUAS RESIDUALES PORCÍCOLAS

En el intervalo de tiempo 2010-2017 se produjeron a nivel mundial cerca de un billón de cerdos por año, con fines de mercado alimenticio. Esto generó aproximadamente 7 billones de kg de nitrógeno por año (Cheng *et al.*, 2020d). El agua residual porcícola es principalmente generada por el lavado de excremento de los animales, este tipo de agua es rica en nitrógeno, fósforo y ciertos iones metálicos (los cuales son adicionados al alimento de porcinos para promover su crecimiento) (Tabla 2); por lo que su descarga es un factor importante para la eutrofización (Chen *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020). Este tipo de aguas residuales, comúnmente son de color café y olor desagradable, además de la presencia coliformes fecales y huevos de helminto (Tabla 2) (Qu *et al.*, 2020; Sylvestre *et al.*, 2014).

Tabla 2. Composición de agua residual porcícola.

Parámetro	Agua residual porcícola*
pH	6.94
Sólidos totales volátiles (mg/L)	11792
Sólidos suspendidos (mg/L)	15042
Demanda biológica de oxígeno (mg/L)	8460
Demanda química de oxígeno (mg/L)	25205
Nitrógeno total (mg/L)	2034
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	1760
Fósforo total (mg/L)	180.1
Coliformes Fecales (NMP/L)	9.2x10 ⁹
Huevos de helminto (unidades / L)	2.3

* Contiene agua residual del proceso de maternidad, proceso de engorda y proceso de deteste (Garzón-Zúñiga & Buelna; Sylvestre *et al.*, 2014).

Se estima que en México un porcino produce alrededor de 0.27 m³ de efluentes cada mes (Gonzalez-Tineo *et al.*, 2020). En México el 28 % de las descargas de granjas porcinas no son tratadas, este tipo de agua debe cumplir con los límites máximos de contaminantes especificados en la NOM-001-SEMARNAT-2021 si descargan en un cuerpo de agua y con la NOM-003-SEMARNAT-2021 si descargan al suelo para riego agrícola. Sin embargo, casi ninguna granja cumple con la normatividad por lo que se hacen acreedoras a sanciones de la Comisión Nacional del Agua (Garzón-Zúñiga & Buelna, 2014).

En animales de ganado, como los porcinos, es común incluir antibióticos junto con su alimentación. El objetivo es tratar infecciones y prevenir la aparición de bacterias que pudieran afectar la salud de porcinos jóvenes. Esto repercute en un mayor crecimiento debido a que, en ausencia de enfermedades, los porcinos pueden desarrollar todo su potencial de crecimiento. Por tal motivo los antibióticos son considerados promotores de crecimiento (Cromwell, 2002; Lekagul *et al.*, 2019). Al administrar antibióticos a los porcinos, pueden retener en su cuerpo aproximadamente el 10-70% de la dosis, pero el otro porcentaje es excretado mediante heces fecales y orina, terminando en cuerpos de agua (Jauregi *et al.*, 2021). Las aguas residuales porcinas contienen una mayor concentración de GRA (3 a 5 órdenes de magnitud) que las aguas residuales municipales y de hospitales. La abundancia de GRA totales en desechos no tratados de ganado (sólidos

combinados y aguas residuales) varían de 10⁶ a 10¹¹ copias / g de peso seco o de 10⁶ a 10¹² copias / mL (abundancia absoluta), y 10³ a 10¹ copias / ARN ribosómico 16S (ARNr; abundancia relativa) (He *et al.*, 2020); por lo tanto son un entorno que favorece la propagación de resistencia a antibióticos (Wang *et al.*, 2016).

Algunos de los GRA identificados en aguas residuales porcinas son a tetraciclinas, *tetG*, *tetM*, *tetW*, *tetX*, *tetA408*, *tetB*, *tetC*, *tetG*, *tetH*, *tetL*, *tetO*, *tetS*; a sulfonamidas, *sul1*, *sul2*; a betalactámicos, *blaTEM*; a macrólidos, *mcr-1*, *ermB*, *ermF*, *ermA*; a quinolonas, *qnrS*; y a fluorquinolonas, *cfr* (He *et al.*, 2020; Sui *et al.*, 2019; Yiwen Yang *et al.*, 2019). Adicionalmente, en aguas residuales porcinas, se ha reportado la presencia de BRA reportados como patógenos, *Salmonella* y *Campylobacter* (Brooks *et al.*, 2014).

1.5 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES PORCÍCOLAS

Algunos ejemplos de sistemas de tratamiento empleados para efluentes porcino son biodigestores, estanques anaerobios, estanques facultativos y reactores UASB con eficiencias de remoción de materia orgánica (DQO) de ≤ 50%, ≤ 56%, ≤30%, ≤60%, respectivamente. Por otro lado, los compuestos orgánicos nitrogenados presentes en este tipo de agua residual como las proteínas, aminoácidos y urea son mayoritariamente reducidos a amonio, el cuál es pobremente removido en condiciones anaeróbicas. Se han reportado rendimientos limitados en la remoción de nitrógeno en los siguientes sistemas anaerobios: reactor UASB, digestor anaerobio, estanques anaerobios y biodigestores siendo ≤ 11%, 0%, ≤56 % y 17%, respectivamente. La baja remoción de nitrógeno ocasiona un proceso anaerobio ineficiente, que puede estar acompañado con la acidificación del efluente, el cual no tiene la calidad aceptable para ser reutilizado en prácticas de agricultura como la irrigación (Gonzalez-Tineo *et al.*, 2020). En México el principal tratamiento de las aguas residuales porcícolas es a través de digestores anaerobios, contando con un registro de 479 a través de diferentes estados.

En la literatura se ha reportado que el tratamiento de agua residual porcina

mediante digestión anaerobia presenta remociones limitadas de GRA a tetraciclinas, sulfonamidas, macrólidos y quinolonas, 60%, 50%, 70% y 40%, respectivamente; lo que indica una eliminación ineficiente y alta abundancia de estos genes en el digestato residual (Liu *et al.*, 2020). Al momento, no se ha reportado en la literatura la capacidad de remoción de BRA durante el tratamiento de agua residual porcina mediante digestión anaerobia. Debido a que este sistema convencional no puede incidir de manera satisfactoria en la remoción de la resistencia a antibióticos durante el tratamiento de aguas residuales porcícolas se han probado otras alternativas, por ejemplo, humedales integrados de flujo vertical para evaluar los efectos de zeolitas y plantas, en la remoción de antibióticos y GRA presentes en aguas residuales porcícolas. Sus resultados mostraron una óptima remoción de antibióticos, sin embargo, los humedales no fueron propicios para la eliminación de GRA (Du *et al.*, 2020). También se han estudiado procesos de tratamiento acoplados como la nanofiltración y ósmosis reversa, para la remoción de GRA en aguas residuales porcícolas. Estos procedimientos no pudieron remover a los genes implicados en la resistencia a sulfonamidas, antibiótico que tiene una amplia presencia en las aguas residuales porcinas (Lan *et al.*, 2019). En otro estudio se investigó a escala piloto, un proceso acoplado; el cual contemplaba una etapa anóxica, 4 etapas micro aireadas junto con una etapa de coagulación. Se determinó la capacidad de remoción de antibióticos y GRA en aguas residuales porcícolas (Ma *et al.*, 2018). Aunque obtuvieron óptimos rendimientos en la remoción de nitrógeno (97%), fósforo (96%), antibióticos (98%) y GRA (en influente 10^{10} copias/mL, en efluente 10^5 copias/mL), el uso de coagulantes se considera como una tecnología costosa en el tratamiento de aguas residuales (Kweinor Tetteh & Rathilal, 2020).

1.5.1 DIGESTATO PORCINO

En México el principal tratamiento de las aguas residuales porcícolas es a través de digestores anaerobios, contando con un registro de 479 a través de diferentes estados (Gonzalez-Tineo *et al.*, 2020). El digestato es el material orgánico residual coproducido con el biogás durante la digestión anaerobia (Chong *et al.*, 2022). El uso de digestato en dosis adecuadas para la fertilización de suelos representa una

opción sustentable para valorizar estos residuos y para proveer a los agricultores de un importante suplemento de macro y micro nutrientes, como estrategia en los esquemas de la economía circular (Sanz *et al.*, 2021), por ejemplo el uso de digestato porcino como fertilizante en dosis de 200 kg de nitrógeno total/hectárea en aplicaciones múltiples y en pequeñas cantidades favorece el crecimiento del cultivo vegetal de Shanghai cabbage (Jin *et al.*, 2022). Sin embargo, las grandes cantidades de digestato porcino que son dispuestas incorrectamente en la naturaleza presentan una problemática ambiental debido a su alta carga de materia orgánica, nitrógeno y fósforo (Tabla 3), que pueden causar la eutroficación de cuerpos de agua, contaminación de aguas subterráneas y contaminación del aire por la volatilización de amoníaco (NH₃) (Godos *et al.*, 2009). Bajo condiciones operacionales normales, los sistemas anaerobios generan digestato con una carga orgánica de 3000 mg/L en términos de DQO, la cual es 5 veces superior a la materia orgánica contenida en aguas residuales domésticas. Por lo tanto requieren de un tratamiento secundario para poder ser reusadas o descargadas en el ambiente, además de que representan un posible riesgo de contaminación de patógenos y/o metales pesados (Saucedo-Terán *et al.*, 2017; Tricolici *et al.*, 2014).

Por ejemplo se ha reportado la presencia de los siguientes patógenos para humanos en muestras de digestato porcino: *Sallmonella enterica*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Aspergillus fumigatus*, *Vibrio cholera*, *Yersinia pestis*, *Neisseria meningitides*, *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* (Zhang *et al.*, 2021). Adicionalmente se ha reportado la presencia de GRA en digestatos porcinos, específicamente de resistencia a tetraciclinas, *tetG*, *tetM*, *tetW*, *tetX*, *tetC*, *tetG*, *tetL*, *tetO*, *tetS*; a sulfonamidas, *sul1*, *sul2*; a betalactámicos, *bla_{TEM}*; a macrólidos, *mcr-1*, *ermB*, *ermF*, *ermA*; y a quinolonas, *qnrS* (Sanz *et al.*, 2021; Sui *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021).

Debido a las problemáticas presentadas por los residuos porcinos, es importante el desarrollo de nuevos sistemas de tratamiento del digestato porcino que permitan remover tanto contaminantes emergentes como DQO y nutrientes, para mejorar la sostenibilidad de la digestión anaerobia y para mejorar las aplicaciones

agrícolas del digestato como fertilizante. En este sentido, el digestato porcino es un potencial medio de cultivo para microalgas, debido a su contenido de nitrógeno, fósforo, micronutrientes y fuente de agua (Ran *et al.*, 2021).

Tabla 3. Composición de digestato porcino típico.

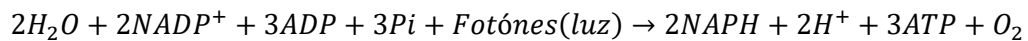
Parámetro	Digestato porcino*
pH	8.3-8.5
Sólidos totales volátiles (mg/L)	1100 ± 200
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	3800 ± 200
Demanda química de oxígeno (mg/L)	1300-1400
Nitrógeno total (mg/L)	1610-1659
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	1402-1492
Fósforo total (mg/L)	37.1- 42.0

*Ran *et al.*, 2021

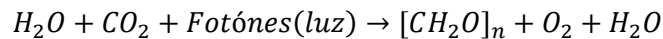
1.6 SISTEMAS DE TRATAMIENTO BASADOS EN MICROALGAS-BACTERIAS (MABA)

El término “microalga” es utilizado para referirse a un diverso grupo de organismos fotosintéticos productores de oxígeno, que pueden ser unicelulares o multicelulares, procariotas como las cianobacterias o algas verdes eucariotas (Mohsenpour *et al.*, 2021). Dentro de las algas verdes se encuentran los géneros representativos: *Chlorella*, *Spirogya*, *Chlamydomonas*, *Botryococcus*, *Scenedesmus*, *Skeletonema*, *Chaetomorpha*, *Neochloris*, *Haematococcus*, *Nannochloropsis*, *Pycnococcus*, *Potamogeton*, mientras que en cianobacterias se encuentran los géneros representativos: *Mycrocystis*, *Synechococcus*, *Prochlorococcus*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Spirulina*, *Aphanothece*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Synechocystis* (Gupta *et al.*, 2013; Singh & Singh, 2015). Las algas verdes son organismos eucariotas; mientras que las cianobacterias, también llamadas algas verde azuladas, son procariotas, bacterias Gram negativas autótrofas capaces de realizar fotosíntesis (Sukla *et al.*, 2019; Safi *et al.*, 2014). Las microalgas están presentes en casi todos los ambientes acuáticos y son responsables de la mitad del O₂ producido en todo el mundo (Su, 2021); adicionalmente las microalgas fijan el CO₂ tanto atmosférico como disuelto en el agua residual gracias a su proceso fotosintético, convirtiéndolo en biomasa (Molazadeh *et al.*, 2019). En resumen, la primera etapa del proceso de fotosíntesis de las microalgas es dependiente de luz y ocurre en los tilacoides de los

cloroplastos; consiste en la captura y transformación de energía solar a energía química. Se requiere de CO₂, nicotinamida dinucleótido fosfato en su forma oxidada (NADP⁺), adenosín difosfato (ADP) y fosfatos, mientras que el agua funge como donador de electrones. El O₂ es producido después de la fotólisis mediada por la luz, mientras que el NDP⁺ funge como aceptor final de electrones reduciéndose a NADPH+H⁺, el ATP se genera a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi) (Ecuación 1 y 2). En la segunda etapa que es independiente de luz (llamada reacción oscura o ciclo de Calvin-Benson) ocurre en el estroma (cavidad interna de los cloroplastos) en el caso de las microalgas y en el citoplasma en el caso de las cianobacterias, en donde el ATP cede su energía, el NADPH+H⁺ cede los electrones y protones obtenidos en el proceso anterior, mientras que el CO₂ se fija para la formación de carbohidratos (Ecuación 3) (Chai *et al.*, 2021; Starr *et al.*, 2009).



Ecuación 1



Ecuación 2



Ecuación 3

Las estructuras de carbono que son producidas durante las reacciones dependientes e independientes de luz son empleadas en procesos subsecuentes, formando otros compuestos orgánicos, por ejemplo la celulosa que aparte de ser una molécula estructural puede ser un precursor en la biosíntesis de lípidos y aminoácidos (Chai *et al.*, 2021; Ho *et al.*, 2017).

Emplear un consorcio de microalgas-bacterias (MABA) en procesos de tratamiento de aguas residuales presenta ventajas sobre un cultivo puro debido a la interacción y trabajo conjunto que existe entre los organismos: la fotosíntesis realizada por las microalgas, proporcionan a las bacterias del O₂ necesario para la

oxidación de materia orgánica (reducción de DQO y demanda biológica de oxígeno DBO), mientras que las bacterias suministran CO₂, nutrientes, Vitamina B12 y fitohormonas como la auxina (Chai *et al.*, 2021; Cheng *et al.*, 2020d; Krustok, 2016); además las bacterias pueden utilizar compuestos producidos a partir de la actividad metabólica de las algas como componentes de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Fito & Alemu, 2019). Durante el día las microalgas producen oxígeno en presencia de luz y consumen CO₂, mientras que durante la noche el oxígeno es utilizado por las bacterias para oxidar la materia orgánica y finalmente producir CO₂ esencial para el proceso de fotosíntesis en las microalgas (Muñoz & Guieysse, 2006). La degradación de compuestos orgánicos con nitrógeno es más eficiente en el consorcio microalga-bacteria con respecto a emplear un cultivo solo de bacterias, esta ventaja ocurre por la asimilación de amonio (NH₄⁺) que realizan las microalgas (Pires *et al.*, 2013). La mutua cooperación que se realiza entre microalgas y bacterias está denominada como mutualista (Fito & Alemu, 2019). El tratamiento de aguas residuales con un consorcio de microalgas-bacterias no requiere de la transición entre diferentes ambientes operativos para facilitar la remoción de N y P, ya que solo se requiere de un solo paso de tratamiento; esto ocurre debido a que las microalgas asimilan el amonio junto con el fosfato directamente en el crecimiento celular y funciones metabólicas (Mohsenpour *et al.*, 2021). Con todo ello se propicia una mayor degradación de sustratos complejos. Se han reportado las siguientes clases de bacterias en consorcio con microalgas: *Bacteroides* (50%), *Flavobacteria* (25%), *Betaproteobacteria* (12.5%) y *Gammaproteobacteria* (Mohsenpour *et al.*, 2021).

1.6.1 FACTORES OPERACIONALES DE LOS SISTEMAS MABA

En la literatura se han reportado los factores operacionales que tienen un impacto óptimo en la remoción de DQO y nutrientes (nitrógeno y fósforo) al emplear un consorcio de microalgas-bacterias en el tratamiento de aguas residuales: concentración de carbono, nitrógeno y fósforo a una relación de 106:16:1, nivel de pH de 7 (Nagarajan *et al.*, 2019), rango de temperatura entre 20-30 °C, nivel de irradiancia de luz entre 33-400 μmol/m²/s (Cheng *et al.*, 2019), dilución del agua residual a un factor de 1:10 o 1:20 (Ferrero *et al.*, 2012), tiempo de retención

hidráulica de 5-10 días, mezclado con paletas a una velocidad de 5 revoluciones por minuto en raceways (Ferrero *et al.*, 2012; Godos *et al.*, 2009).

La irradiancia solar es la principal fuente de energía de la tierra. La irradiancia solar es la salida de energía luminosa de todo el disco del sol, medida en la tierra, es la cantidad de energía luminosa del sol que golpea un metro cuadrado de la tierra por segundo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), también representada como vatio por metro cuadrado (W/m^2) (Garner, 2017). La irradiancia solar es un factor operacional que tiene un gran impacto en el rendimiento del tratamiento de aguas residuales basado en microalgas, ya que el rendimiento está en función de la disponibilidad de luz en el reactor (lugar, fecha y hora), así como la profundidad del cultivo. La fijación de nutrientes llevada a cabo por microalgas, especialmente de nitrógeno y fósforo, está en función de la irradiancia promedio. Por esta razón, a menor profundidad del contenedor de cultivo, mayor será el alcance que tiene la irradiancia promedio sobre el volumen de trabajo, resultando en una mayor tasa de fijación de nitrógeno y fósforo (Acién Fernández *et al.*, 2018). A pesar de que el volumen de trabajo tiene un papel importante, en la literatura solo se reporta la irradiancia solar ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que incide en las superficies de los fotobiorreactores debido a que es la energía máxima que incide en el sistema (Castrillo *et al.*, 2018). En lugares con baja radiación solar los sistemas de tratamiento basados en microalgas pueden remover nitrógeno de 2 a 10 t/ha-año, mientras que en áreas tropicales se pueden remover de 5 a 25 t/ha-año. En el caso del fósforo se pueden remover de 0.2 a 1.1 t/ha-año en lugares con baja radiación solar y de 0.5 a 2.5 t/ha-año en áreas tropicales (Acién Fernández *et al.*, 2018). Se ha reportado que el rango óptimo de intensidad lumínica para los agregados microalgas-bacterias es de 100 a 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Arango *et al.*, 2016; Quijano *et al.*, 2017). Arcila y Buitrón en el año 2017 evaluaron el efecto de 3 diferentes niveles de irradiancia solar máxima promedio: 1065, 665 y 479 W/m^2 en el tratamiento de aguas residuales municipales en un estanque de algas de alta tasa al aire libre (por sus siglas en inglés HRAP). La radiación solar mostró tener un efecto en la actividad fotosintética, en la producción de biomasa, en la remoción de DQO y nutrientes. Siendo la condición expuesta a 479 W/m^2 la que

obtuvo una mayor eficiencia de remoción, de $91 \pm 4\%$, $99 \pm 1\%$, para DQO soluble y amonio, respectivamente. En esta condición también hubo una óptima formación de gránulos y sedimentación, 1.3 mm (diámetro) y 18.1 ± 2.1 m/h, respectivamente. Otro factor relacionado con la irradiancia es la fotoinhibición. Esta última ocurre cuando los valores de intensidad de luz exceden a los fotosistemas I y II, provocando la inhibición de microalgas, siendo el punto de fotoinhibición alrededor de 43.8 W/m^2 ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) por lo tanto es probable que las microalgas que se encuentran en las superficies de los fotobiorreactores están expuestas a mayores valores de luz y por lo tanto sean inhibidas, mientras que a mayor profundidad disminuye la intensidad y el riesgo de inhibición (González-Camejo *et al.*, 2019).

