

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE QUÍMICA
CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Proyecto Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería
Ambiental

**Evaluación de la carga de genes de resistencia a antibióticos en una planta de
tratamiento de aguas residuales**

Fernando Molina Ospina

CARTAGO, julio, 2024

TEC | Tecnológico
de Costa Rica

ingeniería
ambiental

This work is licensed under [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) 

Evaluación de la carga de genes de resistencia a antibióticos en una planta de tratamiento de aguas residuales

Informe presentado a la Escuela de Química del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar por el título de Ingeniero Ambiental con el grado de licenciatura

Miembros del tribunal

PhD. Mary Luz Barrios Hernández
Director(a)

MSc. Andrea Quesada González
Lector 1

PhD. Luz María Chacón Jiménez
Lector 2

MSc. David Hernández Parra
Coordinador(a) COTRAFIG

PhD. Guillermo Calvo Brenes
Director Escuela de Química

MSc. Diana Zambrano Piamba
Cordinadora Carrera de Ingeniería Ambiental

DEDICATORIA

A mis papás, por su cariño y apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la guía que brindaron mi tutora de tesis Mary Luz Barrios y las lectoras Luz Chacón y Andrea Quesada.

Agradezco a la Municipalidad de la Unión por permitirme realizar el proyecto en la Municipalidad y el apoyo del CEQIATEC, del CIPA y del INISA en los análisis realizados en esta investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

1. Resumen	1
2. Abstract	2
1. Introducción.....	3
2.1. <i>Objetivos</i>	4
2.1.1. Objetivo general.....	4
2.1.2. Objetivos específicos.....	4
3. Revisión de literatura	5
3.1. <i>Transferencia horizontal de genes.....</i>	5
3.1.1. Plásmidos bacterianos.....	6
3.1.2. Islas genómicas	6
3.1.3. Transposones	6
3.1.4. Integrones	6
3.2. <i>Diseminación y control de ARGs</i>	7
3.3. <i>PTARs como reservorios de ARGs.....</i>	8
3.4. <i>PTAR de la comunidad Monserrat</i>	10
3.4.1. Configuración SBR	12
3.4.2. Remoción de contaminantes	13
3.5. <i>Comportamiento de ARGs y ARBs en PTARs</i>	15
3.5.1. Métodos de detección y cuantificación de ARGs	16
3.5.2. Prevalencia de ARGs en PTARs.....	18
4. Materiales y métodos.....	19
4.1. <i>Cuantificación de la carga relativa de ARGs</i>	20
4.1.1. Extracción del ADN.....	20
4.1.2. Detección y cuantificación de ARGs	20
4.2. <i>Contaminantes fisicoquímicos y microbiológicos.....</i>	22
4.2.1. Transformación de nitrógeno amoniacal	22
4.2.2. Cálculo del Índice Volumétrico de Lodos (IVL)	23
4.3. <i>Análisis de información.....</i>	23

