



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA

**REMOCIÓN DE GENES RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN PLANTAS
DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL DE LA CDMX.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA
P R E S E N T A :
MARGARITA JAZMIN HERNANDEZ SANTIAGO

JURADO DE EXAMEN

DIRECTOR: DR. DANIEL DE LOS COBOS VASCONCELOS.
ASESOR: DR. OCTAVIO REYES HERNÁNDEZ.
ASESOR: DR. JORGE ANTONIO VALDIVIA ANISTRO.
SINODAL: DR. HERNANDEZ AVILES JUSTO SALVADOR.
SINODAL: MTRO. HERNANDEZ MUÑOZ MARCO ANTONIO.



Ciudad de México



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.

El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM (Campus Ciudad Universitaria), que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015 No. de Certificado CMX C SGC 285 2023, válido en el período del 12 de octubre de 2023 al 11 de octubre de 2026



**GOBIERNO DE LA
CIUDAD DE MÉXICO**

Esta investigación fue desarrollada gracias al apoyo de la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SECTEI) del Gobierno de la Ciudad de México (proyecto 265/2049).

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme esta gran inteligencia y amor a su hermosa creación para poder estudiarla con un gran respeto y admiración.

A mi mamá por apoyarme en cada paso que doy, por su increíble paciencia y amor.

A mi hermano el M. en C. Erick por ser mi mejor maestro en cada tema que se me dificultaba y amigo, por escuchar cada anécdota, por siempre saber que decir para mantenerme motivada por ser una inspiración para mí.

Al resto de mi familia, mis primas, tías, mi abuelita, por su apoyo, interés en mi vida académica y mi salud, por los hermosos ratos que pasamos juntos en cada reunión familiar.

Al Dr. Noyola por confiar en mí y aceptarme como parte de este proyecto.

Al Dr. Daniel por ser mi asesor principal y por el aprendizaje obtenido

A la M. en C. Margarita Cisneros por su ayuda en temas burocráticos, y su presión constante.

Al Dr. Yovany por transmitirme su conocimiento y pasión sobre temas y técnicas relacionadas con mi tema y con la vida en general, por su confianza, ser mi amigo y ayudarme en todo lo que se me surgiera en el camino, por ser un gran ejemplo a seguir.

A la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SECTEI) por la beca para la realización de este proyecto.

Al resto de mis compañeros de GIPA por ser mis amigos, brindarme su apoyo y ánimo constante.

A todos mis amigos de la FES Zaragoza por su hermosa amistad y amor que me brindan día a día, en especial a: Salvador por estar conmigo en las buenas y malas y a Sebas por su presión para terminar las correcciones motivándome gracias a su peculiaridad competitividad conmigo.

A mi jefa Guadalupe y a mis compañeros de trabajo Adri y Luis por siempre escucharme, apoyarme y motivarme en seguir adelante.

A mí por nunca rendirme pese a los obstáculos o distracciones que se me fueron presentando.

Índice

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
MARCO TEÓRICO.....	11
Tratamiento de las aguas residuales municipales y sus tecnologías	11
Tratamiento preliminar de aguas residuales	12
Tratamiento primario de aguas residuales	13
Tratamiento secundario de aguas residuales	14
a. Procesos anaerobios para la transformación de la materia orgánica.	14
b. Procesos aerobios para la transformación de la materia orgánica	14
Tratamiento terciario de aguas residuales.....	15
Desinfección.....	15
A) Cloración.....	15
B) Luz UV.....	16
tecnologías en las plantas de tratamiento de agua residual	17
Lodos activados convencionales	17
Lodos activados con aireación extendida.....	17
Membranas de filtración (MBR).....	18
Humedales artificiales.....	18
Reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB).	19
Las PTAR como sitios de concentración de genes de resistencia a antibióticos	20
Uso de aguas residuales para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana.	21
Presión selectiva.....	22
Adquisición de resistencia antimicrobiana	23
Mecanismos de acción antimicrobiana.....	25
Cefalosporinas.....	29
Carbapenémicos.....	30
Glucopéptidos	31
Inhibición de la síntesis de proteínas	32
Inhibición de vías metabólicas.....	33
Mecanismos de resistencia	35
Permeabilidad disminuida.....	36

Producción de enzimas.	37
Alteración de dianas antimicrobianas.....	39
JUSTIFICACIÓN Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	41
OBJETIVO GENERAL.....	42
Objetivos particulares	42
MATERIAL Y MÉTODOS	43
Diseño de muestreo	43
A) Trabajo de campo	43
1. Colecta de muestras	43
B) Trabajo de laboratorio.	44
1. Extracción de DNA total en agua residual	44
2. Análisis de integridad de las extracciones de DNA total.	45
3. Selección de <i>GRA</i> Y <i>EGM</i>	45
4. Amplificación de <i>GRA</i> mediante PCR punto final	46
5. Curva estándar para qPCR	46
Análisis estadísticos.....	48
RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	49
1. Pruebas de amplificación de <i>GRA</i> en ADN provenientes de aguas residuales de la CDMX.	52
2. Abundancia de <i>GRA</i> en influentes, efluentes después del tratamiento biológicos y efluentes finales	55
3. Acumulación de <i>GRA</i> en lodo secundario.	74
CONCLUSIONES.	76
Anexo.	77
REFERENCIAS.....	78

RESUMEN

Actualmente, las regulaciones de descarga para plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) se basan en parámetros convencionales, pero se necesita más para garantizar la reutilización segura del agua. En particular, no se consideran los contaminantes emergentes, como los antimicrobianos y los genes de resistencia a los antibióticos (GRA). Esta investigación se centra en el destino de los contaminantes biológicos emergentes durante el tratamiento de aguas residuales en la Ciudad de México. *intl1* y los ARG *cphA-02*, *OXA-10* y *sul1* se analizaron mediante qPCR. Se realizaron dos campañas de muestreo (épocas de lluvia y seca) en cuatro EDAR municipales de la Ciudad de México, representando cinco procesos de tratamiento biológico: lodos activados convencionales, lodos activados de aireación extendida, biorreactor de membrana, digestión anaeróbica directa y humedal artificial, seguido de luz ultravioleta. o desinfección con cloro. Los ARG aquí estudiados fueron parcialmente eliminados en las EDAR, y en la mayoría de los casos, el número de copias por segundo descartadas en los lodos fue mayor que en el efluente.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos patógenos fueron causantes de múltiples enfermedades y decesos, hasta que el desarrollo y aplicación generalizada de los antibióticos proporcionó un tratamiento eficiente para las infecciones bacterianas. Sin embargo, se ha incrementado la diseminación de bacterias resistentes a antibióticos, por lo que el uso de estos compuestos se ha visto comprometido (MacLean & San Millan, 2019). Aunque la evolución de la resistencia y los eventos de transferencia de genes asociados con genes de resistencia a antibióticos (GRA) es compleja, se supone que el uso excesivo y, a menudo, el uso indebido de antibióticos en la medicina humana y veterinaria es la principal fuerza impulsora del desarrollo de la resistencia dando como resultado la proliferación de GRA, lo que hace que el tratamiento de enfermedades sea menos eficiente, más costoso y, a menudo imposible (Alexander *et al.*, 2020; Langbehn *et al.*, 2021).

La vigilancia en aguas residuales se ha utilizado con éxito para cuantificar la presencia y abundancia de GRA (Aarestrup & Woolhouse, 2020). Sin embargo, las plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) pueden actuar como reservorios y proveedores de genes vinculados con la resistencia a la mayoría de los antibióticos debido a que estos agentes antimicrobianos consumidos a nivel doméstico son liberados en grandes cantidades a lagunas residuales municipales que favorecen la selección de GRA que son adquiridos por transferencia horizontal de genes (THG) (Karman *et al.*, 2017). Esto propicia la propagación de los GRA entre especies bacterianas generando una presión selectiva entre ellas debido a estos ambientes hostiles en las PTAR, y, facilitando que los GRA y las bacterias resistentes a antibióticos (BRA) que los portan ingresen al medio acuático entre otros matices ya que, si las aguas residuales son utilizadas para riego, llegan a más componentes ambientales (Bouki *et al.*, 2013; Karkman *et al.*, 2018; Sorinolu *et al.*, 2021).

En las PTAR un tema muy discutido (Alexander *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2017; H.Wang *et al.*, 2021) es su capacidad para eliminar GRA y BRA, debido a que algunas no están diseñadas para eliminar estos contaminantes emergentes, además, la diversidad de GRA ha aumentado, por ejemplo, en los últimos años se han descrito más de ~1,000 variantes de β -lactamasas por ser uno de los

antibióticos más recetados a nivel mundial (Alexander *et al.*, 2020). Sumado a esto, la pandemia de SARS-Cov-2 pudo contribuir al aumento del consumo global de antibióticos, lo cual, contribuye a la aparición de antibióticos en las aguas residuales y ejercer presión selectiva en este medio para la proliferación de GRA (Alexander *et al.*, 2020; Langbehn *et al.*, 2021).

A medida que aumenta la reutilización del agua, se ha incrementado la preocupación por la introducción de BRA y GRA; además la agricultura sostenible promueve la reutilización de los lodos activados (o biosólidos) debido a que tienen un contenido de nutrientes relativamente más alto que puede aumentar el rendimiento de los cultivos y reducir los requisitos de fertilizantes, dependiendo del nivel de tratamiento (Shi *et al.*, 2021). En consecuencia, el agua residual y los biosólidos que contienen BRA y GRA representan un problema de salud pública por su movilidad a mantos freáticos utilizados para suministrar los servicios de agua potable (Kim & Aga, 2007; Sorinolu *et al.*, 2021).

El uso de herramientas y métodos avanzados de microbiología molecular, como la metagenómica, han ayudado a conocer más acerca del destino, distribución, movilidad y hospedadores microbianos de GRA en las PTAR y que ingresan al medio ambiente a través de sus afluentes (Bouki *et al.*, 2013; Aarestrup & Woolhouse 2020). Los métodos moleculares para la detección y caracterización de BRA y de los GRA incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*, PCR) (simple, múltiple y en tiempo real), la secuenciación de ADN y las técnicas basadas en hibridación (macro- y microarreglos) (Cuetero *et al.*, 2023). A diferencia de la PCR convencional, la qPCR puede dar seguimiento al progreso de la amplificación del ADN en tiempo real y visualizar la fase de amplificación exponencial (Kim *et al.*, 2013). La clave para la cuantificación absoluta de la “secuencia blanco” se consigue midiendo continuamente la fluorescencia emitida a medida que se acumulan los amplicones, aunque cada método de detección tiene características únicas, en todos los métodos, el nivel de señal de fluorescencia refleja la cantidad acumulada de amplicones de la “secuencia blanco” (Kim *et al.*, 2013). Aunque, teóricamente, cualquier secuencia puede detectarse selectivamente

mediante qPCR, la especificidad y sensibilidad del análisis se ve afectada en gran medida por la especificidad de los iniciadores y la sonda utilizada (Lim et al., 2011).

Está claro que las bacterias continuarán desarrollando resistencia durante el tratamiento de las aguas residuales (Adekanmbi *et al.*, 2020; Alexander *et al.*, 2020), ya sea por nuevas mutaciones o por el intercambio de información, donde genes que codifican para diferentes mecanismos de resistencia son adquiridos por nuevos huéspedes. Por ende, vigilar la resistencia antimicrobiana nos dará información sobre la capacidad de las plantas de tratamiento de agua residual para eliminar estos microorganismos y/o los genes de resistencia antimicrobianos.

MARCO TEÓRICO

Tratamiento de las aguas residuales municipales y sus tecnologías

De acuerdo con Noyola *et al.* (2013), las aguas residuales municipales son la combinación de diversas corrientes de descarga, provenientes de residencias, instituciones, establecimientos comerciales e industriales, que se incorporan al sistema de drenaje urbano que, por su composición, tienen diversas sustancias que alteran su composición. Generalmente, las aguas residuales sin tratar se vertían en cuerpos de agua y, alternativamente, se aplicaban a los campos para disponer de ellas o mantener la fertilidad del suelo (Aarestrup *et al.*, 2020). Su aplicación en la producción agrícola se mantiene en países de desarrollo o donde el agua escasea y no hay una adecuada gestión sanitaria (Noyola *et al.*, 2013).

Trabajos de investigación describieron una relación entre la disposición de agua residual a diferentes cuerpos de agua y el estado de salud de la población, ya que las enfermedades se extendieron a lo largo de las cuencas desde los pueblos “río arriba” hasta la desembocadura (Salgot & Folch, 2018). Esto impulsó la implementación de sistemas de alcantarillado y plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) en muchas partes del mundo (Salgot & Folch, 2018). En estos sistemas, los contaminantes contenidos en el agua residual son removidos o transformados por diversos procesos, dando por resultado un agua de mejor calidad (Noyola *et al.*, 2013).

Hay dos propósitos principales al tratar las aguas residuales: 1) el saneamiento del mayor número posible de asentamientos y la consiguiente necesidad de evacuación segura de las aguas residuales al medio ambiente y, 2) la reutilización de aguas residuales. Esta última apareció como una práctica de base tecnológica durante el siglo XX, luego de la implementación del tratamiento de aguas residuales a gran escala en todo el mundo desarrollado, y siguiendo también el aumento de la población que vive en las ciudades (Salgot & Folch, 2018).

Para que el agua residual pueda ser reutilizada, tiene que alcanzar una calidad igual o superior a la que se tenía antes de ser contaminada (Salgot & Folch, 2018). Por lo que es necesaria la integración de procesos que serán seleccionados en función de las características del agua residual a tratar y de la calidad deseada del agua tratada, los requerimientos de insumos se darán en función de las tecnologías seleccionadas para integrar el sistema de tratamiento y, por ende, el costo de operación dependerá también de ello (Noyola *et al.*, 2013). La eficacia del reciclaje y la reutilización de aguas residuales dependerá en gran medida de la fiabilidad y eficacia de las tecnologías para convertir las aguas residuales en agua utilizable segura

Para un sistema típico de tratamiento de aguas residuales, se requiere que las instalaciones lleven a cabo tres niveles de procesos de tratamiento (primario, secundario y terciario) (Gupta *et al.*, 2012; Noyola *et al.*, 2013). El uso de estos procesos dependerá del nivel de contaminación, la naturaleza de los contaminantes y el uso previsto después del tratamiento (Sonune & Ghate, 2004).

Tratamiento preliminar de aguas residuales

La primera etapa del tratamiento de aguas residuales puede comenzar con un proceso de selección preliminar para la eliminación de sólidos gruesos y otros materiales grandes, como: trapos, madera, papel, botellas, telas y artículos similares. Este proceso se efectúa por medio de cribas o rejillas, desarenadores y flotadores, en algunas PTAR se emplean trituradores para reducir el tamaño de ciertos desechos y reincorporarlos al tratamiento (Sonune & Ghate, 2004; Noyola *et al.*, 2013).

Tratamiento primario de aguas residuales

Después del proceso de selección preliminar, una porción de sólidos y materia orgánica suspendida es removida del agua residual utilizando la fuerza de gravedad como principio (Noyola *et al.*, 2013). Las aguas residuales se envían a tanques de sedimentación donde los sólidos más pesados se depositan en el fondo y los materiales más livianos pueden flotar hacia la superficie del tanque (Gupta *et al.*, 2012). El sólido sedimentado (lodo primario) se bombea a través de dispositivos para separar la arena, la gravilla y la grava del lodo. Luego, el lodo separado se desecha en un vertedero. La solución restante de los tanques de sedimentación primarios fluye a otros tanques para que se lleve a cabo el sistema de tratamiento secundario (Sonune & Ghate, 2004). El propósito del tratamiento primario es un proceso de purificación preliminar para eliminar sólidos orgánicos e inorgánicos gruesos, suspendidos y flotantes por procesos físicos; donde se espera reducir el total de sustancias sólidas en suspensión entre 50 y 60% y, en consecuencia, disminuir Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) en un 30% y las grasas y aceites en un 65% (Noyola *et al.*, 2013). También, fracciones de nitrógeno y fósforo orgánico, y metales pesados asociados con los sólidos pueden ser removidos durante la sedimentación primaria, pero los constituyentes coloidales y disueltos no se ven afectados (Sonune & Ghate, 2004). Los procesos utilizados son métodos de cribado, filtración, centrifugación, sedimentación, coagulación, gravedad y flotación (Sonune & Ghate, 2004; Noyola *et al.*, 2013).

A pesar de este tratamiento, la calidad del agua no es apta para descarga, reciclaje o reutilización, para que las aguas residuales sean aptas para el reciclaje o la reutilización, es necesario un tratamiento secundario o terciario con el fin de eliminar otros contaminantes y mejorar su calidad (Ding, 2017).

Tratamiento secundario de aguas residuales

El tratamiento secundario incluye rutas biológicas que ayudan a la eliminación de sustancias orgánicas e inorgánicas por actividad microbiana (Sonune & Ghate, 2004). El objetivo principal del proceso es disminuir la DBO como un indicador de reducción de la materia orgánica disuelta y particulada y, en ciertos casos, los nutrientes tales como el nitrógeno y el fósforo (Noyola *et al.*, 2013; Ding, 2017). Las cepas bacterianas y fúngicas transforman la materia orgánica en formas químicas sencillas (agua, dióxido de carbono, amoníaco, entre otros) para aprovecharlas en su crecimiento (Sonune & Ghate, 2004).

a. Procesos anaerobios para la transformación de la materia orgánica.

Si el oxígeno libre disuelto no está disponible en las aguas residuales, se produce una descomposición anaeróbica (Ding, 2017). Las bacterias convierten la materia orgánica en compuestos orgánicos más simples y se liberan diversos gases como: nitrógeno molecular, óxido nitroso, sulfuro de hidrógeno y metano (Gupta *et al.*, 2012). Este proceso se caracteriza por tener una baja tasa de síntesis bacteriana que se ve reflejada en la cantidad de lodos de desecho producidos (Noyola *et al.*, 2013).

b. Procesos aerobios para la transformación de la materia orgánica

Cuando el oxígeno está disponible en forma disuelta en las aguas residuales, la materia orgánica sufre una tasa mayor de descomposición, provocada por bacterias aeróbicas y facultativas (Sonune & Ghate, 2004). La extensión del proceso no solo depende de la disponibilidad de oxígeno, también del tiempo de retención, la temperatura y, en consecuencia, de la actividad biológica de las bacterias (Gupta *et al.*, 2012). La técnica es eficaz para la eliminación de la demanda biológica de oxígeno (DBO), los compuestos orgánicos disueltos y suspendidos, los compuestos orgánicos volátiles, los nitratos, los fosfatos etc. La concentración de compuestos orgánicos biodegradables se puede reducir hasta ~90% (Gupta *et al.*, 2012; Sonune & Ghate, 2004). La desventaja del método es la producción de una gran cantidad de biosólidos en forma de lodo no estabilizado, gracias a una mayor cantidad de

energía del sustrato que es utilizada para la síntesis celular, que requieren un tratamiento y el costo del tratamiento sería elevado (Ding, 2017). El proceso aeróbico se lleva a cabo mediante filtros percoladores o procesos de lodos activados o lagunas de oxidación (Noyola *et al.*, 2013).

Tratamiento terciario de aguas residuales

El tratamiento terciario es necesario para cumplir criterios estrictos de descarga (remoción de nutrientes) o cuando el agua tratada está destinada a un uso en específico (Noyola *et al.*, 2013). Las tecnologías empleadas para mejorar la calidad del agua dependerán del uso esperado para dichos recursos, dichas tecnologías pueden ser costosas y, requerir un consumo elevado de energía y de personal altamente capacitado para operar durante todo el proceso (Ding, 2017). Las técnicas utilizadas para este fin son: la destilación, la cristalización, la evaporación, la extracción por solventes, la oxidación, la coagulación, la precipitación, la electrolisis, la electrodiálisis, el intercambio iónico, la ósmosis inversa y la adsorción (Gupta *et al.*, 2012; Noyola *et al.*, 2013).

Desinfección.

Para garantizar la calidad microbiológica, el tratamiento de desinfección es de primordial importancia. Con el uso de desinfectantes, se pueden eliminar las bacterias patógenas del agua y hacer que el agua sea segura para el usuario (Collivignarelli *et al.*, 2018). La aplicación de desinfectantes más comunes de aguas residuales son compuestos de cloro y ozono al igual que la utilización de luz ultravioleta (UV) (Amin *et al.*, 2013).

A) Cloración.

El cloro es el desinfectante por excelencia, ya que en general ofrece una gran eficacia y su aplicación se debe a su poder desinfectante por oxidación, destruyendo la célula tras provocar la rotura de la pared celular (Reyes, 2011). Las reacciones

Redox del cloro con las sustancias inorgánicas son muy rápidas, mientras que la oxidación de la materia orgánica suele ser más lenta, llegando en ocasiones a necesitar varias horas para que se produzca la oxidación total de algunos compuestos (Aguirre *et al.*, 2004).

En la práctica de la cloración del agua residual implica el suministro de entre 10 y 30 mg/L de cloro con tiempo de contacto de entre 30 y 60 minutos (Jiménez, 2001). Para determinar la dosis y el tiempo óptimo en la desinfección existen características del agua residual que tienen que ser consideradas como: a) el tamaño, distribución y concentración de *solidos suspendidos totales* (SST), b) la naturaleza de los organismos, número y distribución en el líquido y c) componentes químicos que pueden reaccionar con el desinfectante (Reyes, 2011).

B) Luz UV.

Su escasa exigencia de espacio y el gran atractivo de reducir los costes de obra civil y de operación ha hecho de la desinfección con luz ultravioleta (UV) sea uno de los más utilizados. Sin embargo, la aplicación de la luz UV para la desinfección de agua residual todavía presenta notables limitaciones, especialmente derivadas de su escasa eficacia cuando se utilizan aguas de composición fisicoquímica heterogénea en función de los vertidos de zona (Aguirre *et al.*, 2004).

El blanco principal de la desinfección mediante la luz UV es el material genético (Aguirre *et al.*, 2004). Los microbios son destruidos por la radiación UV cuando la luz penetra a través de la célula generando un daño genotóxico donde se forman dímeros de timina. La exposición a la luz UV provoca alteraciones en la información genética, lo que interfiere con la capacidad reproductora de la célula. Por consiguiente, los microorganismos son inactivados por la luz UV como resultado del daño fotoquímico que sostiene el ácido nucleico (Meza & Alvez 2013). La eficacia de la desinfección con luz UV es función de la dosis aplicada al agua, de la transmitancia del agua y de su concentración inicial de microorganismos (Aguirre *et al.*, 2004).

tecnologías en las plantas de tratamiento de agua residual

Lodos activados convencionales

Hoy en día, dada su eficiencia, operación relativamente simple y bajo costo, el proceso de lodos activados es, el más utilizado para el tratamiento secundario biológico de aguas residuales. En los procesos de lodos activados, los microorganismos se encuentran mezclados con la materia orgánica que digerirán para reproducirse y sobrevivir, esta se airea para proporcionar oxígeno disuelto para la biodegradación aeróbica. Las bacterias consumen una parte de los compuestos carbonosos coloidales y disueltos para satisfacer sus necesidades energéticas (catabolismo), y sintetizan otra parte, junto con una pequeña proporción de amonio y fósforo, en nuevos tejidos celulares (anabolismo) para formar una masa activa de microorganismos denominada lodo activado, a la mezcla de este lodo con el agua residual se llama licor mezclado. Un tanque de sedimentación (denominado sedimentador secundario o clarificador) donde el lodo activado (biomasa floculada) se separa gravitacionalmente de las aguas residuales tratadas. El efluente se desborda en el cuerpo de agua receptor. Una porción del lodo sedimentado debe ser retornado al tanque de aireación para mantener una apropiada relación sustrato-microorganismo y permitir así una adecuada degradación de la materia orgánica (Noyola *et al.*, 2013; Hreiz *et al.*, 2015).

Lodos activados con aireación extendida.