Los fotobiorreactores de placa plana tienen aplicación tanto en condiciones interiores de laboratorio como a la intemperie, consisten en un diseño robusto y compacto de forma cuboidal, en la cual sus paredes translucientes o placas planas permiten la iluminación de ambos lados de la estructura (Assunção & Malcata, 2020). Los fotobiorreactores de placa plana son ideales para la producción de biomasa de microorganismos foto-autotróficos como diversas especies de microalgas (Vo *et al.*, 2019). Este tipo de fotobiorreactores tiene una gran utilidad cuando se desea evaluar el efecto de la luz en el crecimiento celular de microalgas, en el proceso de fotosíntesis y en la acumulación de algunos productos de interés como ácidos grasos y aceites (Feng *et al.*, 2020).

1.6.2 REMOCIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES Y PATÓGENOS EN SISTEMAS MABA

Es gracias a la luz que también las microalgas pueden incidir en la remoción de contaminantes emergentes. Las microalgas no son inhibidas por los antibióticos a altas concentraciones debido a que carecen de las dianas objetivo de estos fármacos (Russell & Yost, 2021). En la literatura se ha reportado que recientemente se ha explorado la tecnología basada en microalgas como una potencial alternativa para el tratamiento de agua residual contaminada con antibióticos, demostrando que las microalgas pueden remover estos fármacos mediante adsorción, acumulación, biodegradación, foto-degradación e hidrólisis

(Leng *et al.*, 2020). De esta manera, es probable que la eliminación de los antibióticos mediada por microalgas disminuya la presión selectiva que ejercen los medicamentos sobre la comunidad bacteriana, reduciendo la propagación de GRA y BRA. El nivel de pH del sistema de microalgas puede mediar la hidrólisis de algunos antibióticos, por ejemplo un pH alcalino puede cambiar el estado iónico de la tetraciclina debido a la hidrólisis del antibiótico, mejorando su eficiencia de eliminación (Norvill *et al.*, 2017).

Se ha reportado que la irradiancia solar causa la foto inactivación de ejemplares de *Escherichia coli* resistentes a tetraciclina, mediante la deformación y daño en la membrana celular, daño en el genoma y en las proteínas citolíticas debido al incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (HO• y H₂O₂). También se demostró que la irradiancia solar es responsable de la foto degradación de genes de resistencia a tetraciclina extracelulares, disminuyendo la THG (Zhang *et al.*, 2020). Adicionalmente, los sistemas de tratamiento basados en microalgas pueden remover patógenos como las coliformes fecales gracias al proceso de fotosíntesis; cuando las microalgas consumen CO₂ aumenta el nivel de pH en el sistema, así como la concentración de O₂, factores que inhiben el crecimiento de coliformes fecales mediante fotooxidación (Dar *et al.*, 2019). Previamente un estudio sobre la inactivación y remoción de *E. coli*, coliformes totales, *Enterococcus* y *Clostridium perfringens*, empleando un sistema de tratamiento basado en microalgas (*Hydrodictyon sp.* y *Mougeotia sp.*), determinó que los valores de pH, OD y temperatura son determinantes (Liu *et al.*, 2020).

1.7 USO DE MICROALGAS PARA EL TRTAMIENTO DE EFLUENTES PORCINOS

Un ejemplo del tratamiento de aguas residuales porcinas con microalgas es el estudio realizado por Chen y colaboradores (2020), en donde emplearon el agua residual como medio de cultivo para el crecimiento de 3 cepas de microalgas autóctonas: *Chlorella sorokiniana AK-1*, *Chlorella sorokiniana MS-C1* y *Chlorella sorokiniana TJ5*. De acuerdo con este estudio se obtuvieron los mejores resultados cuando el agua residual porcícola se encontraba a una concentración del 50%, alcanzando rendimientos de remoción de 84.3, 90.4 y 99.6% % para

DQO, nitrógeno total y para fósforo total, respectivamente; a partir de concentraciones iniciales de 2345, 180 y 37.5 mg/L. En otro estudio se evaluó el potencial de *Chlorella sp.* en la remoción de nutrientes y DQO de agua residual porcina, encontrando una remoción del 80% de DQO y 50% de NH₄⁺-N, NO₃-N y PO₄³⁻, a partir de una concentración inicial de 4365, 19.7, 0.087 y 136.1 mg/L, respectivamente (Gracida-Valdepeña *et al.*, 2020).

También se ha reportado el uso de la microalga *Chlorella vulgaris* para el tratamiento de digestato porcino, en fotobiorreactores tubulares. La eficiencia de remoción simultánea de nitrógeno amoniacal y fósforo total alcanzó valores de 99 y 97 %, diluyendo el agua residual a una relación 1:7, siendo las concentraciones iniciales 1402 y 37.1 mg/L, respectivamente (Ran *et al.*, 2021).

1.7.1 REMOCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AGUAS RESIDUALES PORCINAS Y MUNICIPALES MEDIANTE MICROALGAS

Actualmente el estudio sobre la remoción de conjunta de BRA y GRA usando sistemas MABA se encuentra limitado a un trabajo (Cheng *et al.*, 2020c), en donde se empleó un sistema raceway monoalgal (*Galdieria sulphuraria*) a escala piloto (700 L) para el tratamiento de aguas residuales municipales. La remoción de bacterias resistentes a ampicilina, eritromicina, sulfametoxazol, ciprofloxacino y tetraciclina fue de 4, 2.5, 2, 1, y 1 unidades log, respectivamente. En cuanto a la remoción de GRA se obtuvo una reducción de la abundancia relativa de los genes que confieren resistencia a tetraciclinas, quinolonas, betalactámicos y macrólidos, los cuales fueron removidos en un rango de 0.62 a 3 log. En ese estudio se menciona que el nivel de pH, la concentración de oxígeno disuelto y las temperaturas en el sistema de microalgas juegan un rol crucial en la remoción de coliformes fecales.

Con respecto al digestato porcino, solo hay un estudio en donde se reporta la remoción de BRA (Mezzari *et al.*, 2017), específicamente *Salmonella Typhimurium* multirresistente empleando un consorcio de microalgas dominado principalmente por *Scenedesmus spp.* Se emplearon fotobiorreactores escala laboratorio con un volumen de trabajo de 3L y estuvieron expuestos a una irradiancia promedio de 26.6 W/m². La carga inicial del patógeno fue de 10.x10⁵ UFC/mL y el nivel de pH

inicial fue de 6.8. Después de 48 horas de tratamiento y sin controlar el nivel de pH, *Salmonella Typhimurium* fue totalmente removida del digestato porcino, los autores explican que se debió al incremento en el nivel de pH a valores superiores a 11.

Es importante señalar que en estos estudios no se investiga el efecto que podría tener la irradiación solar en la remoción de la resistencia a antibióticos a pesar de ser un factor vital para el proceso fotosintético del sistema MABA (Arcila & Buitrón, 2017) y que incide en la remoción de contaminantes emergentes (Zhang *et al.*, 2020). Si bien el destino de los principales nutrientes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales basados en microalgas-bacterias está ampliamente investigado, hay muy poca información sobre el destino de los contaminantes como BRA y GRA (Nólvak *et al.*, 2018).

2. JUSTIFICACIÓN

Los efluentes porcícolas son un potencial contaminante debido a su alto contenido de nitrógeno y fósforo (Chen *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020); así como una alta concentración de GRA, mayor que los efluentes municipales y hospitalarios, en un rango de 3 a 5 órdenes de magnitud, por tal motivo son un entorno que favorece la propagación de resistencia a antibióticos (He *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2016). Por lo tanto, es primordial el desarrollo de alternativas que puedan remover tanto contaminantes químicos como biológicos (Sabri *et al.*, 2020). El tratamiento de aguas residuales mediante sistemas MABA es una posible solución a la problemática ambiental que presenta el digestato porcino, ya que utilizan el nitrógeno y fósforo presente en el agua residual junto con la fijación de CO₂ para la generación de biomasa (Gracida-Valdepeña *et al.*, 2020). Adicionalmente se ha comprobado que los sistemas MABA son capaces de remover antibióticos, BRA y GRA en aguas residuales domésticas (Krustok, 2016; Cheng *et al.*, 2020c). Esta acción ocurre gracias a la actividad fotosintética de las microalgas (aumentan el nivel de pH, la concentración de OD y especies reactivas de oxígeno) y a las condiciones operacionales (nivel de irradiancia solar y temperatura), las cuales realizan cambios en la estructura de la comunidad microbiana pudiendo alterar significativamente la abundancia de GRA y BRA (Cheng *et al.*, 2020c; Nölvak *et al.*, 2018). Zhang y colaboradores en el 2020 comprobaron que la irradiancia solar es responsable de la foto degradación de GRA extracelulares y la foto inactivación de ejemplares de *Escherichia coli* resistentes a tetraciclina en aguas superficiales, disminuyendo la propagación de resistencia a antibióticos. La evaluación de remoción de GRA y BRA de aguas residuales empleando tecnología MABA es incipiente (Cheng *et al.*, 2020c); no se ha investigado a detalle el efecto que tienen las condiciones operacionales como el nivel de irradiancia solar, ni el tratamiento de digestato porcino. Este proyecto de tesis es el primer estudio donde se comprueba el potencial de tratamiento que tiene un sistema MABA para remover conjuntamente BRA y GRA en digestato porcino. Específicamente, se evalúa el efecto generado por 3 diferentes irradiancias solares durante la remoción de BRA y GRA en sistemas MABA, y su efecto en variables de proceso pH, temperatura y OD.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial de remoción de bacterias y genes asociados a la resistencia a antibióticos presentes en digestato proveniente efluentes porcinos mediante un sistema de microalgas-bacterias a diferentes irradiancias solares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la irradiancia solar en la remoción de bacterias resistentes a antibióticos y genes de resistencia a antibióticos en digestato proveniente de efluentes porcícolas, mediante un sistema de microalgas-bacterias en fotobiorreactores de placa plana.
- Relacionar la persistencia de BRA en el sistema de microalgas-bacterias con la presencia de genes que pueden otorgar dicha resistencia.

4. METODOLOGÍA

En la figura 3 se presentan las diferentes etapas de la estrategia experimental para cumplir los objetivos establecidos.

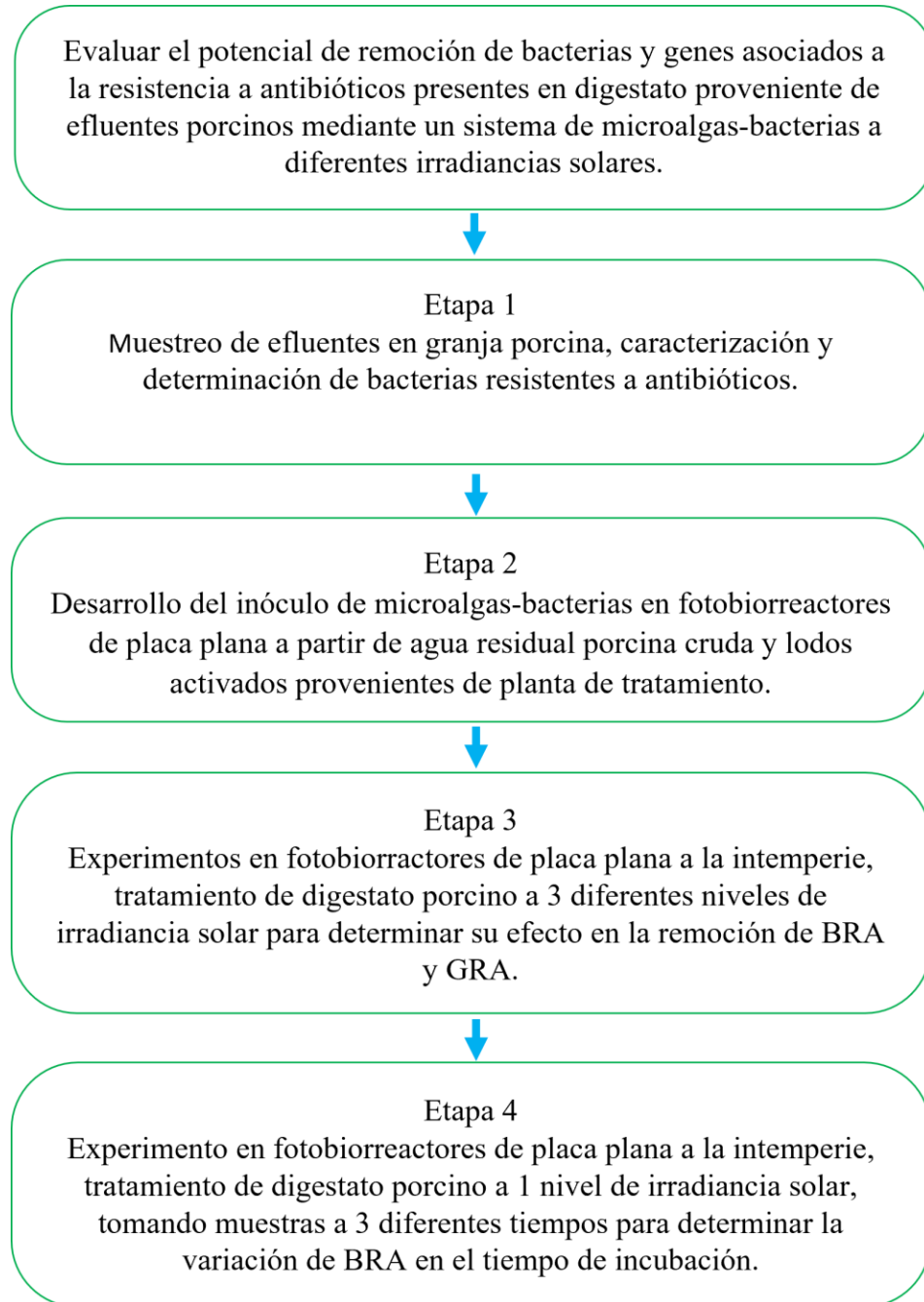


Figura 3. Estrategia experimental.

4.1 ETAPA 1, MUESTREO Y CARACTERIZACIÓN DE EFLUENTES

La primera etapa consistió en realizar el muestreo de 2 efluentes en una granja porcina ubicada en la comunidad de San Juan de Llanos, municipio de San Felipe, Guanajuato, México. La granja cuenta con un digestor anaerobio el cual realiza el tratamiento de los desechos de orina y heces fecales, mientras que su efluente (digestato) es vertido en una laguna. El primer efluente muestreado fue agua residual cruda obtenida a partir de los contenedores de desechos ubicados debajo de la zona de maternidad. El segundo efluente muestreado fue digestato obtenido en la salida del digestor anaerobio. Los puntos de muestreo se muestran en la Figura 4. Los efluentes fueron transportados en bidones y fueron conservados en refrigeración a 4°C hasta su caracterización y posterior empleo en experimentos.

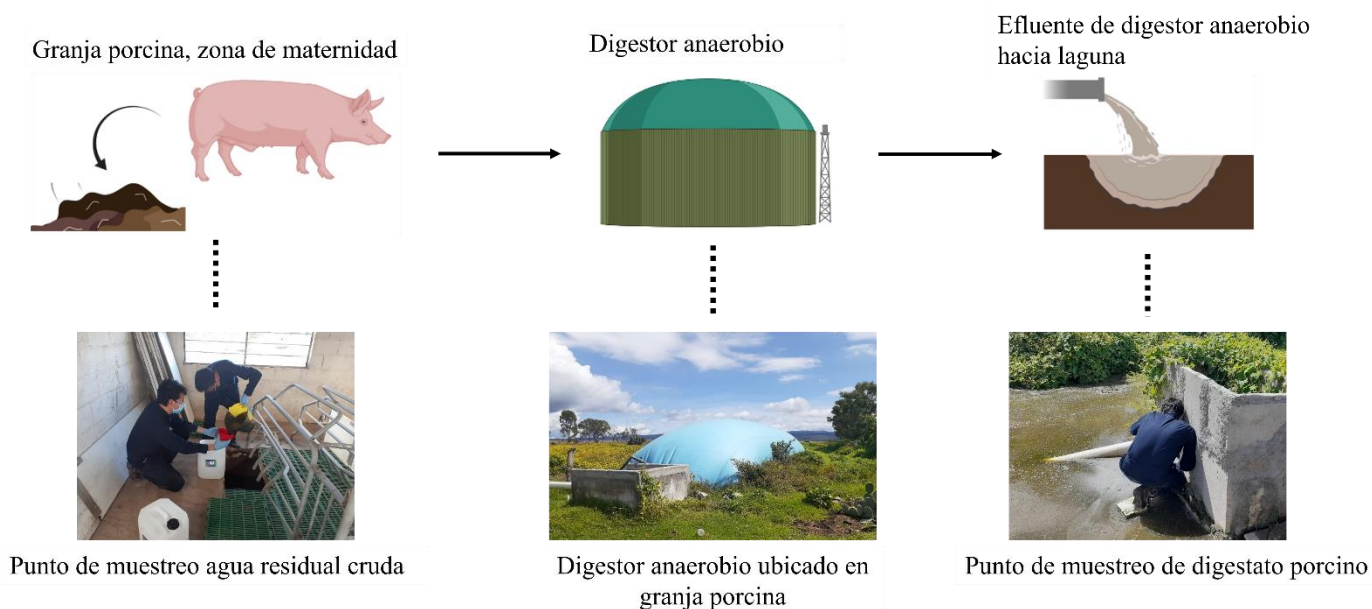


Figura 4. Diagrama de puntos de muestreo de efluentes en granja porcina.

Para la caracterización de los efluentes se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), DQO total, DQO soluble, nitrógeno amoniacal (N-NH_4), iones nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y fosfato (PO_4^{3-}) (Sección 4.7). También se determinaron unidades formadoras de colonias UFC de bacterias cultivables y resistentes a 5 antibióticos: ampicilina, ciprofloxacino, eritromicina, sulfametoxazol y tetraciclina (Sección 4.5). Adicionalmente se llevó a cabo la extracción de ADN de la muestra de digestato porcino para análisis de GRA y comunidad microbiana (Sección 4.6).

4.2 ETAPA 2, DESARROLLO DEL INÓCULO

La segunda etapa se realizó a la intemperie en la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la UNAM, Querétaro, México (20°42'31"N 100°27'29"O) durante los meses de septiembre y octubre del 2021. Consistió en desarrollar el inóculo de microalgas-bacterias, a partir de lodos activados provenientes de la planta de tratamiento de agua residuales urbanas de Santa Rosa Jauregui (Querétaro, México), utilizando como sustrato agua residual porcina cruda. Se emplearon 3 fotobiorreactores de placa plana (consiste en un diseño robusto y compacto de forma cuboidal, en la cual sus paredes translucientes o placas planas permiten la iluminación de todos los lados de la estructura) con capacidad de 6 L y con una superficie iluminada de $1800 \text{ cm}^2 = 0.18 \text{ m}^2$ (altura:30 cm, largo 20 cm, ancho:10 cm, grosor de acrílico de 6mm). Cada fotobiorreactor fue operado con un volumen de trabajo de 5 L en lote, constituido por 4 L de agua residual porcícola diluida (1:50, con agua de grifo) y 1 L de lodos activados (Arango *et al.*, 2016). El contenido de los fotobiorreactores fue mezclado mediante burbujeo de aire con bombas, mangueras y dispersores de pecera. El oxígeno disuelto, temperatura e irradiancia solar fueron monitoreados en línea con sensores VERNIER (Vernier, EUA). La adquisición de datos en línea se realizó conectando los sensores mencionados a la interfaz y software LabQuest Mini (Vernier, EUA), con el apoyo de un computador (Figura 5). El nivel de pH inicial fue de 7 y se ajustó diariamente. Se tomaron muestras del licor mezclado para determinación de SST y SSV, mientras que del sobrenadante se tomaron muestras para determinación de: DQO soluble, N-NH₄, NO₃⁻, NO₂⁻ y PO₄³⁻ (Sección 4.7). Durante este proceso se monitoreó que no hubiera ausencia de N-NH₄⁺ en el medio, debido a que se podría inhibir la proliferación de microalgas, en su caso se suministró 1 L de una solución de urea (10 mg/L) a cada fotobiorreactor. El consorcio MABA (microalgas-bacterias) fue observado al microscopio en campo claro (Nikon H550L, Nikon Instruments, EUA), y se recolectaron evidencias fotográficas (Nikon DS-Ri1, Nikon Instruments, Melville, NY. EUA). Se terminó esta etapa cuando la concentración de SSV fue cercana a 6 g/L en el licor mezclado, para poder repartir la biomasa en los 6 fotobiorreactores de placa plana empleados en la siguiente etapa experimental.