5.	Resultados y discusión.....	26
5.1.	<i>Carga relativa de ARGs de la PTAR</i>	<i>26</i>
5.2.	<i>Remoción de contaminantes fisicoquímicos y microbiológicos</i>	<i>36</i>
5.3.	<i>Relación de la operatividad de la PTAR con la carga de ARGs.....</i>	<i>42</i>
6.	Conclusiones	45
7.	Recomendaciones	46
8.	Referencias	48
9.	Apéndice I. ARGs asociados a antibióticos	60
10.	Apéndice II. Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	62
10.1.	<i>Modificación del sitio activo</i>	<i>62</i>
10.2.	<i>Bypass molecular</i>	<i>62</i>
10.3.	<i>Bombas de eflujo</i>	<i>62</i>
10.4.	<i>Inactivación del antibiótico por medio de hidrólisis.....</i>	<i>62</i>
10.5.	<i>Alteraciones estructurales de la membrana celular.....</i>	<i>62</i>
10.6.	<i>Desactivación del antibiótico por medio de modificación química.....</i>	<i>63</i>
11.	Apéndice III. ARGs prevalentes en fuentes ambientales de interés	64
12.	Apéndice IV. Resultados de las pruebas Shapiro-Wilk.....	68
13.	Anexo I. Límites máximos permitidos en la normativa nacional.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Mecanismos de HGT en bacteria. Adaptado de: [12] y [13].	5
Figura 2.2. PTARs como reservorios de ARGs. Adaptado de: [6].	9
Figura 2.3. Localización de la PTAR Monserrat. Adaptado de: [39].	10
Figura 2.4. Distribución de las etapas de tratamiento de la PTAR. Adaptado de: [39].	11
Figura 2.5. Diagrama esquemático del funcionamiento de un SBR. Adaptado de: [42].	12
Figura 2.6. Gráfico de amplificación hipotético qPCR. Adaptado de: [55].	17
Figura 3.1. Puntos de muestreo de la PTAR Monserrat.	19
Figura 4.1. Gráficos de cajas y bigotes para la distribución en la matriz de agua de los genes: a) <i>tetA</i> , b) <i>ermB</i> , c) <i>drfA12</i> , d) <i>sul1</i> , e) <i>sul2</i> , f) <i>qacE</i> , g) <i>int11</i> y h) <i>bla_{TEM}</i> , PTAR Monserrat, febrero a junio 2024, n=6.	28
Figura 4.2. Gráficos de cajas y bigotes para la distribución en la matriz de lodo de los genes: a) <i>tetA</i> , b) <i>ermB</i> , c) <i>drfA12</i> , d) <i>sul1</i> , e) <i>sul2</i> , f) <i>qacE</i> , g) <i>int11</i> y h) <i>bla_{TEM}</i> , PTAR Monserrat, febrero a junio 2024, n=6.	30
Figura 4.3. Comparación entre las abundancias relativas de ARGs en la matriz de agua, febrero a junio 2024, n=6.	31
Figura 4.4. Comparación entre las abundancias relativas de ARGs en la matriz de lodo, febrero a junio 2024, n=6.	32
Figura 4.5. Evaluación del efecto de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en la abundancia relativa de ARGs presentes en la PTAR Monserrat por medio de un PCA, febrero a junio 2024, n=6.	42

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1. Procesos unitarios del SBR de la PTAR Monserrat. Adaptado de: [39].	14
Cuadro 2.2. Análisis fisicoquímicos del efluente en la PTAR Monserrat por época, 2021, 2022 y 2023, n=10. Adaptado de: [49], [50], [51].	15
Cuadro 2.3. ARGs asociados a antibióticos en ambientes de interés [13], [14].....	18
Cuadro 3.1. Primers y condiciones para las reacciones de qPCR.	21
Cuadro 3.2. Parámetros evaluados por etapa de tratamiento.....	22
Cuadro 4.1. Resultados de pruebas estadísticas relacionadas con la abundancia relativa de ARGs, PTAR Monserrat, febrero a junio 2024, n=6.....	34
Cuadro 4.2. Parámetros fisicoquímicos procesados del afluente y efluente, PTAR Monserrat, febrero a junio 2024, n=6.	36
Cuadro 4.3. Eficiencias de remoción de los parámetros analizados en la matriz de agua, febrero a junio 2024, n=6.	39
Cuadro 4.4. Caracterización del lodo en el licor mezclado, febrero a junio 2024, n=6.	40
Cuadro 8.1. Principales ARGs relacionados con antibióticos distintivos.	60
Cuadro 10.1. ARGs asociados a antibióticos en ambientes de interés [13], [14].....	64
Cuadro 11.1. Resultados de las pruebas Shapiro-Wilk aplicadas en los conjuntos de ARGs, PTAR Monserrat, febrero a junio del 2024, n=6.....	68
Cuadro 11.2. Resultados de las pruebas Shapiro-Wilk aplicadas en los parámetros analizados en la matriz de agua, febrero a junio del 2024, n=6.	69
Cuadro 11.3. Resultados de las pruebas Shapiro-Wilk aplicadas en los parámetros analizados en el lodo del licor mezclado, febrero a junio del 2024, n=6.	69
Cuadro 12.1. Límites máximos permisibles de análisis obligatorio.....	71

LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ARBs	Bacterias Resistentes a Antibióticos
PTARs	Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales
ARGs	Genes de Resistencia a Antibióticos
AMR	Resistencia Antimicrobiana
HGT	Transferencia Horizontal de Genes
MGEs	Elementos Genéticos Móviles
ESBLs	Betalactamasas de Espectro Extendido
DDD	Dosis Diaria Definida
CFs	Compuestos Farmacéuticos
SBR	Reactor Discontinuo Secuencial
C	Carbono
N	Nitrógeno
P	Fósforo
HRT	Tiempo de Retención Hidráulico
SRT	Tiempo de Retención de Sólidos
DO	Oxígeno Disuelto
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DBO ₅	Demanda Bioquímica de Oxígeno
NH ₄ ⁺	Amonio
NO ₃ ⁻	Nitrato
EBPR	Eliminación de Fósforo
PAOs	Organismos Acumuladores de Fósforos
pH	Potencial de Hidrógeno
GyA	Grasas y Aceites
SSed	Sólidos Sedimentables
SST	Sólidos Suspendidos Totales
SAAM	Sustancias Activas al Azul de Metileno
T	Temperatura
PCA	Análisis de Componentes Principales

VFAs	Ácidos Grasos Volátiles
<i>tetA</i>	Gen de resistencia a tetraciclina A
<i>ermB</i>	Gen de eritromicina metilasa ribosomal clase B
<i>dhfrA12</i>	Gen de dihidrofolato reductasa tipo A12
<i>sulI</i>	Gen de resistencia a sulfonamidas clase I
<i>sulII</i>	Gen de resistencia a sulfonamidas clase I
<i>intI</i>	Integrasa de clase 1
<i>blaTEM</i>	Gen de la b-lactamasa TEM
<i>qacE</i>	Proteína E de resistencia a compuestos de amonio cuaternario
QACs	Compuestos de amonio cuaternario

1. RESUMEN

Las bacterias resistentes a antibióticos representan una creciente amenaza para la salud pública a nivel mundial. Múltiples actividades antropogénicas pueden crear ambientes que funcionen como reservorios para dichos microorganismos, siendo uno de ellos las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs). Este estudio se enfoca en comprender la carga de genes asociados a resistencias de antibióticos (ARGs) en un sistema de tratamiento de aguas residuales de una urbanización en Costa Rica, donde no existen estudios previos con este enfoque. Para ello, se establecieron tres sitios de muestreo en esta PTAR para recolectar muestras de afluente, lodos y efluente durante las épocas seca y lluviosa. Posteriormente, se realizaron análisis fisicoquímicos, microbiológicos y la cuantificación de ARGs presentes en las muestras. Con estos resultados, se aplicó la prueba Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos, y pruebas paramétricas o no paramétricas para comparar las distintas matrices. Las primeras pruebas t-Student y Wilcoxon revelaron que los genes *drfA12*, *sull*, *qacE*, *intI1* y *blaTEM* fueron significativamente más abundantes en el efluente que en el afluente debido ya sea a la transferencia horizontal de genes (HGT) o bien debido a presiones selectivas. Por otra parte, las pruebas ANOVA y Kruskal-Wallis no demostraron diferencias significativas en la abundancia de genes entre las épocas, lo que indica que las condiciones climáticas no influyeron en la presencia de ARGs en la PTAR de estudio. Asimismo, las concentraciones de contaminantes fisicoquímicos y microbiológicos en el afluente o en el efluente tampoco presentaron diferencias significativas debido a cambios estacionales al aplicar los análisis t-Student o Wilcoxon. Esto demostró tanto una entrada constante de contaminantes, como una eficiencia de tratamiento estable en la planta a lo largo del año. Finalmente, por medio de un análisis de componentes principales (PCA) se demostró que los ARGs están estrechamente correlacionados entre sí, particularmente con el gen *intI1*, lo que sugiere un riesgo de diseminación de estos genes a través de la HGT.

Palabras clave: actividades antropogénicas, salud pública, reservorios, condiciones climáticas, genes de resistencia a antibióticos, transferencia horizontal de genes.