El reactor con aireación extendida es parecido a uno convencional solo que el tiempo de retención hidráulica y celular que es mayor para permitir la digestión del lodo por medio de la respiración endógena. La ventaja de esta variante es que simplifica considerablemente el manejo de lodos, la desventaja es que el costo por energía eléctrica es mayor por unidad de agua tratada en comparación con la variante convencional, el tiempo de retención hidráulica y celular que es mayor para permitir la digestión del lodo por medio de la respiración endógena, En estos sistemas, se prescinde del sedimentador primario, de forma que la totalidad de la

materia orgánica es recibida en el tanque de aeración. La baja carga orgánica y el largo tiempo de residencia de lodos, características de esta variante, permiten alcanzar la estabilización del lodo (Noyola *et al.*, 2013).

Membranas de filtración (MBR)

Los biorreactores de membrana (por sus siglas en inglés MBR) combinan tanto el tratamiento biológico como la separación física (utilizando membranas) de diversos contaminantes para tratar los desechos líquidos domésticos e industriales. Debido a la combinación de los procesos mencionados anteriormente, los MBR producen efluentes tratados de mayor calidad en comparación con el proceso convencional de lodos activados (Du *et al.*, 2020). Sin embargo, el ensuciamiento de la membrana afecta el flujo operativo y la vida útil de las membranas, otra desventaja es el costo de las membranas, lo que implican procesos de limpieza frecuentes y una vida útil de dos o tres años en el mejor de los casos (Noyola *et al.*, 2013).

Humedales artificiales

Durante los últimos treinta años, los humedales construidos (*constructed wetlands* por sus siglas en inglés CW) se han empleado ampliamente como tecnología de tratamiento de aguas residuales debido a una baja complejidad mecánica y a sus bajos requerimiento de energía, esto especialmente en países de bajos ingresos (Hazra *et al.*, 2022). Son sistemas diseñados que aprovechan la relación sinérgica de las plantas con sus organismos asociados, así como otros procesos bióticos y abióticos, para el tratamiento de varios tipos de aguas residuales, aguas pluviales, lixiviados de vertederos y otras fuentes de contaminación. Aunque la eficiencia general del proceso de un CW depende en gran medida de las especies de plantas seleccionadas, el número de especies de macrófitas que se han utilizado para este proceso se considera bastante limitado (Kochi *et al.*, 2020).

Reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB).

En los reactores UASB ocurren procesos de depuración anaeróbica, la cual transforma las sustancias contaminantes en amoníaco, dióxido de carbono, agua y sulfuro de hidrógeno (H_2S). La principal característica de un reactor UASB, además del flujo ascendente, es la formación de un manto de lodo floculento o granular con buena capacidad de sedimentación. El tratamiento se produce al entrar en contacto el agua residual y el lodo microbiológico. Los gases producidos en condiciones anaeróbicas (principalmente metano y dióxido de carbono) provocan una circulación interior, que colabora en la formación y mantenimiento de los gránulos. Parte del gas generado dentro del manto de lodos se adhiere a las partículas biológicas. Tanto el gas libre como las partículas a las que se ha adherido gas, ascienden hacia la parte superior del reactor. Allí se produce la liberación del gas adherido a las partículas, al entrar éstas en contacto con unos deflectores desgasificadores. Las partículas desgasificadas suelen volver a caer hasta la superficie del manto de lodo (Lorenzo, 2006).

Los UASB pueden ser diseñados en forma rectangular, cuadrada o circular. Se han construido en concreto reforzado, fibra de vidrio y acero inoxidable. Algunas ventajas de este tipo de proceso son que la producción de lodos estabilizados en exceso es mínima y fácilmente drenable hasta de 30 a 40 % y, por tanto, los costos de tratamiento del lodo y su transportación posterior son relativamente bajos, eficiencias de reducción de DBO_5 , DQO y SS en rangos de 70 al 90%, se pueden aplicar altas cargas hidráulicas y orgánicas con eficiencias aceptables, el reactor necesita poco espacio, su construcción no es compleja y los costos de operación y mantenimiento son relativamente bajos, y en cuanto a sus desventajas son que el comienzo del proceso es lento y requiere de un período de 8 a 12 semanas, es sensible a la presencia de compuestos tóxicos, y la reducción de bacterias patógenas es relativamente baja (Salazar-Larrosa *et al.*, 2019).

Las PTAR como sitios de concentración de genes de resistencia a antibióticos

Las PTAR tienen el propósito de remover diversos contaminantes (sólidos suspendidos, contaminantes orgánicos, entre otros) cumpliendo con las normas de evacuación segura de las aguas residuales para así poder ser reutilizadas entre otras cosas como relleno sanitario (Noyola *et al.*, 2013). Sin embargo, desde un punto de vista microbiológico, los efluentes finales de las PTAR están lejos de ser estériles y, por lo tanto, liberan al medio ambiente grandes cantidades de bacterias que, desafortunadamente, pueden albergar GRA y que pueden participar en la diseminación de estos genes al microbioma ambiental (Manaia *et al.*, 2018; Michael *et al.*, 2013).

La microbiota de las aguas residuales está compuesta principalmente de bacterias comensales humanas que se mezclan con bacterias de otros orígenes que, en conjunto, pueden sufrir cambios adaptativos a lo largo del tratamiento de una PTAR (Honda *et al.*, 2023). Los microorganismos que prosperan en las aguas residuales se adhieren a partículas (orgánicas e inorgánicas) que pueden eliminarse en los tanques de sedimentación primaria (Noyola *et al.*, 2013). Sin embargo, aquellos microorganismos que se encuentran en suspensión acaban en los tanques de tratamiento biológico donde los GRA no eliminados entran en contacto con las bacterias de los lodos activados. En este punto, las bacterias se encuentran bajo presiones selectivas impuestas por los niveles de antibióticos presentes, en estas condiciones es cuando puede ocurrir el desarrollo y propagación de GRA (Cuetero *et al.*, 2023).

En tanques de sedimentación, los lodos activados regresan a los reactores biológicos que se mezcla con el efluente primario que llega a la PTAR (Sonune & Ghate, 2004). Por lo que, puede generarse una estimulación de las bacterias que llegan como las BRA. Además de que factores como la alta carga de nutrientes, el pH, temperatura y la proximidad de las células en los flóculos puede facilitar la transferencia horizontal de genes (Karman *et al.*, 2017). En las PTAR que cuentan

con pasos de desinfección las células se encuentran nuevamente en condiciones estresantes. La efectividad de los procesos de cloración o radiación UV no solo depende de la dosis sino de otros factores (Manaia et al., 2018; Michael et al., 2013).

Los lodos de depuradora son una suspensión con un contenido variable de humedad resultante de las operaciones de sedimentación primaria y secundaria en los procesos de tratamiento de agua residual, estos deben estabilizarse antes de su disposición final mediante procesos químicos, físicos o biológicos. Los GRA se concentran en los niveles primarios y lodos secundarios por procesos de sedimentación por lo que es de suma importancia la vigilancia de los efluentes en las PTAR y lodos, esto es necesario para estimar los riesgos potenciales para la salud asociados con su eliminación (Cuetero-Martínez *et al.*, 2022; Manaia *et al.*, 2018).

Uso de aguas residuales para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana.

Debido a que la resistencia a los antibióticos es un problema creciente para la salud mundial es importante contar con datos de vigilancia confiables que describan y caractericen con precisión la aparición y distribución de la resistencia a los antimicrobianos al igual contar con patrones geográficos y estacionales para rastrear los cambios en la resistencia a lo largo del tiempo para mitigar las infecciones por la resistencia antimicrobiana, sin embargo esto ha sido difícil a una escala global y aún más en países de bajos ingresos en gran medida porque los sistemas de vigilancia actuales se basan en pacientes hospitalarios (Aarestrup & Woolhouse, 2020). La vigilancia y el análisis de resistencia a los antibióticos en las PTAR tiene una mayor ventaja debido a que proporciona un punto de vista más amplio sobre la presencia de GRA en una población, superando las limitaciones tradicionales de la vigilancia debido al tamaño de la muestra y/o datos únicamente de hospitales (Aarestrup & Woolhouse, 2020; Rodríguez *et al.*, 2021).

Además, las aguas residuales pueden brindar una oportunidad para el monitoreo en tiempo real o incluso ser una herramienta de predicción temprana de futuros brotes de infección, es decir, inmediatamente después de la exposición o durante las primeras etapas de la colonización, un individuo puede comenzar a eliminar biomarcadores de patógenos a los sistemas de alcantarillado municipales a través de diversas excreciones corporales (heces, orina, moco y nasal) y así producir una detección temprana posible con aguas residuales (Tiwari *et al.*, 2022).

Las aguas residuales han sido una fuente útil de información para la vigilancia epidemiológica de los poliovirus durante la campaña mundial de erradicación de la polio y en la pandemia de COVID-19, para estimar la circulación comunitaria del SARS-CoV-2 a diferentes escalas espaciales (Javvadi & Mohan, 2023). Un marco práctico de vigilancia de las PTAR debería incluir el estudio de las diversas comunidades microbianas presentes en estas instalaciones (Cuetero-Martínez *et al.*, 2022).

Los métodos actualmente aplicados para detectar BRA en aguas residuales se basan en enfoques fenotípicos basados en cultivo (difusión en disco o microdilución) y genotípicos (PCR, PCR cuantitativa) (Cuetero-Martínez *et al.*, 2022)., al igual que la secuenciación de próxima generación de ácidos nucleicos (ADN y ARN) aislados permite la detección oportuna de la resistencia antimicrobiana (Cuetero-Martínez *et al.*, 2022).

Presión selectiva

Los antibióticos son esenciales para el tratamiento de infecciones microbianas en humanos y animales, lo cual ha definido el desarrollo de la civilización humana tal como la conocemos (MacLean & San Millan, 2019). Durante décadas diferentes organizaciones han tratado de regular el uso de antibióticos en un esfuerzo por frenar el incremento de la resistencia, por ejemplo: en la agricultura antibióticos como la amoxicilina y la eritromicina, también se utilizan para tratar enfermedades,

promover el crecimiento y mejorar la eficiencia alimentaria en los animales lo cuales se han utilizado desmedidamente (Aarestrup & Woolhouse, 2020).

Debido a las grandes cantidades de antibióticos que consumen en la medicina y la agricultura se crea un ambiente hostil en lugares donde estas sustancias llegan como desecho en las PTAR; lugar dónde se pueden favorecer el establecimiento y propagación de microorganismos con mutaciones que favorezcan la generación de GRA (Baquero & Negri, 1998).

Adquisición de resistencia antimicrobiana

La presencia de elementos de resistencia a los antibióticos en las bacterias se vuelve aún más problemática debido a la transferencia horizontal genética (THG) que es un proceso de adquisición de genes del medio ambiente por medio de tres mecanismos, los cuales, también se llevan a cabo en las PTAR (Figura 1) (Karkman *et al.*, 2018).

Los mecanismos de THG por los que las bacterias pueden adquirir los genes de resistencia a antibióticos son:

1. Transformación: cuando las bacterias sensibles pueden volverse resistentes adquiriendo un gen de resistencia del medio (Figura 1a) Karkman *et al.*, 2018). El proceso comprende diferentes etapas: (i) captación de ADN, (ii) recombinación de ADN homólogo en el cromosoma o reconstitución de ADN plasmídico y (iii) eventualmente expresión fenotípica del material genético adquirido (Krüger & Stingl, 2011).
2. Transducción: se requiere de un bacteriófago (un virus) para transferir el ADN (Figura 1b) entre bacterias (Karkman *et al.*, 2018). Los bacteriófagos utilizan las células bacterianas para sus replicaciones, durante este procedimiento, es posible que fragmentos de ADN bacteriano (la secuencia de resistencia) entren en uno de los bacteriófagos el cual inyectará su contenido de ADN en otra bacteria para su posterior

replicación. Por tanto, la secuencia de resistencia puede ser recombinante con el ADN de la bacteria y convertirse en resistente (Abushaheen *et al.*, 2020).

3. Conjugación (plásmidos)Figura 1c): Los plásmidos son elementos genéticos móviles que transfieren GRA haciendo que la movilización y transferencia de resistencia sea posible y fácil de lograr entre bacterias con el mismo o diferente origen (Allen *et al.*, 2010; Karkman *et al.*, 2018). Como resultado, se comparten elementos conjugativos (como plásmidos y transposones) entre las células del donante y las del receptor (Abushaheen *et al.*, 2020).

Mutaciones espontaneas: replicación del cromosoma bacteriano que pueden hacer que las bacterias sean resistentes a antibióticos modificando las células diana o blanco.

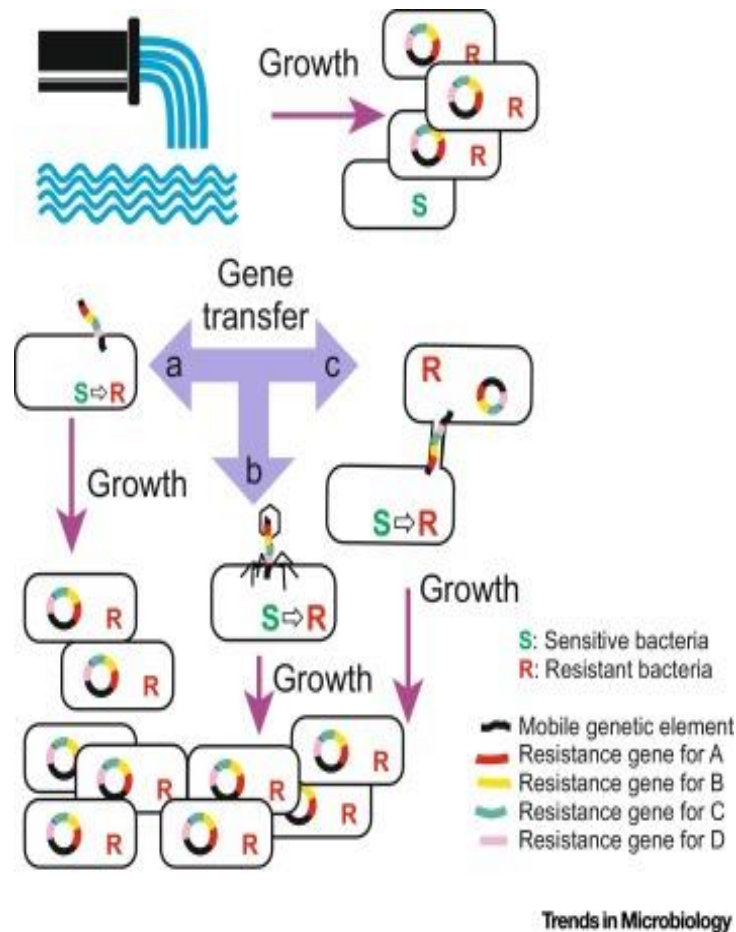


Figura 1. Mecanismos de transferencia horizontal genética en las PTAR (Karkman *et al.*, 2018).

Mecanismos de acción antimicrobiana

Para entender los mecanismos de resistencia que confieren los distintos tipos de GRA es necesario saber el mecanismo de acción de los antibióticos. Los agentes antimicrobianos se dirigen específicamente a las funciones microbianas vitales. Cada clase de agentes antimicrobianos actúa de manera diferente para inhibir (la pared celular, síntesis de proteínas, vías metabólicas etc. descritas a detalle más adelante) a las bacterias (Abushaheen *et al.*, 2020). Los mecanismos de acción son:

1. **Inhibición de la pared celular:** El peptidoglucano (PGN) es una estructura que cubre la membrana plasmática en bacterias Gramnegativas y Grampositivas y su función es mantener la forma de la célula, protegerla de lisis y, es esencial para el crecimiento y desarrollo normal de las bacterias (Suárez & Gudiol, 2009). El PGN, también llamado mucopéptido o mureína, está formado por ácido diaminopimélico, ácido murámico, ácido teicoico, aminoácidos, carbohidratos y lípidos (Cho *et al.*, 2014). El PGN está constituido por largas cadenas de glúcidos (repeticiones de moléculas de ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG)) (Figura 2) que, para su síntesis, se necesita la acción de enzimas transpeptidasas (Suárez & Gudiol, 2009). El PGN es el principal objetivo de antibióticos β -lactámicos (Abushaheen *et al.*, 2020).

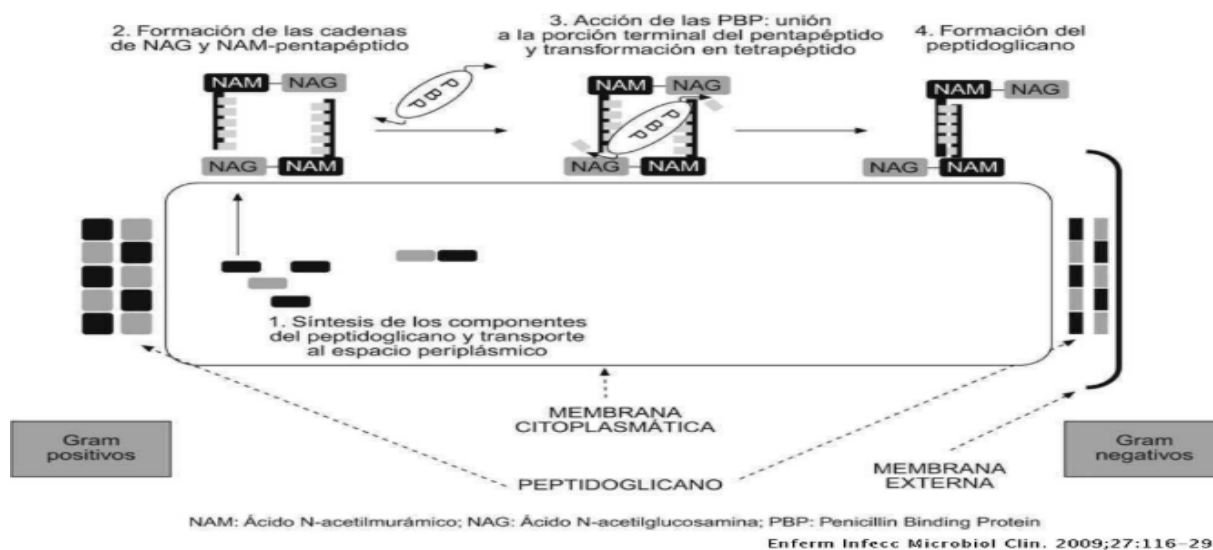


Figura 2. Fases de formación del peptidoglucano en bacterias gram-negativas y gram-positivas (Suárez & Gudiol, 2009).

Los β -lactámicos siguen siendo la clase de antibióticos más prescrita y la más importante en términos de ventas (Tooke *et al.*, 2019). Existen cuatro clases de β -lactámicos en uso clínico (Figura 3): las penicilinas, las cefalosporinas, los carbapenémicos y los monobactámicos (Tabla 1). Estas clases se caracterizan por la presencia del anillo β -lactámico (en rojo, Figura 3) de tres carbonos y un nitrógeno (Tooke *et al.*, 2019; Varela *et al.*, 2021).

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos betalactámicos (Suárez & Gudiol, 2009).

GRUPO	CARACTERÍSTICAS Y/O TIPO	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	
		Parenteral	Oral
PENICILINAS (SENSIBLES BETALACTAMASAS)	Activas frente a enterobacterias	Ampicilina	Amoxicilina, ampicilina
	Espectro reducido	Bencilpenicilina (penicilina G)	Fenoxibencilpenicilina (penicilina V)
	Antiestafilocócicas	Cloxacilina, meticilina, nafcilina	Cloxacilina, dicloxacilina
PENICILINAS (RESISTENTES BETALACTAMASAS)	Combinadas con inhibidores de las betalactamasas	Amoxicilina con ácido clavulánico, piperacilina con tazobactam, ampicilina con sulbactam, ticarcilina con ácido clavulánico	Amoxicilina con ácido clavulánico
	Primera generación	Cefazolina, cefadroxilo, cefradina	Cefalexina, cefadroxilo, cefradina
	Segunda generación	Cefuroxima, cefonicida, cefamandol, Cefoxitina, cefotetán, cefmetazol, cefminox	Cefaclor, cefuroxima axetil, cefprozilo
	Tercera generación	Ceftriaxona, cefotaxima, ceftizoxima, Cefacidima, cefepima, cefoperazona	Cefditoren pivoxil, ceftibuteno, cefixima, cefpodoxima, cefdinir
	Cuarta generación	Cefepima	
CEFALOSPORINAS	Quinta generación	Ceftarolina fosamil, Ceftobiprol medocaril y Ceftolozano (solo disponible en combinación con tazobactam)	
CARBAPENÉMICOS		Imipenem con cilastatina, meropenem, ertapenem	
MONOBACTÁMICOS		Aztreonam	

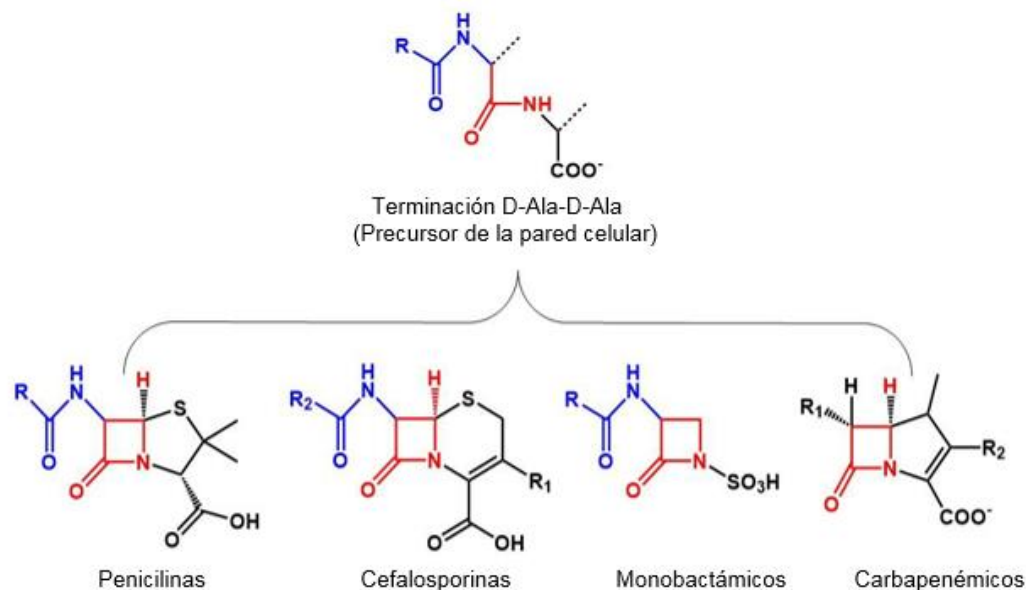
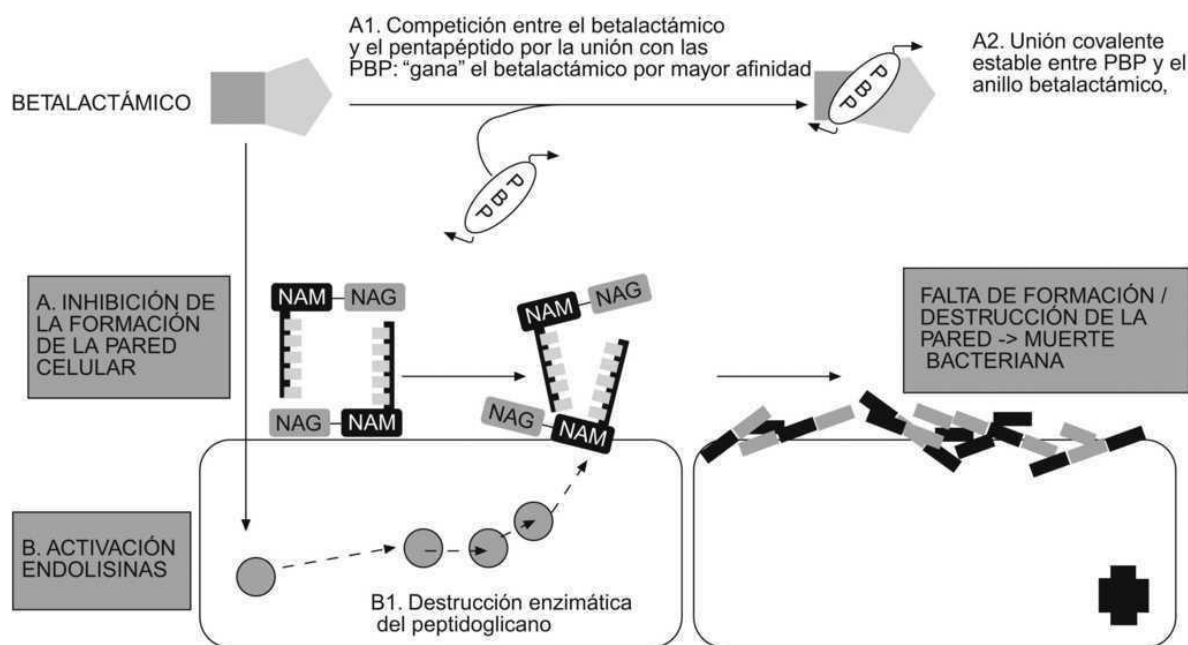


Figura 3. Estructura y clasificación de los antibióticos β -lactámicos (Venkataravanappa et al., 2022).