4.3 ETAPA 3, EFECTO DE LA IRRADIANCIA SOLAR

Para la etapa experimental 3 se distribuyó el inóculo en 6 fotobiorreactores de placa plana, de las mismas dimensiones y con el mismo sistema de monitoreo en línea descrito en la sección 4.2. La operación de esta etapa se realizó en el mes de noviembre del 2021. Cada reactor fue operado con un volumen de trabajo de 5 L en lote, constituido por 1 L de digestato porcino, 1 L de inóculo de microalgas bacterias y 3 L de agua del grifo. Al inicio del experimento se determinó SST y SSV a partir del licor mezclado, mientras que del sobrenadante se determinó: DQO soluble, N-NH₄, NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄³⁻ (Sección 4.7) y UFC de BRA (Sección 4.5). Se evaluaron 3 diferentes niveles de irradiancia solar denominadas: baja (IB), media (IM) y alta (IA), con valores máximos de 60 ± 9, 212 ± 9 y 373 ± 21 W/m², respectivamente; utilizando dos réplicas para cada irradiancia. La IB e IM, se controlaron cubriendo los fotobiorreactores con malla sombra, es importante mencionar que estos 2 valores son considerados como altos en muchas partes del mundo (Arcila & Buitrón, 2017), sin embargo, para fines del presente proyecto de investigación se nombraron los 3 niveles evaluados como alto, medio y bajo. La IA se logró al exponer directamente los fotobiorreactores sin malla (Figura 5). Para evaluar el efecto de la irradiancia, los fotobiorreactores se operaron en 3 lotes secuenciales durante 10 días cada uno. Al término de cada lote se tomaron muestras del licor mezclado para determinación de SST, SSV. Posteriormente se dejó sedimentar el sistema para separar los agregados MABA del sobrenadante, retirando 4 L aproximadamente de sobrenadante y empleándolo para determinación de: DQO soluble, N-NH₄, NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄³⁻ (Sección 4.7) y UFC de BRA (Sección 4.5). Después de retirar el sobrenadante se completó el volumen de trabajo para el siguiente lote, adicionando 1L de digestato y 3 L de agua de grifo. Se recolectaron agregados MABA de las 3 condiciones al final del segundo lote para medir la velocidad de sedimentación (VS, m/h), el índice volumétrico de lodos (IVL, mL/g SSV) y la distribución de tamaño de gránulos (escáner digital G3110, Hewlett-Packard Company, EE.UU.). Como control negativo se utilizó un contenedor de acrílico con capacidad de 1.2 L (altura: 16 cm, diámetro: 15.4 cm, grosor acrílico de 6mm), el volumen de trabajo estuvo constituido por 0.2 L de digestato porcino, 0.2 L de inóculo de microalgas-bacterias y 0.6 L de agua del

grifo. El contenedor fue cubierto en su totalidad con papel aluminio para evitar el paso de irradiación solar, el contenedor se encontraba junto a los fotobiorreactores de placa plana como se muestra en la Figura 5.

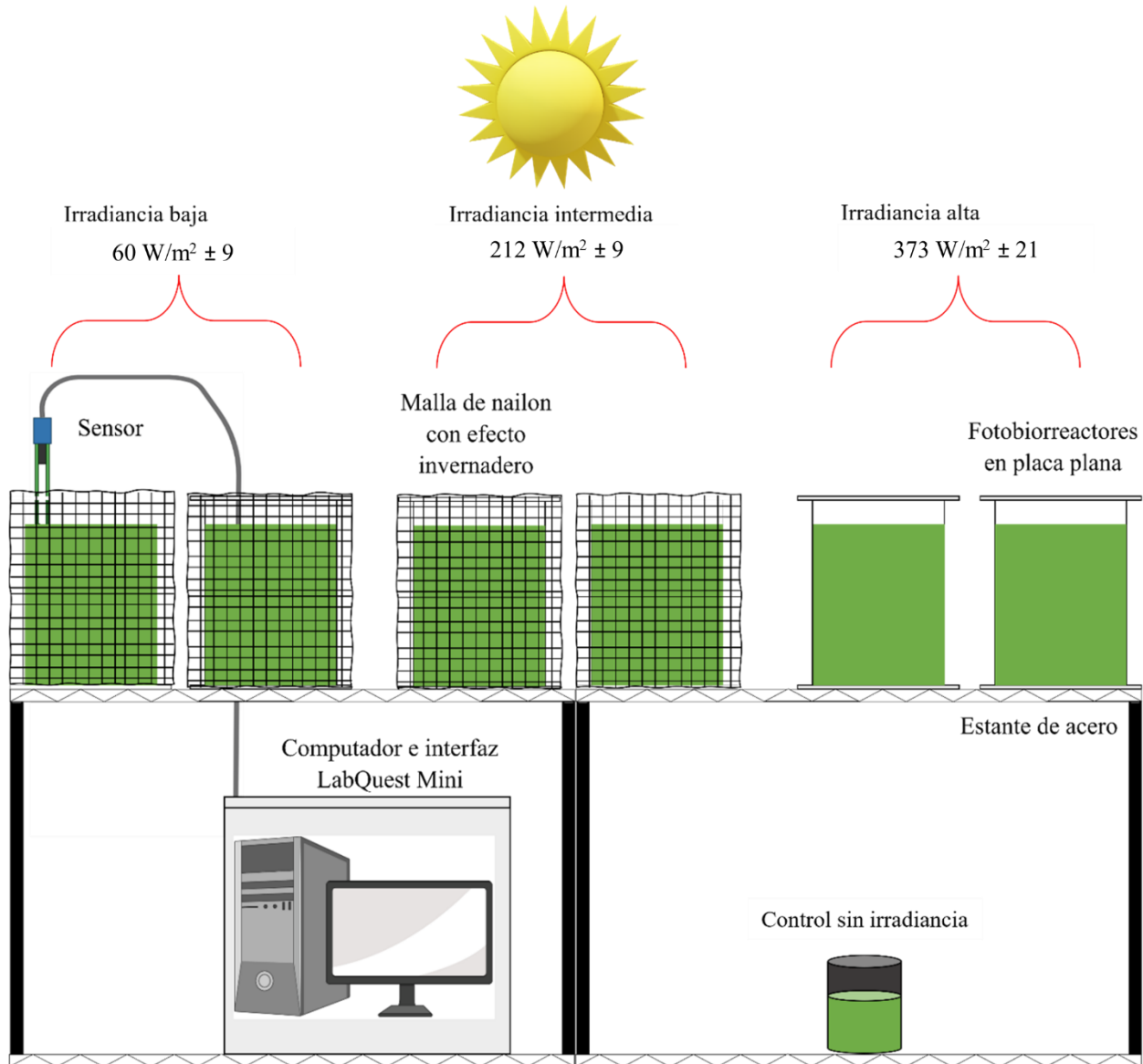


Figura 5. Ilustración de estación de trabajo con fotobiorreactores de placa plana al exterior.

4.4 ETAPA 4, DETERMINACIÓN DE BRA A DIFERENTES TIEMPOS

A partir de los resultados obtenidos en la etapa anterior, en términos de remoción de BRA se realizó un experimento empleando 2 fotobiorreactores expuestos a la condición IM con el mismo sistema de monitoreo. En esta etapa se realizaron 3 puntos de muestreo del sobrenadante: al inicio del experimento o tiempo 0 (IM-T0), 1 día (IM-T1) y 10 días (IM-T10), para determinar la variación en el número de

UFC cultivables y resistentes a antibióticos en el tiempo. Se llevó a cabo la extracción de ADN del sobrenadante de este último lote considerado como efluente, para análisis de GRA y de la comunidad microbiana (Sección 4.6).

4.5 DETERMINACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS (BRA)

Para la determinación de BRA se recolectaron muestras de agua residual porcina cruda, digestato porcino (sección 4.1), sobrenadante de los fotobiorreactores al inicio del experimento a 3 diferentes niveles de irradiancia solar y al final de cada lote tanto de la tercera (sección 4.3) como de la cuarta etapa (sección 4.4), considerándose las 2 últimas muestras como el efluente del tratamiento de digestato porcino mediante el sistema MABA. Las muestras fueron recolectadas en tubos Falcon estériles y se almacenaron en refrigeración (máximo 24 horas). Se empleó el método de recuento en placas heterotróficas para cuantificar la presencia de BRA en las muestras especificadas. Cinco tipos de fármacos fueron elegidos para cuantificar a las bacterias resistentes: tetraciclina 16 mg/L, eritromicina 8 mg/L, sulfametoxazol 50.4 mg/L, ampicilina 32 mg/L y ciprofloxacino 4 mg/L, debido a que son los antibióticos cuyos GRA están reportados en efluentes porcícolas (Sui *et al.*, 2019; Tao *et al.*, 2014). Se utilizó agar R2A (BD, Difco) como medio de cultivo con las concentraciones de antibióticos previamente mencionadas, además de la adición de 50 mg/L de nistatina para prevenir el crecimiento de hongos. Cada antibiótico fue empleado por separado en los medios de cultivo. El volumen de las muestras a analizar fue de 0.1 mL. Las muestras se diluyeron 4 veces en serie a una relación 1:10 y se esparcieron sobre las placas que contenían la concentración específica de antibiótico mediante la técnica de propagación con ayuda de un asa de vidrio. Todos los análisis fueron conducidos en duplicado. Las placas fueron incubadas por 48 h a 37°C. Se registraron las UFC y se convirtieron los valores a Log UFC/g SSV para determinar la concentración de BRA en la biomasa de las muestras, lo cual permitió visualizar el rendimiento del sistema MABA en la remoción de BRA (Cheng *et al.*, 2020c).

Posteriormente, se realizó una muestra compuesta partir de la biomasa de UFC resistentes a antibióticos que creció de los lotes de la tercera etapa (sección 4.3) y se realizó una segunda muestra compuesta a partir del lote de la cuarta etapa

(Sección 4.4). Para realizar las muestras compuestas, se recolectaron con un asa bacteriológica 60 µg de biomasa de UFC resistentes a antibióticos que crecieron en cada uno de los 5 diferentes medios de cultivo adicionados con antibiótico y fueron mezclados en un tubo Eppendorf, posteriormente se llevó a cabo la extracción de ADN para análisis de GRA y de la comunidad microbiana (Sección 4.6).

4.6 EXTRACCIÓN DE ADN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Se realizó la extracción de ADN de las muestras anteriormente mencionadas para determinar la estructura de la comunidad microbiana a través del metagenoma y para cuantificar los GRA presentes. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta el momento de la extracción. Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico utilizando el kit DNeasy PowerSoil de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Alemania). La concentración del ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría utilizando un NANODrop 2000c (Thermo Scientific, EUA). Las muestras de ADN fueron secuenciadas usando la plataforma NextSeq, Illumina (2X, ~8 millones PE 150 + 150 pb lecturas) en el Laboratorio de Recursos de Microbioma Integrado (IMR) en la Universidad de Dalhousie (Halifax, Canadá). El procesamiento del secuenciamiento de ADN metagenómico consistió en recortar adaptadores y tramos de nucleótidos de baja calidad empleando Trim Galore (v0.6.5) (Yoo *et al.*, 2020). MEGAHIT (v1.2.9) fue usado para ensamblar lecturas limpias en contigs (Nölvak *et al.*, 2018). Los contigs resultantes fueron alineados contra la base de datos Integral de Resistencia a los Antibióticos (por sus siglas en inglés CARD), usando BLASTP, con un límite de valor *e* de 10⁻⁵ (McArthur *et al.*, 2013). Una lectura se consideró como una secuencia de GRA si el resultado mostraba una identidad ≥80% y como un bitcore si tenía ≥50. Los niveles de GRA o secuencias similares a elementos móviles en el presente trabajo se describen utilizando la unidad de “ppm” (una lectura en un millón de lecturas) el cual es definido como la porción de GRA o secuencias similares a elementos móviles en el total de secuencias metagenómicas (Yang *et al.*, 2013).

Las secuencias procesadas se cargaron en el servidor de Metagenomics Rapid Annotation usando Subsystems Tchnology (MG-RAST) (Meyer *et al.*, 2008). Los

perfiles taxonómicos se generaron utilizando la base de datos RefSeq con 95% de identidad, 50 de longitud y 1 de mínima abundancia.

4.7 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

La determinación de nitrógeno amoniacal se realizó con el método Hach 10031-nitrógeno amoniacal (EUA) basado en el método Salicilato con rango de 0 a 50 mg NH₃-N/L. La DQO se determinó de acuerdo con el método de Hach 8000-DQO (EUA), basado en el método del dicromato a flujo cerrado. La determinación de los iones fosfato, nitrito y nitrato se realizó mediante cromatografía iónica empleando el equipo Dionex ICS 1500 (Thermo Scientific TM, EUA) equipado con una columna capilar IonPac AS23 (0.4 x 250 mm) y un detector de conductividad. El análisis fue realizado a 30°C usando una solución de Na₂CO₃/NaHCO₃ (proporción de concentración 4.5 mM/0.8 mM) como fase móvil a una tasa de flujo de 0.8 mL/min y presión de trabajo de 1860 psi (Quijano *et al.*, 2021). Para la determinación de SST y SSV se utilizaron métodos estándar (APHA, 2005). La distribución de tamaño de los MABA se determinó de acuerdo con (Oliveira *et al.*, 2018), en resumen, a partir de 5 mL de agregados los gránulos se separaron de los materiales particulados por sedimentación, capturando imágenes de los gránulos (escáner digital G3110, Hewlett-Packard Company, EE.UU.), midiendo sus dimensiones computacionales. Las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ (versión 1.52a). El tamaño de un agregado fue determinado con el diámetro Feret, como ha sido reportado para el tamaño de los flóculos de microalgas (Vandamme *et al.*, 2014). La velocidad de sedimentación (VS, m/h) y el Índice volumétrico de lodos (IVL, mL/g SSV) se determinaron mediante (APHA, 2005).

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizaron análisis de variancia (ANOVA) seguidos de pruebas de Tukey para evaluar la significancia del efecto de las distintas irradiancias solares evaluadas (RStudio versión 4.2.0). También se realizó un análisis multivariado para determinar la correlación entre las condiciones ambientales evaluadas y la variación de Log UFC resistentes a antibióticos (RStudio versión 4.2.0, paquete 1.0.2-2.1).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN DE EFLUENTES PORCINOS

En la literatura se ha reportado el rendimiento de digestores anaerobios en el tratamiento de agua residual porcina cruda, alcanzando los porcentajes de remoción promedio de DQO soluble, N-NH_4^+ , PO_4^{3-} , SST y SSV, de 99%, 92%, 91%, 26%, 83%, respectivamente (Garzón-Zúñiga & Buelna, 2014). En la primera etapa del presente proyecto de investigación, al caracterizar el agua residual porcina cruda y el digestato se puede observar que el desempeño de remoción promedio fue similar o mayor de los discutidos, excepto para N-NH_4^+ (Garzón-Zúñiga & Buelna, 2014). Considerando las concentraciones del agua residual porcina cruda (ARPC) y el digestato porcino (DP) (Figura 6), las eficiencias de remoción del digestor fueron para DQO total, DQO soluble, N-NH_4^+ , PO_4^{3-} , SST y SSV, 98%, 90%, 44%, 62.5%, 97.8% y 97.64%, respectivamente.

Se ha reportado que la digestión anaerobia es un proceso que favorece la propagación de la resistencia a antibióticos debido a las concentraciones sub inhibitorias de estos fármacos que ingresan al reactor mediante el agua residual cruda, ejerciendo una presión selectiva sobre una alta densidad bacteriana, facilitando la transferencia horizontal de genes entre células bacterianas mediante plásmidos o integrones (Cheng *et al.*, 2020c). Siguiendo dicho comportamiento de aumento en la digestión anaerobia, en el presente proyecto se observó un aumento en el número de UFC de BRA en el digestato porcino con respecto al agua residual cruda que ingresó al digestor (Figura 7). Las UFC resistentes a ciprofloxacino, eritromicina, sulfametoxazol y tetraciclina incrementaron 0.88 log, 0.07 log, 0.37 log y 1.48 log, respectivamente, mientras que solamente hubo una remoción de UFC resistentes a ampicilina (0.76 log).

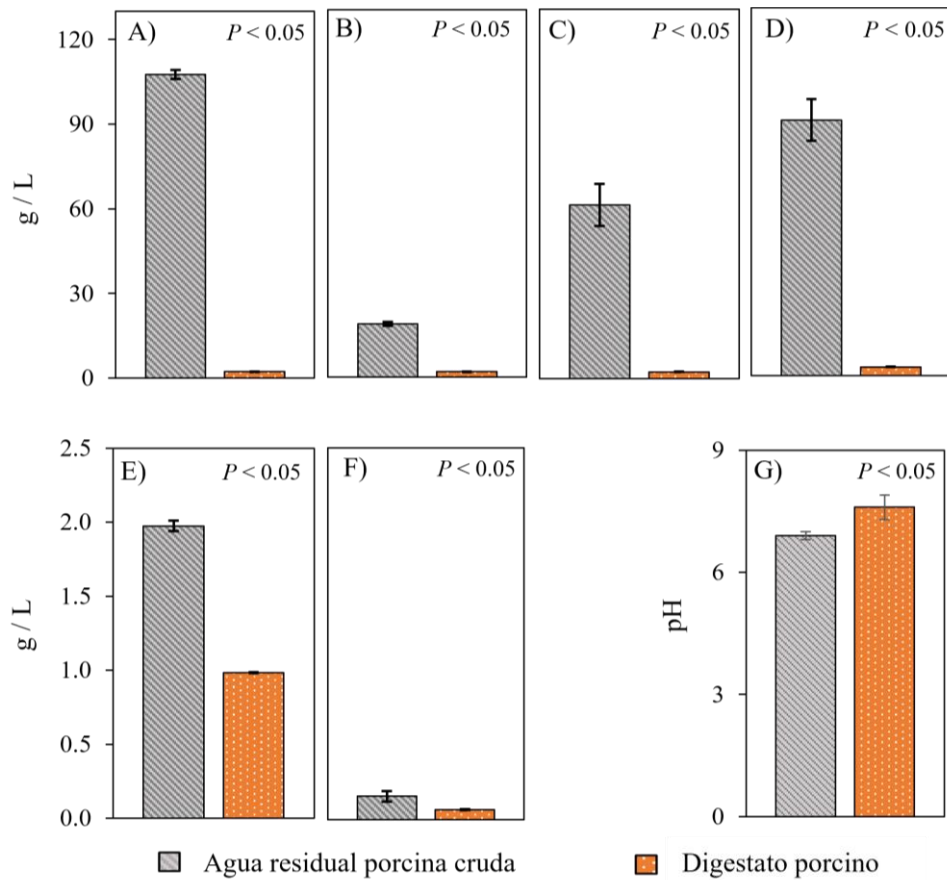


Figura 6. Caracterización de agua residual porcina cruda y digestato porcino. A) DQO total, B) DQO soluble, C) SST, D) SSV, E) Nitrógeno amoniacal, F) Ion fosfato, G) Nivel de pH. $P < 0.05$, indica que existe una diferencia significativa con una certeza del 95%, ANOVA.