2. ABSTRACT

Antibiotic resistant bacteria represent a growing threat to public health worldwide. Various anthropogenic activities can create environments that serve as reservoirs for these microorganisms, one of which is wastewater treatment plants (WWTPs). This study focuses on understanding the load of antibiotic resistance genes (ARGs) in a wastewater treatment system from a residential area in Costa Rica, where no previous studies with this focus have been conducted. For this purpose, three sampling sites were established in this WWTP to collect influent, sludge, and effluent samples during the dry and rainy seasons. Subsequently, physicochemical, microbiological, and ARG quantification analyses were performed on the samples. Based on these results, the Shapiro-Wilk test was applied to determine the normality of the data, and parametric or non-parametric tests were used to compare the different matrices. The initial t-Student and Wilcoxon tests revealed that the *drfA12*, *sull*, *qacE*, *intI1*, and *blaTEM* genes were significantly more abundant in the effluent than in the influent, due to either horizontal gene transfer (HGT), or selective pressures. On the other hand, ANOVA and Kruskal-Wallis tests did not show significant differences in gene abundance between seasons, indicating that climatic conditions did not influence the presence of ARGs in the studied WWTP. In a similar way, the concentrations of physicochemical and microbiological contaminants in the influent or effluent did not show significant differences due to seasonal changes when applying the t-Student or Wilcoxon analyses. This demonstrated a constant influx of contaminants as well as stable treatment efficiency within the plant throughout the year. Finally, through a principal component analysis (PCA), it was shown that the ARGs are closely correlated with each other, particularly with the *intI1* gene, suggesting a risk of dissemination of these genes through HGT.

Key words: anthropogenic activities, public health, reservoirs, climatic conditions, antibiotic resistance genes, horizontal gene transfer.

1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son considerados como uno de los descubrimientos más importantes del siglo XX, ya que son esenciales para tratar infecciones en humanos y aumentar la productividad en el sector agropecuario. No obstante, a nivel mundial, su uso y producción han incrementado a un ritmo alarmante para la comunidad científica [1]. Esto se debe, a que la acción efectiva de los antimicrobianos se ve comprometida por el desarrollo potencial de tolerancia o resistencia al compuesto utilizado; dando a lugar bacterias resistentes a antibióticos (ARBs, por sus siglas en inglés) [2].

Actualmente, las infecciones generadas por ARBs representan una de las principales preocupaciones para la salud pública en todo el mundo. Se estima que las infecciones relacionadas con esta problemática pasarán de provocar 700 000 muertes en el 2014 a 10 millones de muertes para el 2050, con un costo acumulado de 100 mil millones de dólares para los servicios de salud [3].

Costa Rica, siendo un pequeño país centroamericano, posee uno de los niveles más graves de ARBs en la región. Especialmente a los carbapenémicos, que son fármacos avanzados para tratar infecciones severas [4]. Este panorama se debe a la falta de regulaciones sobre el consumo y disposición de antibióticos; lo que ha provocado que, según el contexto socioeconómico, se les dé un uso de forma libre y excesiva [5].

Ahora bien, múltiples actividades antropogénicas pueden crear ambientes que funcionen como depósitos de estas bacterias. Según [2], se ha demostrado que las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) pueden ser un rico reservorio tanto para genes asociados a resistencia a los antibióticos (ARGs, por sus siglas en inglés), como para las ARBs. De igual forma, en [6] se evidencia que las PTARs incluso pueden llegar a incrementar las porciones de ARGs en el efluente, convirtiéndose en focos de alarma debido a su potencial para aumentar la dispersión de estos genes en el ambiente

Así que, entender el comportamiento de los ARGs en distintos ambientes que puedan actuar como focos de dispersión, representa uno de los mayores retos para la salud mundial. No obstante, hay poca información relacionada con el tema en países de ingreso bajo y medio, como Costa Rica [6]. Esta falta de información regional se debe resolver, ya que la prevalencia y los tipos de genes presentes en muestras de alcantarillado difieren en cada país.

Con este estudio se busca generar conocimiento sobre las cargas de ARGs presentes en un sistema de tratamiento de aguas residuales, operado por la Municipalidad de la Unión en Costa Rica, y su consecuente capacidad de remoción.