En 1974, Blumberg & Stromiger describieron el mecanismo de acción de la penicilina al observar que la terminación D-Ala-D-Ala del peptidoglucano en las paredes celulares son estructuralmente similares (Lima *et al.*, 2020). La estructura de los β -lactámicos da como resultado una unión estrecha al sitio activo de las transpeptidasas, conocidas como proteínas unión PBP (Figura 4). La penicilina permanece unida covalentemente a la PBP, inhibiendo la síntesis de la pared celular (Suárez & Gudiol, 2009; Abushaheen *et al.*, 2020). En consecuencia, existen enlaces cruzados débiles de peptidoglucano, lo que hace que el crecimiento bacteriano sea muy susceptible a la lisis y muerte celular (Suárez & Gudiol, 2009). Esto confiere a los antibióticos β -lactámicos su clasificación como agentes bactericidas. Los β -lactámicos también actúan activando autolisinas bacterianas endógenas capaces de degradar el peptidoglucano, induciendo autólisis bacteriana (figura 4) (Suárez & Gudiol, 2009).



NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27:116-29

Figura 4. Mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos en las bacterias (Suárez & Gudíol, 2009)

Cefalosporinas.

En 1948, Giuseppe Brotzu realizó el aislamiento de las primeras cefalosporinas de cultivos de *Cephalosporium acremonium*. Brotzu observó que los productos aislados inhibían la bacteria responsable de causar la fiebre tifoidea, es decir *Salmonella typhi*. Las cefalosporinas fueron un antibiótico natural que mostró cierta actividad contra cultivos resistentes a la penicilina (Varela *et al.*, 2021).

Las cefalosporinas de primera y segunda generación se clasifican en dos grupos: orales y parentales (Tabla 1) (Suárez & Gudíol, 2009). Estas generaciones se diferencian en que la segunda generación es más eficaz contra Gramnegativas; debido a su mayor polaridad y, en consecuencia, mayor hidrofiliidad que la primera generación de cefalosporinas (Lima *et al.*, 2020). Adicionalmente, la principal diferencia entre las cefalosporinas de primera y segunda generación es la naturaleza del grupo saliente C3 (Lima *et al.*, 2020). La tercera generación de cefalosporinas presenta mayor estabilidad que la primera y segunda generación

producidas por bacterias Gramnegativas como *Pseudomonas aeruginosa* (Lima *et al.*, 2020). La cuarta generación de antibióticos tiene el mismo espectro de actividad sobre las bacterias Gramnegativas y una mayor sobre organismos Grampositivos. Las cefalosporinas son menos susceptibles a la hidrólisis por β -lactamasas. La diferencia estructural entre ellos y la tercera generación de cefalosporinas se trata de la presencia de un grupo amonio cuaternario como sustituyente en C-3 (Figura 5), el cual, aumenta la polaridad para una rápida difusión a través de la membrana externa de las bacterias Gramnegativas (Lima *et al.*, 2020).

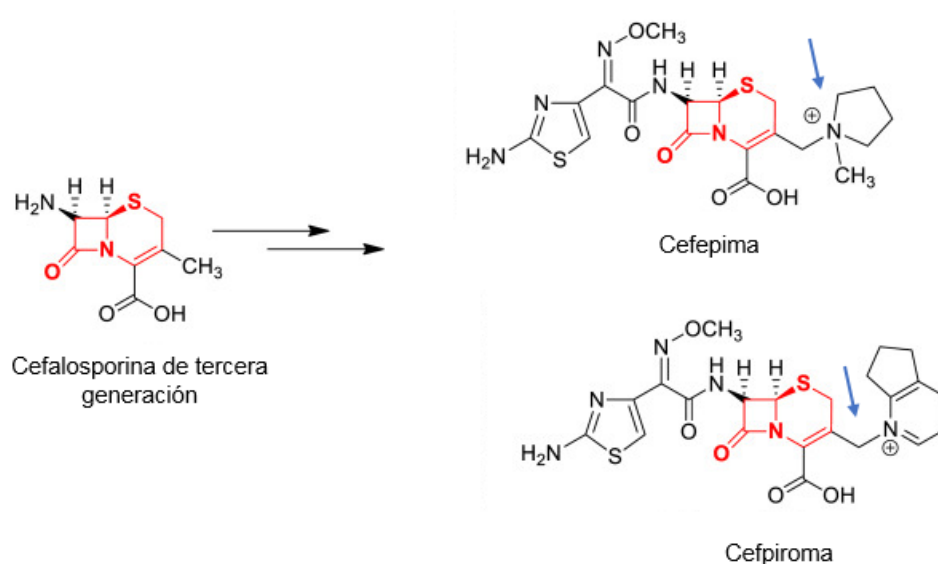


Figura 5. Cefalosporinas de 4° generación son cefepima y cefpiroma (Lima *et al.*, 2020).

Carbapenémicos.

Los carbapenémicos son antibióticos relativamente resistentes a la hidrólisis por la mayoría de las β -lactamasas, penetran en las membranas externas de las bacterias Gramnegativas a través de los canales de porina y se dirigen a las PBP (Suárez & Gudiol, 2009). Por lo que, estos antibióticos tienen una actividad antibacteriana de amplio espectro contra una variedad de patógenos Gramnegativos y Grampositivos (Lima *et al.*, 2020). El primer carbapenémico resistente a la hidrólisis por la deshidropeptidasa-1 renal (DHP-1) fue el meropenem, aprobado en 1996. La

resistencia bacteriana a los antibióticos ocurre principalmente entre patógenos Gramnegativos como: *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Tookey et al., 2019). El desarrollo de resistencia a los carbapenémicos puede deberse a la inactivación enzimática de las carbapenemasas, la mutación del sitio objetivo y las bombas de eflujo (Varela et al., 2021).

Glucopéptidos

Los antibióticos glucopéptidos son una de las clases más importantes de fármacos de productos naturales (Khane et al., 2005). Como el primer miembro de la clase, la vancomicina se ha utilizado en la clínica durante más de 60 años y, recientemente, como antibiótico de último recurso para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos Grampositivos resistentes, incluido el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (Wu et al., 2020). Los antibióticos glucopéptidos tienen dos clases principales que se usan clínicamente en la práctica: vancomicina y teicoplanina (Abushaheen et al., 2020).

Los glucopéptidos actúan sobre la transpeptidasa (PBP) impidiendo la formación de enlaces entre las capas de peptidoglucano, lo que hace que la estructura sea inestable (Wu et al., 2020). Estos antibióticos se unen a la fracción d -alanina- d -alanina (d -Ala- d -Ala) de los precursores de peptidoglicano, evitando así los pasos posteriores de transglicosilación y transpeptidación implicados en la biosíntesis de la pared celular (Figura 6). Como resultado, el contenido celular se moverá fuera de la célula causando la muerte celular (Abushaheen et al., 2020; Wu et al., 2020).

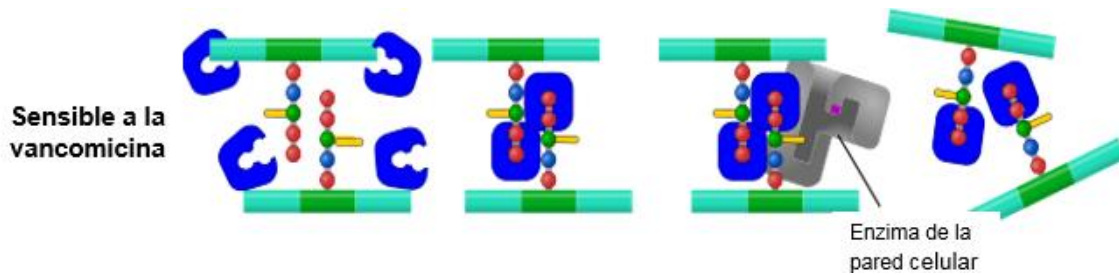


Figura 6. Mecanismo de acción del antibiótico vancomicina del grupo de los glucopéptidos en la pared celular bacteriana

Inhibición de la síntesis de proteínas

Los macrólidos, los aminoglucósidos, las tetraciclinas, el cloranfenicol, las estreptograminas y las oxazolidinonas producen sus efectos antibacterianos al inhibir la síntesis de proteínas (Abushaheen *et al.*, 2020). Los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas se deben a la diferencia estructural en el ribosoma bacteriano y el ribosoma eucariótico, los agentes antibacterianos aprovechan estas diferencias para inhibir selectivamente el crecimiento bacteriano (Tenover, 2006; Abushaheen *et al.*, 2020).

Los antibióticos ingresan a la célula bacteriana al unirse a la membrana plasmática cargada negativamente, después de estar dentro de la célula bacteriana, se adhieren a la subunidad 30S, como la edeína, e inhiben el inicio de la traducción al evitar una interacción estable entre el ARNt iniciador y el codón de inicio en el sitio P. La mayoría de los otros antibióticos dirigidos a 30S inhiben el alargamiento de la traducción al interferir con la entrega de ARNt al sitio A (por ejemplo, tetraciclinas y estreptomycinas) o la posterior translocación del complejo ARNm-ARNt a través del ribosoma como los aminoglucósidos (Wilson, 2013).

En la subunidad 50S, la mayoría de los sitios de unión de antibióticos se agrupan cerca del centro peptidil-transferasa (PTC), donde inhiben la formación de enlaces peptídicos al perturbar o prevenir el posicionamiento correcto de los extremos aminoacilados de los ARNt en el PTC (Tenover, 2006). Los sitios de unión de los antibióticos dirigidos a PTC se superponen con el ARNt del sitio A o el ARNt

del sitio P, o abarcan tanto el Sitio A y P como el cloranfenicol, Por lo que se interrumpe el paso de elongación que conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas (Abushaheen *et al.*, 2020). Los sitios de unión de las clases de macrólidos están ubicados adyacentes al PTC dentro del túnel de salida ribosomal. La mayoría de los macrólidos no inhiben la formación de enlaces peptídicos, sino que previenen el alargamiento de la mayoría de las cadenas nacientes, lo que conduce a la caída de peptidil-tRNA (Wilson, 2013; Abushaheen *et al.*, 2020).

Inhibición de vías metabólicas.

Las sulfonamidas o sulfanilamidas (SN) pertenecen a una clase importante de fármacos antimicrobianos sintéticos que se utilizan farmacológicamente como de amplio espectro para el tratamiento de infecciones bacterianas en humanos y animales (Ovung & Bhattacharyya, 2021).

La sulfonamida y la trimetoprima (TMP) cubren un amplio espectro de bacterias, incluidas bacterias Gramnegativas (*Escherichia coli*, especies de *Shigella* y *Proteus mirabilis*) y Grampositivas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*) (Abushaheen *et al.*, 2020).

El ácido paraaminobenzoico (PABA) es necesario para la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS) en la síntesis de la ruta del folato, las sulfonamidas son antagonistas competitivos y análogos estructurales del PABA en la síntesis de ácido fólico, que es esencial para la producción adicional de ADN en las bacterias (Abushaheen *et al.*, 2020).

Las sulfonamidas tienen una estructura similar al PABA (Figura 7) lo cual permite que la SN inhiba y reemplace al PABA en la enzima dihidropteroato sintasa (Figura 8), un factor requerido por las bacterias para la síntesis del ácido fólico y funcionan para inhibir el crecimiento bacteriano al consumir el conjunto de folato (Abushaheen *et al.*, 2020).

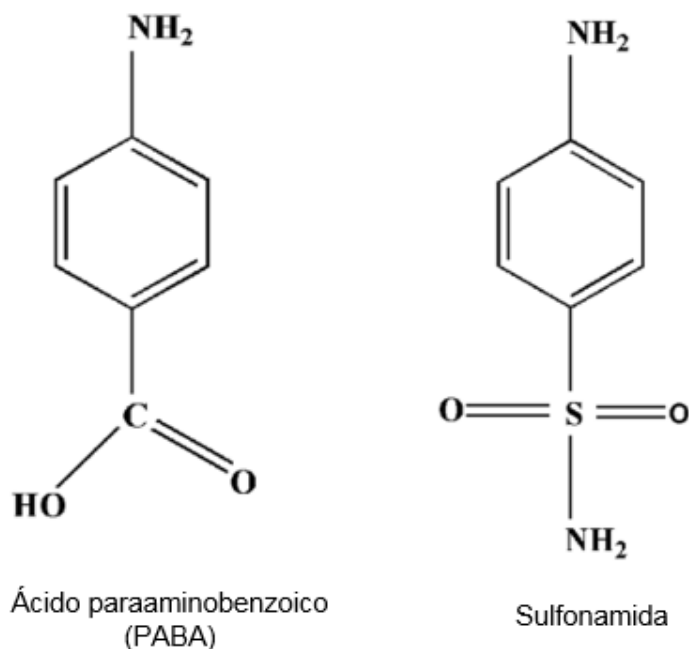


Figura 7. Estructura química de las sulfonamidas y del PABA (Ovung y Bhattacharyya., 2023).

Las sulfonamidas están estructuralmente relacionadas con el ácido paraaminobenzoico y compiten por la enzima dihidropteroato sintasa que interviene en el metabolismo del ácido fólico (Figura 8) (Pareek *et al.* 2013). Las células de los mamíferos requieren ácido fólico preformado, ya que no pueden sintetizarlo y, por tanto, no se ven afectados por la acción de las sulfamidas. La trimetoprima, además, inhibe otra enzima integral de las bacterias, la dihidrofolato reductasa (Figura 8) interfiriendo en el metabolismo del ácido fólico, por lo que combinadas tienen efecto sinérgico (Ovung & Bhattacharyya, 2021).

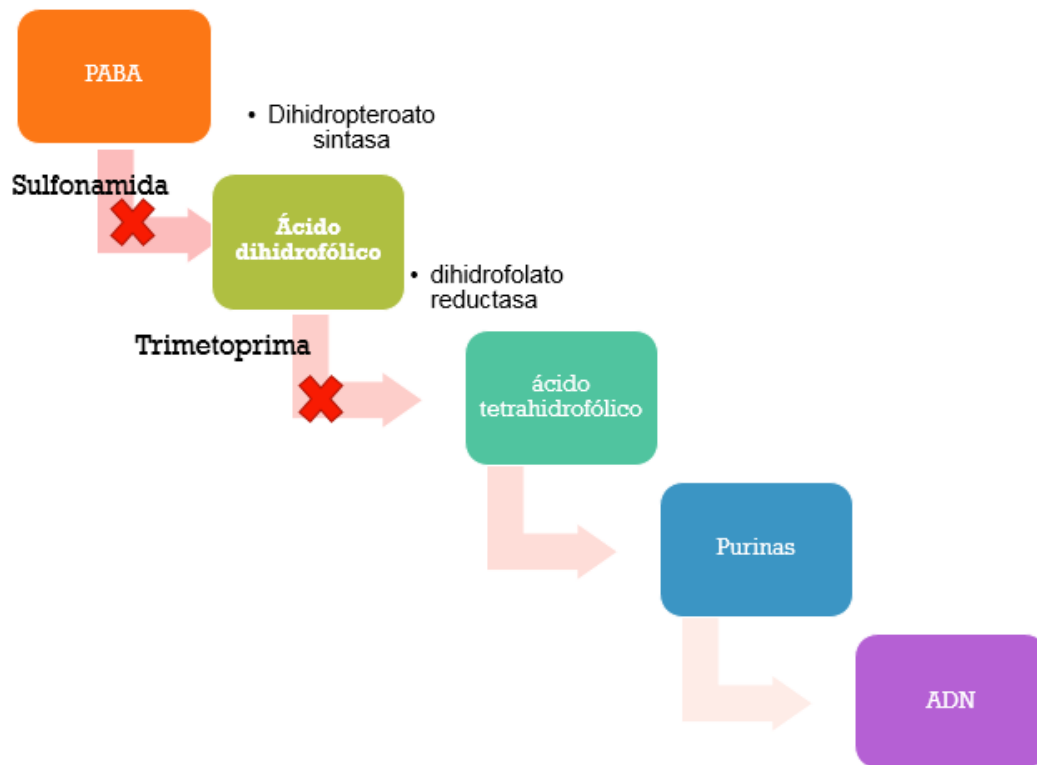


Figura 8. Mecanismos de acción de las sulfonamidas en la ruta metabólica de síntesis de DNA.

Mecanismos de resistencia

Las bacterias naturalmente susceptibles pueden desarrollar resistencia contra ciertos antibióticos al recibir códigos genéticos de otras cepas bacterianas (Abushaheen *et al.*, 2020). Los principales mecanismos de resistencia son: (1) enzimas degradantes de antibióticos que inactivan directamente los antibióticos modificando sus estructuras químicas, (2) las modificaciones enzimáticas de los antibióticos mediante transferencia de grupo y el proceso redox, 3) al modificar los sitios objetivo de los antibióticos, los antibióticos ya no pueden alterar la función de las células bacterianas. Los sitios de destino de los antibióticos pueden estar en los ribosomas, las enzimas de replicación del ADN y los precursores de la pared celular, (4) la permeabilidad reducida a los antibióticos mediante modificaciones de las porinas y (5) disminuir las concentraciones intracelulares de antibióticos al disminuir

o perder porinas, para evitar que los antibióticos entren en el espacio intracelular y bombeando activamente los antibióticos hacia el espacio extracelular mediante bombas de eflujo de membrana (Figura 9) (Varela *et al.*, 2021).

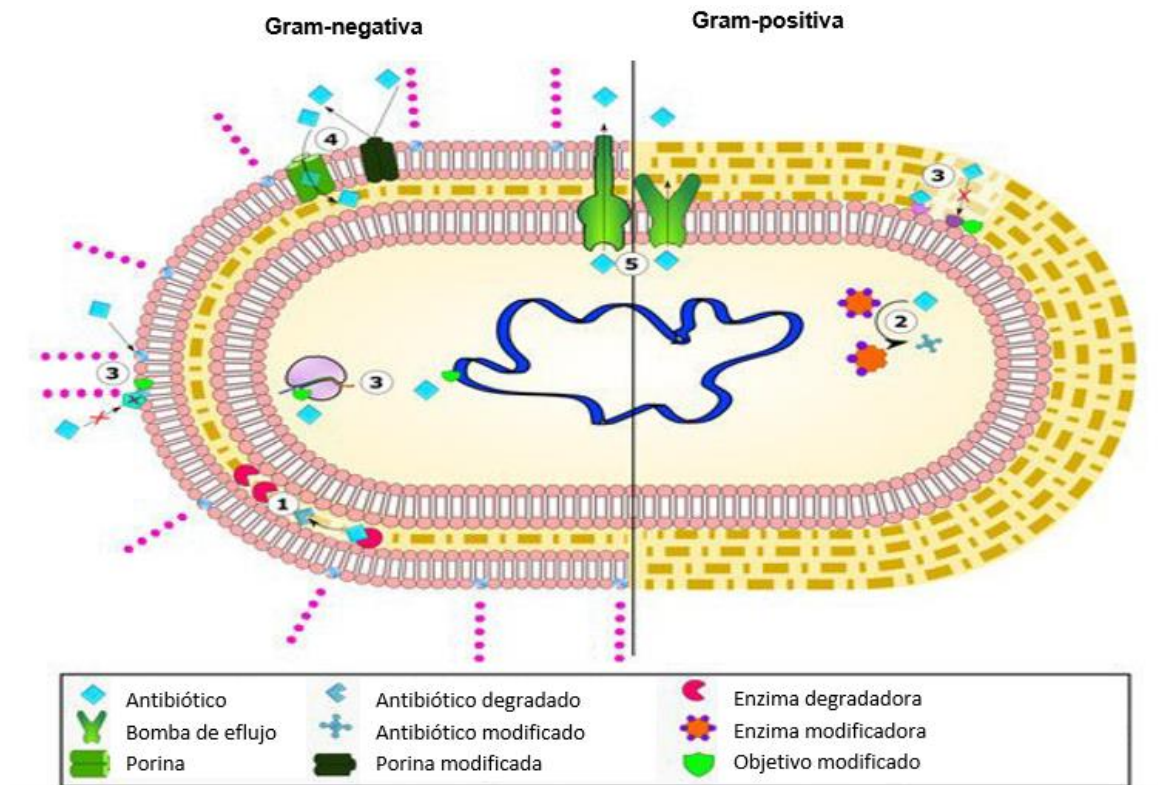


Figura 9. Mecanismo de resistencia a los antibióticos tomado de (Varela *et al.*, 2021).

Permeabilidad disminuida.

La resistencia a los fármacos β -lactámicos puede estar relacionada con la incapacidad de los antibióticos para alcanzar sus sitios de acción al reducir la entrada en sus paredes celulares externas a través de los canales de porina, estos antibióticos se difunden a través de canales acuosos en la membrana externa que están formados por proteínas (Omp) llamadas porinas (Ghai *et al.*, 2018). El número, la forma y la calidad de las porinas en la membrana externa son mutables entre diferentes bacterias (Aurilio *et al.*, 2022). Un ejemplo significativo es *P. aeruginosa* que es intrínsecamente resistente a una amplia variedad de antibióticos debido a la expresión reducida de las clásicas porinas de alta permeabilidad (Kapor *et al.*, 2017).

Producción de enzimas.

La unión directa de las enzimas bacterianas a los antibióticos y su desintegración se produce principalmente por escisión hidrolítica de los antibióticos (como las β -lactamasas). La hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos por las β -lactamasas siempre involucra una molécula de agua que, al activarse, lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el β -lactámico para hidrolizar y “abrir” su estructura de anillo (Abushaheen *et al.*, 2020; He *et al.*, 2020).

Las enzimas representan el principal mecanismo de resistencia, algunas bacterias Gramnegativas poseen β -lactamasas como *S. aureus*, enterobacterias como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Shigella* y *Bacteroides* spp., etcétera (Varela *et al.*, 2021). Otros microorganismos, como *Klebsiella pneumoniae*, producen β -lactamasas forma natural, estas, son enzimas bacterianas que hidrolizan los enlaces β -lactámicos en los antibióticos β -lactámicos. Las β -lactamasas se dividen en cuatro clases: A, B, C y D (He *et al.*, 2020). y su producción puede estar mediada por plásmidos o puede estar cromosómicamente codificada (Suárez & Gudiol, 2009; Tooke *et al.*, 2019; Carcione *et al.*, 2021).