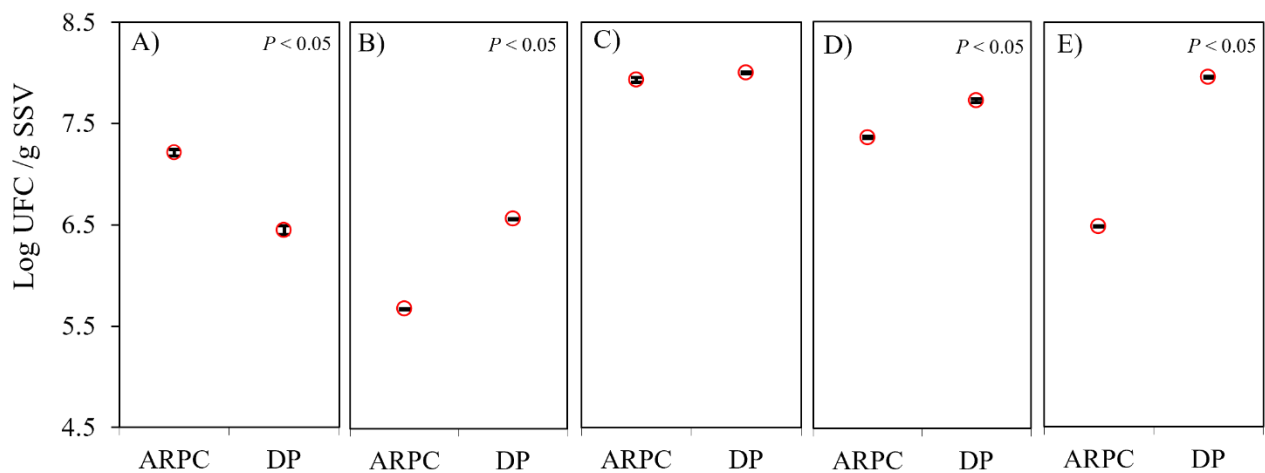


Figura 7. Cuantificación de bacterias resistentes a diferentes antibióticos. A) Ampicilina, B) Ciprofloxacino, C) Eritromicina, D) Sulfametoxazol, E) Tetraciclina. $P < 0.05$, indica que existe una diferencia significativa con una certeza del 95%, ANOVA.

5.2 DESARROLLO DE INÓCULO MICROALGAS-BACTERIAS

La irradiancia solar máxima observada durante el desarrollo del inóculo de microalgas-bacterias (Tabla 4), puede considerarse como alta en la mayor parte del mundo (Arcila & Buitrón, 2017). Al inicio de la etapa los fotobiorreactores presentaban una coloración café debido al digestato porcino. La coloración cambió a verde a partir del día 5, debido al crecimiento de microalgas (Figura 8).

Tabla 4. Condiciones operacionales durante el desarrollo del inóculo de microalgas-bacterias

Parámetro	Valores registrados
Nivel de pH	8.2 ± 0.4
Oxígeno disuelto mínimo (g/L)	5.0 ± 1.5
Oxígeno disuelto máximo (g/L)	9.1 ± 2.2
Irradiancia solar máxima (W/m^2)	421 ± 183
Temperatura máxima ($^{\circ}C$)	34.0 ± 2.3
Temperatura mínima ($^{\circ}C$)	13.0 ± 1.6

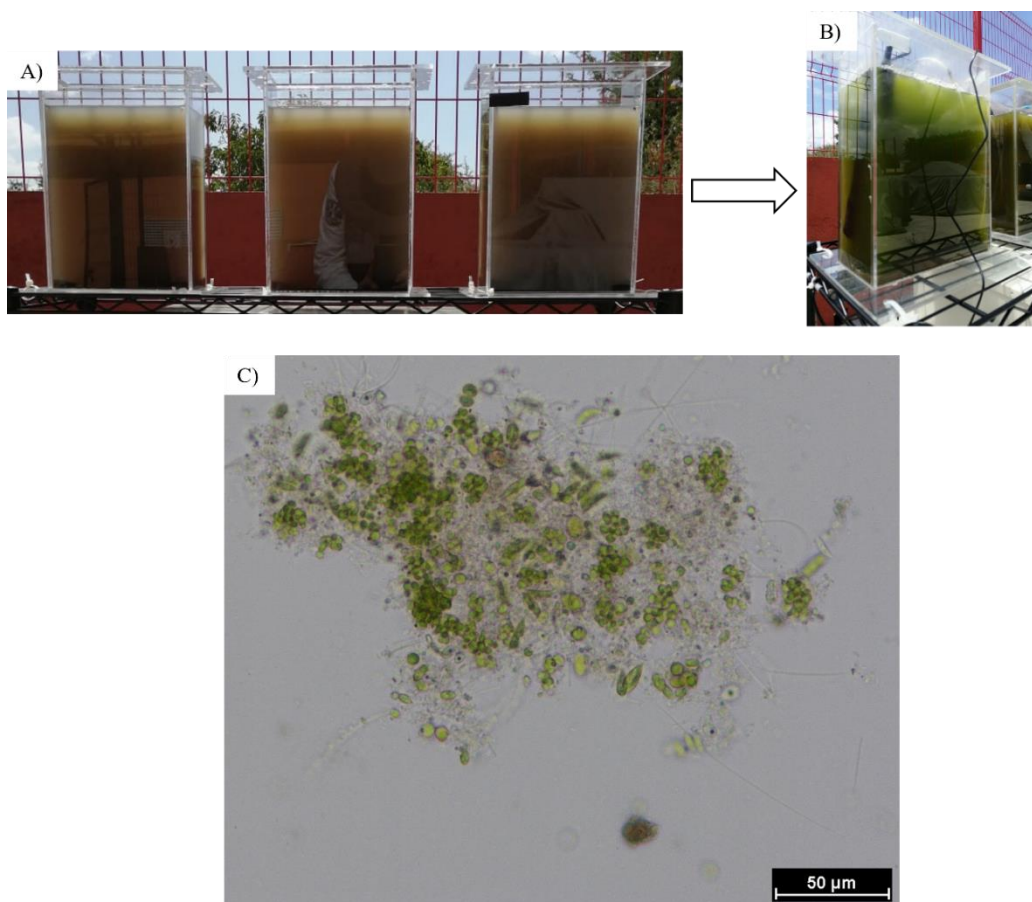


Figura 8. Desarrollo de biomasa microalgas-bacterias. A) Fotobiorreactores al tiempo 0, B) Fotobiorreactores a las 120 horas, C) Observación al microscopio de microalgas en fotobiorreactores a las 120 horas.

Durante el desarrollo del inóculo se observó una remoción de materia orgánica y nutrientes, del 80%, 85%, 99% y 95%, para DQO soluble, N-NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻ y PO₄³⁻, respectivamente. Esta remoción se explica por el aumento de la biomasa (2.4 veces) de microalgas-bacterias en términos de SSV (Figura 9). La remoción de estos valores es comparable con los reportados en la literatura, en donde se empleó digestato porcino para la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactores tubulares expuestos a una irradiancia máxima de 44 W/m², en donde la remoción de N-NH₄⁺, PO₄³⁻ fue del 99% y 97%, respectivamente, mientras que la producción de biomasa fue de 2.6 g/L.

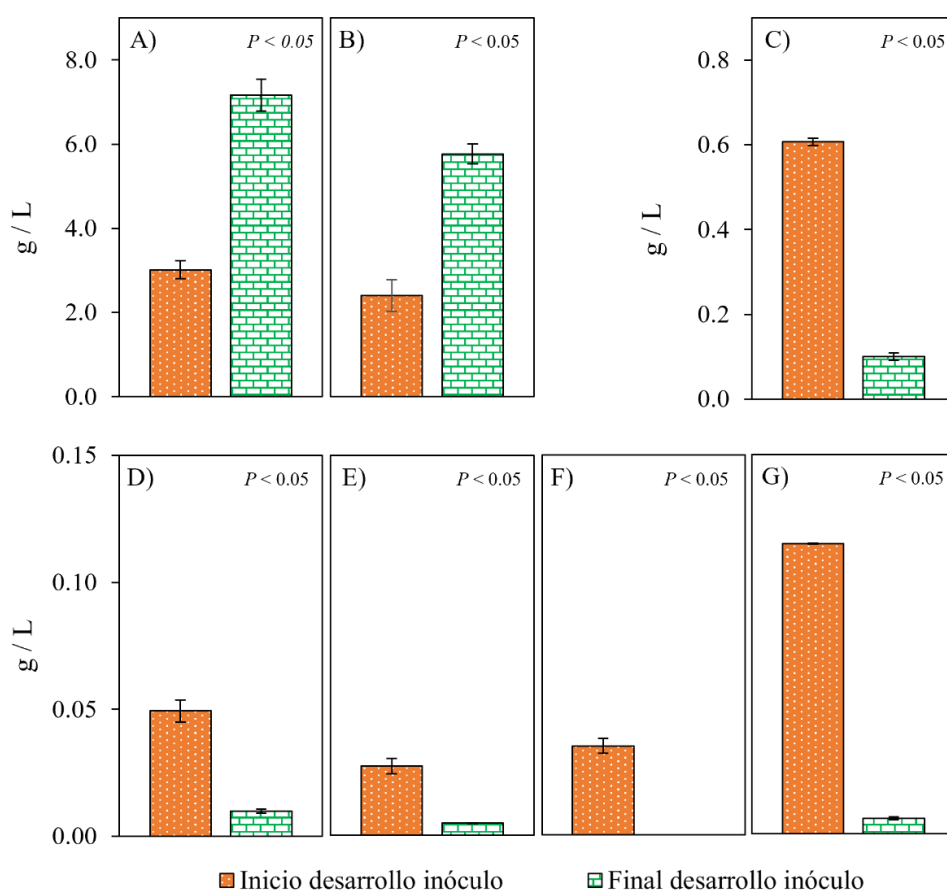


Figura 9. Determinación de fisicoquímicos al inicio y final del desarrollo de inóculo. A) SST, B) SSV, C) DQO soluble, D) Nitrógeno amoniacal, E) Ion nitrato, F) Ion nitrito, G) Ion fosfato. $P < 0.05$, indica que existe una diferencia significativa con una certeza del 95%, ANOVA.

5.3 EFECTO DE LA IRRADIANCIA EN EL TRATAMIENTO DE DIGESTATO PORCINO

La Figura 10 muestra los fotobiorreactores de placa plana expuestos a la intemperie. El uso de la malla logró diferenciar la exposición a diferentes niveles de irradiancia para cada tratamiento (AI, IM, o IB). La condición IM obtuvo 43% menos de irradiancia solar con respecto a la condición IA, mientras la condición IB que estuvo cubierta por 2 capas obtuvo 85% menos irradiancia solar con respecto a la condición IA (Figura 11 A).

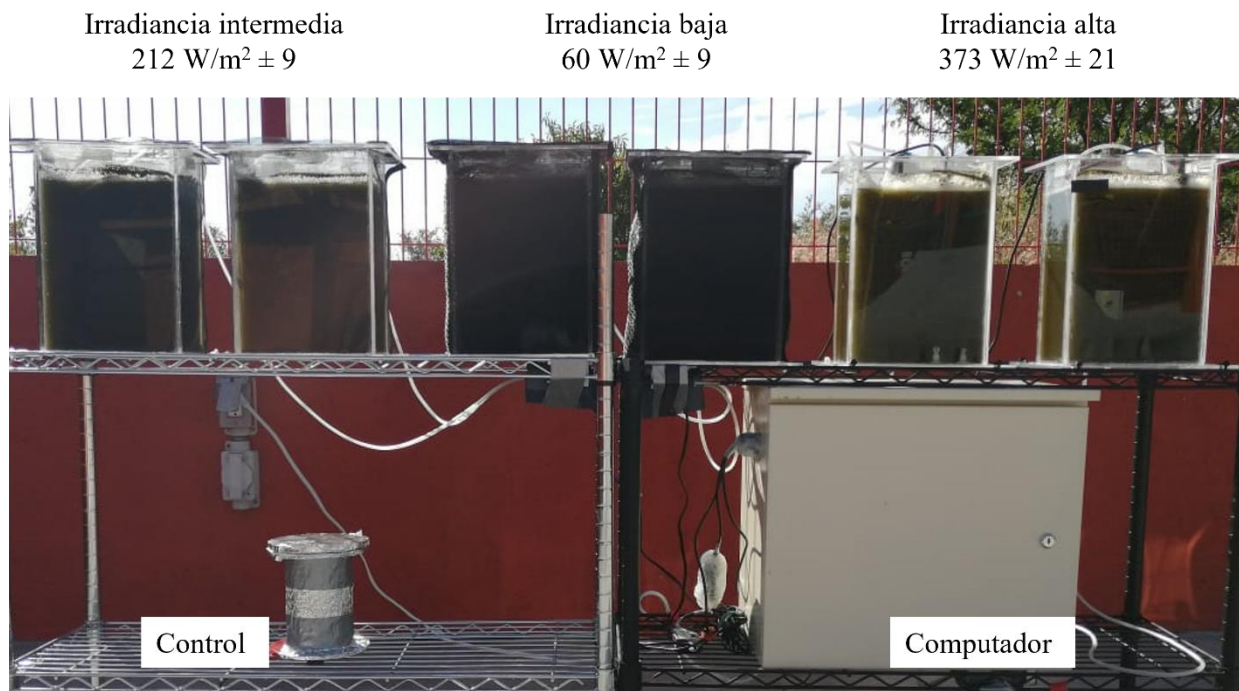


Figura 10. Fotobiorreactores de placa plana.

La variación en los valores obtenidos de temperatura y concentración máxima de OD en las diferentes condiciones se debe a la diferencia en el nivel de exposición a la irradiancia solar. La condición IA registró los mayores valores promedio de temperatura, OD (Figura 11) y producción de biomasa (Figura 12B) siendo 30.1 ± 3.4 °C, 9.82 ± 0.6 mg O₂/L y 3.2 ± 0.05 g/L, respectivamente. Estos resultados no presentan diferencia significativa con respecto a los valores obtenidos en la condición IM. En cuanto al nivel de pH no existió una diferencia significativa entre las condiciones debido a que se controló diariamente a un valor de 7.

Respecto a la remoción de nutrientes y materia orgánica, la IA alcanzó el mayor porcentaje de remoción de DQO soluble y PO_4^{3-} , siendo 70% y 49%, respectivamente, siendo solo significativamente diferente la DQO en comparación con las condiciones IM e IB (Figura 12). La IM alcanzó el mayor porcentaje de remoción de N-NH_4^+ (55%).

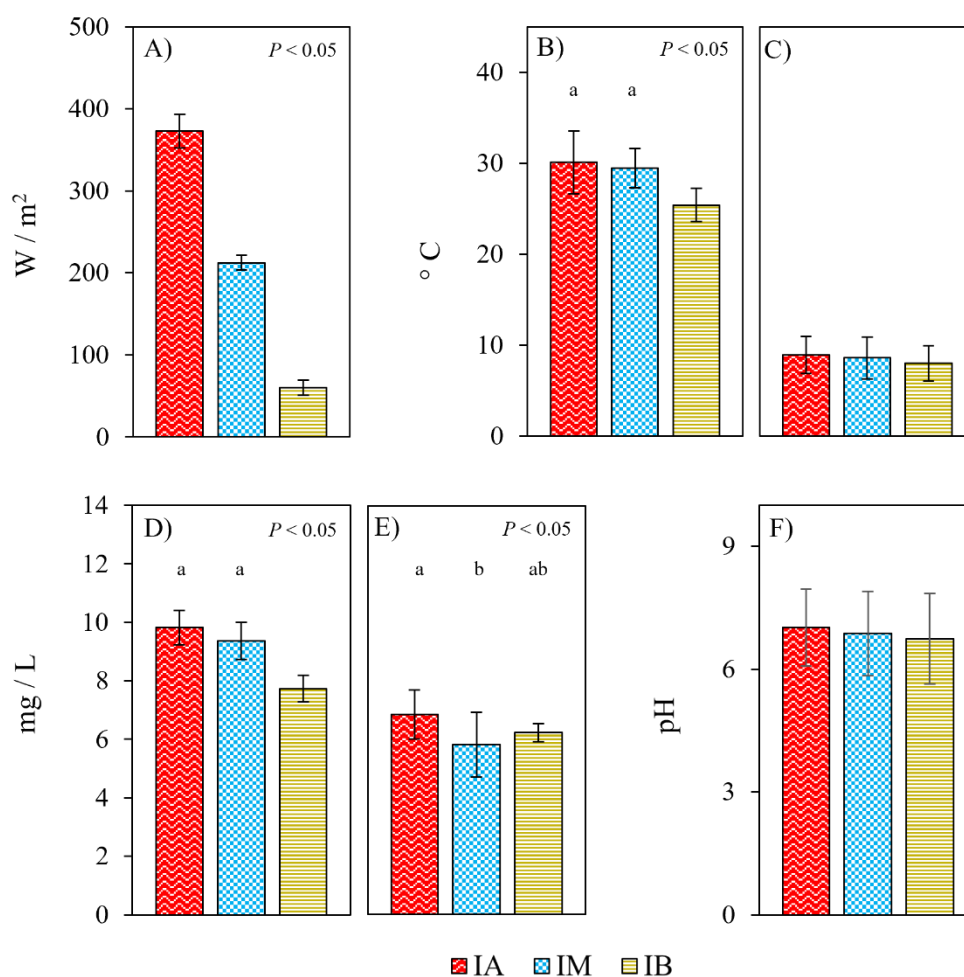


Figura 11. Factores operacionales obtenidos por condición experimental. A) Irradiancia solar máxima, B) Temperatura máxima, C) Temperatura mínima, D) Oxígeno disuelto máximo, E) Oxígeno disuelto mínimo, F) Nivel de pH. IA, IM y IB corresponden a irradiación alta, media, y baja respectivamente. $P < 0.05$, indica que existe una diferencia significativa con una certeza del 95%, ANOVA. (a, b, c, d) = No hay diferencia significativa (Tukey).

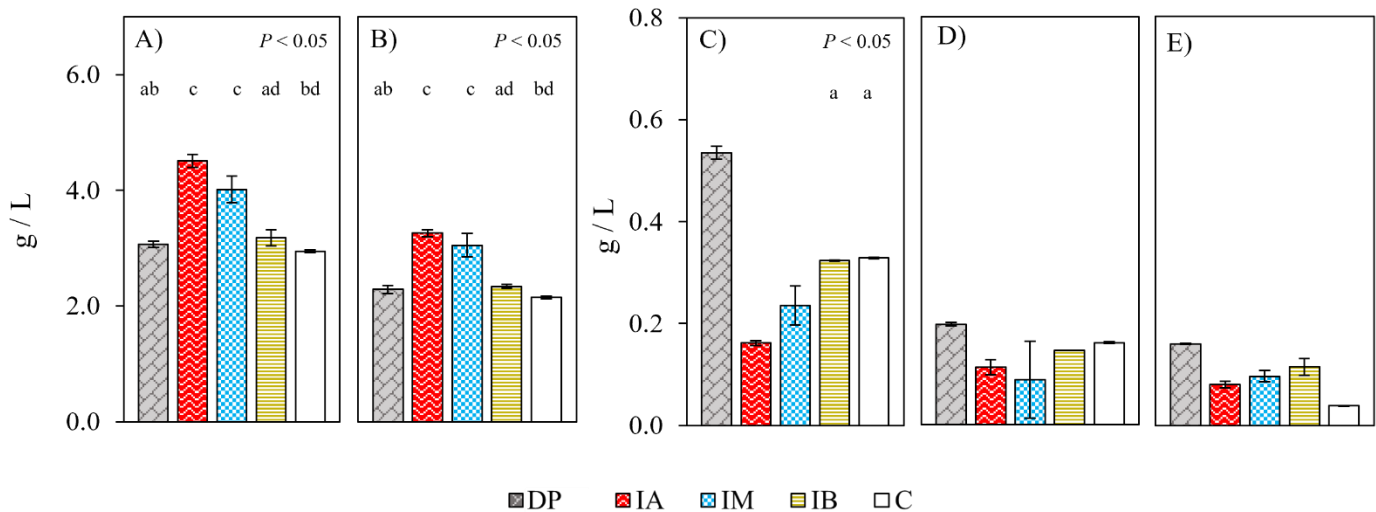


Figura 12. Análisis fisicoquímicos a las diferentes irradiancias evaluadas, Alta, Media y Baja, IA, IM y IB, respectivamente. Así como del digestato alimentado (DP) y reactor control en oscuridad (C). A) SST, B) SSV, C) DQO soluble, D) Nitrógeno amoniacal, E) Ion fosfato. $P < 0.05$, indica que existe una diferencia significativa con una certeza del 95%, ANOVA. (a, b, c, d) = No hay diferencia significativa (Tukey).