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. Objetivo general

Determinar la capacidad de remoción de ARGs de una PTAR ubicada en la urbanización Monserrat de la municipalidad de La Unión, Tres Ríos, Cartago

2.1.2. Objetivos específicos

- Cuantificar la carga relativa de ARGs seleccionados en tres distintas matrices de la PTAR (afluente, lodos y efluente) durante la época seca y la época lluviosa
- Evaluar la remoción de contaminantes fisicoquímicos y microbiológicos de la PTAR en época seca y en época lluviosa
- Analizar la relación de la operatividad de la PTAR con la carga relativa de ARGs

3. REVISIÓN DE LITERATURA

En el contexto actual de creciente preocupación por las ARBs, la evaluación de los ARGs en PTARs municipales emerge como un área de investigación de suma importancia, ya que se consideran el principal destino de fármacos recetados para el consumo humano [7]. Según [8], los principales cuestionamientos relacionados con la propagación de la resistencia antimicrobiana (AMR, por sus siglas en inglés) asociada a los vertidos de PTARs son: (i) ¿Cuál es la magnitud, la dinámica y el destino de las cargas de ARGs en los cuerpos receptores de agua?; (ii) ¿Cuáles son sus medios de distribución?; y (iii) ¿Qué riesgos implican para la salud humana y la ecología?

3.1. TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES

Los ARGs son segmentos de ADN presentes en el genoma de microorganismos resistentes (ARBs), a los cuales le confieren su tolerancia a un antibiótico determinado [9]. Desde una perspectiva evolutiva, existen dos principales estrategias para adquirir dicha adaptación: la mutación genética y la transferencia horizontal de genes (HGT, por sus siglas en inglés). Este último es considerado como el factor más importante en la actual pandemia de AMR y es facilitado por condiciones como alta densidad bacteriana, diversidad de especies y la presencia de elementos genéticos móviles (MGEs, por sus siglas en inglés) [10].

Los mecanismos de HGT (Figura 2.1.), se pueden resumir como: (1) Conjugación mediante contacto célula a célula por medio de la acción de MGEs; (2) Transducción a través de fagos; (3) Transformación mediante la captación de ADN extracelular [11] y (4) Vesículas extracelulares microbianas [12].

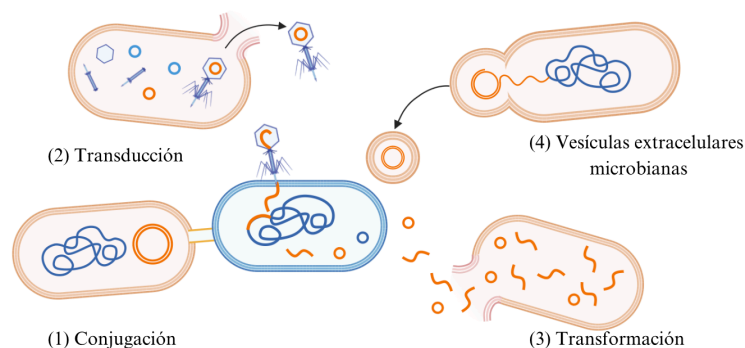


Figura 3.1. Mecanismos de HGT en bacteria. Adaptado de: [12] y [13].

Dichos mecanismos también están asociados a ARGs en específico, por lo que su identificación permite determinar cuáles MGEs median los mecanismos de HGT en la comunidad microbiana dentro de la muestra de estudio [13], los cuales incluyen:

3.1.1. Plásmidos bacterianos

Un ejemplo de genes transportados por plásmidos, son los ARGs que codifican betalactamasas de espectro extendido (ESBLs, por sus siglas en inglés), que confieren resistencia a antimicrobianos como las penicilinas y cefalosporinas [13]. En aguas residuales, los plásmidos pB10, pTB11 y pRSB101 confieren genes *tetA*; mientras que los plásmidos pB2, pB3, pB8 y pB10 confieren genes *sull* [14].

3.1.2. Islas genómicas

Estas áreas del genoma están presentes en algunas cepas bacterianas, generalmente flanqueadas por secuencias de repeticiones directas y asociadas con genes de ARNt [13].

3.1.3. Transposones

Hay diferentes tipos de transposones, los cuales se pueden distinguir por su estructura, similitud genética y mecanismo de transposición [13].

3.1.4. Integrones

Estos elementos genéticos móviles son comúnmente hallados en cepas bacterianas de origen clínico [13]. Existen tres clases principales de estructuras, dependiendo de su integrasa, pero la mayoría de los integrones de resistencia en PTARs se ajustan a una estructura denominada integrasa de clase 1 (*intl1*) [13].