Las β -lactamasas de clase A, C y D (Figura 10a). son proteasas de serina que ejecutan el proceso hidrolítico en dos pasos (He *et al.*, 2020). En el primer paso de acilación, un residuo de serina lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el sustrato de β -lactámico, esto lleva a la formación de un complejo de acil-enzima (ES). En el siguiente paso de desacilación, una molécula de agua activada ataca a ES, lo que lleva a su hidrólisis y liberación del sitio activo con el anillo β -lactámico (He *et al.*, 2020). En este proceso se requieren dos residuos básicos generales, uno para activar el residuo de serina en el paso de acilación y el otro para activar la molécula de agua hidrolítica en el paso de desacilación (He *et al.*, 2020; Carcione *et al.*, 2021).

Las β -lactamasas de clase B (llamadas metalo- β -lactamasas, MBL) (Figura 10b) son metaloenzimas con actividades hidrolíticas vigorosas, que emplean Zn^{2+} u otros iones metálicos para activar una molécula de agua para la hidrólisis directa del sustrato β -lactámico sin el paso intermedio de formar ES, estas enzimas pueden

hidrolizar fácilmente todos los antibióticos β -lactámicos clínicamente disponibles, incluidos los carbapenémicos de última generación que suelen ser sustratos deficientes para las β -lactamasas basadas en serina de clase A, C y D (He *et al.*, 2020; Carcione *et al.*, 2021; Varela *et al.*, 2021).

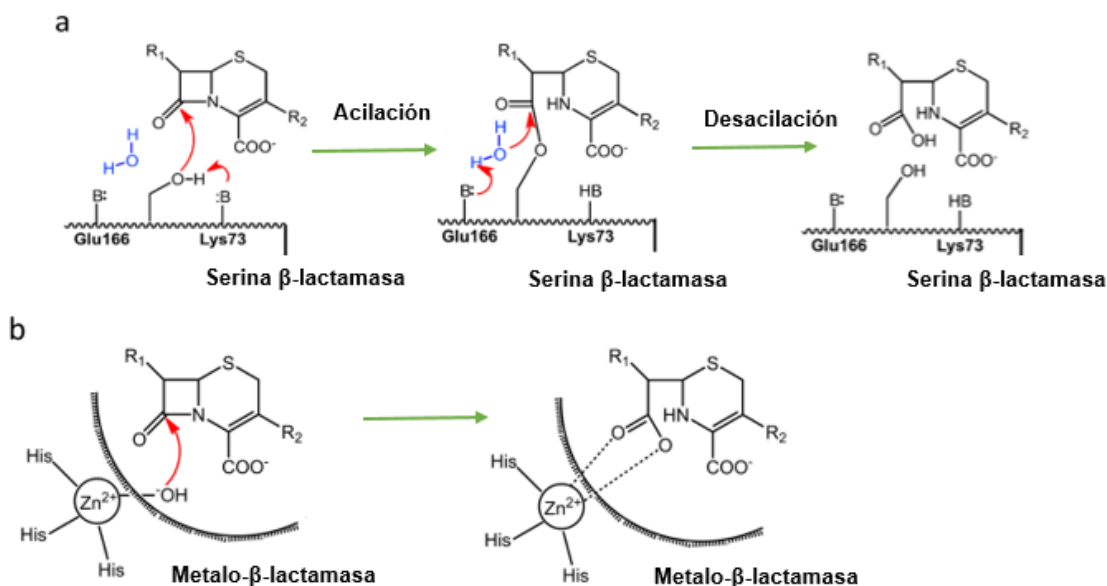


Figura 10. Mecanismo de acción de las betalactamasas. a Betalactamasas serina, b Metalo-betalactamasas (He *et al.*, 2020).

Las β -lactamasas AmpC de clase C son cefalosporinasas codificadas en los cromosomas de varias *Enterobacteriaceae*. confieren la resistencia a la cefalotina, la cefazolina, la cefoxitina, la mayoría de las penicilinas (Carcione *et al.*, 2021; Varela *et al.*, 2021).

Las β -lactamasas OXA estuvieron entre las primeras β -lactamasas detectadas; sin embargo, estas β -lactamasas de clase molecular D eran relativamente raras y siempre mediadas por plásmidos (Carcione *et al.*, 2021). Tenían un perfil de sustrato limitado a las penicilinas, pero algunas llegaron a conferir resistencia a las cefalosporinas como OXA-10 se transportan en plásmidos, confieren resistencia a ampicilina y cefalotina. Estas enzimas son poco afectadas por los inhibidores de β -lactamasa como el ácido clavulánico (Evans & Amyes, 2014; Carcione *et al.*, 2021; Varela *et al.*, 2021).

Alteración de dianas antimicrobianas.

Las variaciones naturales o los cambios adquiridos en los sitios de destino de los antimicrobianos que impiden la unión del fármaco es un mecanismo común de resistencia (Kapoor *et al.*, 2017). Los cambios en el sitio de destino a menudo resultan de la mutación espontánea de un gen bacteriano en el cromosoma. Dado que la interacción del antibiótico con la molécula diana es generalmente bastante específica, una alteración menor de la molécula diana puede tener un efecto importante en la unión del antibiótico y, por lo tanto, confiere resistencia. Estos objetivos deben diferir o estar completamente ausentes de los seres humanos o las especies animales que se tratan con un antimicrobiano para permitir un modo de acción selectivo como el peptidoglucano (Kapoor *et al.*, 2017; Varela *et al.*, 2021)

Alteración de la PBP

La modificación de la PBP es un mecanismo favorecido de resistencia a bacterias Grampositivas, mientras que la producción de β -lactamasas es un mecanismo para el desarrollo de resistencia a bacterias Gramnegativas (Kapoor *et al.*, 2017). La presencia de mutación en la proteína de unión a penicilina conduce a una menor afinidad por los antibióticos β -lactámicos. La resistencia de *Enterococcus faecium* a la ampicilina y *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina es por este mecanismo (Kapoor *et al.*, 2017).

Precusores de la pared celular

Los precursores de peptidoglucano pueden sufrir alteraciones, lo que reduce la afinidad de los antimicrobianos sin la participación de la inactivación enzimática (Valera *et al.*, 2021). La resistencia adquirida a la vancomicina se debe a la producción de precursores de peptidoglucano que terminan en d -alanina- d -lactato (d -Ala- d -Lac) y d -alanina - d -serina (d -Ala- d -Ser) en lugar de d -Ala- d -Ala, que se unen a la vancomicina con una afinidad disminuida (Kapoor *et al.*, 2017). Tal es el caso de *Enterococcus faecium* y *E. faecalis* mediante la adquisición de uno de los dos grupos de genes relacionados que codifican para VanA y VanB. Estos grupos de genes, que se encuentran en elementos transponibles, han permitido la

propagación de objetivos modificados en enterococos (Varela *et al.*, 2021; Acharya *et al.*, 2022).

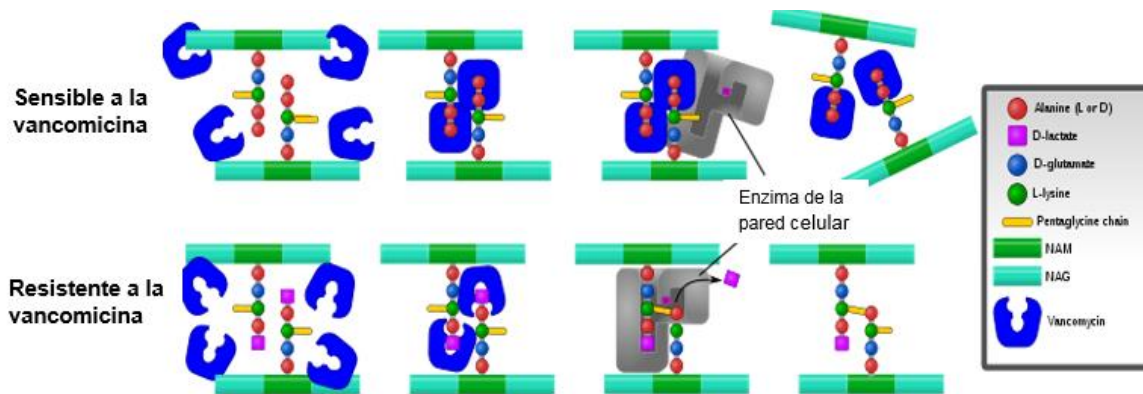


Figura 11. Resistencia adquirida a vancomicina por GRA tomado de Brouckaert (2017).

Alteración de enzimas precursores de ácido fólico

En el caso de las sulfonamidas se han descrito los genes como *sul1* relacionados con integrones y que codifican un DHPS dihidropteroato sintasa que no pueden ser inhibidas por el antibiótico, lo que hace que la bacteria desarrolle una baja afinidad por las sulfonamidas (Adekanmbi *et al.*, 2020). Lo mismo sucede en el caso del trimetropim, se han descritos múltiples genes *dfr* que generan resistencia antibiótica (Mosquito *et al.*, 2011). Estos genes están ubicados en plásmidos que tienen una amplia gama de huéspedes y transposones (Adekanmbi *et al.*, 2020).

JUSTIFICACIÓN Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La administración excesiva de antibióticos a personas y animales tiene muchas consecuencias, ya que la mayoría de las dosis administradas se excretan al medio ambiente como compuestos activos en forma de heces y orina debido a que estos agentes no se metabolizan completamente después de su administración (FAO, 2018). Este uso excesivo de los antibióticos ha propiciado que sean detectados en suelos, aguas superficiales y subterráneas, en los influentes y efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) e, incluso, en el agua potable (Karkman *et al.*, 2018).

Las PTAR son consideradas sitios de concentración (“hotspots”) de resistencia antimicrobiana; esto se refiere a que en estos ambientes las bacterias son expuestas a presiones selectivas, en las que las bajas concentraciones de antibióticos favorecen el aumento, la evolución y la diseminación de bacterias resistentes a antibióticos (BRA; *antibiotic resistance bacteria*), así como de los genes de resistencia a antibióticos (GRA; *antibiotic resistance genes*) que les confieren dichas capacidades, esto es que son sitios en los que los GRA pueden aumentar, evolucionar y diseminarse (Abushaheen *et al.*, 2020).

Debido a que las PTAR no están diseñadas para eliminar GRA y BRA, la descarga final en el agua receptora es un mecanismo clave por el cual los GRA y BRA ingresan al ambiente acuático, y la aplicación de biosólidos a los campos agrícolas son fuentes reconocidas de antibióticos para las aguas superficiales

(Auerbach *et al.*, 2007; Bruchmann *et al.*, 2013). Además, la acumulación de GRA, que favorecen patógenos multirresistentes, dificulta especialmente el tratamiento con antibióticos (Alexander *et al.*, 2020).

En este contexto, la vigilancia de GRA en PTAR es necesaria para garantizar el reúso seguro de aguas residuales tratadas, así como, una gestión adecuada de los lodos residuales producidos es necesario cuestionar si ¿los procesos de tratamiento que llevan a cabo diferentes plantas de la Ciudad de México logran una remoción eficaz de estos genes de resistencia a antibióticos?

REMOCIÓN DE GENES RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL DE LA CDMX

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el grado de remoción de los genes de resistencia a antibióticos (*Sul1*, *CphA-02*, *OXA-10* y el elemento genético móvil *Int11*) en el tratamiento de aguas residuales, así como, su acumulación en lodos residuales de 4 PTAR de la Ciudad de México, con cinco tecnologías de tratamiento distintas.

Objetivos particulares

1. Desarrollar un diseño de muestreo adecuado en dos fases (campo y laboratorio) para informar la concentración de los genes de resistencia a antibióticos *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02* y el elemento genético móvil *Int11* en influentes, efluentes después del tratamiento biológico y efluentes finales.
2. Seleccionar GRA abundantes en las PTAR de la CDMX con base en investigaciones en desarrollo en el Instituto de Ingeniería de la UNAM.
3. Estandarizar una técnica basada en qPCR para la cuantificación de GRA aguas residuales, tratadas y en lodos secundarios.
4. Cuantificar de manera absoluta (copias de GRA/mL y copias de GRA/gSV) tres genes de resistencia a antibióticos (*OXA-10*, *Sul1*, *CphA-02*) y un elemento genético móvil (*Int11*) en aguas y lodos secundarios
5. Evaluar la eliminación de GRA durante el tratamiento de aguas residuales de diferentes tecnologías de tratamiento biológico y de los postratamientos de cloración y de radiación UV en las PTAR estudiadas.
6. Evaluar el grado de acumulación de GRA en lodos secundarios producidos en la CDMX.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de muestreo

La presente investigación estudió la concentración de los genes de resistencia a antibióticos *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02* y el elemento genético móvil *Int1* en influentes, efluentes después del tratamiento biológico y efluentes finales (Figura 13) de cuatro PTAR de la CDMX, con cinco distintas tecnologías de tratamiento. Este trabajo fue parte de un proyecto multidisciplinario patrocinado por la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México. El procedimiento consistió en 2 fases: trabajo de campo y otra de laboratorio.

A) Trabajo de campo

Se seleccionaron cuatro PTAR de la CDMX que representaran cinco tecnologías diferentes: 1) Lodos activados convencionales (LAC), 2) Lodos activados con aeración extendida (LAAE), 3) Reactores secuenciales de digestión anaerobia tipo UASB (DA), 4) Reactor biológico acoplado a membranas de filtración (MBR) y 5) Humedales construidos tipo “wetland” (WL). Algunas PTAR también presentaron procesos de desinfección como cloración y radiación UV (figura 13).

1. Colecta de muestras

Las muestras fueron colectadas en temporadas de lluvias (septiembre-octubre 2020) y estiaje (marzo-abril 2021) en las PTAR: Cerro de la Estrella (CE), Chapultepec (CH), Ecoducto (EC) y Santa Fe (SF) ubicadas en la CDMX. Se tomaron muestras de los Influentes (I), de la salida de los tratamientos biológicos (B), de los efluentes desinfectados por cloración o radiación UV (E) y de los lodos biológicos (L). Se tomaron muestras compuestas representativas de 24 horas (12 muestras, una cada dos horas) por triplicado (tres días distintos de la semana) en bidones de plástico estériles de 5.0L. Las muestras se mantuvieron en hielo y se transportaron al laboratorio para su procesamiento.

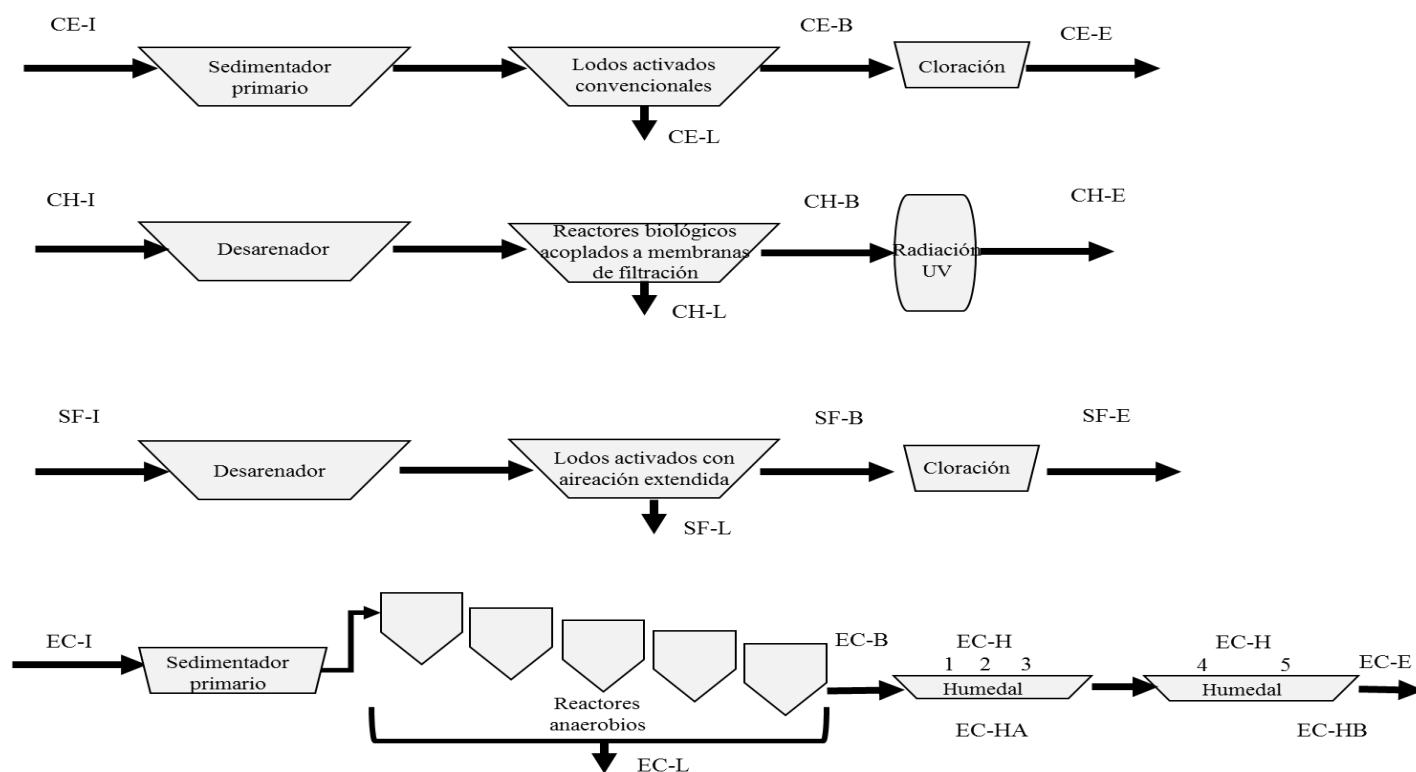


Figura 13. Tratamientos utilizados en las PTARS estudiadas (Cuetero-Martinez.*et al.*, 2023).

B) Trabajo de laboratorio.

El trabajo *ex situ* consistió en la obtención de pellets de muestras de agua y lodo para su posterior extracción de DNA total, análisis de este (integridad, pureza y calidad de DNA total), cuantificación de tres GRA y un EGM, esta se realizó utilizando qPCR basada en la química del colorante SYBR Green.

1. Extracción de DNA total en agua residual

El procesamiento de las muestras de la temporada de lluvias fue el siguiente: Se permitió la sedimentación de 4.0L de cada influente, efluente biológico y efluente final en bidones estériles almacenados a 4.0°C. Posteriormente se retiraron ~3.5L por vacío, el volumen restante se centrifugó a 10,000 x g por 5 minutos a 4.0°C. Por otro lado, fueron centrifugados volúmenes de a~0.75 a 1.0mL de lodos residuales a 10,000 x g durante 2 minutos.

El procesamiento de las muestras de la temporada de estiaje fue el siguiente: Se obtuvo material sedimentado a partir de la centrifugación de muestras; para lo cual se transfirieron frente al mechero volúmenes de ~45 a 90mL en frascos estériles, estos se centrifugaron a 10,000 x g por 15 minutos; en el caso de lodos residuales se centrifugaron volúmenes de ~0.75 a 1mL a 10,000 x g por 2 minutos.

El DNA total de ambos tipos de muestra fue extraído con el kit PowerSoil® DNA Isolation siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 1). El DNA fue conservado a -80°C para posteriores análisis.

2. Análisis de integridad de las extracciones de DNA total.

Para visualizar la integridad del ADN total se utilizó electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en TAE 1X por 30 min a 100 volts. la concentración y la pureza se midieron con un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000-Thermo Scientific y un Qubit™ 3 Fluorometer - Thermo Fisher Scientific.

3. Selección de GRA Y EGM

Los GRA a cuantificar se eligieron en función de tres variables: 1) Antibióticos cuantificados en el proyecto “*Análisis de la eficiencia en la remoción de patógenos en efluentes y lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales en la Ciudad de México con fines de reúso seguro*”, 2) Su frecuencia de aparición con base en un proyecto en desarrollo por (Cuetero-Martínez, 2023) sobre la caracterización de patógenos y resistomas de las PTAR aquí reportadas. Para esto se realizó la secuenciación masiva de los ADN extraídos utilizando la plataforma Illumina NexSeq 2000 por servicios externos en la Universidad de Dalhousie en Canadá. Posteriormente para la anotación del GRA a partir de las bibliotecas metagenómicas se utilizó el Resistance Gene Identifier (RGI) (Alcock *et al.*, 2003) con base en el tutorial disponible en <http://github.com/arpcard/>. y 3) con base en la existencia de iniciadores descritos previamente en la literatura científica, estos fueron: el gen de resistencia a la penicilina *AmpC*, el gen *OXA-10* resistente a cefalosporinas, *Sul1* resistente a sulfonamidas, el gen resistente a múltiples antibióticos *MexD* y el gen *CphA-02* resistente a carbapenémicos, también se cuantificó el gen de integrasa

(*intl1*), que es responsable de la propagación de múltiples genes de resistencia a través de la transferencia horizontal de genes, y el gen 16S ARNr.

4. Amplificación de GRA mediante PCR punto final

Se llevó a cabo una PCR de punto final de los genes *AmpC*, *OXA-10*, *Sul1*, *Cpha-02*, *MexD* y el gen de integrasa (*intl1*), con el fin de evaluar la amplificación de estos genes a partir de muestras de aguas residuales sin tratar, tratadas y de lodos residuales. La mezcla de reacción consistió en 5.0µL de Taq polimerasa, 5.0µL de cada iniciador (delantero y reverso), 3.0µL de agua Milli-Q y 1.0µL de DNA molde. La información detallada sobre los iniciadores utilizados se muestra en la Tabla 2

El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de: 1) desnaturalización a 95° C por 30 s, 2) alineamiento a 60°C por 30 s y 3) extensión a 73°C por 30 s; finalmente, se llevó a cabo una extensión final a 73°C por 5 min.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en TAE 1X mezclado con 2.0µL de colorante GelRed para resaltar las bandas en el fotodocumentador. La corrida se realizó a 100 volts durante 40 min. (el tamaño de los amplicones se muestran en la sección de resultados).

5. Curva estándar para qPCR

Con la finalidad de cuantificar la remoción de GRA y EGM en los tratamientos de aguas residuales se calculó la abundancia absoluta de los GRA enumerados anteriormente. Los amplicones de los GRA se clonaron en vectores plasmídicos, estos, se usaron como muestras de ADN estándar. Se llevó a cabo por PCR punto final muestras ambientales de los GRA. Los productos de PCR se clonaron utilizando servicios externos (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México) utilizando el vector pGEM-T Easy, para la transformación se usó una cepa de *Escherichia coli* DH5 α , se inocularon en cultivo BHI suplementado con ampicilina a partir de una colonia individual, el ADN plasmídico se purificó a partir de 2.0mL de un cultivo líquido por el método de lisis alcalina. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.0% en TAE 1X

para visualizar el plásmido, se purificó ADN plasmídico a partir de productos en gel de agarosa con el kit PROMEGA Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Sysytem siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN plasmídico purificado se determinó mediante fluorometría utilizando un fluorómetro Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific, EU). El número de copias correspondiente se calculó con la siguiente ecuación (Lee *et al.*, 2006).

$$ADN = \frac{6.02 \times 10^{23} \left(\frac{copias}{mol} \right) \times DNA (g)}{DNA (dp) \times 660 \left(\frac{g}{mol} \right)}$$

La curva estándar se realizó con diluciones del vector pGEM-T Easy, desde 1×10^{-1} a 1×10^{-5} copias/ μ L para los GRA *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02* e *Int11*. Se hizo una regresión lineal de los puntos trazados a partir de la pendiente de cada curva estándar, se calculó la eficiencia de amplificación por PCR con ayuda del programa BIO-RAD CFX Maestro.

6. Cuantificación de *int11*, GRA y 16S ARNr

Los GRA se cuantificaron mediante el termociclador CFX96 Touch Sysstem (Bio-Rad, EU), utilizando el colorante fluorescente SYBR Green Supermix. La información detallada sobre los iniciadores utilizados se muestra en la Tabla 2. Las corridas de qPCR se realizaron en placas de 96 pocillos BIO-RAD con un volumen final de 20 μ L, que contenían 10 μ L de SsAdvanced Universal SYBR Green Supermix, 0.6 μ L de primer reverse, 0.6 μ L de primer forward, 3.8 μ L de agua libre de endonucleasas y 5 μ L de ADN molde. Cada ejecución de qPCR se realizó por duplicado con controles negativos. El protocolo qPCR consistió en desnaturalización inicial a 95°C por 2 min seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 s, alineamiento y extensión a 60°C por 30 s.