En cuanto a la caracterización de la biomasa MABA, se puede observar en la figura 13 que la mayoría de las frecuencias relativas de tamaño de gránulo entre las 3 condiciones no tienen diferencia significativa, sin embargo, la condición IA registró una mayor abundancia relativa de gránulos con diámetros mayores a 2 mm, siendo este valor y el registrado por la condición IB los únicos que tienen una diferencia significativa entre sí. La velocidad de sedimentación de los gránulos en IA fue 31% y 50% mayor con respecto a los valores obtenidos en las condiciones IM e IB, respectivamente. La velocidad de sedimentación obtenida por los gránulos de la IM fue 0.5 m/h inferior a la obtenida por IA, mientras que en el índice volumétrico de lodos no hubo una diferencia significativa entre las 2 condiciones.

En cuanto a granulometría, en IB no se obtuvieron gránulos con diámetro mayor a 2 mm, la velocidad de sedimentación y el índice volumétrico de lodos también fueron los más bajos registrados siendo 0.08 m/h y 0.001 L/gSST, respectivamente. Los resultados muestran el impacto que tiene la irradiancia solar en el sistema de microalgas-bacterias, siendo que a menor exposición (60 ± 9

W/m²) se obtienen los menores rendimientos, probablemente la irradiancia recibida no sea la suficiente para llevar a cabo el proceso fotosintético de manera adecuada, lo que se puede inferir a partir del bajo nivel de oxígeno disuelto máximo registrado (7.73 ± 0.45 mg/L). También puede ser comprobado al observar el valor de SSV obtenido (Figura 12B) por la condición IB, el cual no tuvo un incremento significativo con respecto al sustrato de digestato porcino a tratar y el reactor control en oscuridad, sin embargo, se registró la producción de oxígeno disuelto probablemente por la biomasa de microalgas presente en el inóculo y debido al oxígeno presente en el aire burbujeadado para el mezclado de los fotobiorreactores. La retención de la concentración de oxígeno disuelto en la condición IB puede deberse a la temperatura, ya que se ha reportado que en aguas residuales a una temperatura de 25°C se puede alcanzar una concentración de OD de 8.2 mg/L (Aliwasi, 2020).

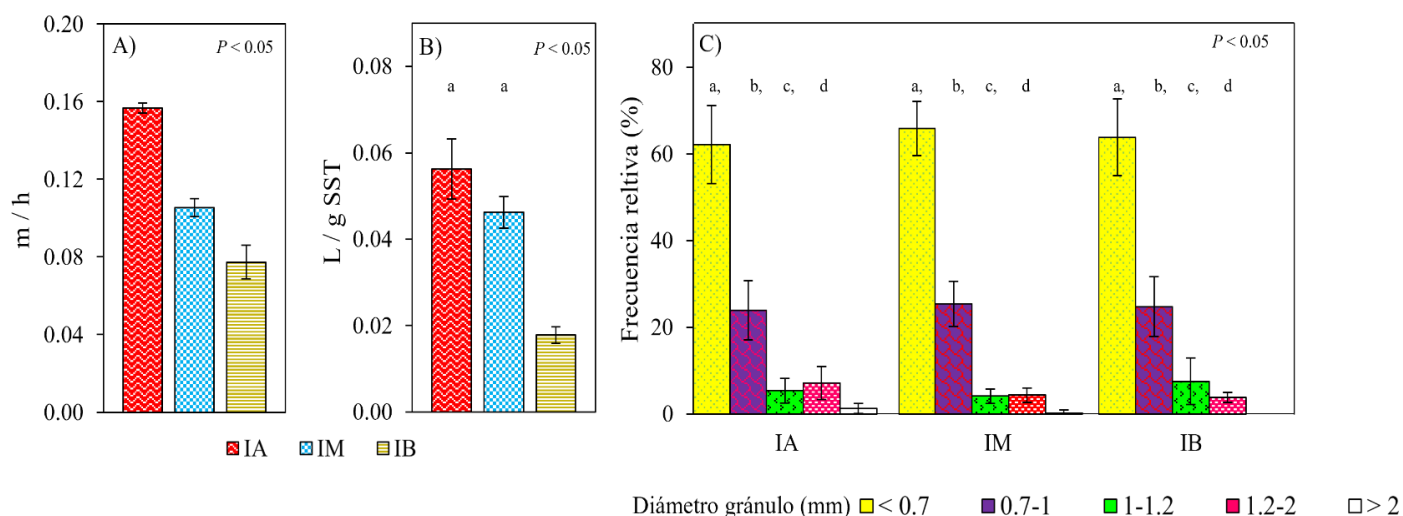


Figura 13. Caracterización física de la biomasa MABA. Obtenida a diferentes condiciones de irradiancia, Alta, Media y Baja, IA, IM y IB, respectivamente. A) Velocidad de sedimentación, B) Índice volumétrico de lodos, C) Granulometría. $P < 0.05$, indica que existe una diferencia significativa con una certeza del 95%, ANOVA. (a, b, c, d) = No hay diferencia significativa (Tukey).

En la literatura solo se ha reportado un estudio sobre el uso de microalgas-bacterias para el tratamiento de digesto porcino en fotobiorreactores de placa plana (Sun *et al.*, 2019). Se empleó el digestato porcino sin diluir y los valores

iniciales de DQO soluble, nitrógeno y fósforo totales fueron 0.8 g/L, 0.4 g/L y 5×10^{-3} g/L, respectivamente, mientras que la remoción debido al tratamiento fue del 86%, 72% y 87%, respectivamente. La producción de biomasa reflejada en los SSV fue de 0.61 g/L. Los valores de remoción y producción reportados por Sun y colaboradores (2019) fueron mayores a los obtenidos en el presente proyecto de investigación probablemente por la irradiancia solar a la que fueron expuestos los fotobiorreactores ya que fue de 438 W/m^2 , 15% mayor a la condición IA.

5.3.1 CUANTIFICACIÓN DE BRA DURANTE EL TRATAMIENTO DE DIGESTATO.

Dentro la tercera etapa experimental se determinó la variación de UFC de BRA durante el tratamiento de digestato porcino a 3 diferentes condiciones de irradiancia solar (Figura 14). Coincidente con la actividad fotosintética observada, la remoción de materia orgánica y nutrientes en la IA y IB, presentaron remociones significativamente similares para BRA resistentes a sulfametoxazol y tetraciclina, en el rango de 0.3 y 1.4 log, respectivamente. Mientras que la IM removió significativamente mayores UFC relacionadas con la resistencia a ciprofloxacino y eritromicina, hasta 0.4 y 0.7 log, respectivamente (Figura 14).

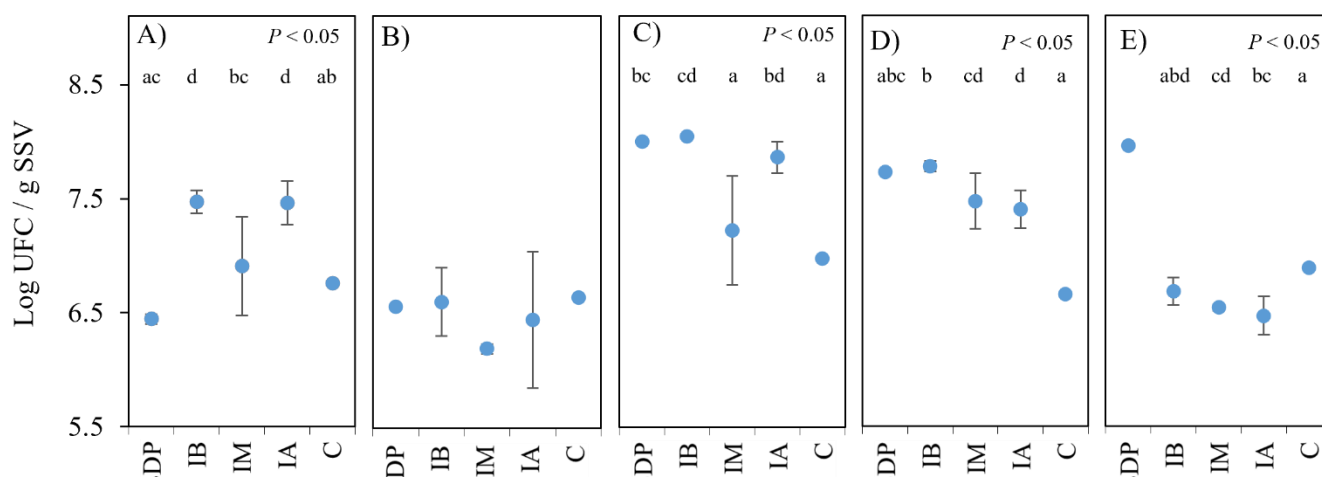


Figura 14. Cuantificación de UFC de bacteria resistentes A) ampicilina, B) ciprofloxacino, C) eritromicina, D) sulfametoxazol, y E) tetraciclina, ante diferentes condiciones de irradiancia, alta, media y baja, digestato porcino y control, IA, IM, IB, DP y C, respectivamente. Así como del digestato alimentado y reactor control en oscuridad. $P < 0.05$, indica que existe una diferencia significativa con una certeza del 95%, ANOVA. (a, b, c, d) = No hay diferencia significativa (Tukey).

Por otro lado, los tratamientos también favorecieron la proliferación de bacterias resistentes a ampicilina, 1 log y 0

.4 log, en IA e IM, respectivamente (Figura 14). Esta condición que favoreció la propagación de BRA se observó para la mayoría de los antibióticos en IB, aumentando los valores log de UFC resistentes a ampicilina, ciprofloxacino, eritromicina y sulfametoxazol, 1, 0.1, 0.4 y 0.05 respectivamente. En esta última condición, solamente se logró remover 1.2 log de UFC resistentes a tetraciclina (Figura 14).

En el estudio de Cheng y colaboradores (2020c) se empleó un sistema raceway con un inóculo de microalgas (300 L) para la remoción de resistencia a antibióticos de efluentes primarios provenientes de aguas residuales municipales, sin enfocarse en la remoción o análisis de sólidos, DQO y nutrientes. El sistema raceway fue operado a la intemperie en Las Cruces Nuevo México, en donde se registraron altas temperaturas (40-46 °C) dentro del biorreactor. Las concentraciones iniciales de bacterias resistentes a ampicilina, ciprofloxacino, eritromicina, sulfametoxazol y tetraciclina fueron aproximadamente: 4 log/mL, 3 log/mL, 4 log/mL, 4.1 log/mL y 1.7 log/mL, respectivamente, mientras que gracias al tratamiento con microalgas se alcanzaron las remociones de 4 log, 2.5 log, 2 log, 1 log y 1 log, respectivamente. El estudio reportó que al final del lote ya no se registraron bacterias resistentes a ampicilina, mientras que en el presente proyecto de investigación en las 3 condiciones de irradiación solar ocurrió un incremento para resistentes a este antibiótico. Las concentraciones iniciales de BRA presentadas en los efluentes primarios municipales son comparables con las registradas en el en el digestato porcino del presente proyecto de tesis, las cuales fueron: 3.7 log/mL, 3.8 log/mL, 5.25 log/mL, 5 log/mL y 5.2 log/mL, para ampicilina, ciprofloxacino, eritromicina, sulfametoxazol y tetraciclina respectivamente, sin embargo, en el presente proyecto de tesis se alcanzó una menor remoción de BRA. Los autores mencionan que la remoción de BRA puede tener 2 razones: el pH ácido (nivel de 4) al cuál se operaron los fotobiorreactores y las altas

temperaturas registradas dentro del sistema (40-46 °C), estos factores operacionales pudieron incidir en una mayor remoción de BRA.

En la literatura se ha reportado que un nivel de irradiancia solar de 550 W/m² disminuye el número total de bacterias heterotróficas en efluentes secundarios de aguas residuales y decreta la proporción de bacterias resistentes a sulfametoxazol (Glady-Croue *et al.*, 2018), lo que explicaría la reducción de UFC resistentes a antibióticos en el presente proyecto en IA e IM. Se ha reportado que la irradiancia solar causa la foto inactivación de ejemplares de *Escherichia coli* resistentes a tetraciclina, mediante los siguientes mecanismos: deformación y daño en la membrana celular, daño en el genoma y en las proteínas citolíticas debido al incremento en los niveles de oxígeno disuelto y las especies reactivas de oxígeno (HO• y H₂O₂) producidas en el proceso fotosintético llevado a cabo por las microalgas (Zhang *et al.*, 2020), esto podría explicar porque las condiciones IA, IM e IB lograron los mayores valores de remoción de UFC resistentes a tetraciclina en el presente proyecto, siendo 1.4, 1.4 y 1.2 log, respectivamente. Por lo tanto, se podría inferir que la remoción de BRA en el sistema se debe a una acción conjunta de la irradiancia solar y la actividad fotosintética que llevan a cabo las microalgas, la cual es dependiente de esta condición ambiental, en donde se produce un aumento en la concentración de oxígeno disuelto, especies reactivas de oxígeno, temperatura y nivel de pH.

5.4 CUANTIFICACIÓN BRA A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN

De acuerdo con los resultados de la etapa 3 donde la IM propició mayor remoción de BRA y menor propagación de resistencia a ampicilina, esta condición se seleccionó para evaluar la variación de UFC resistentes a antibióticos a diferentes tiempos (0, 1 y 10 días) durante el tratamiento de digestato. En los 5 antibióticos evaluados se puede observar la disminución de UFC resistentes durante el transcurso del tiempo (Figura 14). Las UFC resistentes a ciprofloxacino son las únicas que tuvieron una remoción significativa a partir de las 24 horas, sin embargo, para el final del tratamiento fueron las que menor potencial de remoción presentaron (0.6 log). El mayor potencial de remoción obtenido por el sistema fue para las UFC resistentes a tetraciclina, alcanzando el valor de 3 log, mientras que

la remoción de UFC resistentes a ampicilina, eritromicina y sulfametoxazol fue de 0.7, 1.8 y 0.7 log, respectivamente. En los 5 casos hubo una remoción significativa de UFC resistentes en el día 10 con respecto a las primeras 24 horas, esta información es importante para futuros diseños de tratamiento basados en el presente sistema, ya que el proceso debe tener una duración de al menos 10 días para obtener una remoción significativa de BRA. Es necesario realizar mayor investigación con tiempos de incubación desde las 24 horas hasta las 240 horas para conocer a partir de qué momento la remoción es significativa y analizar si es factible la disminución del tiempo de operación.

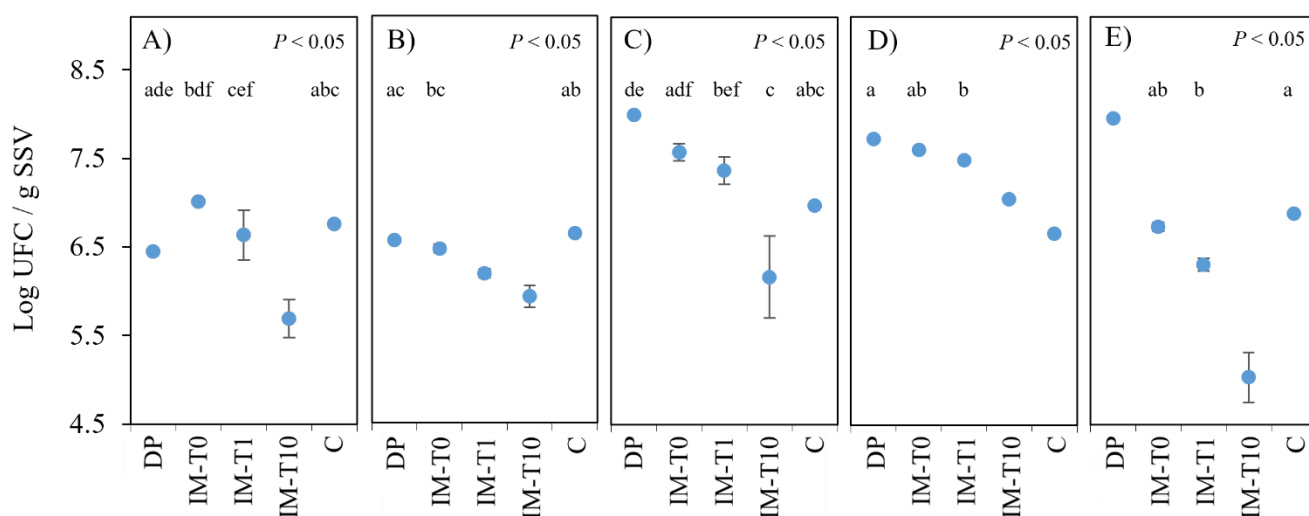


Figura 15. Cuantificación de UFC de bacteria resistentes a ampicilina (A), ciprofloxacino (B), eritromicina (C), sulfametoxazol (D), y tetraciclina (E); a diferentes tiempos de tratamiento con IM, 0, 1 y 10 días, IM-T0, IM-T1, IM-T10, respectivamente, así como del digestato alimentado DP y el control C. Así como como del digestato porcino alimentado y la condición control. $P < 0.05$, indica que existe una diferencia significativa con una certeza del 95%, ANOVA. (a, b, c, d) = No hay diferencia significativa (Tukey).

Mezzari y colaboradores en el 2017 midieron la remoción de UFCs multirresistentes a antibióticos de *Salmonella enterica* a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas), en digestato porcino y empleando un consorcio de microalgas dominado principalmente por *Scenedesmus spp.* Sus resultados muestran que a las 24 horas del proceso no ocurrió una remoción significativa con respecto al conteo inicial de 3 log UFC/mL, mientras que a las 48 horas se registró la

remoción total del patógeno. Los autores señalan que probablemente se debe a que no controlaron el nivel de pH el cual paso de un valor inicial de 6.8 hasta valores superiores a 11 gracias al proceso fotosintético. Para verificarlo realizaron otro experimento donde controlaron el nivel de pH a un valor de 6.8 resultando en que las concentraciones iniciales del patógeno se mantuvieron por toda la duración del ensayo (96 horas).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación y con los resultados reportados por Mezzari y colaboradores en el 2017, se podría inferir que la duración del tratamiento repercute en la remoción de resistencia a antibióticos: con el transcurrir del tiempo de operación las bacterias resistentes a antibióticos se encuentran cada momento más expuestas a un incremento en el nivel de pH y de la concentración de oxígeno disuelto por la actividad fotosintética de las microalgas.

5.5 EFECTO DE CONDICIONES AMBIENTALES EN LA PREVALENCIA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Los resultados del análisis muestran que hay una correlación negativa entre las condiciones ambientales y la prevalencia de las UFC resistentes a antibióticos. Esta relación es significativa para la irradiancia solar y el oxígeno disuelto, en relación con la menor presencia de BRA (Figura 15). En la literatura se han reportado estos factores como relevantes en la remoción de resistencia a antibióticos, la irradiancia solar causa la foto inactivación de ejemplares resistentes mediante deformación y daño en la membrana celular, daño en el genoma y en las proteínas citolíticas debido al incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno gracias al proceso fotosintético ($\text{HO}\cdot$ y H_2O_2); además la irradiancia solar provoca la foto degradación de genes de resistencia extracelulares, disminuyendo la THG (Zhang *et al.*, 2020). Adicionalmente en el presente estudio se observó que el pH tiene una correlación no significativa con las UFC resistentes a antibióticos, esto se debe a que el nivel fue controlado diariamente a 7. Sin embargo, se ha demostrado que durante la remoción de BRA de digestato porcino mediante microalgas-bacterias, se remueve totalmente a ejemplares de *Salmonella Typhimurium* multirresistentes a antibióticos durante las primeras 48 horas de

tratamiento cuando el nivel de pH no se controla y sube a niveles superiores a 11 (Mezzari *et al.*, 2017).