Tabla 2. Iniciadores utilizados para cuantificación de PCR y qPCR.

Gen	Primers	Tamaño del amplicon (pb)	Autor
Sul1	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG	162	Miao <i>et al.</i> , (2021).
OXA-10	CGCAATTATCGGCCTAGAAACT TTGGCTTTCCGTCCCATT	71	Miao <i>et al.</i> , (2021).
MexD	TTGCCACTGGCTTTCATGAG CACTGCGGAGAACTGTCTGTAGA	96	Li <i>et al.</i> , (2021).
AmpC	CAGCCGCTGATGAAAAATATG CAGCGAGCCCACTTCGA	147	Miao <i>et al.</i> , (2021).
cphA-02	GTGCTGATGGCGAGTTTCTG GGTGTGGTAGTTGGTGTGATCAC	Aprox. 250	Li <i>et al.</i> , (2021).
Int1	TCGTGCGTCGCCATCACA GCTTGTCTACGGCACGTTTGA	67	Miao <i>et al.</i> , (2021).

Análisis estadísticos

Se realizaron análisis no paramétricos basados en pruebas de Kruskal-Wallis. Cuando correspondía, estas pruebas fueron seguidas de pruebas post hoc utilizando los métodos Wilcoxon o Steel-Dwass, para probar la hipótesis nula de que la concentración de GRA en influentes, efluentes después del tratamiento biológicos y efluentes finales de una PTAR eran diferentes. En todas las pruebas estadísticas se consideró $\alpha < 0.05$ como significativo. Los cálculos se realizaron utilizando el paquete de herramientas de análisis de datos en JMP Pro 13.2 (SAS Institute Inc., EE. UU.) y Microsoft Excel.

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Selección de GRA

En la tabla 3 se muestran los GRA más abundantes en muestras compuestas de aguas residuales y tratadas y lodos secundarios de la CDMX mandadas a secuenciar masivamente. Estos GRA son específicos de los grupos de antibióticos de importancia clínica en México, los cuales son penicilinas, carbapenémicos y cefalosporinas (Programa Universitario de Investigación en Salud, 2018).

De los GRA más abundantes se optaron por cinco genes principales, los cuales, se muestran en la tabla 4. Los cuales fueron *OXA-10* resistente a cefalosporinas, *CphA-02* resistente a carbapenémicos, *AmpC* resistente a penicilina, a excepción del gen *Sul1* que si bien no es un gen resistente los antibióticos β -lactámicos, lo es para el grupo de las sulfonamidas el cual se eligió en función a su gran frecuencia de lecturas completamente mapeadas (siempre mayor a 100), y el gen *MexD* resistente a múltiples antibióticos entre ellos los β -lactámicos, se eligió debido a que su mecanismo de resistencia que es bombas de eflujo lo que es diferente a otros genes estudiados (inactivación del antibiótico), al igual que se eligió cuantificar al integron *Int1* debido a que es un elemento genético móvil.

Tabla 3. GRA elegidos para su cuantificación por qPCR. Se muestran muestras compuestas de aguas residuales (CEI: cerro de la estrella influente, CHI: Chapultepec influente, ECI: ecoducto influente, SFI: santa fe influente) y lodos secundarios (CEL cerro de la estrella lodos, CHL: Chapultepec lodos, ECL: ecoducto lodos SFL: santa fe lodos) mandadas a secuenciar masivamente donde se observan los primeros 11 GRA más abundantes de antibióticos β -lactámicos (lecturas completamente mapeadas expuesto por los resultados entre paréntesis) en dichas aguas residuales u lodos secundarios de la CDMX.

[illegible]

Tabla 4. GRA con mayor abundancia relativa de secuencias en PTAR de la CDMX. Fueron seleccionados de la tabla 3 los genes resistentes a β -lactámicos con una mayor frecuencia de lecturas completamente mapeadas, a excepción del gen *Sul1* que es un gen resistente a sulfonamidas.

Gen	Abundancia	Antibiótico
sul1	15	Sulfonamidas
MexD	15	MDR
OXA-10	10	Cefalosporinas
AmpC	5	Penicilinas
CphA-02	5	Carbapenémicos

1. Pruebas de amplificación de GRA en ADN provenientes de aguas residuales de la CDMX

Para llevar a cabo las amplificaciones de manera cuantitativa (qPCR), primero se realizaron amplificaciones de punto final para estandarizar la técnica y verificar la especificidad y funcionamiento de los iniciadores seleccionados. Se seleccionaron muestras donde los GRA *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02*, *MexD*, *AmpC* y *Int11* tenían la mayor abundancia. Los resultados de estas pruebas se presentan en la Figura 14.

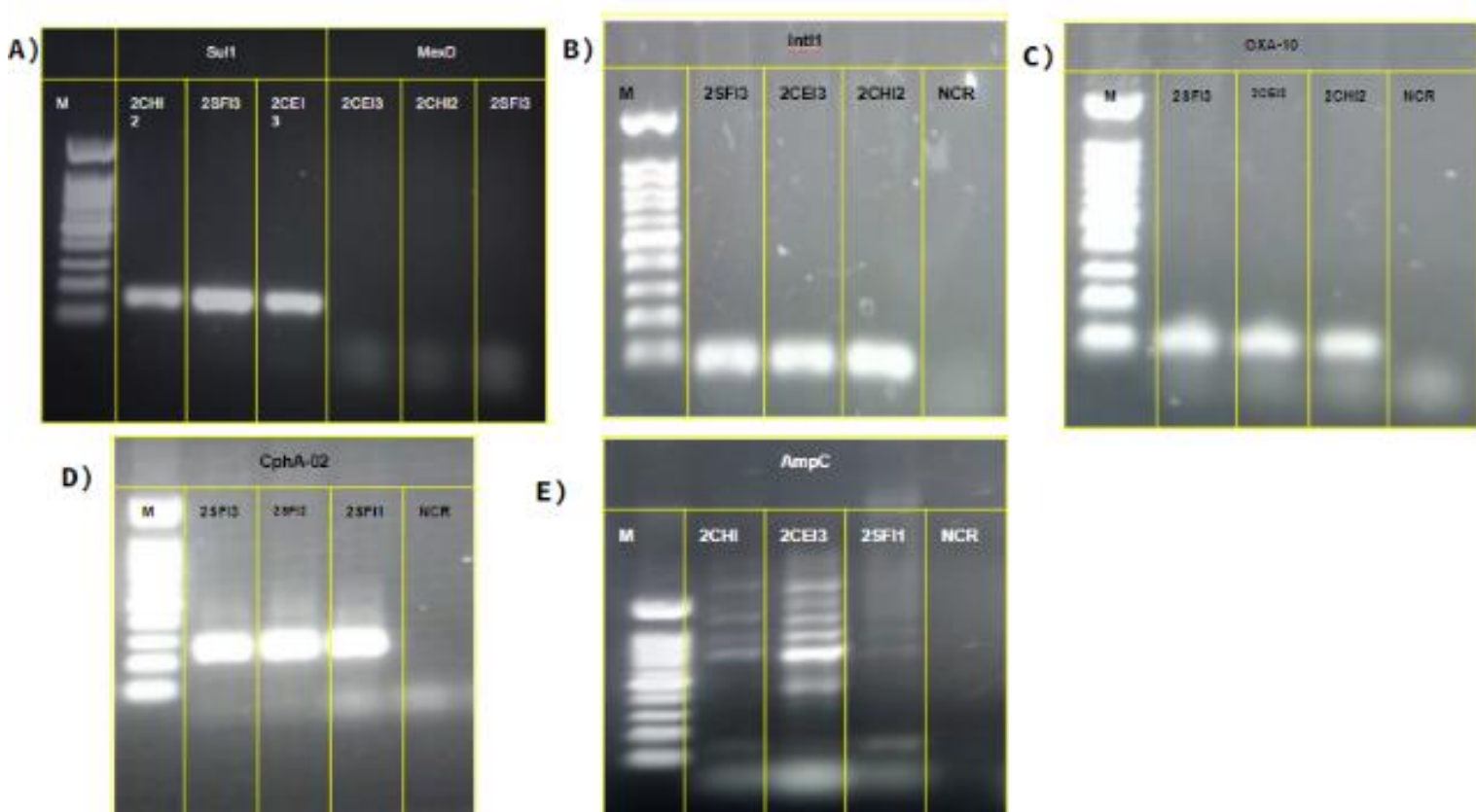


Figura 14. Prueba de primers de GRA e *Int11* A) *Sul1*, *MexD*, B) *Int11*, C) *OXA.10*, D) *CphA-02*, y E) *AmpC* mediante PCR punto final, **M**: marcador de peso molecular, **2CHI2**: Chapultepec influente, **2SFI3**: Santa Fe influente, **2CEI3**: Cerro De la estrella influente, **NCR**; no contaminación de reactivos.

De los 5 GRA e *Int1*, se lograron amplificar sólo 4 (*Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02*, *Int1*) en diferentes muestras de agua influente de tres PTAR (Santa Fe, Cerro de la estrella, Chapultepec). Para el caso de los genes *Sul1* (figura 14 A), *OXA-10* (figura 14 C) *CphA-02* (figura 14 D) y el gen de integrasa *Int1* (figura 14 B) donde el tamaño de los amplicones fue de 162, 71, 250 y 67 pb respectivamente; se confirmó la eficacia de los primers para su posterior cuantificación por qPCR.

Por otro lado, para el gen de resistencia a múltiples antibióticos *MexD* no se obtuvieron amplicones en ninguna de las muestras es tres muestras elegidas (2CEI, 2CHI, 2SFI), por lo tanto, se hicieron dos corridas más, una con diferentes muestras de influentes y otra con distinta temperatura de alineamiento (57°C) antes de poder descartar el gen por completo. Aún con estas pruebas no se observaron amplicones de este gen lo que puede deberse a diversos factores como errores de fábrica de los iniciadores utilizados, o que el primer usado puede tener una secuencia diferente de la que se pensó por el análisis previo.

Para el gen *AmpC* que confiere resistencia a la penicilina se observó que los iniciadores no son específicos en las condiciones de PCR probadas inicialmente; la aseveración anterior se basa en que la amplificación presentó múltiples tamaños cuando se esperaba un solo amplicon de un tamaño aproximado de 147 pb (figura 14 E). Con el fin de descartar que la inespecificidad se deba a la temperatura de alineamiento se realizó una corrida adicional en gradiente (figura 15) de 57 a 59.7 °C con 9 intervalos), sin embargo, esta inespecificidad persistió. Dado que diferentes partes de transcripciones pueden compartir alguna similitud de nucleótidos debido a regiones homólogas o coincidencias fortuitas, no es raro que un par de cebadores destinados a un objetivo también se una a otro, lo que resulta en amplificaciones de objetivos no específicos (Ye *et al.*, 2012). Debido a esto, para los resultados descritos de las pruebas de qPCR se prefirió descartar este GRA.

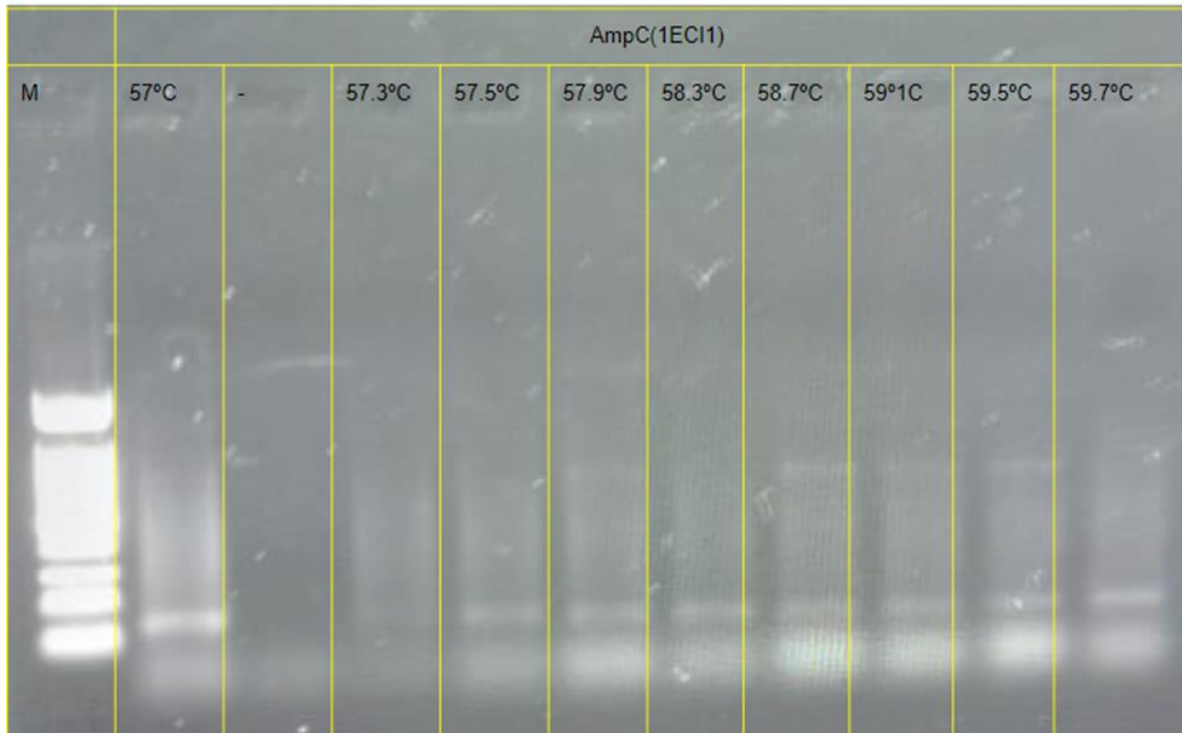
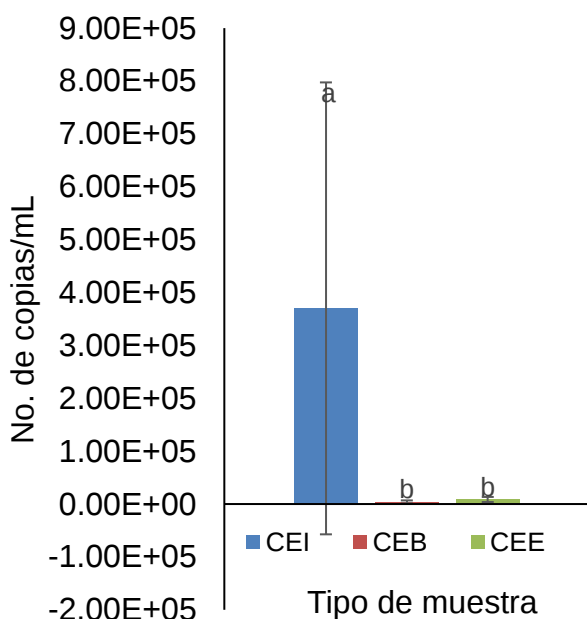


Figura15. Prueba de primers para el gen AmpC a distintas temperaturas de alineamiento en la muestra de agua influente 1ECI1 (Ecoducto influente). Se observan múltiples bandas pese a distintas temperaturas de alineamiento lo que indica una inespecificidad del primer.

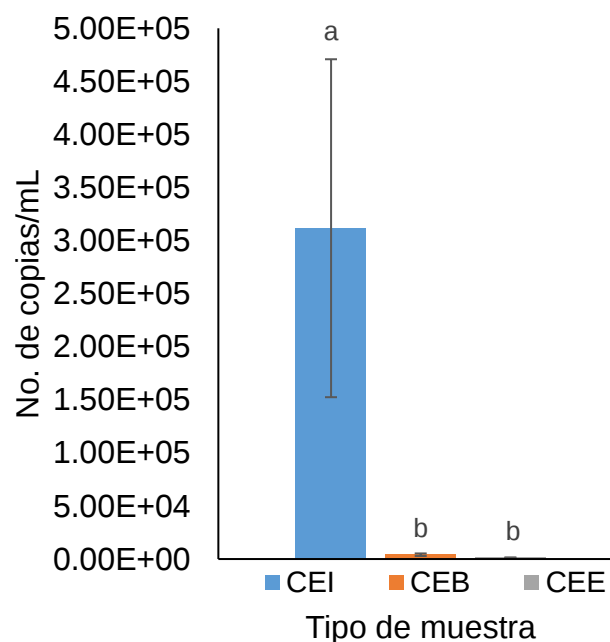
2. Abundancia de GRA en influentes, efluentes después del tratamiento biológicos y efluentes finales

En las PTAR evaluadas “Cerro de la estrella, Ecoducto, Santa fe y Chapultepec” se observó una disminución significativa ($\alpha > 0.05$) en la mayoría de los casos en las concentraciones de los GRA *OXA-10*, *Sul1*, *CphA-02* (Figura 18). al igual que la del integron *Int11* durante los tratamientos biológicos con las que cuenta cada una, destacando la contribución de los tratamientos biológicos para eliminar parcialmente estos contaminantes biológicos emergentes

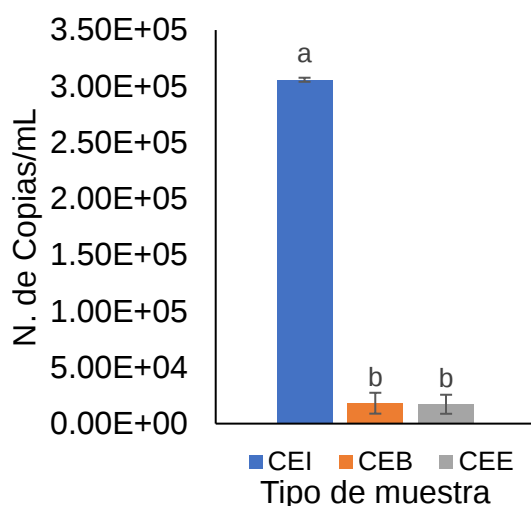
Sul1- Cerro de la estrella -Lluvias



OXA-10- Cerro de la estrella-Lluvia



Intl1- Cerro de la estrella- Lluvia



CphA-02-Cerro de la estrella- Lluvias

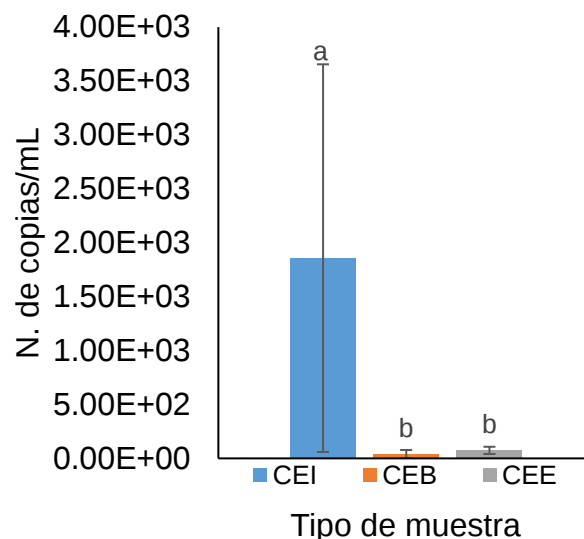


Figura 16 Abundancias absolutas de los genes estudiados en la PTAR Cerro de la estrella (CE) en la temporada de lluvia. Influyente (I), Efluente después del tratamiento de lodos activados convencionales (B), Efluente después de la cloración (E)

Las concentraciones de *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02* en los influentes de la temporada de lluvias de la PTAR “Cerro de la Estrella” fueron de 3.70×10^5 , 3.12×10^5 , 1.86×10^3 copias/mL, respectivamente. Posterior al tratamiento por lodos activados convencionales estas disminuyeron a 4.06×10^3 , 4.06×10^3 , 3.99×10^1 copias/mL de *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02*, respectivamente (figura 16). Un fenómeno similar ocurrió con *Intl1* que presentó una disminución significativa ($\alpha > 0.05$) de su concentración del influente (3.06×10^5 copias/mL) al efluente después del tratamiento biológico (1.81×10^4 copias/mL). Mismas observaciones fueron detectadas por Rodríguez *et al.*, (2021). donde *Intl1* disminuyó a través de la PTAR con tratamiento de lodos activados en dos unidades logarítmicas. Sin embargo, también se cuantificó en el efluente final después de la desinfección con cloro, esto es debido a cambios están asociados a algunas características fisicoquímicas del agua residual como la demanda bioquímica de oxígeno el cual tuvo una eliminación del 80% que pueden afectar las capacidades funcionales de las comunidades

bacterianas y una eliminación del 84% de sólidos en suspensión. La importancia de detectar *Int1* radica en que forma parte del integron clase 1 y tiene la capacidad de compartir cassettes genéticos promoviendo la *transferencia horizontal de genes* (THG) y la proliferación de *bacterias resistentes a antibióticos* (BRA) (Gillings, 2014).

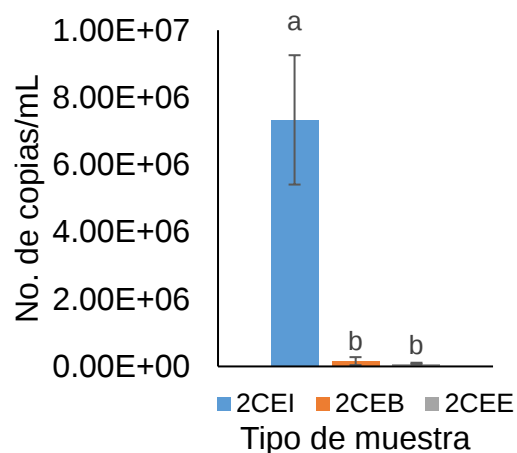
En la temporada de estiaje (Figura 17) los influentes obtuvieron concentraciones promedio de 7.33×10^6 , 1.36×10^5 , 4.96×10^6 copias/mL para *Sul1*, *CphA-02* e *Int1* respectivamente. Con respecto a las concentraciones de estos genes en los efluentes después del tratamiento biológico, se observaron concentraciones significativamente menores que en los influentes (Figura 17). Estas concentraciones fueron de 1.58×10^5 , 8.32×10^2 , 1.10×10^5 copias/mL para *Sul1*, *CphA-02* e *Int1* respectivamente. Al igual que los demás GRA detectados *OXA-10* mostró remociones significativas ($\alpha > 0.05$) para ambas temporadas de dos unidades logarítmicas. Diferentes resultados fueron realizados por Rodríguez *et al.*, (2021). En donde cuantifica un aumento específico de *OXA-10* después del tratamiento con lodos activados, ellos mostraron que los GRA responden a cambios en las comunidades microbianas ya que los procesos selectivos favorecen a ciertas comunidades. Estos cambios pueden explicarse por la reorganización de comunidades microbianas en toda la planta necesarias para realizar procesos biológicos de eliminación de materia orgánica, de ahí que el tratamiento parece afectar la eliminación específica de ciertos GRA. Los cambios están asociados a algunas características fisicoquímicas del agua residual (demanda química de oxígeno, pH y conductividad) y parámetros operativos de la planta de tratamiento (temperatura, tiempo de retención de lodos y sólidos suspendidos de líquidos mezclados).