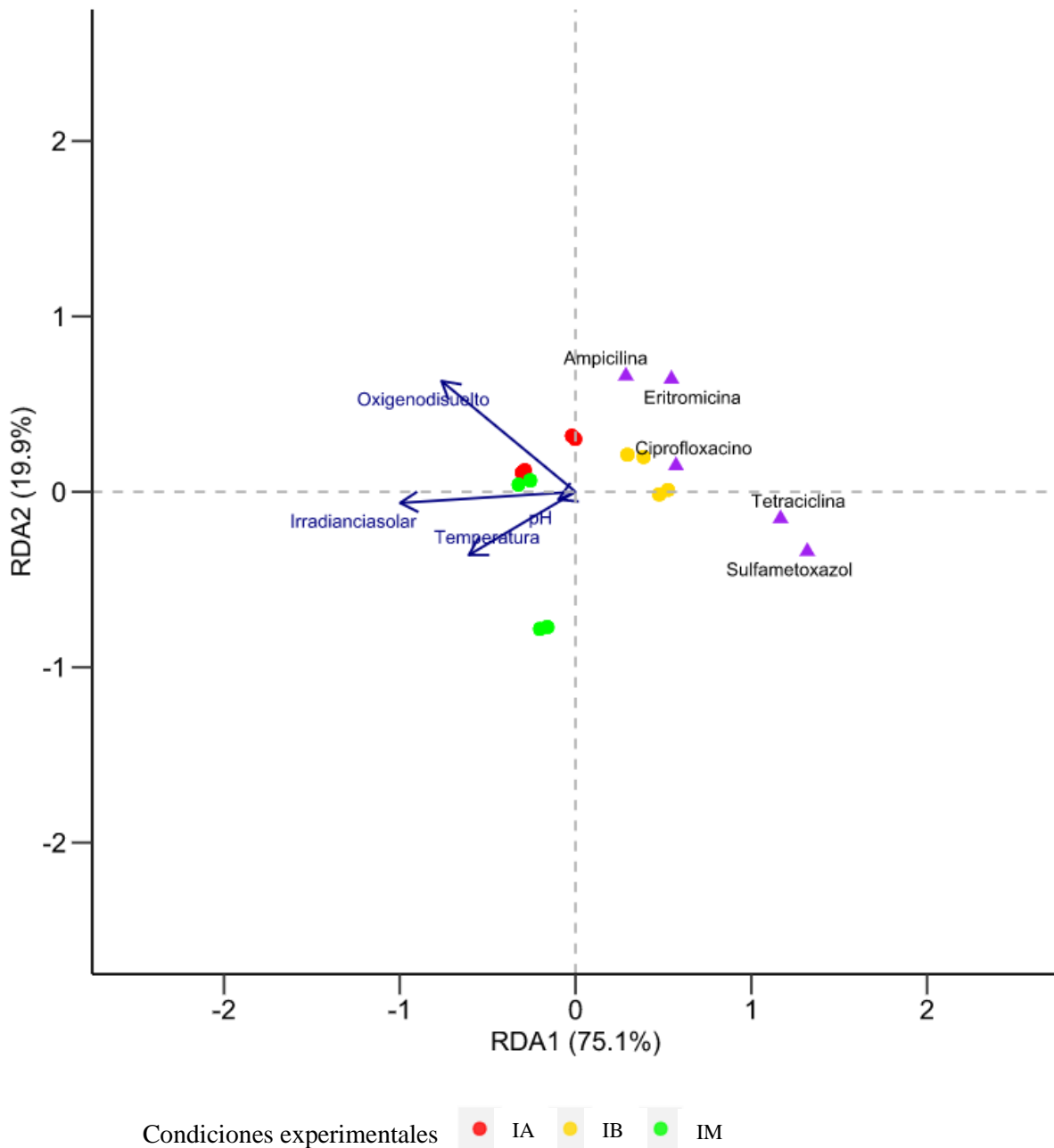


Figura 16. Análisis estadístico multivariado empleando condiciones ambientales y BRA. Las variables ambientales significativas fueron la irradiancia solar ($P = 1 \times 10^{-3}$) y el oxígeno disuelto ($P = 7 \times 10^{-3}$).

De acuerdo con el estudio publicado por Munasinghe-Aranchchige y colaboradores en 2019, a un nivel de pH neutral y bajo exposición directa a la luz solar, las coliformes fecales se reducen a niveles indetectables en 24 horas, sin

embargo en presencia de microalgas y exposición directa a la luz solar las coliformes fecales son reducidas a niveles indetectables en menos de 12 horas, atribuyendo la aceleración de inactivación por el efecto sinérgico de la luz solar y los elevados niveles de oxígeno disuelto (7 mg/L) generados por el proceso fotosintético de las microalgas en el reactor (Munasinghe-Arachchige *et al.*, 2019). A partir de esa investigación Cheng y colaboradores en el 2020c identificaron que la irradiancia solar combinada con el oxígeno disuelto, nivel de pH y temperatura son factores que influyen sustancialmente en la estructura de la comunidad microbiana, alterado la abundancia de los genes de resistencia a antibióticos.

5.6 REMOCIÓN DE GRA DURANTE EL TRATAMIENTO DE DIGESTATO PORCINO

En la figura 16 se puede observar la remoción de GRA que logró el tratamiento de digestato porcino mediante el consorcio MABA en fotobiorreactores de placa plana expuestos a la condición IM. Con respecto a los genes que confieren resistencia a los antibióticos empleados en los medios de cultivo R2A, se alcanzaron remociones para betalactámicos, macrólidos y tetraciclinas, de 98, 73 y 79%, respectivamente. Sin embargo, ocurrió un aumento (36%) en la abundancia de los genes de resistencia a sulfonamidas (Figura 17), situación que no ocurre con las bacterias resistentes a sulfametoxazol determinadas en los medios de cultivo, las cuales fueron removidas (0.7 log) (Figura 14). Es importante señalar que en el medio R2A solo pueden crecer ciertas especies heterotróficas y hay muchas especies que no son cultivables, es probable que se llevará a cabo la disminución en la resistencia a sulfametoxazol para las especies heterotróficas cultivables mientras que a la par ocurría un aumento en la resistencia a sulfonamida para las especies no cultivables en R2A, por lo que los resultados de GRA muestran un panorama más completo. En este sentido, se ha reportado que en el sistema de microalgas-bacterias pueden incrementar los genes de resistencia a sulfonamidas debido a que son albergados por las bacterias acidófilas (Cheng *et al.*, 2020c). Por otro lado, se detectaron genes que codifican triple resistencia: MLS (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas) cuya remoción fue del 84%. En cuanto al ciprofloxacino, que pertenece al grupo de las fluoroquinolonas, los genes que

confieren resistencia a este antibiótico se encontraron dentro de los genes que confieren multi resistencia, alcanzando un porcentaje de remoción del 47%. Adicionalmente se detectaron genes que confieren resistencia a antibióticos diferentes a los suministrados en la granja porcina, sin embargo, de manera general se alcanzó un alto valor promedio de remoción de los GRA totales, siendo del 85%, con lo cual se puede demostrar la efectividad del sistema para la remoción de resistencia a antibióticos. Es probable que se alcanzaran estos valores de remoción debido a que son sustancias no suministradas a los porcinos y por lo tanto no ejercieron una presión selectiva sobre la alta densidad de microorganismos presentes en el agua residual, evitando la propagación de genes que confieren su resistencia.

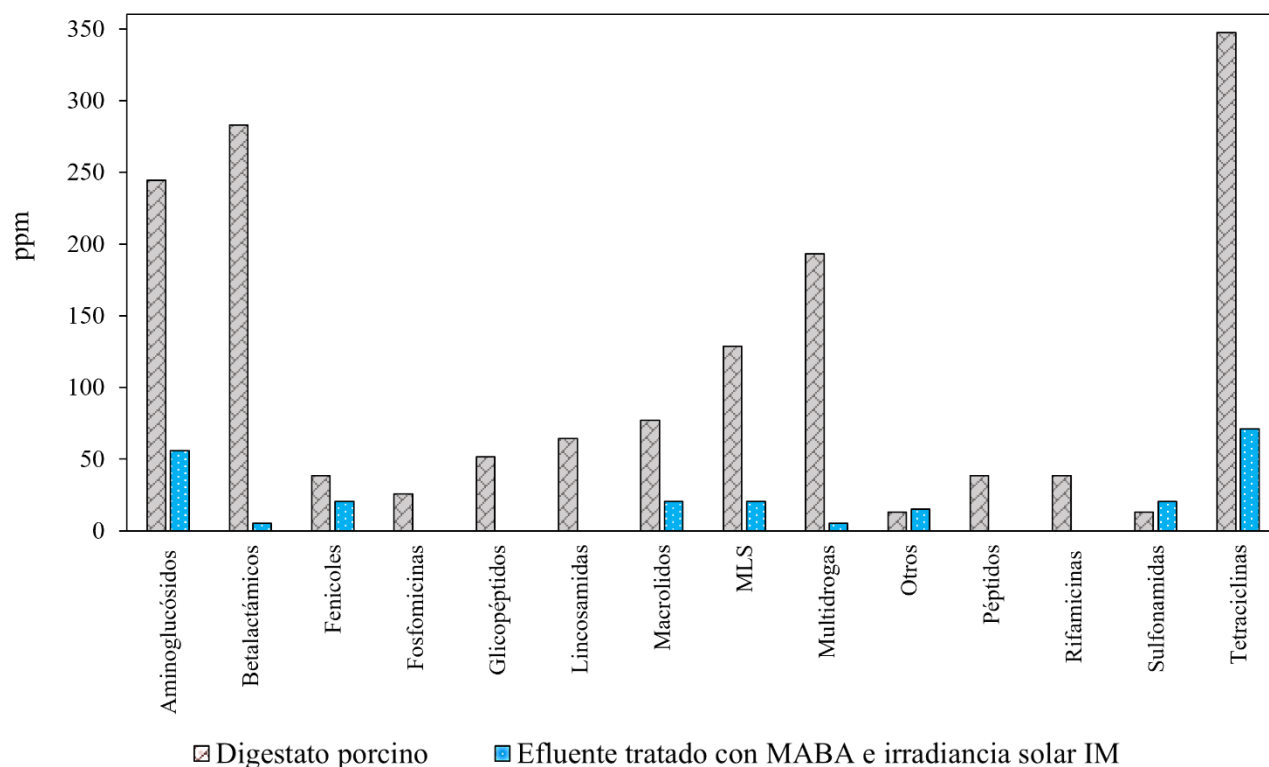


Figura 17. Cuantificación de genes de resistencia a diferentes antibióticos en el digestato y efluente durante el tratamiento con irradiancia media. Partes por millón (ppm) refiere a la cuantificación de GRA en cada millón de genes identificados en el metagenoma. MLS, genes que confieren resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas; Multidrogas, genes que confieren resistencia a ciprofloxacino, macrólidos, lincosamidas, streptograminas, tetraciclinas, oxazolidona, fenicol y pleuromutilina; Otros, genes que confieren resistencia a acridina, agentes desinfectantes, antibióticos nucleotídicos.

En la literatura se ha reportado que el sistema de tratamiento raceway basado en microalgas-bacterias puede remover GRA a 2 órdenes de magnitud mayor en comparación al sistema de lodos activados, argumentando que existe menor riesgo de propagación de resistencia debido a una menor abundancia de integrones de clase 1 en el sistema (estructuras genéticas móviles capaces de integrar o moviliza genes de resistencia a antibióticos) (Cheng *et al.*, 2020c). El presente proyecto de investigación es el primero en investigar la remoción de GRA durante el tratamiento de digestato porcino mediante un consorcio de microalgas-bacterias, por lo tanto, el punto de comparación es un sistema convencional de lodos activados reportado por Sui y colaboradores en el 2015. En dicho estudio, el sistema de lodos activados pertenece a un tren de tratamiento presente en una granja porcina y trata el digestato porcino mediante lotes secuenciales con un tiempo de retención hidráulico de 2.4 horas. Sus resultados muestran intervalos de remoción para los genes que confieren resistencia a macrólidos: *ermB* y *ermF*, siendo 6% - 16% y 20 % - 50 %, respectivamente, siendo sus concentraciones iniciales 11.03 log/mL y 11.16 log/mL, respectivamente. Los autores mencionan que la posible explicación para la remoción es la temperatura de 37°C a la cual se operó el sistema (Sui *et al.*, 2015).

La baja diseminación de genes de resistencia a antibióticos que se registra en los sistemas de tratamiento basados en microalgas se debe a la simple comunidad bacteriana asociada (Cheng *et al.*, 2020c), ya que las bacterias representan una abundancia relativa del 16% en el sistema y esto se puede atribuirse tanto al cambiante nivel de pH como a la competencia por los limitados compuestos orgánicos y nutrientes resultantes del crecimiento de la biomasa de microalgas (Delanka-Pedige *et al.*, 2019).

5.7 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PRESENTES EN EL EFLUENTE DEL SISTEMA MABA

La tabla 5 muestra la abundancia relativa de los géneros encontrados en las muestras metagenómicas de las BRA que crecieron en los medios de cultivo R2A adicionados con antibióticos a partir de sembrar el efluente del tratamiento de digestato porcino mediante el sistema MABA. En la tabla también se encuentran las especies patógenas de estos géneros, las afectaciones a la salud que provocan y su resistencia a antibióticos. Se puede apreciar la abundancia relativa de los coliformes fecales *Escherichia*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, 16, 13 y 2 %, respectivamente, géneros encontrados comúnmente en aguas residuales porcinas (Homeier-Bachmann *et al.*, 2021).

La relevancia en identificar estos géneros de BRA, es que pueden fungir como reservorio de GRA y transferirlos, favoreciendo la propagación de resistencia a antibióticos en el ambiente, y principalmente que dentro de estos géneros se encuentran especies patógenas. *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Shigella* y *Vibrio* (Kaper *et al.*, 2004; Busi Siddhardha, 2020; Wexler, 2007; Zafar & Saier, 2021; Eng *et al.*, 2015; Gillaspay & landolo, 2009; Rajkovic, 2016; Cercenado, 2011; Corzo-Delgado & Gómez-Mateos, 2006; Pang *et al.*, 2019; Sciortino *et al.*, 2021; Spigaglia *et al.*, 2018; Gundogan, 2014; Haenni *et al.*, 2018; Ranjbar & Farahani, 2019; Gxalo *et al.*, 2021).

Los géneros bacterianos identificados en las BRA tienen una gran importancia ambiental y en la salud, ya que no solamente afectan a las personas, sino a otras especies que fungen como alimentos para los humanos, por citar algunos ejemplos: se ha reportado la presencia de ejemplares de *Escherichia coli* en los desechos de porcinos diarreicos, siendo una de las principales causas de muerte (Nguyet *et al.*, 2022), mientras que la especie *Pseudomonas syringae* es un patógeno de las plantas del maíz y tomate (Özen & Ussery, 2012).

Tabla 5. Géneros identificados en las muestras metagenómicas de BRA.

Género identificado	Abundancia relativa	Especies patógenas	Infecciones típicas	Resistencias a antibióticos reportadas	Referencias
<i>Escherichia</i>	16.4 %	<i>Escherichia coli</i>	Entérica/diarreica, infecciones del tracto urinario y sepsis/meningitis.	Amoxicilina, oxitetraciclina, enrofloxacina, sulfametoxazol.	Kaper <i>et al.</i> , 2004; Nguyet <i>et al.</i> , 2022.
<i>Enterobacter</i>	13.2 %	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> y <i>E. hormaechei</i>	En el tracto urinario, respiratorias, de tejidos blandos, osteomielitis y endocarditis.	Penicilina, sulfametoxazol, cefalosporinas, amoxicilinas, tetraciclina y multi resistencia.	Davin-Regli <i>et al.</i> , 2019; Muensritharam <i>et al.</i> , 2016; Busi Siddhardha, 2020.
<i>Bacteroides</i>	11 %	<i>Bacteroides fragilis</i>	Bacteriemia y formación de abscesos en múltiples sitios del cuerpo.	Amoxicilina, penicilina, tetraciclina, clindamicina y metronidazol.	Wexler, 2007; Zafar & Saier, 2021; Kierzkowska <i>et al.</i> , 2020; Rasmussen <i>et al.</i> , 1993.
<i>Salmonella</i>	8 %	<i>Salmonella enterica</i> y <i>S. bongori</i>	Gastroenteritis, bacteriemia y fiebre entérica.	Ampicilina, sulfametoxazol, ciprofloxacino, cloranfenicol y multi resistencia.	Eng <i>et al.</i> , 2015.
<i>Staphylococcus</i>	7.3 %	<i>Staphylococcus aureus</i>	En la piel y huesos, bacteriemia, endocarditis, intoxicación alimentaria y neumonía.	Betalactámicos, glucopéptidos, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, fluoroquinolonas y sulfonamidas.	Gillaspy & Iandolo, 2009; Rajkovic, 2016; Foster, 2017.
<i>Enterococcus</i>	6.3 %	<i>Enterococcus faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	En la piel, intrabdominales, pélvicas y tejidos blandos, urinarias, bacteriemia, endocarditis.	Cefalosporinas, sulfametoxazol, aminoglucósidos, clindamicina, glucopéptidos, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, fluoroquinolonas.	Cercenado, 2011.
<i>Stenotrophomonas</i>	5 %	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Respiratoria y gastrointestinal.	Aminoglucósidos, betalactámicos, tetraciclinas, quinolonas y macrólidos.	Corzo-Delgado & Gómez-Mateos, 2006; Sánchez, 2015.
<i>Pseudomonas</i>	3.4 %	<i>Pseudomonas</i>	Respiratorias, del	Carbapenémicos,	Özen &

		<i>aeruginosa</i>	tracto urinario, de heridas, tejidos blandos y fibrosis cística.	aminoglucósidos, quinolonas, betalactámicos y multi resistencia	Ussery, 2012; Roulová <i>et al.</i> , 2022; Pang <i>et al.</i> , 2019.
<i>Arcobacter</i>	3 %	<i>Arcobacter butzleri</i>	Bacteriemia, gastroenteritis y diarrea aguda	Multi resistencia a tetraciclina, betalactámicos, ampicilina, cefalotina, y ácido nalidíxico.	Carney <i>et al.</i> , 2020; Score & A. Phillips, 2015; Sciortino <i>et al.</i> , 2021.
<i>Clostridium</i>	3 %	<i>Clostridium difficile</i>	Diarrea aguda	Cefalosporinas, macrólidos, fluoroquinolonas, metronidazol, vancomicina y tetraciclina.	Figueiredo <i>et al.</i> , 2020; Spigaglia <i>et al.</i> , 2018; Sciortino <i>et al.</i> , 2021.
<i>Klebsiella</i>	2 %	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tracto urinario, tracto intestinal neumonía y septicemia.	Multi resistente a betalactámicos, aminoglucósidos, ciprofloxacino y carbapenémicos.	Gundogan, 2014; Aminul <i>et al.</i> , 2021.
<i>Streptococcus</i>	2.3 %	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Tracto urinario. sepsis, meningitis, neumonía, endocarditis y artritis.	Macrólidos, tetraciclina, betalactámicos y fluoroquinolonas.	Haenni <i>et al.</i> , 2018
<i>Shigella</i>	2 %	<i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Shigella boydii</i> y <i>Shigella sonnei</i> .	Diarrea mucoide sanguinolenta (shigelosis).	Betalactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, trimetoprima, sulfonamidas, colistinas, macrólidos.	Percival & Williams, 2014; Ranjbar & Farahani, 2019.
<i>Vibrio</i>	2%	<i>Vibrio cholerae</i>	Infección diarreica (Colera)	Betalactámicos, carbapenémicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, cefalosporinas, macrólido, fenicoles y tetraciclinas.	Gxalo <i>et al.</i> , 2021.
*Otros	15%				

*Conjunto de géneros bacterianos que tuvieron una abundancia relativa individual menor al 2%,

En la figura 18 se muestran los GRA identificados en la biomasa de las BRA. Los resultados comprueban que las UFC que crecieron en los medios de cultivo R2A son resistentes a los antibióticos empleados: ampicilina (betalactámicos), ciprofloxacino (representado en el grupo de multidrogas), eritromicina (macrólidos), sulfametoxazol (sulfonamidas) y tetraciclina (tetraciclinas), los principales fármacos suministrados a los porcinos en las granjas (He *et al.*, 2020; Sui *et al.*, 2019; Yiwen Yang *et al.*, 2019). Es interesante observar que las bacterias presentes en las UFC también contenían otros tipos de GRA, incluso llegando a presentarse el caso de multi resistencia. Esto podría indicar que durante el tratamiento del agua residual mediante digestión anaerobia en la granja porcina no solo ocurre la propagación de GRA relacionados con los fármacos administrados a los porcinos, sino que también ocurre la propagación de los otros tipos de GRA.