Adicionalmente la PTAR Cerro de la Estrella cuenta con el proceso químico de desinfección con cloro (cloro gaseoso 0.2 a 0.6 mg/L). Las concentraciones promedio para los genes *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02* e *Int1* en efluentes finales fueron 8.63×10^3 , 1.02×10^3 , 7.44×10^1 y 1.72×10^4 copias/mL respectivamente, en temporada de lluvias y 8.68×10^4 , 8.95×10^3 , 8.38×10^1 , 4.15×10^4 copias/mL, respectivamente, en temporada de estiaje. La desinfección con cloro de los

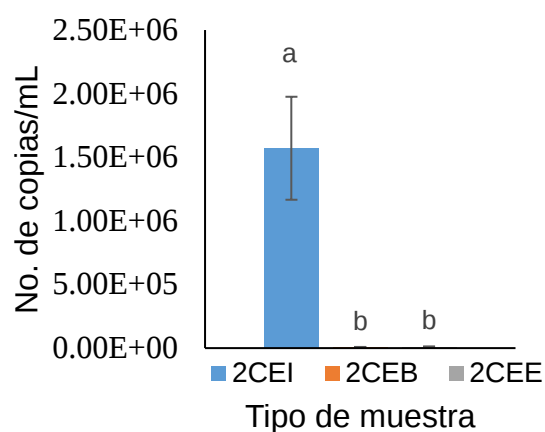
efluentes "B" no presentó un efecto significativo de disminución de la concentración de estos genes ni en lluvias ni en estiaje (Figuras 16 y 17). Estudios similares muestran que la desinfección con cloro no contribuyó a la disminución de los GRA y BRA sino todo lo contrario, esto debido a que la cloración puede contribuir al desarrollo de biopelículas las cuales brindan protección a las bacterias y puede mejorar su capacidad para superar diversos estresores como el cloro residual además de que el desarrollo de biopelículas puede incluso contribuir a la transferencia horizontal de genes y aumentar la resistencia al estrés de las bacterias (Li *et al.*, 2021). Otro estudio informó que la dosis de cloración a 9 mg min. L-1 aumentó la abundancia de GRA hasta 80% más para genes como *Sul1* (Liu *et al.*, 2018). La eficiencia de desinfección del cloro depende de la dosis de cloro, el tiempo de contacto en el reactor y la posterior salida de componentes intracelulares, lo que da como resultado un aumento en la concentración GRA en el agua tratada (Li *et al.*, 2021). Al igual que el cloro residual se consideró un factor importante que impulsa los genes de resistencia a múltiples fármacos y afecta la resistencia a los antibióticos (Li *et al.*, 2021).

En la temporada de estiaje (primavera) (Figura 17) los influentes detectados obtuvieron concentraciones de GRA e *Int1* significativamente más altas que en la temporada de lluvias (otoño). Harnisz *et al.*, (2020). encontraron patrones similares de GRA en aguas residuales donde hubo mayores concentraciones en invierno y primavera, que en verano y otoño. Las concentraciones de GRA pueden verse diluidas en la estación húmeda por las lluvias diarias en la época de muestreo (Truong *et al.*, 2021). Sin embargo, la estacionalidad es un fenómeno que afecta las prescripciones de antibióticos en pacientes ambulatorios. Caucci *et al.*, (2016). cuantificaron concentraciones mayores de GRA en invierno que en primavera esto se debe a que los médicos recetan mayor número de antibióticos en los meses fríos del año. Por lo tanto, es necesario un muestreo en todas las épocas del año para confirmar esta tendencia. Aun así, se destaca la contribución del tratamiento de lodos activados convencionales para disminuir las concentraciones de GRA, sin embargo, estos no se eliminaron por completo el cual resulta de una importante preocupación en su diseminación en los sistemas receptores.

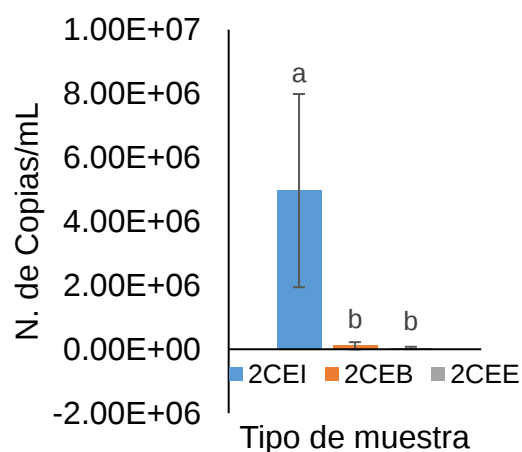
Sul1- Cerro de la estrella- Estiaje



OXA-10- Cerro de la estrella- Estiaje



Intl1- Cerro de la estrella- Estiaje



CphA-02-Cerro de la estrella- Estiaje

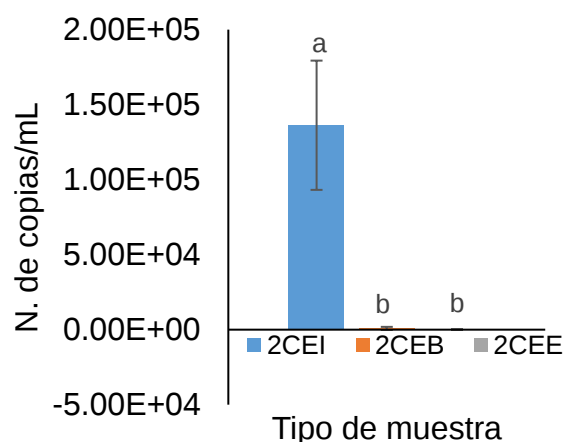


Figura 17. Abundancias de los GRA e Intl1 estudiados en la PTAR “Cerro de la estrella” en la temporada de Estiaje. Influyente (I), Efluente después del tratamiento de lodos activados convencionales (B), Efluente después de la cloración (E)

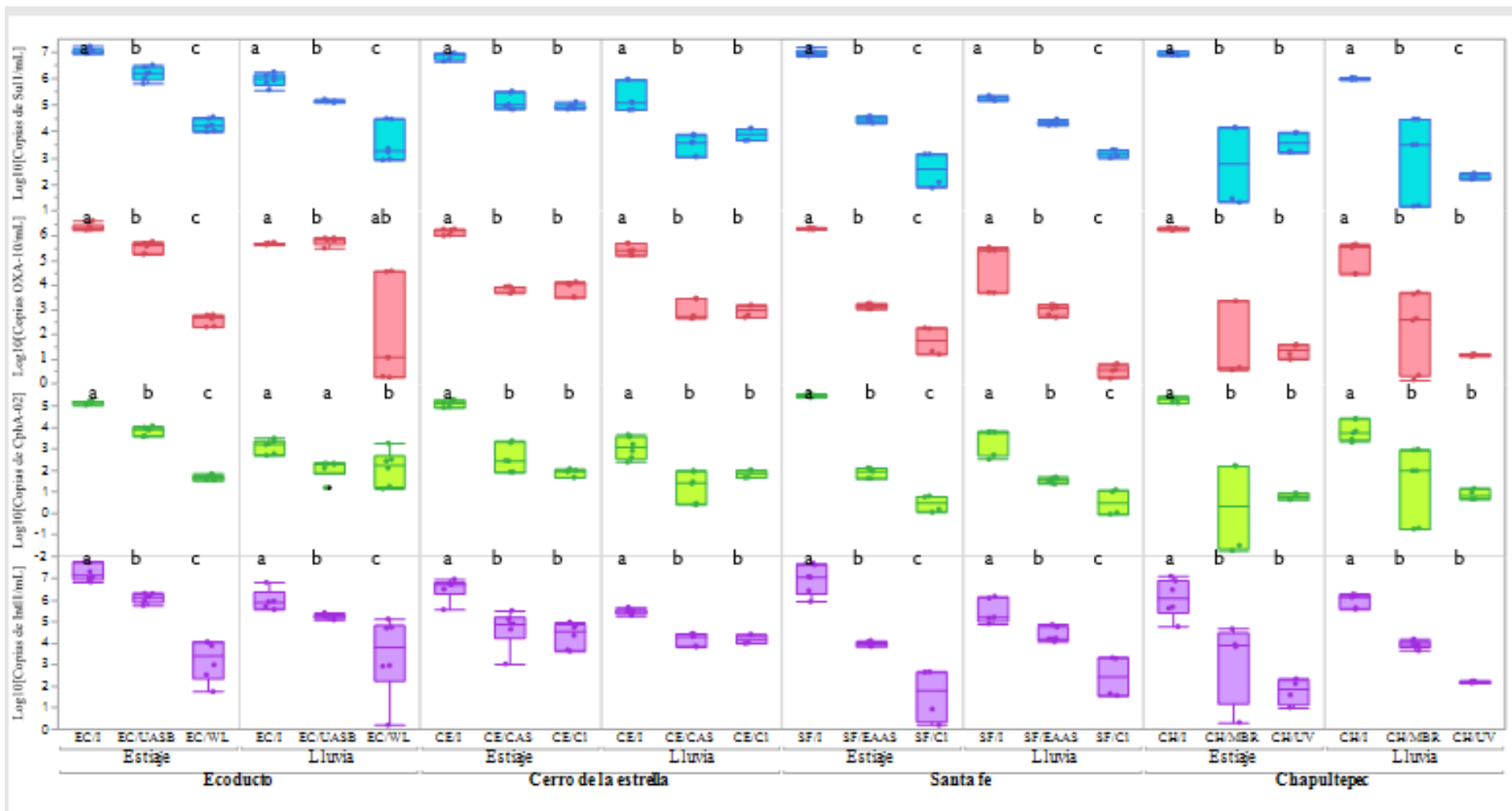
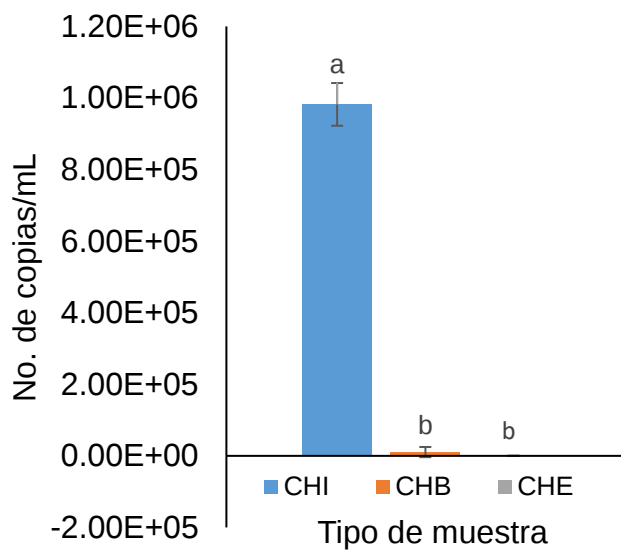


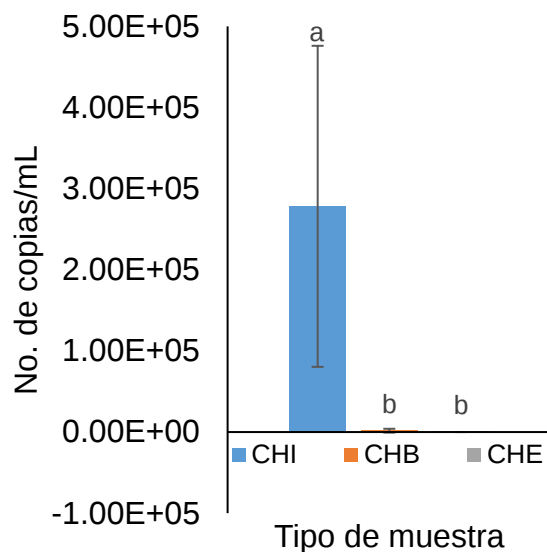
Figura18. Abundancia absoluta de Sul1, OXA-10, CphA-02 e Intl1 en las PTAR Ecoducto (EC), Cerro de la estrella (CE), Santa fe (SF) y Chapultepec (CH) en influentes (I), efluentes después del tratamiento biológicos (UASB, CAS, EAAS, MBR) y efluentes finales (CL, UV)

En la PTAR “Chapultepec” las concentraciones de los influentes de los genes *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02* e *Int1* mostraron respectivamente promedios que oscilaron entre 9.82×10^5 , 2.78×10^5 , 1.11×10^4 , 1.21×10^6 copias/mL en temporada de lluvias (figura 19) y 8.80×10^6 , 2.00×10^6 , 2.08×10^5 , 4.11×10^6 copias/mL en temporada de estiaje (Figura 20) que cuenta con un reactor biológico acoplado a membranas de filtración (MBR). Entre los GRA estudiados *Sul1* presenta las concentraciones más altas, sus concentraciones oscilaron entre 9.82×10^5 a 8.80×10^6 copias/mL para lluvias y estiaje respectivamente, para ambas temporadas las concentraciones obtenidas de influentes y efluentes biológicos son significativamente distintos ($\alpha > 0.05$). Esto concuerda con lo reportado por Li *et al.*, (2019) en el cual *sul1* tuvo la mayor abundancia entre todos los GRA estudiados (alrededor de 1×10^6 copias/mL). En general el proceso MBR mostró una remoción significativa ($\alpha > 0.05$) de hasta tres órdenes de magnitud en temporada de lluvia para *Int1* (9.35×10^3 copias/mL) y hasta seis órdenes en la temporada de estiaje para el gen *OXA-10* (3.39×10^0 copias/mL). De manera similar las abundancias de GRA en los efluentes fue de una a cuatro veces menor que en el influente (10^4 - 10^7 copias/mL) en una PTAR con la misma tecnología de tratamiento (Li *et al.*, 2019). Wang *et al.*, (2020) observaron una reducción de cuatro órdenes de magnitud del gen 16S ARNr, mientras que otros genes tuvieron una eliminación del 100%, esto debido a una alta retención de biomasa. El proceso MBR muestra de manera eficiente un buen rendimiento de reducción de GRA con éxito mayor (de hasta tres órdenes más), en comparación con la tecnología de lodos activados convencionales (PTAR “Cerro de la estrella”). Una mayor reducción en las concentraciones de GRA de esta PTAR también puede deberse al desarrollo de densas capas de ensuciamiento de la membrana que se demostró que fortalece las membranas creando una doble barrera que evita el escape del material genético a diferencia de un mayor escape de materia con la tecnología de lodos activados (Ng *et al.*, 2019).

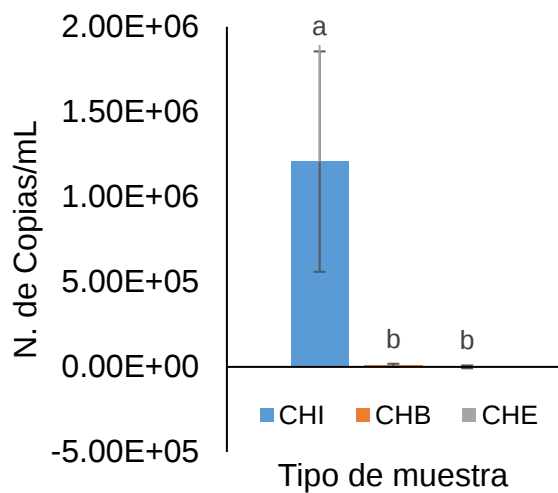
Sul1- Chapultepec-Lluvias



OXA-10- Chapultepec-Lluvia



Intl1- Chapultepec- Lluvia



CphA-02-Chapultepec-Lluvias

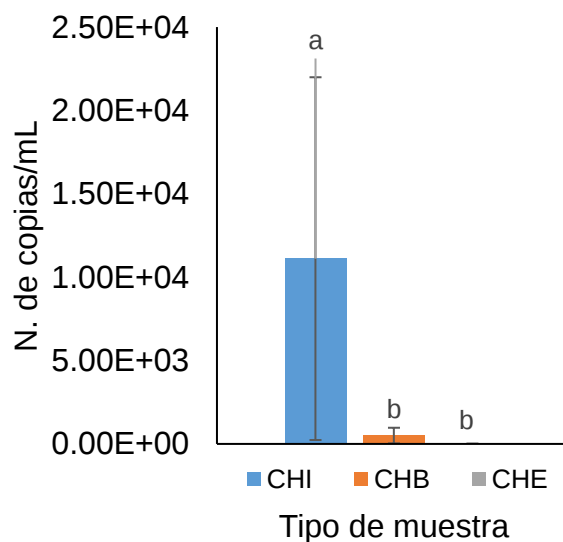
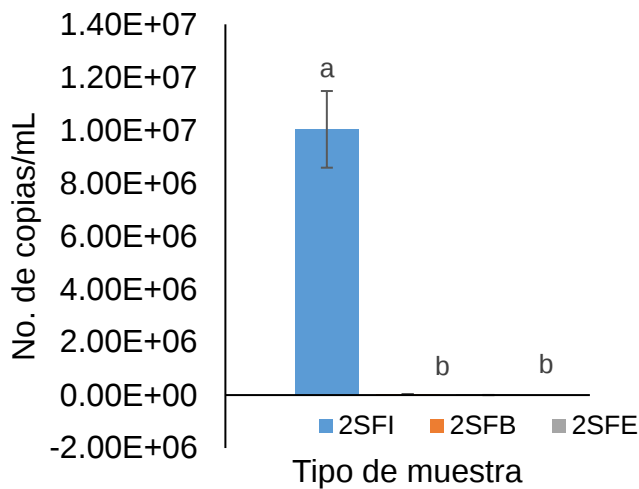


Figura 19. Abundancias de los GRA e Intl1 estudiados en la PTAR “Chapultepec” en la temporada de lluvia. Influyente (CHI), Efluente después del tratamiento (CHB), Efluente después de la desinfección UV (CHE)

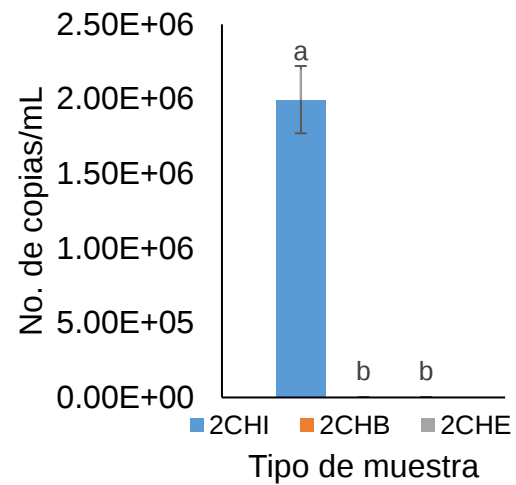
Por otro lado, después del tratamiento de desinfección con UV los efluentes finales no mostraron una remoción significativa a excepción de *Int1* en la época de lluvias el cual tuvo una remoción de un orden menor de 9.35×10^3 copias/mL a 1.56×10^2 copias/mL en el efluente final (Figura 19), La radiación UV causa alteraciones en el ADN como la formación de dímeros de timina inhibiendo así la transcripción celular, estas lesiones dificultan la actividad de la Taq polimerasa durante la PCR debido a que inhiben el proceso de transcripción *in situ* (Süß *et al.*, 2009)., sin embargo, esta técnica es limitada debido al tamaño de los cebadores utilizados (todos menores a 162pb). Süß *et al.*, (2009). Realizó una investigación de las mismas muestras con diferentes pares de cebadores revelando que cuanto más largo era el producto de ADN amplificado mayor era el número de daños en el ADN que inhibían la PCR. Por lo tanto, se puede suponer que las mediciones de qPCR subestiman las tasas de reducción reales.

McConnell y colaboradores. (2018). reportaron que una concentración de 250 mJ/cm^2 fue más significativa para la eliminación de GRA en comparación con concentraciones de 50 mJ/cm^2 donde fue nula, al igual que Lee *et al.*, (2017). quienes reportaron que no presentó una reducción en las GRA después de la desinfección UV con una dosis de 27 mJ/cm^2 en dos PTAR diferentes. McKinney & Pruden, (2012). desarrollaron una qPCR con una longitud de amplicones de aproximadamente 1000 pb, y observaron que el daño al ADN requiere dosis de radiación mayores (de 200 a 400 mJ/cm^2) en comparación con la inactivación de bacterias resistentes a los antibióticos (10 mJ/cm^2). Sugiriendo así que la desinfección UV tiene un potencial limitado para dañar los GRA en el agua y los efluentes de aguas residuales.

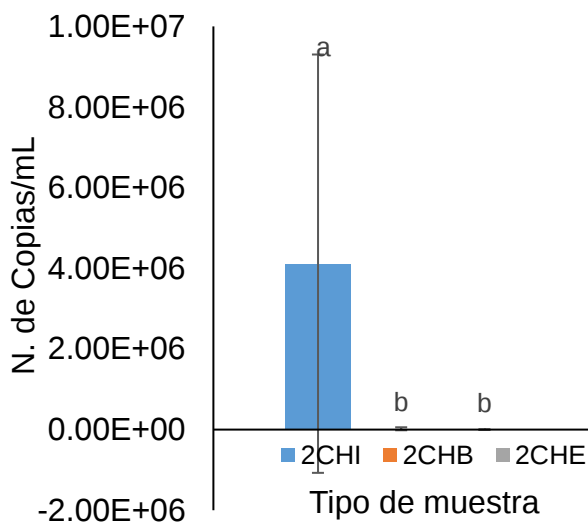
Sul1- Chapultepec-Estiaje



OXA-10- Chapultepec-Estiaje



Intl1- Chapultepec- Estiaje



CphA-02- Chapultepec-Estiaje

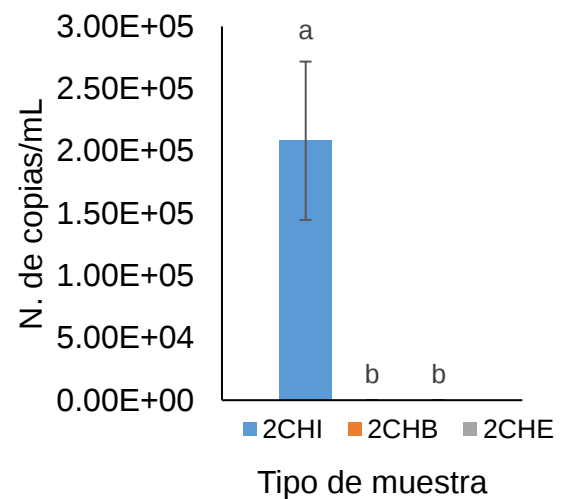


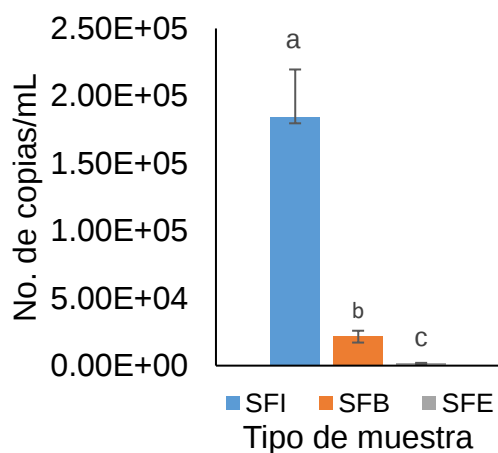
Figura 20. Abundancias de los GRA e Intl1 estudiados en la PTAR “Chapultepec” en la temporada de estiaje. Influyente (2CHI), Efluente después del tratamiento (2CHB), Efluente después de la desinfección UV (2CHE).

Como se muestra en la figura 21 de la PTAR “Santa Fe” las abundancias absolutas en los influentes en época de lluvias fueron de 1.84×10^5 , 1.99×10^5 , 4.19×10^3 , 6.20×10^5 copias/mL para los GRA *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02* e *Int1* respectivamente. La PTAR “Santa Fe” cuenta con un tratamiento biológico de lodos activados con aireación extendida, las concentraciones obtenidas después de este tratamiento fueron significativamente diferentes menores ($\alpha > 0.05$) con concentraciones de 2.15×10^4 , 1.09×10^3 , 3.52×10^2 , 3.13×10^4 copias/mL para los genes *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02* e *Int1*. Wang *et al.*, (2015). Informaron un aumento de 1.4 hasta 1.8 órdenes de magnitud después del tratamiento de lodos activados con aeración extendida en comparación con procesos anaeróbicos esto debido al lento crecimiento de la comunidad microbiana en las etapas de tratamiento anaeróbico y anóxico. La eliminación de GRA en los efluentes finales depende en gran medida de la separación de los sólidos mediante sedimentadores, clarificadores o la detención mediante materiales de membrana de fibra hueca en el procesamiento de MBR (Wang *et al.*, 2015). Explicando por qué la PTAR “Chapultepec” muestra una mayor remoción de GRA en efluentes finales.