A pesar de que es un factor fundamental para la propagación de resistencia antimicrobiana, en el presente trabajo de investigación no se determinaron las concentraciones de antibióticos presentes en el digestato porcino ni en el efluente tratado debido a que en la literatura se ha reportado ampliamente la presencia de estos fármacos (Cheng *et al.*, 2020a), por lo tanto se dio prioridad a la determinación de GRA y BRA para evaluar la remoción de resistencia a antibióticos en el tratamiento de digestato porcino mediante el consorcio de microalgas-bacterias. Sin embargo, recientemente se ha explorado la tecnología basada en microalgas como una potencial alternativa para el tratamiento de agua residual contaminada con antibióticos, demostrando que las microalgas pueden remover estos fármacos mediante los siguientes mecanismos: adsorción, acumulación, biodegradación, foto degradación e hidrólisis (Leng *et al.*, 2020), es probable que la eliminación de los antibióticos mediada por microalgas disminuya la presión selectiva que ejercen los medicamentos sobre la comunidad bacteriana, reduciendo la propagación de GRA y BRA.

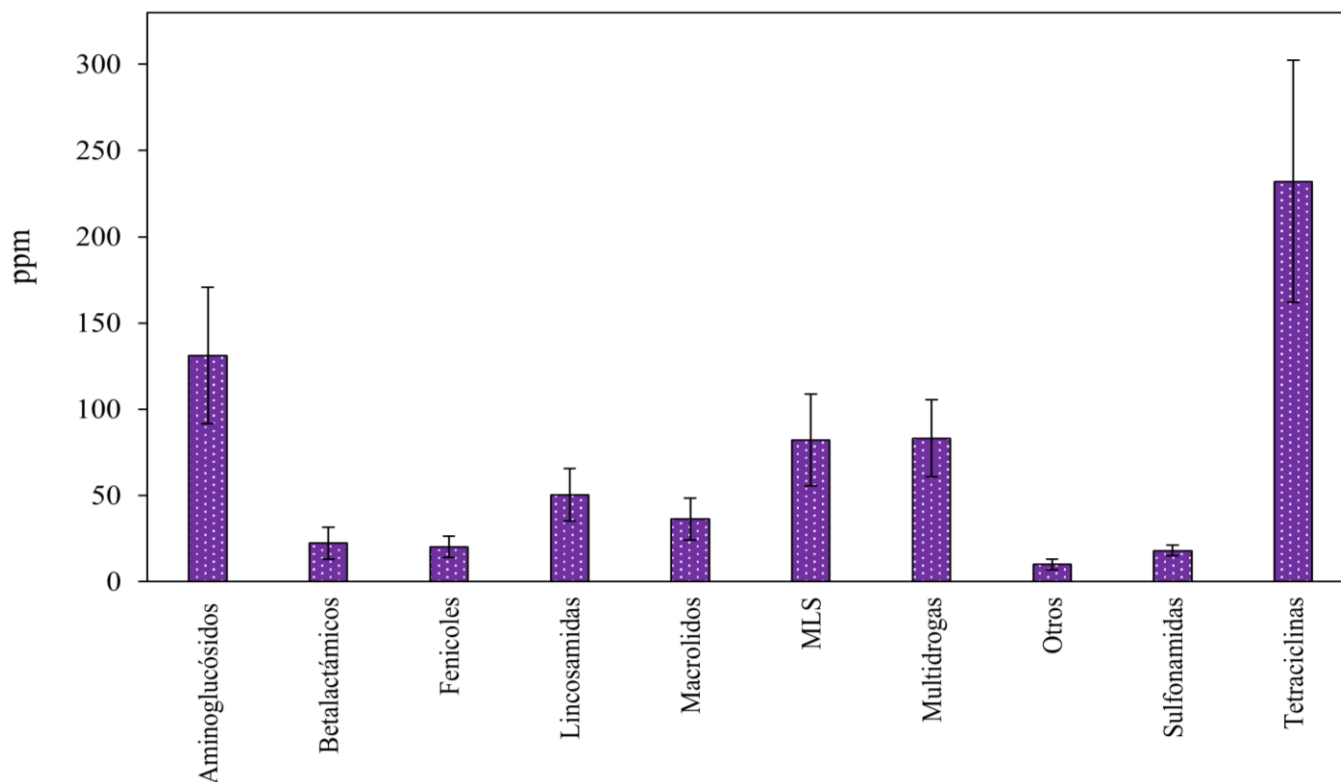


Figura 18. Genes de resistencia a antibióticos presentes en las BRA que crecieron en los medios de cultivo adicionados con antibióticos a partir de sembrar el efluente del tratamiento de digestato porcino mediante el sistema MABA. Partes por millón (ppm) refiere a la cuantificación de GRA en cada millón de genes identificados en el metagenoma. MLS, genes que confieren resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas; Multidrogas, genes que confieren resistencia a ciprofloxacino, macrólidos, lincosamidas, streptograminas, tetraciclinas, oxazolidona, fenicol y pleuromutilina; Otros, genes que confieren resistencia a acridina, agentes desinfectantes, antibióticos nucleotídicos.

6. CONCLUSIONES

El objetivo de la investigación fue evaluar el potencial de remoción de bacterias y genes asociados a la resistencia a antibióticos presentes en digestato proveniente efluentes porcinos mediante un sistema de microalgas-bacterias a diferentes irradiancias solares. Los resultados obtenidos permiten concluir que la irradiancia solar tuvo un efecto significativo en la remoción de bacterias resistentes a antibióticos del digestato porcícola mediante el sistema MABA, siendo la condición IM de $212 \pm 9 \text{ W/m}^2$ la que en promedio favoreció la mayor remoción de bacterias resistentes a ciprofloxacino, eritromicina, sulfametoxazol y tetraciclina, alcanzando remociones de 0.4, 0.7, 0.2 y 1.4 log respectivamente, mientras que fue la condición que presentó menor incremento de bacterias resistentes a ampicilina (0.4 log). Estos resultados tienen una diferencia significativa con respecto a los obtenidos por la condición IA de $373 \pm 9 \text{ W/m}^2$ en el caso de bacterias resistentes a ampicilina y eritromicina, mientras que en comparación con la condición IB de $60 \pm 9 \text{ W/m}^2$ existe una diferencia significativa para bacterias resistentes a ampicilina, eritromicina y sulfametoxazol. No obstante que la condición IA presentó los mejores resultados en cuanto a producción de biomasa MABA y remoción de DQO junto con nutrientes, sus remociones promedio de BRA son inferiores a la condición IM. Por otro lado, la condición IB favoreció el incremento de bacterias resistentes a ampicilina, ciprofloxacino, eritromicina y sulfametoxazol, removiendo solamente 1.2 log de bacterias resistentes a tetraciclina. Del análisis estadístico multivariado se puede inferir que la remoción de BRA en el sistema, durante las condiciones IM e IA se debe a una acción conjunta de la irradiancia solar y la actividad fotosintética que llevan a cabo las microalgas a esta condición ambiental, en donde se produce un aumento en la concentración de oxígeno disuelto, especies reactivas de oxígeno, temperatura y nivel de pH. Esta hipótesis se refuerza comparando los resultados de la condición IB, donde el nivel de irradiancia solar y la actividad fotosintética no fueron suficientes para llevar a cabo la remoción de resistencia a antibióticos.

La reducción de BRA en la condición IM, fue congruente con la remoción de los GRA identificados en el digestato tratado, alcanzado remociones de 98, 73, 79 y

47% para genes que confieren resistencia a betalactámicos, macrólidos, tetraciclinas y multi resistencia (donde se encontró resistencia a fluoroquinolonas) respectivamente, mientras que ocurrió un aumento del 36% para genes de resistencia a sulfonamidas. Del total de GRA presentes en el digestato porcino se redujo en promedio el 85%, con lo cual se comprueba la efectividad del sistema para la remoción de resistencia a antibióticos.

A pesar de la remoción de GRA y BRA durante el tratamiento digestato porcino, en el efluente prevalecen en su mayoría (85 % de la abundancia relativa) géneros que contienen especies patógenas como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Bacteroides*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Arcobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Shigella* y *Vibrio*. Esta persistencia se confirmó por la presencia de genes de resistencia a aminoglucósidos, betalactámicos, fenicoles, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas e incluso presentando multi resistencia en el metagenoma de las BRA.

Aunque se confirmó la eficiencia del sistema basado en microalgas-bacterias para la remoción de GRA y BRA del digestato porcino, el efluente aun representa una problemática ambiental y de salud por la persistencia de algunas bacterias resistentes a antibióticos; que pueden ser un vector de propagación de la resistencia. Por lo tanto, se recomienda investigar el potencial de remoción de estos patógenos en fotobiorreactores con microalgas controlando la irradiancia, pero optimizando otros factores operativos como la configuración del reactor, tiempo de retención de sólidos, hidráulico, pH, entre otros.

Este proyecto de tesis es el primer estudio donde se comprueba el potencial de tratamiento que tiene un sistema MABA para remover conjuntamente BRA y GRA en digestato porcino. Específicamente, se evalúa el efecto generado por la irradiancia solar durante la remoción de BRA y GRA.

BIBLIOGRAFÍA

Ación Fernández, F. G., Gómez-Serrano, C., & Fernández-Sevilla, J. M. (2018). Recovery of Nutrients From Wastewaters Using Microalgae. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00059>.

Alisawi, H.A.O. Performance of wastewater treatment during variable temperature. *Appl Water Sci* 10, 89 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13201-020-1171-x>

Aminul, P., Anwar, S., Molla, M. M. A., & Miah, M. R. A. (2021). Evaluation of antibiotic resistance patterns in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Bangladesh. *Biosafety and Health*, 3(6), 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2021.11.001>

APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. (21st ed.). American Public Health Association.

Arango, L., Cuervo, F. M., González-Sánchez, A., & Buitrón, G. (2016). Effect of microalgae inoculation on the start-up of microalgae-bacteria systems treating municipal, piggery and digestate wastewaters. *Water Science and Technology*, 73(3), 687–696. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.544>

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(September), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.011>

Assunção, J., & Malcata, F. X. (2020). Enclosed “non-conventional” photobioreactors for microalga production: A review. *Algal Research*, 52(November). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102107>

Becker, D., Varela, S., Giustina, D., Rodriguez-mozaz, S., Schoevaart, R., Barceló, D., Cazes, M. De, Belleville, M., Sanchez-marcano, J., Gunzburg, J. De, Völker, J., Oehlmann, J., & Wagner, M. (2016). Removal of antibiotics in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccase – Degradation of compounds does not always eliminate toxicity. *Bioresource Technology*, 219, 500–509. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.004>

Brooks, J. P., Adeli, A., & McLaughlin, M. R. (2014). Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems. In *Water Research* (Vol. 57, pp. 96–103). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.017>

Burmeister, A. R. (2015). Horizontal Gene Transfer. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2015(1), 193–194. <https://doi.org/10.1093/emph/eov018>

Busi Siddhardha, and M. D. V. T. A. (2020). Model Organisms for Microbial Pathogenesis, Biofilm Formation and Antimicrobial Drug Discovery. In B. Siddhardha, M. Dyavaiah, & A. Syed (Eds.), *Model Organisms for Microbial Pathogenesis, Biofilm Formation and Antimicrobial Drug Discovery*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1695-5>

Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>

Carney, R. L., Brown, M. V., Siboni, N., Raina, J.-B., Kahlke, T., Mitrovic, S. M., &

- Seymour, J. R. (2020). Highly heterogeneous temporal dynamics in the abundance and diversity of the emerging pathogens *Arcobacter* at an urban beach. *Water Research*, 171, 115405. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115405>
- Castrillo, R. Díez-Montero, I. Tejero. 2018. Model-based feasibility assessment of a deep solar photobioreactor for microalgae culturing, *Algal Research*, Volume 29, Pages 304-318. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.12.004>.
- CDC. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. In *Department of Health and Human Services*. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- Cercenado, E. (2011). Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(SUPPL. 5), 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70045-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70045-3)
- Chai, W. S., Tan, W. G., Halimatul Munawaroh, H. S., Gupta, V. K., Ho, S. H., & Show, P. L. (2021). Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: A review. *Environmental Pollution*, 269, 116236. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116236>
- Chen, C. Y., Kuo, E. W., Nagarajan, D., Ho, S. H., Dong, C. Di, Lee, D. J., & Chang, J. S. (2020). Cultivating *Chlorella sorokiniana* AK-1 with swine wastewater for simultaneous wastewater treatment and algal biomass production. *Bioresource Technology*, 302(January), 122814. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122814>
- Cheng, D., Hao Ngo, H., Guo, W., Wang Chang, S., Duc Nguyen, D., Liu, Y., Zhang, X., Shan, X., & Liu, Y. (2020) a. Contribution of antibiotics to the fate of antibiotic resistance genes in anaerobic treatment processes of swine wastewater: A review. *Bioresource Technology*, 299, 122654. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122654>
- Cheng, D. L., Ngo, H. H., Guo, W. S., Chang, S. W., Nguyen, D. D., & Kumar, S. M. (2019) b. Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. *Bioresource Technology*, 275(October 2018), 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.019>
- Cheng, Delanka-Pedige, H., Munasinghe-Arachchige, S., Abeysiriwardana-Arachchige, I., Smith, G., Nirmalakhandan, N., & Zhang, Y. (2020) c. Removal of antibiotic resistance genes in an algal-based wastewater treatment system employing *Galdieria sulphuraria*: A comparative study. *Science of the Total Environment*, 711, 134435. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134435>
- Cheng, H. H., Narindri, B., Chu, H., & Whang, L. M. (2020) d. Recent advancement on biological technologies and strategies for resource recovery from swine wastewater. *Bioresource Technology*, 303(1), 122861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122861>
- Chong, C. C., Cheng, Y. W., Ishak, S., Lam, M. K., Lim, J. W., Tan, I. S., Show, P. L., & Lee, K. T. (2022). Anaerobic digestate as a low-cost nutrient source for sustainable microalgae cultivation: A way forward through waste valorization approach. In *Science of the Total Environment* (Vol. 803). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150070>
- Corzo-Delgado, J. E., & Gómez-Mateos, J. M. (2006). *Stenotrophomonas maltophilia*, un patógeno nosocomial de importancia creciente. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(1), 1–3. <https://doi.org/10.1157/13083366>

- Crispín Pérez, V. (2008). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Ciencia e Investigación*, 11(2), 5–6. <https://doi.org/10.15381/ci.v11i2.4040>
- Cromwell, G. L. (2002). Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology*, 13(1), 7–27. <https://doi.org/10.1081/ABIO-120005767>
- Dar, R. A., Sharma, N., Kaur, K., & Phutela, U. G. (2019). Feasibility of Microalgal Technologies in Pathogen Removal from Wastewater. In S. Kumar-Gupta & F. Bux (Eds.), *Application of Microalgae in Wastewater Treatment* (1 st, pp. 237–268). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-13913-1_12
- Davies, J. (1996). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiología (Madrid, Spain)*, 12(1), 9–16. <https://doi.org/10.1128/membr.00016-10>
- Davin-Regli, A., Lavigne, J.-P., & Pagès, J.-M. (2019). Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>
- Delanka-Pedige, H. M. K., Munasinghe-Arachchige, S. P., Cornelius, J., Henkanatte-Gedera, S. M., Tchinda, D., Zhang, Y., & Nirmalakhandan, N. (2019). Pathogen reduction in an algal-based wastewater treatment system employing *Galdieria sulphuraria*. *Algal Research*, 39, 101423. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101423>
- Demoulin, C. F., Lara, Y. J., Cornet, L., François, C., Baurain, D., Wilmotte, A., & Javaux, E. J. (2019). Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free Radical Biology and Medicine*, 140(May), 206–223. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.007>
- Du, L., Zhao, Y., Wang, C., Zhang, H., Chen, Q., Zhang, X., Zhang, L., Wu, J., Wu, Z., & Zhou, Q. (2020). Removal performance of antibiotics and antibiotic resistance genes in swine wastewater by integrated vertical-flow constructed wetlands with zeolite substrate. *Science of the Total Environment*, 721, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137765>
- Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Feng, P., Xu, Z., Qin, L., Asraful Alam, M., Wang, Z., & Zhu, S. (2020). Effects of different nitrogen sources and light paths of flat plate photobioreactors on the growth and lipid accumulation of *Chlorella* sp. GN1 outdoors. *Bioresource Technology*, 301(January), 122762. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122762>
- Ferrero, E. M., de Godos, I., Rodríguez, E. M., García-Encina, P. A., Muñoz, R., & Bécares, E. (2012). Molecular characterization of bacterial communities in algal-bacterial photobioreactors treating piggery wastewaters. *Ecological Engineering*, 40, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.10.001>
- Figueiredo, G. G. O., Lopes, V. R., Romano, T., & Camara, M. C. (2020). Clostridium. In N. Amaran, K. Annapurna, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 477–491). Elsevier Inc. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00022-8>
- Fito, J., & Alemu, K. (2019). Microalgae–bacteria consortium treatment technology for

municipal wastewater management. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s41204-018-0050-2>

Foster, T. J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 430–449. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux007>.

Gao, B. (2022). Introduction. Emerging Contaminants in Soil and Groundwater Systems, Elsevier, Chapter 1, Pages 1-4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824088-5.00002-1>.

Garner, Rob. 2017. Solar Irradiance. https://www.nasa.gov/mission_pages/sdo/science/solar-irradiance.html

Garzón-Zúñiga, M. A., & Buelna, G. (2014). Caracterización de aguas residuales porcinas y su tratamiento por diferentes procesos en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30(1), 65–79.

Gillaspay, A. F., & Iandolo, J. J. (2009). *Staphylococcus*. In *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 293–303). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00237-6>

Gladys-Croue, J., Niu, X. Z., Ramsay, J. P., Watkin, E., Murphy, R. J. T., & Croue, J. P. (2018). Survival of antibiotic resistant bacteria following artificial solar radiation of secondary wastewater effluent. In *Science of the Total Environment* (Vol. 626, pp. 1005–1011). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.101>

Godos, I. de, Blanco, S., García-Encina, P. A., Becares, E., & Muñoz, R. (2009). Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresource Technology*, 100(19), 4332–4339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.016>

Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V. K., Tushara Chaminda, G. G., An, A. K., & Kumar, M. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, 6(December 2017), 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>

González-Camejo, J., Viruela, A., Ruano, M. V., Barat, R., Seco, A., & Ferrer, J. (2019). Effect of light intensity, light duration and photoperiods in the performance of an outdoor photobioreactor for urban wastewater treatment. *Algal Research*, 40, 101511. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101511>

Gonzalez-Tineo, P. A., Durán-Hinojosa, U., Delgadillo-Mirquez, L. R., Meza-Escalante, E. R., Gortáres-Moroyoqui, P., Ulloa-Mercado, R. G., & Serrano-Palacios, D. (2020). Performance improvement of an integrated anaerobic-aerobic hybrid reactor for the treatment of swine wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, 34(January), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101164>

Gracida-Valdepeña, M. L., Navarro-Aguirre, F., Herrera-Acosta, K., Ulloa-Mercado, G., Meza-Escalante, E., Plascencia-Jatomea, R., González-Meza, G., & Serrano-Palacios, D. (2020). Nutrient removal from swine wastewater using a thermotolerant strain of *Chlorella* sp. grown under outdoor conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(4), 1243–1249. <https://doi.org/10.1002/jctb.6313>

Grehs, B. W. N., Linton, M. A. O., Clasen, B., de Oliveira Silveira, A., & Carissimi, E.

(2021). Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: understanding the problem and future perspectives. *Archives of Microbiology*, 203(3), 1009–1020. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02093-6>

Gundogan, N. (2014). Klebsiella. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 383–388). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00172-5>

Gupta, V., Ratha, S. K., Sood, A., Chaudhary, V., & Prasanna, R. (2013). New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)-Prospects and challenges. *Algal Research*, 2(2), 79–97. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.006>

Gxalo, O., Digban, T. O., Igere, B. E., Olapade, O. A., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2021). Virulence and Antibiotic Resistance Characteristics of Vibrio Isolates From Rustic Environmental Freshwaters. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 19. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.732001>

Haenni, M., Lupo, A., & Madec, J.-Y. (2018). Antimicrobial Resistance in Streptococcus spp. *Microbiology Spectrum*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017>

He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R., & Alvarez, P. J. J. (2020). Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment. *Npj Clean Water*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0051-0>

Ho, S. H., Chen, Y. Di, Chang, C. Y., Lai, Y. Y., Chen, C. Y., Kondo, A., Ren, N. Q., & Chang, J. S. (2017). Feasibility of CO₂ mitigation and carbohydrate production by microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation under outdoor conditions: Effects of seasonal changes. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0712-5>.