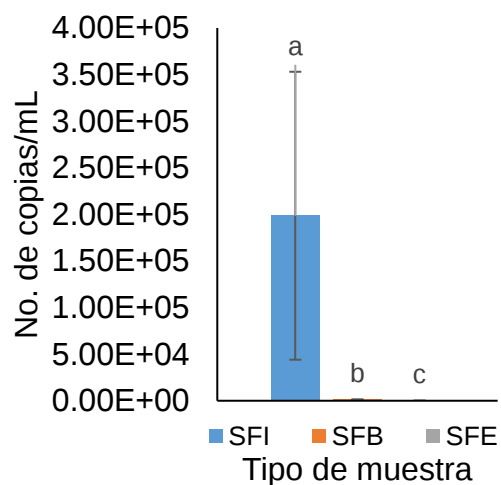
La PTAR está equipada adicionalmente con un proceso de desinfección con cloro y los resultados obtenidos de los efluentes finales muestran una remoción significativa ($\alpha > 0.05$) 1.52×10^3 , 3.72, 6.08, 1.01×10^3 copias/mL para los GRA *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02* e *Int1* respectivamente, mostrando tendencias distintas a la PTAR “Cerro de la Estrella” la cual también cuenta con el mismo proceso de desinfección adicional. A diferencia de la PTAR “Cerro de la Estrella” en la cual la etapa de desinfección se da a través del suministro de cloro gas, la PTAR Santa fe cuenta con un tanque de contacto de cloro en que se aplica la solución del hipoclorito al 13%, como se mencionó anteriormente el tiempo de retención y dosis dependerá mucho de la eficacia a la hora de la desinfección con cloro. Yuan *et al.*, (2015). encontraron que la eficacia de la cloración en la eliminación fue mayor en las BRA que en los GRA, a una concentración de 15 mg de Cl_2 min/litro. Cabe destacar que a concentraciones más altas no dieron como resultado una mayor reducción de GRA, y ciertos GRA no presentaron reducciones significativas. El cloro puede dañar la pared celular y alterar la permeabilidad de la membrana, lo que

provoca la fuga de componentes celulares como el ADN y las proteínas. Sin embargo, es posible que los GRA no se destruyan en el proceso y que sobrevivan como ADN disociado incluso sin la presencia de sus huéspedes (Yuan *et al.*, 2015). Como se mencionó antes, en la PTAR “Cerro de la Estrella” la aparición de biopelículas puede ayudar a brindar asistencia útil a las bacterias y mejorar su capacidad para superar los efectos de agentes que las estresan, como el cloro residual. Además, estas condiciones contribuyen a la transferencia horizontal de genes lo que aumenta la resistencia al estrés de las bacterias y los genes de resistencia a antimicrobianos en las biopelículas formadas (Li *et al.*, 2021).

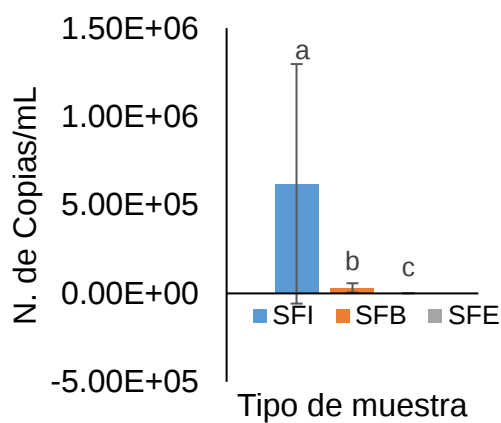
Sul1- Santa fe-Lluvias



OXA-10- Santa fe-Lluvias



Intl1- Santa fe- Lluvias



CphA-02-Santa fe-Lluvias

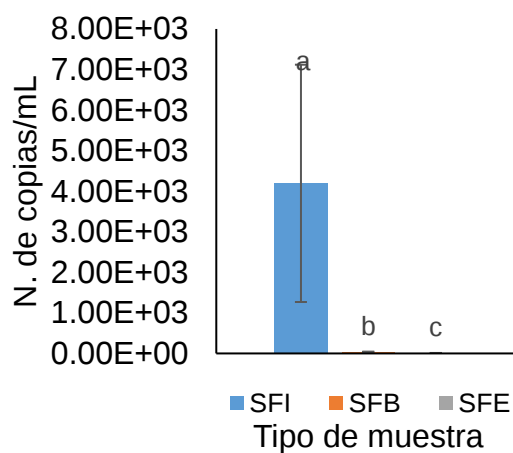
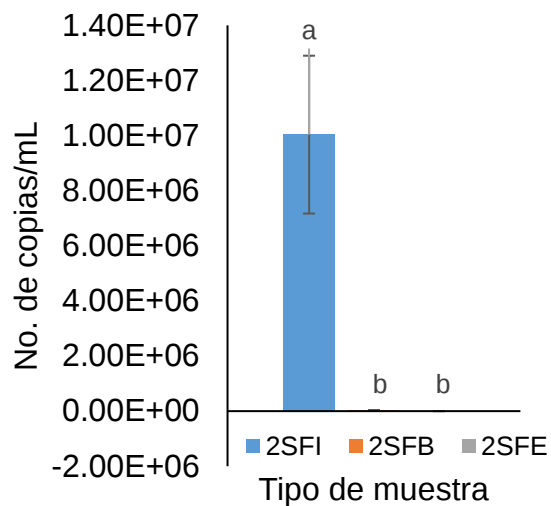


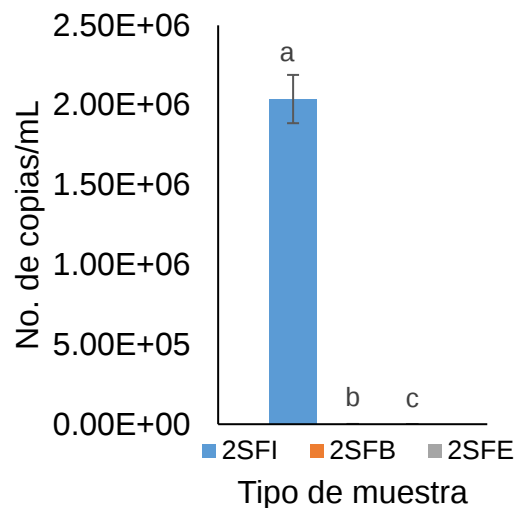
Figura 21. Abundancias absolutas de los GRA estudiados en la PTAR “Santa fe” en la temporada de lluvia. Influyente (I), Efluente después del tratamiento de lodos activados con aireación extendida (B), Efluente después de la cloración (E)

En la temporada de estiaje las concentraciones obtenidas de los influentes fueron 1.00×10^7 , 2.04×10^6 , 3.09×10^5 , 2.08×10^7 copias/mL (Figura 22) siendo hasta dos órdenes más altas que en temporada de lluvia (1.00×10^7 copias/mL). En los efluentes biológicos las concentraciones obtenidas fueron 2.78×10^4 , 1.41×10^3 , 8.62×10^1 , 9.75×10^3 copias/mL, siendo significativamente menores ($\alpha > 0.05$), los resultados muestran una remoción de hasta 4 órdenes de magnitud (partiendo de 2.06×10^7 copias de *Int11/mL*) en el cual se nota que a diferencia de la PTAR “Cerro de la Estrella” (con tecnología de lodos activados) que si bien demuestra una reducción significativamente menor de estos genes en sus efluentes biológicos teniendo remociones de hasta 3 órdenes de magnitud (partiendo de 1.36×10^5 copias de *Cpha-02/mL*) la tecnología de lodos activados con aireación extendida es más eficaz removiendo estos genes, es importante mencionar que ninguno se remueve hasta límites indetectables por qPCR. Los resultados obtenidos en los efluentes finales (después de la desinfección con cloro) si fueron menores significativamente esto concuerda con la temporada de lluvia dando resultados de 7.25×10^2 , 2.42×10^1 , 6.36 y 9.79×10^1 copias/mL para los genes *Sul1*, *OXA-10*, *Cpha-02* e *Int11* respectivamente.

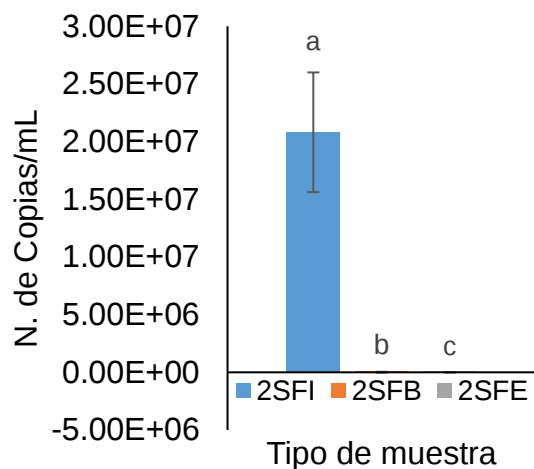
Sul1- Santa fe-Estiaje



OXA-10- Santa fe-Estiaje



Intl1- Santa fe- Estiaje



CphA-02- Santa fe-Estiaje

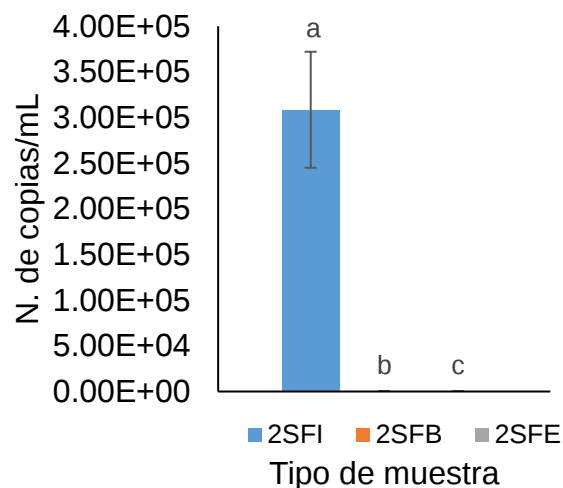
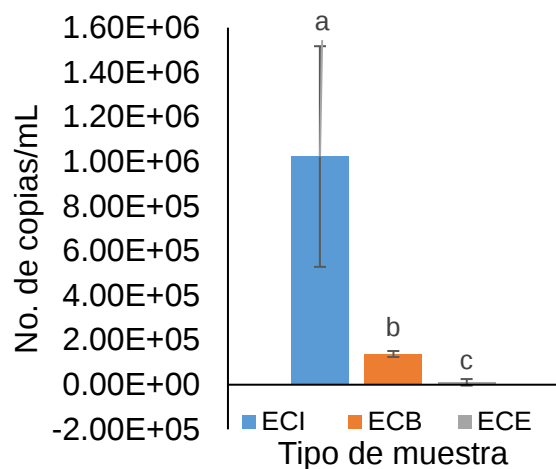


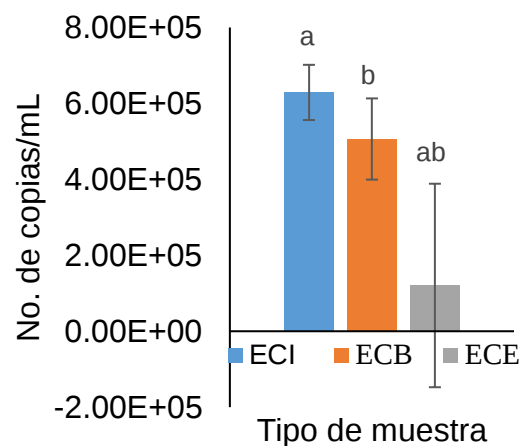
Figura 22. Abundancias absolutas de los genes estudiados en la PTAR Santa fe en la temporada de estiaje. Influyente (2SFI), Efluente después del tratamiento de lodos activados con aireación extendida (2SFB), Efluente después de la cloración (2SFE).

La PTAR de Ecoducto cuenta con dos tecnologías, reactores anaerobios tipo UASB acoplados a, humedales artificiales. Las concentraciones de influentes de los genes *Sul1*, *CphA-02* e *Int11* obtenidas fueron 1.02×10^6 , 1.60×10^3 y 1.85×10^6 copias/mL respectivamente para la época de lluvias (figura 23), en cuanto a los efluentes después de pasar por el reactor UASB se encontraron diferencias significativamente menores (1.38×10^5 , 1.58×10^2 1.82×10^5 copias/mL) con un grado de remoción de un orden a excepción del gen OXA-10 el cual su concentración fue de 4.96×10^5 en influente a 6.66×10^5 en el efluente biológico, siendo estas significativamente iguales (Figura 23). *Int11* y *Sul1* fueron los genes más abundantes en todas la PTARS estudiadas. Du *et al.*, (2014) encontraron resultados iguales en 5 plantas de tratamiento con distintas tecnologías en cada una en el cual *Sul1* e *Int11* fueron los genes más abundantes. *Sul1* se encuentra en la región conservada de *Int11*, lo que demuestra que sea el gen con mayor concentración de los GRA estudiados en este estudio. La concentración de genes en los efluentes finales (después del tratamiento con humedales artificiales) si son significativamente menores ($\alpha > 0.05$) a los efluentes después del reactor UASB mostrando remociones de 2 órdenes de magnitud partiendo de 1.38×10^5 copias *Sul1*/mL, a excepción del gen *CphA-02* el cual sus concentraciones son iguales significativamente ($\alpha > 0.05$). Cheng & Hong, (2017). Muestran resultados parecidos el cual *Sul1* es el gen más predominante y con tasas de eliminación de 1 hasta 3 órdenes de magnitud mientras que Sabri *et al.*, (2021). no mostró una acumulación o reducción significativa de GRA en la PTAR con humedales artificiales. En la eliminación de GRA dentro de las PTAR intervienen mecanismos biológicos como la absorción de GRA por parte de las plantas como a través de las raíces hasta el tallo y a través de las hojas, al igual que la comunidad microbiana en las raíces también puede ayudar a acelerar el proceso de biodegradación, al igual que mecanismos físicos como la sorción a sedimentos o materia orgánica, filtración mecánica o sedimentación (Sabri *et al.*, 2021). Los humedales construidos podrían ser una tecnología prometedora para remover GRA, pero no hasta límites indetectables por qPCR.

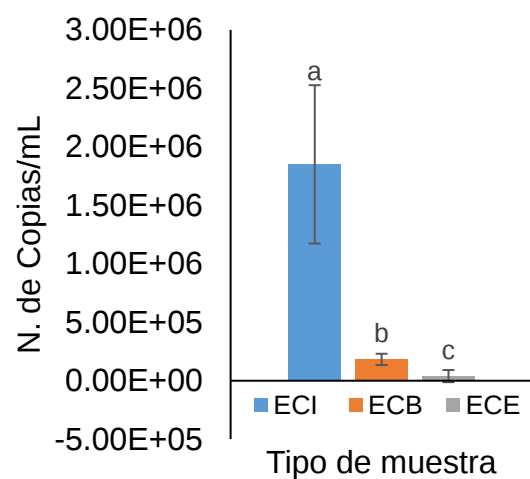
Sul1- Ecoducto-Lluvias



OXA-10- Ecoducto-Lluvias



Intl1- Ecoducto- Lluvias



CphA-02-Ecoducto-Lluvias

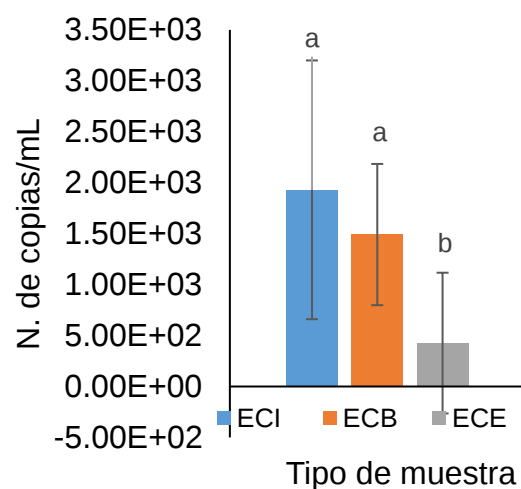
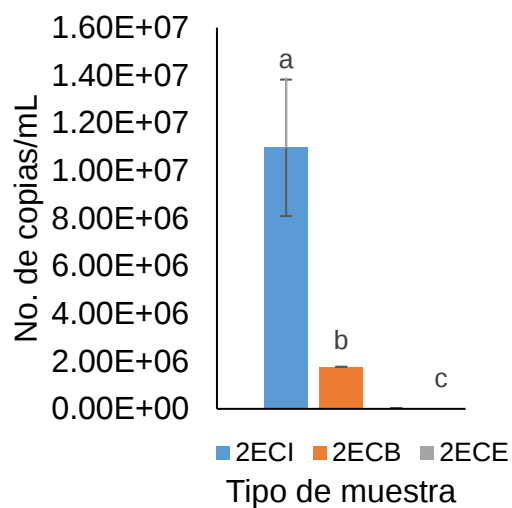


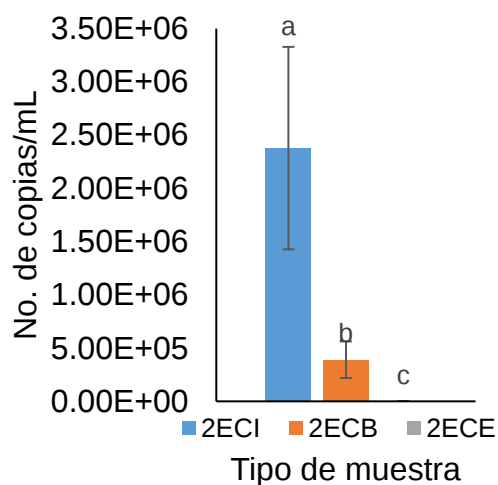
Figura 23 Abundancias absolutas de los genes estudiados en la PTAR Ecoducto en la temporada de lluvia. Influyente (ECI), Efluente después del tratamiento (ECB), Efluente (ECE).

En cuanto a la Temporada de estiaje las concentraciones obtenidas de influentes (1.10×10^7 , 2.38×10^6 , 1.42×10^5 y 2.86×10^7 para los genes *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02* e *Int11* respectivamente) fueron mayores a las obtenidas en la época de lluvia. Independientemente de la carga inicial en la PTAR de Ecoducto los resultados obtenidos de los efluentes (1.76×10^6 , 3.91×10^5 , 1.41×10^6 , 7.49×10^3 para los genes *Sul1*, *OXA-10*, *CphA-02* e *Int11* respectivamente) son significativamente ($\alpha > 0.05$) menores, mostrando que la PTAR independiente de la temporada (lluvia y secas) se comporta de manera similar, removiendo los GRA hasta en un orden de magnitud (Figura 24). al igual que los efluentes finales después del tratamiento con humedales artificiales. Yuan *et al.*, (2016) informaron que el reactor anaerobio UASB no redujo significativamente los GRA, indicando que la condición anaeróbica parecía ser favorable para la persistencia y el desarrollo de la resistencia a los antibióticos Tao *et al.*, (2014) obtuvieron las concentraciones más altas de GRA en el tanque de tratamiento anaerobio comparándolo con la tecnología de lodos activados. En el proceso de tratamiento anaeróbico, los microorganismos convierten los contaminantes orgánicos en metano y biomasa, en ausencia de oxígeno (Hazra *et al.*, 2022) y como en ciertas condiciones el oxígeno y la luz solar pueden disminuir la cantidad de bacterias (Tao *et al.*, 2014)., las condiciones que se presentan en el tanque UASB son favorables para la persistencia y el desarrollo de BRA de ahí es que esta tecnología a comparación de las demás es la menos eficiente a la hora de remover GRA.

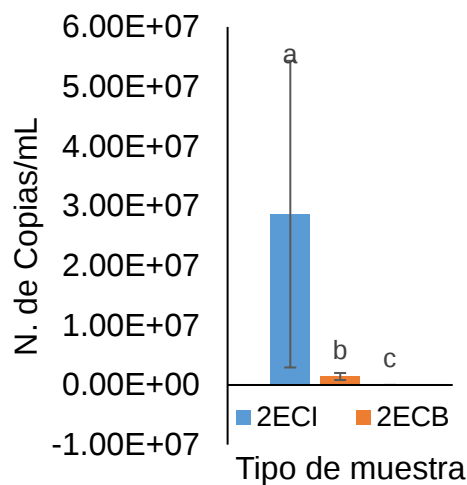
Sul1- Ecoducto-Estiaje



OXA-10-Ecoducto-Estiaje



IntI1- Ecoducto- Estiaje



CphA-02- Ecoducto-Estiaje

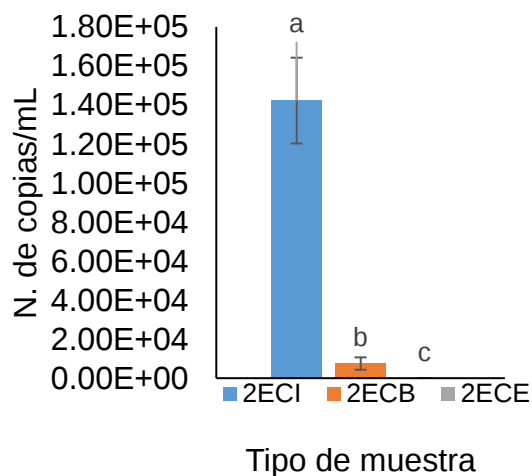


Figura 24 Abundancias absolutas de los genes estudiados en la PTAR Ecoducto en la temporada de estiaje. Influyente (ECI), Efluente después del tratamiento (ECB), Efluente (ECE).

3. Acumulación de GRA en lodo secundario.

La disminución de GRA y copias de *int1* en unidades de volumen puede deberse esencialmente a que una fracción importante (aprox. 90%) de la materia en suspensión contenida en las aguas residuales se elimina durante los tratamientos biológicos y se concentra en los lodos primarios y secundarios de los tanques de decantación. Un análisis de la concentración de estos genes en unidades de materia en suspensión correspondientes a la materia orgánica contenida en aguas residuales, aguas tratadas y lodos de depuradora puede explicar mejor el destino de los GRA en las PTAR.

Como se muestra en la Figura 25, en la mayoría de los casos, GRA/gSV e *int1*/gSV disminuyen en el efluente, pero no hasta límites indetectables por qPCR. También se observa que en la mayoría de los casos la abundancia en el influente no es significativamente menor que en el lodo secundario, y en algunos casos el lodo secundario tiene una mayor abundancia de estos genes. Estos resultados demuestran que los GRA no se degradan durante el tratamiento de aguas residuales y se diseminan desde el influente hasta los lodos donde se concentran actuando como depósito de genes resistentes (Hazra *et al.*, 2022).

Esta es la primera vez que se reporta un análisis de *Int1* y GRA en PTAR en México, y el hecho de que exista una prevalencia de los genes *int1* y *sul1* en aguas residuales y aguas tratadas es consistente con investigaciones basadas en análisis metagenómicos a escala global (Hendriksen *et al.*, 2019; Karkman *et al.*, 2019) o a través de investigaciones basadas en qPCR en 10 países de Europa (Cacace *et al.*, 2019) y Brasil (Leroy-Freitas *et al.*, 2022), por nombrar algunos. Adicionalmente, esta investigación presenta la persistencia de *OXA-10* y *CphA-02* que, aunque no tan bien estudiados como *int1* y *sul1*, se encuentran entre los GRA más abundantes en aguas residuales de la Ciudad de México.