Homeier-Bachmann T, Heiden SE, Lübcke PK, Bachmann L, Bohnert JA, Zimmermann D, Schaufler K. Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Wastewater of Abattoirs. *Antibiotics* (Basel). 2021 May 12;10(5):568. doi: 10.3390/antibiotics10050568. PMID: 34065908; PMCID: PMC8150771.

Jauregi, L., Epelde, L., Alkorta, I., & Garbisu, C. (2021). Antibiotic Resistance in Agricultural Soil and Crops Associated to the Application of Cow Manure-Derived Amendments From Conventional and Organic Livestock Farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.633858>

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 123–140. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 33(3), 300–305. https://doi.org/doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15.

Keda Jin, Yi Ran, Ahmed Alengebawy, Gaozhong Yang, Shijiang Jia, Ping Ai. 2022. Agro-environmental sustainability of using digestate fertilizer for solanaceous and leafy vegetables cultivation: Insights on fertilizer efficiency and risk assessment. *Journal of Environmental Management*, Volume 320, 115895. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115895>.

- Kierzkowska, M., Majewska, A., & Mlynarczyk, G. (2020). Trends and Impact in Antimicrobial Resistance Among *Bacteroides* and *Parabacteroides* Species in 2007–2012 Compared to 2013–2017. *Microbial Drug Resistance*, 26(12), 1452–1457. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0462>
- Krustok, I. (2016). Microbiological Analysis of Municipal Wastewater Threatening Photobioreactors [Mälardalen University Sweden]. In *Mälardalen University Press Dissertations No. 196*. <https://doi.org/10.1039/9781847551443-00109>
- Kweiner Tetteh, E., & Rathilal, S. (2020). Application of Organic Coagulants in Water and Wastewater Treatment. In A. Sand & E. Saki (Eds.), *Organic Polymers* (1 st, pp. 1–18). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84556>
- Percival, S., & W. Williams, D. (2014). Shigella. In S. L. Percival, D. W. Williams, & N. F. Gray (Eds.), *Microbiology of Waterborne Diseases* (2nd ed., pp. 223–236). Elsevier Inc. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00011-1>
- Lan, L., Kong, X., Sun, H., Li, C., & Liu, D. (2019). High removal efficiency of antibiotic resistance genes in swine wastewater via nanofiltration and reverse osmosis processes. *Journal of Environmental Management*, 231(August 2018), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.073>
- Lekagul, A., Tangcharoensathien, V., & Yeung, S. (2019). Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Veterinary and Animal Science*, 7(April), 100058. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100058>
- Leng, L., Wei, L., Xiong, Q., Xu, S., Li, W., Lv, S., Lu, Q., Wan, L., Wen, Z., & Zhou, W. (2020). Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review. *Chemosphere*, 238, 124680. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124680>
- Li, B., Huang, H., Sun, Z., Zhao, N., Munir, T., Yu, W., & Young, B. (2020). Minimizing heavy metals in recovered struvite from swine wastewater after anaerobic biochemical treatment: Reaction mechanisms and pilot test. *Journal of Cleaner Production*, 272, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122649>
- Lima, T., Domingues, S., & Silva, G. J. Da. (2020). Manure as a potential hotspot for antibiotic resistance dissemination by horizontal gene transfer events. *Veterinary Sciences*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/VETSCI7030110>
- Liu, C., Li, X., Zheng, S., Zhang kai, Jin, T., Shi, R., Huang, H., & Zheng, X. (2020). Effects of wastewater treatment and manure application on the dissemination of antimicrobial resistance around swine feedlots. *Journal of Cleaner Production*, 280, 123794. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123794>
- Liu, L., Hall, G., & Champagne, P. (2020). The role of algae in the removal and inactivation of pathogenic indicator organisms in wastewater stabilization pond systems. *Algal Research*, 46(December 2019), 101777. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101777>
- Ma, Z., Wu, H., Zhang, K., Xu, X., Wang, C., Zhu, W., & Wu, W. (2018). Long-term low dissolved oxygen accelerates the removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in swine wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 334(October 2017), 630–637. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.051>

- Mahizan, N. A., Yang, S. K., Moo, C. L., Song, A. A. L., Chong, C. M., Chong, C. W., Abushelaibi, A., Erin Lim, S. H., & Lai, K. S. (2019). Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. *Molecules*, *24*(14), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., & Edwards, R. (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, *9*(1), 386. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386>
- Mohsenpour, S. F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloye, A., & Gutierrez, T. (2021). Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. *Science of the Total Environment*, *752*(September 2020), 142168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142168>
- Molazadeh, M., Ahmadzadeh, H., Pourianfar, H. R., Lyon, S., & Rampelotto, P. H. (2019). The use of microalgae for coupling wastewater treatment with CO₂ biofixation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*(MAR). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00042>
- Muensritharam, L., Fanning, S., & Meharg, C. (2016). Pathogens in Milk: Enterobacter Species. *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00987-2>
- Munasinghe-Arachchige, S. P., Delanka-Pedige, H. M. K., Henkanatte-Gedera, S. M., Tchinda, D., Zhang, Y., & Nirmalakhanda, N. (2019). Factors contributing to bacteria inactivation in the Galdieria sulphuraria-based wastewater treatment system. *Algal Research*, *38*, 101392. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101392>
- Munita, J. M., Arias, C. A., Unit, A. R., & Santiago, A. De. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectrum*, *4*(2), 1–37. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms>
- Muñoz, R., & Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*, *40*(15), 2799–2815. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.011>
- Nagarajan, D., Kusmayadi, A., Yen, H. W., Dong, C. Di, Lee, D. J., & Chang, J. S. (2019). Current advances in biological swine wastewater treatment using microalgae-based processes. *Bioresource Technology*, *289*(June), 121718. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121718>
- Nguyet, L. T. Y., Keeratikunakorn, K., Kaeoket, K., & Ngamwongsatit, N. (2022). Antibiotic resistant Escherichia coli from diarrheic piglets from pig farms in Thailand that harbor colistin-resistant mcr genes. In *Scientific Reports* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13192-3>
- Nnadozie, C. F., & Odume, O. N. (2019). Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environmental Pollution*, *254*, 113067. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113067>
- Nõlvak, H., Truu, M., Oopkaup, K., Kanger, K., Krustok, I., Nehrenheim, E., & Truu, J. (2018). Reduction of antibiotic resistome and integron-integrase genes in laboratory-

scale photobioreactors treating municipal wastewater. *Water Research*, 142, 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.06.014>

Norvill, Z. N., Toledo-Cervantes, A., Blanco, S., Shilton, A., Guieysse, B., & Muñoz, R. (2017). Photodegradation and sorption govern tetracycline removal during wastewater treatment in algal ponds. *Bioresource Technology*, 232, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.011>

Olatunde, O. C., Kuvarega, A. T., & Onwudiwe, D. C. (2020). Photo enhanced degradation of contaminants of emerging concern in waste water. *Emerging Contaminants*, 6, 283–302. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2020.07.006>

Oliveira, G. A., Carissimi, E., Monje-Ramírez, I., Velasquez-Orta, S. B., Rodrigues, R. T., & Ledesma, M. T. O. (2018). Comparison between coagulation-flocculation and ozone-flotation for *Scenedesmus* microalgal biomolecule recovery and nutrient removal from wastewater in a high-rate algal pond. *Bioresource Technology*, 259, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.072>

Özen, A. I., & Ussery, D. W. (2012). Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*? *Microbial Ecology*, 63(2), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9914-8>

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>

Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., & Mulkiwicz, E. (2019). Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Science of the Total Environment*, 697, 134023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>

Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>

Philip, J. M., Aravind, U. K., & Aravindakumar, C. T. (2018). Emerging contaminants in Indian environmental matrices – A review. *Chemosphere*, 190, 307–326. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.120>

Phoon, B. L., Ong, C. C., Mohamed Saheed, M. S., Show, P. L., Chang, J. S., Ling, T. C., Lam, S. S., & Juan, J. C. (2020). Conventional and emerging technologies for removal of antibiotics from wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 400(February), 122961. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122961>

Pinilla, G., Muñoz, L., & Arévalo, P. (2012). El ataque de las bacterias: cómo prevenirlo sin morir en el intento . *Nova- Publicación En Ciencias Biomédicas*, 10(Julio-Diciembre), 135–150. <https://doi.org/DOI: 10.22490/24629448.1012>

Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G., & Simões, M. (2013). Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5096–5105. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1791-x>

- Qu, W., Loke Show, P., Hasunuma, T., & Ho, S. H. (2020). Optimizing real swine wastewater treatment efficiency and carbohydrate productivity of newly microalga *Chlamydomonas* sp. QWY37 used for cell-displayed bioethanol production. *Bioresource Technology*, 305(January), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123072>
- Quijano, G., Arcila, J. S., & Buitrón, G. (2017). Microalgal-bacterial aggregates: Applications and perspectives for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 35(6), 772–781. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.003>
- Quijano, G., Valenzuela, E. I., Cantero, D., Ramírez, M., & Figueroa-González, I. (2021). Impact of an anoxic desulfurization process on methane content of the purified biogas. *Fuel*, 303, 121256. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121256>
- Rajkovic, A. (2016). Staphylococcus: Food Poisoning. In *Encyclopedia of Food and Health* (Vol. 224, Issue 5809, pp. 133–139). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00655-3>
- Ran, C., Zhou, X., Yao, C., Zhang, Y., Kang, W., Liu, X., Herbert, C., & Xie, T. (2021). Swine digestate treatment by prior nitrogen-starved *Chlorella vulgaris*: The effect of over-compensation strategy on microalgal biomass production and nutrient removal. *Science of the Total Environment*, 768(2021), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144462>
- Ranjbar, R., & Farahani, A. (2019). Shigella Antibiotic resistance mechanisms and new horizons for treatment. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3137–3167. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219755>
- Rasmussen, B. A., Bush, K., & Tally, F. P. (1993). Antimicrobial Resistance in Bacteroides. *Clinical Infectious Diseases*, 16(Supplement_4), S390–S400. https://doi.org/10.1093/clinids/16.Supplement_4.S390
- Rodríguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., & Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323, 361–380. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.106>
- Rodríguez-Noriega, E., León-Garnica, G., Petersen-Morfín, S., Pérez-Gómez, H. R., González-Díaz, E., & Morfín-Otero, R. (2014). *La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013*. 34, 181–190.
- Rosenblatt-Farrell, N. (2009). The Landscape of Antibiotic Resistance. *Environ Health Perspect*, 117(6), A244–A250. <https://doi.org/10.1289/ehp.117-a244>
- Roulová, N., Mot'ková, P., Brožková, I., & Pejchalová, M. (2022). Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater in the Czech Republic. *Journal of Water and Health*, 20(4), 692–701. <https://doi.org/10.2166/wh.2022.101>
- Rout, P. R., Zhang, T. C., Bhunia, P., & Surampalli, R. Y. (2021). Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A review. *Science of the Total Environment*, 753, 141990. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141990>
- Russell, J. N., & Yost, C. K. (2021). Alternative, environmentally conscious

approaches for removing antibiotics from wastewater treatment systems. *Chemosphere*, 263, 128177. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128177>

Sabri, N. A., van Holst, S., Schmitt, H., van der Zaan, B. M., Gerritsen, H. W., Rijnaarts, H. H. M., & Langenhoff, A. A. M. (2020). Fate of antibiotics and antibiotic resistance genes during conventional and additional treatment technologies in wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 741, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140199>

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

Sanderson, H., Fricker, C., Brown, R. S., Majury, A., & S.N.Liss. (2016). Antibiotic resistance genes as an emerging environmental contaminant. *Environmental Reviews*, 24(2), 1–68. <https://doi.org/doi.org/10.1139/er-2015-0069>.

Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>.

Sanz, C., Casado, M., Navarro-Martin, L., Tadić, Đ., Parera, J., Tugues, J., Bayona, J. M., & Piña, B. (2021). Antibiotic and antibiotic-resistant gene loads in swine slurries and their digestates: Implications for their use as fertilizers in agriculture. *Environmental Research*, 194, 110513. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110513>

Saucedo-Terán, R. A., Mora-Orozco, C. de la, González-Acuña, I. J., Gómez-Rosales, S., Domínguez-Arajuo, G., & Rubio-Arias, H. O. (2017). Removing organic matter and nutrients from swine wastewater after anaerobic-aerobic treatment. *Water (Switzerland)*, 9(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/w9100726>

Sciortino, S., Arculeo, P., Alio, V., Cardamone, C., Nicastro, L., Arculeo, M., Alduina, R., & Costa, A. (2021). Occurrence and Antimicrobial Resistance of *Arcobacter* spp recovered from aquatic environments. *Antibiotics*, 10(3), 288. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030288>

Score, J., & A.Phillips, C. (2015). *Arcobacter* species an emerged or emerging pathogen. In S. C. Ricke, J. R. Donaldson, & C. A. Phillips (Eds.), *Food Safety Emerging Issues, Technologies and Systems* (pp. 235–263). Elsevier Inc. <https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-12-800245-2.00012-5>

Seoane, J., Yankelevich, T., Dechesne, A., Merkey, B., Sternberg, C., & Smets, B. F. (2010). An individual-based approach to explain plasmid invasion in bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(17–27). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00994.x>

Singh, P., Verma, N., Kumar, P., & Nagu, P. (2018). Review on a Potential of Antibiotics. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(5-s), 35–40. <https://doi.org/10.22270/jddt.v8i5-s.1936>

Singh, S. P., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>

Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: Building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>

Spigaglia, P., Mastrantonio, P., & Barbanti, F. (2018). Antibiotic resistance of *Clostridium difficile*.pdf. In *Updates on Clostridium difficile in Europe* (1st ed., pp. 137–159). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_9

Starr, C., Taggart, R., Evers, C., & Starr, L. (2009). ¿Cómo liberan las células la energía química? In C. Islas (Ed.), *Biología La unidad y la diversidad de la vida* (12a ed., p. 965). CENGAGE Learning. https://www.academia.edu/36129064/Biología_La_unidad_y_la_diversidad_de_la_vida

Sui, Q., Chen, Y., Yu, D., Wang, T., Hai, Y., Zhang, J., Chen, M., & Wei, Y. (2019). Fates of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes and microbial community structures in typical swine wastewater treatment processes. *Environment International*, 133(June), 105183. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105183>

Sui, Q., Zhang, J., Chen, M., Tong, J., Wang, R., & Wei, Y. (2016). Distribution of antibiotic resistance genes (ARGs) in anaerobic digestion and land application of swine wastewater. *Environmental Pollution*, 213, 751–759. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.038>.

Sui, Q., Zhang, J., Tong, J. et al. Seasonal variation and removal efficiency of antibiotic resistance genes during wastewater treatment of swine farms. *Environ Sci Pollut Res* 24, 9048–9057 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5891-7>.

Sukla, L. B., Subudhi, E., & Pradhan, D. (2019). The Role of Microalgae in Wastewater Treatment. In *The Role of Microalgae in Wastewater Treatment*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1586-2>

Sun, Z. liang, Sun, L. qin, & Chen, G. zhong. (2019). Microalgal Cultivation and Nutrient Removal from Digested Piggery Wastewater in a Thin-film Flat Plate Photobioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(4), 1488–1501. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2889-x>

Sylvestre, S. H. Z., Hoppe, E. G. L., & Oliveira, R. A. de. (2014). Removal of Total Coliforms , Thermotolerant Coliforms , and Helminth Eggs in Swine Production Wastewater Treated in Anaerobic and Aerobic Reactors. *International Journal of Microbiology*, 1–11. <https://doi.org/doi.org/10.1155/2014/757934>

Tan, S. Y., & Tatsumura, Y. (2015). Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Medical Journal*, 56(7), 366–367. <https://doi.org/10.11622/smedj.2015105>

Tao, C. W., Hsu, B. M., Ji, W. T., Hsu, T. K., Kao, P. M., Hsu, C. P., Shen, S. M., Shen, T. Y., Wan, T. J., & Huang, Y. L. (2014). Evaluation of five antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR. *Science of the Total Environment*, 496, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.024>

Tricolici, O., Bumbac, C., & Postolache, C. (2014). Microalgae-bacteria system for biological wastewater treatment. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 15(1), 268–276.

Tripathi, V., & Tripathi, P. (2017). Antibiotic Resistance Genes: An Emerging Environmental Pollutant. In: Kesari K. (eds) Perspectives in Environmental Toxicology. In C. Springer (Ed.), *Environmental Science and Engineering* (Issue 9783319462479, pp. iii–iv). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46248-6_9

Urrea, J., Alkorta, I., Mijangos, I., Epelde, L., & Garbisu, C. (2019). Application of sewage sludge to agricultural soil increases the abundance of antibiotic resistance genes without altering the composition of prokaryotic communities. *Science of the Total Environment*, 647, 1410–1420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.092>

Vandamme, D., Muylaert, K., Fraeye, I., & Foubert, I. (2014). Floc characteristics of *Chlorella vulgaris*: Influence of flocculation mode and presence of organic matter. *Bioresource Technology*, 151, 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.112>

Villar-Navarro, E., Baena-Nogueras, R. M., Paniw, M., Perales, J. A., & Lara-Martín, P. A. (2018). Removal of pharmaceuticals in urban wastewater: High rate algae pond (HRAP) based technologies as an alternative to activated sludge based processes. *Water Research*, 139, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.072>

Von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., Van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., Van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>

Wang, J., Ben, W., Yang, M., Zhang, Y., & Qiang, Z. (2016). Dissemination of veterinary antibiotics and corresponding resistance genes from a concentrated swine feedlot along the waste treatment paths. *Environment International*, 92–93, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.020>

Wexler, H. M. (2007). Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 593–621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>

WHO. (2020). *Antibiotic resistance*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance#:~:text=Bacteria%2C not humans or animals,hospital stays%2C and increased mortality>.

Yan, H., Yu, B., Degroote, J. et al. Antibiotic affects the gut microbiota composition and expression of genes related to lipid metabolism and myofiber types in skeletal muscle of piglets. *BMC Vet Res* 16, 392 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02592-0>.

Yang, Ying, Li, B., Ju, F., & Zhang, T. (2013). Exploring variation of antibiotic resistance genes in activated sludge over a four-year period through a metagenomic approach. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 47, Issue 18, pp. 10197–10205). <https://doi.org/10.1021/es4017365>

Yang, Yiwen, Liu, Z., Xing, S., & Liao, X. (2019). The correlation between antibiotic resistance gene abundance and microbial community resistance in pig farm wastewater and surrounding rivers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182(June), 109452. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109452>

Yoo, K., Yoo, H., Lee, J., Choi, E. J., & Park, J. (2020). Exploring the antibiotic

resistome in activated sludge and anaerobic digestion sludge in an urban wastewater treatment plant via metagenomic analysis. In *Journal of Microbiology* (Vol. 58, Issue 2, pp. 123–130). <https://doi.org/10.1007/s12275-020-9309-y>

Zafar, H., & Saier, M. H. (2021). Gut Bacteroides species in health and disease. *Gut Microbes*, 13(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1848158>

Zaman, S. Bin, Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, 9(6), 1–9. <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>

Zhang, B., Li, W., Guo, Y., Zhang, Z., Shi, W., Cui, F., Lens, P. N. L., & Tay, J. H. (2020). Microalgal-bacterial consortia: From interspecies interactions to biotechnological applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 118(November 2019), 109563. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109563>

Zhang, M., Liu, Y. S., Zhao, J. L., Liu, W. R., Chen, J., Zhang, Q. Q., He, L. Y., & Ying, G. G. (2021). Variations of antibiotic resistome in swine wastewater during full-scale anaerobic digestion treatment. *Environment International*, 155, 106694. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106694>

Zhang, Y., Zhang, T., Liu, H., Qu, J., Li, C., Chen, J., & Peijnenburg, W. (2020). Simulated sunlight-induced inactivation of tetracycline resistant bacteria and effects of dissolved organic matter. *Water Research*, 185, 116241. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116241>

Zhu, N., Jin, H., Ye, X., Liu, W., Li, D., Shah, G. M., & Zhu, Y. (2020). Fate and driving factors of antibiotic resistance genes in an integrated swine wastewater treatment system: From wastewater to soil. *Science of the Total Environment*, 721, 137654. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137654>