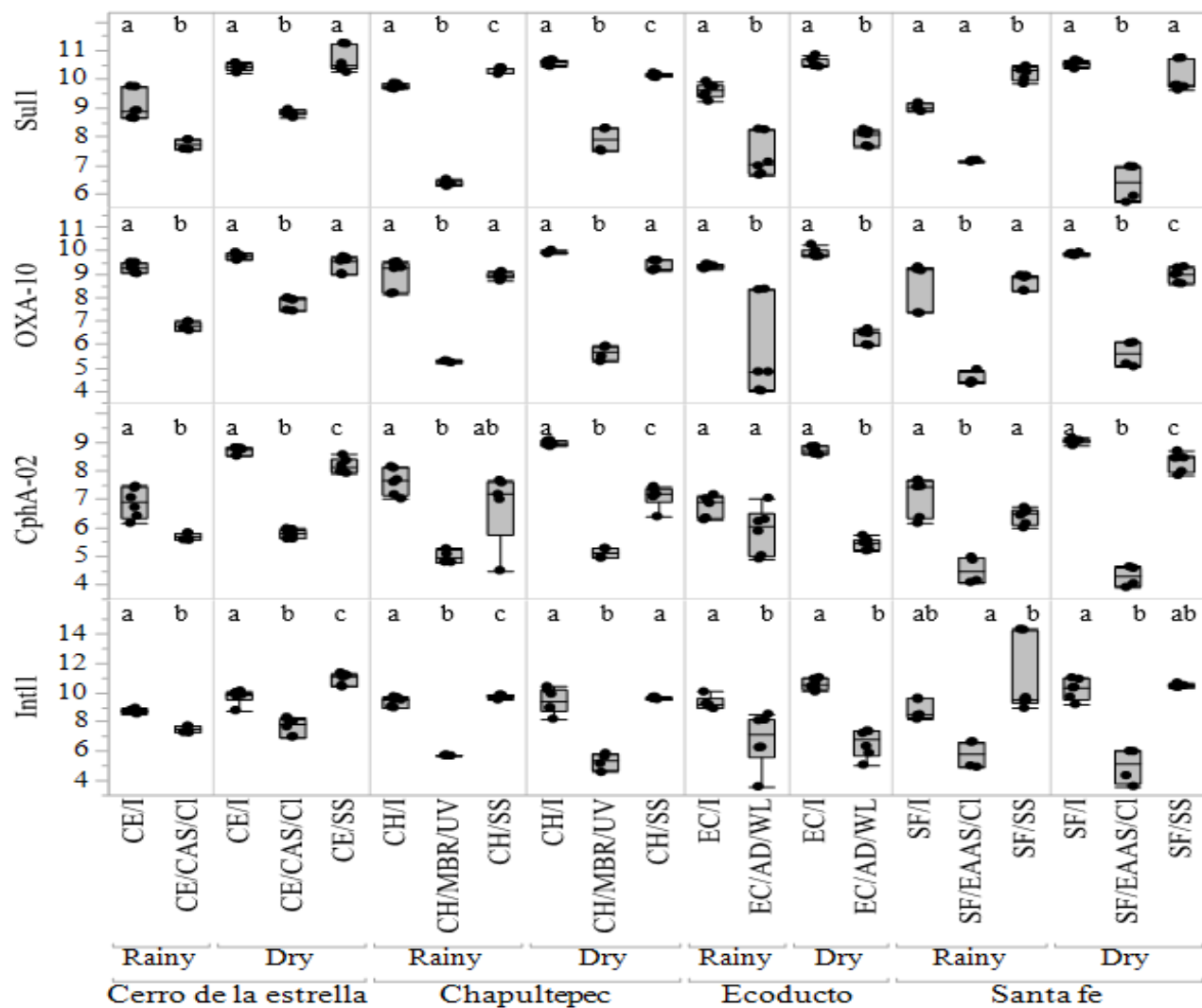


Figura 25. Abundancia absoluta de Sul1, OXA-10, ChpA-02 e Int1. En afluentes (CE/I, CH/I, EC/I y SF/I), efluentes (CE/CI, CH/UV, EC/AD/WL y SF/CI) y lodos secundarios (CE/SS, CH/SS y SF/SS).

CONCLUSIONES.

Se comparó el grado de remoción de *Int1* y tres GRA en cinco tecnologías distintas en cuatro PTAR de la CDMX. Se destaca la contribución de las PTAR evaluadas para lograr una remoción significativa de los genes *SUL1*, *OXA-10*, *CphA-02* e *Int1* en sus efluentes biológicos la cual depende en gran medida de la eliminación de sólidos, sin embargo, los GRA se siguen detectando por qPCR.

La tecnología de MBR con la que cuenta la PTAR “Chapultepec” obtuvo las mejores remociones en la abundancia de GRA debido a una mayor detención de partículas en las membranas.

Sul1 e *Int1* fueron los genes más abundantes tanto en influentes, efluentes biológicos y efluentes después de la desinfección en todas las PTAR estudiadas, seguido de *OXA-10* y *CphA-02*.

Dada la acumulación que se observó de *sul1*, *cphA-02* y *OXA-10* e *int1* en los lodos de purga y su persistencia en los efluentes finales, existe un riesgo considerable para la salud al ser descargados diferentes sistemas acuáticos, generando así presiones de selección y diseminación en sus puntos de descarga.

Anexo.

A) Método de extracción de ADN PowerSoil® DNA Isolation.

1. Adicionar 60µL de la solución C1 al tubo PowerBead y pasar la muestra por vortex brevemente.
2. Asegure el tubo PowerBead horizontalmente al Vortex y utilizar la temperatura máxima por 10min.
3. Centrifugue las muestras a 10,000 x g por 30s.
4. Transferir el sobrenadante a un tubo colector de 2ml.
5. Adicionar 250µL de la solución C2 al tubo colector posteriormente pasarlo por vortex por 5s, e incubar a 4°C por 5min.
6. Centrifugar los tubos por 1min a 10,000 x g.
7. Evitando el pellet, transferir aproximadamente 600µL de sobrenadante a un nuevo tubo colector de 2ml.
8. Adicionar 200µL de la solución C3 y pasar por el vortex brevemente e incubar a 4°C por 5min.
9. Centrifugar los tubos por 1min a 10,000 x g.
10. Evitando el pellet, transferir al tubo colector 750µL del sobrenadante.
11. Agitar brevemente la solución C4 y adicionar 1200µL al sobrenadante. Vortex por 5s.
12. Transferir 675µL dentro de la columna MB Spin y centrifugar a 10,000 x g por 1min. Desechar el sobrenadante.
13. Repetir el paso 12 hasta que se haya procesado toda la muestra.
14. Adicionar 500µL de la solución C5 y centrifugar por 30s a 10,000 x g.
15. Descartar el sobrenadante y centrifugar nuevamente por 1min a 10,000 x g.
16. Coloque con cuidado la columna MB Spin dentro de un tubo colector de 2ml.
17. Adicionar 100µL de la solución C6 en el centro de la membrana.
18. Centrifugar a temperatura ambiente por 30s a 10,000 x g, descartar la columna MB Spin. El ADN está listo para aplicaciones posteriores.

REFERENCIAS.

- Aarestrup, F. M., & Woolhouse, M. E. J. (2020). Using sewage for surveillance of antimicrobial resistance. *Science*, 367(6478), 630–632. <https://doi.org/10.1126/science.aba3432>
- Abushaheen, M. A., Muzaaheed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A. A., Shaik, J., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6), 100971. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>
- Acharya, Y., Bhattacharyya, S., Dhanda, G., & Haldar, J. (2022). Emerging Roles of Glycopeptide Antibiotics: Moving beyond Gram-Positive Bacteria. *ACS Infectious Diseases*, 8(1), 1–28. https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.1C00367/ASSET/IMAGES/ACSINFEC DIS.1C00367.SOCIAL.JPEG_V03
- Adekanmbi, A. O., Adejoba, A. T., Banjo, O. A., & Saki, M. (2020). Detection of sul1 and sul2 genes in sulfonamide-resistant bacteria (SRB) from sewage, aquaculture sources, animal wastes and hospital wastewater in South-West Nigeria. *Gene Reports*, 20, 100742. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100742>
- Aguirre, P. A., García, J., & Mujeriego Sahuquillo, R. (2004). Desinfección con cloro y luz UV en un proceso convencional de regeneración de agua. *Ingeniería Del Agua*, 11(1), 75. <https://doi.org/10.4995/ia.2004.2524>
- Alexander, J., Hembach, N., & Schwartz, T. (2020). Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65635-4>
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural

- environments. *Nature Reviews Microbiology* 2010 8:4, 8(4), 251–259.
<https://doi.org/10.1038/NRMICRO2312>
- Amin, Mohammad Mehdi; Hashemi, Hassan; Bovini, Amir Mohammadi. Una revisión sobre la desinfección de aguas residuales. *Revista internacional de ingeniería en salud ambiental* 2(1).
- Aurilio, C.; Sansone, P.; Barbarisi, M.; Pota, V.; Giaccari, L.G.; Coppolino, F.; Barbarisi, A.; Passavanti, M.B.; Pace, M.C. Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics* 2022, 11, 421.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11030421>
- Baquero, F., & Negri, M. (1998). *Antibiotic-Selective Environments*. 27(Suppl 1), 5–11.
- Bouki, C., Venieri, D., & Diamadopoulos, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.016>
- Brouckaert M. (2017). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial resistance and virulence genes in pet dogs of Durban: the risks of reservoir populations. *Medice, Environmental Science*.
- Carcione, D., Siracusa, C., Sulejmani, A., Leoni, V., & Intra, J. (2021). Old and New Beta-Lactamase Inhibitors: Molecular Structure, Mechanism of Action, and Clinical Use. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 995, 10(8), 995.
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10080995>
- Caucci, S., Karkman, A., Cacace, D., Rybicki, M., Timpel, P., Voolaid, V., Gurke, R., Virta, M., & Berendonk, T. U. (2016). Seasonality of antibiotic prescriptions for outpatients and resistance genes in sewers and wastewater treatment plant outflow. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(5), 60.
<https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIW060>
- Cheng, H., & Hong, P.-Y. (2017). Removal of Antibiotic-Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes Affected by Varying Degrees of Fouling on

- Anaerobic Microfiltration Membranes. *Environmental Science and Technology*, 51(21), 12200–12209. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.7B03798>
- Cho, H., Uehara, T., & Bernhardt, T. G. (2014). Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. *Cell*, 159(6), 1300–1311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.017>
- Cuetero-Martínez, Y. (2023). Caracterización y remoción de bacterias patógenas en los tratamientos de aguas y lodos residuales de la Ciudad de México. *Tesis Doctorado*.
- Cuetero-Martínez, Y., de los Cobos-Vasconcelos, D., Aguirre-Garrido, J. F., Lopez-Vidal, Y., & Noyola, A. (2022). Next-generation Sequencing for Surveillance of Antimicrobial Resistance and Pathogenicity in Municipal Wastewater Treatment Plants. *Current Medicinal Chemistry*, 30(1), 5–29. <https://doi.org/10.2174/0929867329666220802093415>
- Du, J., Ren, H., Geng, J., Zhang, Y., Xu, K., & Ding, L. (2014). Occurrence and abundance of tetracycline, sulfonamide resistance genes, and class 1 integron in five wastewater treatment plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(12), 7276–7284. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2613-5>
- Du, X., Shi, Y., Jegatheesan, V., & Ul Haq, I. (2020). A review on the mechanism, impacts and control methods of membrane fouling in MBR system. In *Membranes* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/membranes10020024>
- Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>
- Fahrenfeld, N., & Bisceglia, K. J. (2016). Emerging investigators series: Sewer surveillance for monitoring antibiotic use and prevalence of antibiotic resistance: Urban sewer epidemiology. *Environmental Science: Water Research and Technology*, 2(5), 788–799. <https://doi.org/10.1039/c6ew00158k>
- FAO. (2018). Antimicrobial Resistance in the Environment. *Summary Report of an FAO Meeting of Experts FAO Antimicrobial Resistance Working Group*.

- Ghai, I.; Ghai, S. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infect. Drug Resist.* 2018, 11, 523–530
- Garcia, Í. R., de Oliveira Garcia, F. A., Pereira, P. S., Coutinho, H. D. M., Siyadatpanah, A., Norouzi, R., Wilairatana, P., de Lourdes Pereira, M., Nissapatorn, V., Tintino, S. R., & Rodrigues, F. F. G. (2022). Microbial resistance: The role of efflux pump superfamilies and their respective substrates. *Life Sciences*, 295, 120391. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120391>
- Gillings, M. R. (2014). Integrins: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), 257–277. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13/ASSET/566A4A73-114E-4004-9CFF-0B65FEC6CBFD/ASSETS/GRAPHIC/ZMR9990923590006.JPEG>
- Gupta, V. K., Ali, I., Saleh, T. A., Nayak, A., & Agarwal, S. (2012). Chemical treatment technologies for waste-water recycling—an overview. *RSC Advances*, 2(16), 6380–6388. <https://doi.org/10.1039/C2RA20340E>
- Harnisz, M., Kiedrzyńska, E., Kiedrzyński, M., Korzeniewska, E., Czatzkowska, M., Koniuszewska, I., Jóźwik, A., Szklarek, S., Niestępski, S., & Zalewski, M. (2020). The impact of WWTP size and sampling season on the prevalence of antibiotic resistance genes in wastewater and the river system. *Science of The Total Environment*, 741, 140466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140466>
- Hazra, M., Joshi, H., Williams, J. B., & Watts, J. E. M. (2022). Antibiotics and antibiotic resistant bacteria/genes in urban wastewater: A comparison of their fate in conventional treatment systems and constructed wetlands. *Chemosphere*, 303, 135148. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135148>
- He, Y., Lei, J., Pan, X., Huang, X., & Zhao, Y. (2020). The hydrolytic water molecule of Class A β -lactamase relies on the acyl-enzyme intermediate ES* for proper

- coordination and catalysis. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66431-w>
- Hopwood, D. A. (2007). How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Molecular Microbiology*, 63(4), 937–940. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2006.05584.X>
- Hreiz, R., Latifi, M. A., & Roche, N. (2015). Optimal design and operation of activated sludge processes: State-of-the-art. *Chemical Engineering Journal*, 281, 900–920. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2015.06.125>
- Javvadi, Y., & Mohan, S. V. (2023). Understanding the distribution of antibiotic resistance genes in an urban community using wastewater-based epidemiological approach. *Science of the Total Environment*, 868(October 2022), 161419. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161419>
- 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. https://doi.org/10.4103/JOACP.JOACP_349_15
- Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F., & Virta, M. P. J. (2018). Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology*, 26(3), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.005>
- Kim, J., Lim, J., & Lee, C. (2013). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1358–1373. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.010>
- Kim, S., & Aga, D. S. (2007). Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 10(8), 559–573. <https://doi.org/10.1080/15287390600975137>
- Krüger, N. J., & Stingl, K. (2011). Two steps away from novelty - principles of

bacterial DNA uptake. *Molecular Microbiology*, 80(4), 860–867.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07647.x>

- Langbehn, R. K., Michels, C., & Soares, H. M. (2021). Antibiotics in wastewater: From its occurrence to the biological removal by environmentally conscious technologies. *Environmental Pollution*, 275, 116603.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116603>
- Lee, J., Jeon, J. H., Shin, J., Jang, H. M., Kim, S., Song, M. S., & Kim, Y. M. (2017). Quantitative and qualitative changes in antibiotic resistance genes after passing through treatment processes in municipal wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 605–606, 906–914.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.250>
- Li, B., Qiu, Y., Li, J., Liang, P., & Huang, X. (2019). Removal of antibiotic resistance genes in four full-scale membrane bioreactors. *Science of The Total Environment*, 653, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.305>
- Li, J., Zhang, S., Guo, L., Chen, L., & Yu, Z. (2021). Chlorination contributes to multi-antibiotic resistance in a pilot-scale water distribution system. *Water Supply*, 21(8), 4369–4381. <https://doi.org/10.2166/WS.2021.185>
- Lim, J., Shin, S. G., Lee, S., & Hwang, S. (2011). Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China* 2011 5:1, 5(1), 28–39.
<https://doi.org/10.1007/S11783-011-0302-X>
- Lima, L. M., Silva, B. N. M. da, Barbosa, G., & Barreiro, E. J. (2020). β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208, 112829.
<https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112829>
- Liu, S. S., Qu, H. M., Yang, D., Hu, H., Liu, W. L., Qiu, Z. G., Hou, A. M., Guo, J., Li, J. W., Shen, Z. Q., & Jin, M. (2018). Chlorine disinfection increases both

- intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Research*, 136, 131–136. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2018.02.036>
- Lomovskaya, O., & Bostian, K. A. (2006). Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic—A vision for applied use. *Biochemical Pharmacology*, 71(7), 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.008>
- Lorenzo, Y. (2006). La digestión anaerobia y los reactores UASB. Generalidades. *ICIDCA : Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 40(1), 13–21.
- MacLean, R. C., & San Millan, A. (2019). The evolution of antibiotic resistance. *Science*, 365(6458), 1082–1083. <https://doi.org/10.1126/science.aax3879>
- Manaia, C. M., Rocha, J., Scaccia, N., Marano, R., Radu, E., Biancullo, F., Cerqueira, F., Fortunato, G., Iakovides, I. C., Zammit, I., Kampouris, I., Vaz-Moreira, I., & Nunes, O. C. (2018). Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment International*, 115(March), 312–324. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.044>
- McConnell, M. M., Truelstrup Hansen, L., Jamieson, R. C., Neudorf, K. D., Yost, C. K., & Tong, A. (2018). Removal of antibiotic resistance genes in two tertiary level municipal wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 643, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.212>
- McKinney, C. W., & Pruden, A. (2012). Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. *Environmental Science and Technology*, 46(24), 13393–13400. https://doi.org/10.1021/ES303652Q/ASSET/IMAGES/LARGE/ES-2012-03652Q_0005.JPEG
- Meza, F., & Alvez, P. (2013). Desinfección por Luz Ultravioleta. *Prosab*, 25–31.
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C. S., Manaia, C. M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research*,

47(3), 957–995. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.027>

Mosquito, S., Ruiz, J., Luis Bauer, J., Ochoa, T. J., Humbold, V., & Peruana Cayetano Heredia Lima, U. (2011). MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Escherichia coli* ASOCIADAS A DIARREA MOLECULAR. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4), 648–656.

Ng, C., Tan, B., Jiang, X. T., Gu, X., Chen, H., Schmitz, B. W., Haller, L., Charles, F. R., Zhang, T., & Gin, K. (2019). Metagenomic and resistome analysis of a full-scale municipal wastewater treatment plant in Singapore containing membrane bioreactors. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 172. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00172/BIBTEX>

Noyola, A., Morgan, J., & Guereca, L. (2013). *Selección de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales municipales* (pp. 1–140). <http://es.slideshare.net/EdwinMamaniVilcapaza/seleccion-de-tecnologias-para-el-tratamiento-de-aguas-residuales-municipales>

Ovung, A., & Bhattacharyya, J. (2021). Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews* 2021 13:2, 13(2), 259–272. <https://doi.org/10.1007/S12551-021-00795-9>

Programa Universitario de Investigación en Salud. (2018). *Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana México 2018*. www.puis.unam.mx

Reyes, M. G. (2011). Uso Del Cloro En Las Plantas De Tratamiento De Aguas Residuales Domesticas: Desinfección Y Formación De Subproductos. *Tesis*, 250, 8729626. <http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/16124>

Rodríguez, E. A., Ramirez, D., Balcázar, J. L., & Jiménez, J. N. (2021). Metagenomic analysis of urban wastewater resistome and mobilome: A support for antimicrobial resistance surveillance in an endemic country. *Environmental Pollution*, 276, 116736. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116736>

Sabri, N. A., Schmitt, H., van der Zaan, B. M., Gerritsen, H. W., Rijnaarts, H. H. M., & Langenhoff, A. A. M. (2021). Performance of full scale constructed wetlands

- in removing antibiotics and antibiotic resistance genes. *Science of The Total Environment*, 786, 147368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147368>
- Salazar-Larrota, L., Uribe-García, L., Gómez-Torres, L., & Zafra-Mejía, C. (2019). Analysis of the efficiency of UASB reactors in a municipal wastewater treatment plant. *DYNA (Colombia)*, 86(209), 319–326. <https://doi.org/10.15446/dyna.v86n209.70332>
- Salgot, M., & Folch, M. (2018). Wastewater treatment and water reuse. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 2, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.03.005>
- Shi, W., Healy, M. G., Ashekuzzaman, S. M., Daly, K., Leahy, J. J., & Fenton, O. (2021). Dairy processing sludge and co-products: A review of present and future re-use pathways in agriculture. *Journal of Cleaner Production*, 314(June), 128035. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128035>
- Sonune, A., & Ghate, R. (2004). Developments in wastewater treatment methods. *Desalination*, 167(1–3), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2004.06.113>
- Sorinolu, A. J., Tyagi, N., Kumar, A., & Munir, M. (2021). Antibiotic resistance development and human health risks during wastewater reuse and biosolids application in agriculture. *Chemosphere*, 265, 129032. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129032>
- Suárez, C., & Gudíol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2008.12.001>
- Süß, J., Volz, S., Obst, U., & Schwartz, T. (2009). Application of a molecular biology concept for the detection of DNA damage and repair during UV disinfection. *Water Research*, 43(15), 3705–3716. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.048>
- 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>
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6), S3–S10. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 2005 3:9, 3(9), 711–721. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO1234>
- Tiwari, A., Kurittu, P., Al-Mustapha, A. I., Heljanko, V., Johansson, V., Thakali, O., Mishra, S. K., Lehto, K. M., Lipponen, A., Oikarinen, S., Pitkänen, T., & Heikinheimo, A. (2022). Wastewater surveillance of antibiotic-resistant bacterial pathogens: A systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 13(December), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.977106>
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2019.04.002>
- Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., Hernandez, A. J., Parvathi, A., & Kumar, S. H. (2021). *BacVarela, M. F. et al. (2021) 'Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents'.terial Resistance to Antimicrobial Agents.*
- Venkataravanappa, L. R., Jyothi, M., Khamees, H. A., Silina, E., Stupin, V., Achar, R. R., Al-Ghorbani, M., & Khanum, S. A. (2023). Design, Synthesis, Characterization, and Analysis of Antimicrobial Property of Novel Benzophenone Fused Azetidinone Derivatives through In Vitro and In Silico Approach. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(1), 92–109. <https://doi.org/10.3390/cimb45010007>
- Wang, G., Zhou, S., Han, X., Zhang, L., Ding, S., Li, Y., Zhang, D., & Zarin, K. (2020).

- Occurrence, distribution, and source track of antibiotics and antibiotic resistance genes in the main rivers of Chongqing city, southwest China. *Journal of Hazardous Materials*, 389, 122110. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.122110>
- Wang, H., Hou, L., Liu, Y., Liu, K., Zhang, L., Huang, F., Wang, L., Rashid, A., Hu, A., & Yu, C. (2021). Horizontal and vertical gene transfer drive sediment antibiotic resistome in an urban lagoon system. *Journal of Environmental Sciences*, 102, 11–23. <https://doi.org/10.1016/J.JES.2020.09.004>
- Wang, J., Mao, D., Mu, Q., & Luo, Y. (2015). Fate and proliferation of typical antibiotic resistance genes in five full-scale pharmaceutical wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 526, 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.046>
- Wilson, D. N. (2013). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology* 2013 12:1, 12(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>
- Wu, Z. C., Cameron, M. D., & Boger, D. L. (2020). Vancomycin C-Terminus Guanidine Modifications and Further Insights into an Added Mechanism of Action Imparted by a Peripheral Structural Modification. *ACS Infectious Diseases*, 6(8), 2169–2180. https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.0C00258/SUPPL_FILE/ID0C00258_SI_001.PDF
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13.
- Yuan, Q. Bin, Guo, M. T., Wei, W. J., & Yang, J. (2016). Reductions of bacterial antibiotic resistance through five biological treatment processes treated municipal wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19495–19503. <https://doi.org/10.1007/S11356-016-7048-8/FIGURES/4>
- Yuan, Q. Bin, Guo, M. T., & Yang, J. (2015). Fate of Antibiotic Resistant Bacteria

and Genes during Wastewater Chlorination: Implication for Antibiotic Resistance Control. *PLOS ONE*, 10(3).