3.2. DISEMINACIÓN Y CONTROL DE ARGs

La resistencia a los antibióticos no es un fenómeno reciente. En [9] se reporta que los ARGs datan de antes del uso actual de antibióticos por los seres humanos en decenas de miles de años, ya que los compuestos antimicrobianos son moléculas producidas de forma natural por microorganismos intrínsecamente resistentes; a los cuales les brindan ventajas sobre sus competidores como toxicidad, dispersión o señalización [15].

Así que, los demás microorganismos que han cohabitado en su mismo nicho ecológico han logrado con el paso del tiempo desarrollar distintos mecanismos para sobrevivir a su acción bactericida [15].

Sin embargo, en [16] se demostró, por medio de muestras de suelo que abarcan los últimos 70 años, que los niveles basales de ARGs están aumentando en paralelo con la producción masiva moderna de antibióticos. Por lo tanto, en la actualidad se presumen dos posibles orígenes a la AMR: bacterias intrínsecamente resistentes y el surgimiento de ARGs bajo presiones selectivas en los desechos o en el mismo cuerpo de organismos que consumen antibióticos [17]. Entonces, una amplia gama de actividades antropogénicas es responsable de diseminar ARGs al ambiente; siendo una de ellas el consumo humano de fármacos [18].

Hoy en día los antibióticos están siendo prescritos con más frecuencia que nunca, con aproximadamente diez dosis al año por cada hombre, mujer y niño en el mundo [19]. Desde inicios del año 2000, el consumo de estas drogas ha aumentado un 39% globalmente, reflejando un aumento del 77% entre los países de ingresos bajos y medianos [20]. Según [21], las principales razones que explican este incremento son la falta de regulaciones y la inadecuada prescripción de antibióticos. Por ejemplo, el uso excesivo en muchos países radica en la disponibilidad al acceso por parte del consumidor sin necesidad de receta médica, la abundancia del producto y su precio económico [22]. Por otra parte, en [23] se encontraron malas prácticas por parte del usuario, ya que, para el tratamiento indicado por el profesional de la salud; el antimicrobiano y la duración de la terapia eran inadecuados para el (30-50) % de los pacientes estudiados.

Costa Rica no es una excepción a esta problemática. El gasto de Costa Rica en medicamentos representa el 8,2% del gasto total en atención médica del país. Dentro de esto, el 2,21% representa el consumo de antibióticos en específico, lo que supone una inversión significativa [24].

Por ejemplo, en [24] se encontró que la azitromicina, doxiciclina y amoxicilina con un inhibidor de betalactamasas son los antibióticos más utilizados en el sector privado de Costa Rica. Estos representan los valores más altos en el gasto bruto del país y el 13,12% del total de dosis diaria definida (DDD). Por otra parte, en el 2015 se detectaron altos niveles en el consumo de antimicrobianos de amplio espectro debido al uso incorrecto de cefalosporinas de primera generación [25].

Debido a esto, el gobierno de Costa Rica publicó en enero del 2019 un Plan de Acción Nacional de Lucha Contra la Resistencia a los Antimicrobianos que, al ser implementado, facilitará vigilar, contener y controlar de forma integrada esta problemática [26].

3.3. PTARs COMO RESERVORIOS DE ARGs

Esta tendencia en el consumo poblacional se ve reflejada en los sistemas de alcantarillado urbano por medio de la excreción de metabolitos y productos químicos [27]. Una vez administrados en el cuerpo humano, (55-80) % del fármaco es eliminado como compuesto parental (forma inalterada) por medio de la orina o de forma parcial (mezcla de metabolitos) a través de las heces [28]. Desde el inodoro, las aguas residuales fluyen a través de una red de tuberías a un sistema de tratamiento, en donde se someten a una serie de procesos que eliminan los contaminantes del agua.

La Figura 2.2. ilustra el desplazamiento de los antimicrobianos desde el consumo humano hasta su llegada a los ecosistemas a través de las PTARs, impactando en la salud humana, animal y ambiental. En nuestro caso de estudio, existen tres principales ecosistemas que funcionan como reservorios de ARGs: (i) las aguas residuales crudas que entran como afluente a una PTAR; (ii) microorganismos ligados en biofilm o lodo en el tratamiento biológico de la PTAR; y (iii) el cuerpo de agua receptor del punto de descarga del efluente de la PTAR [29].

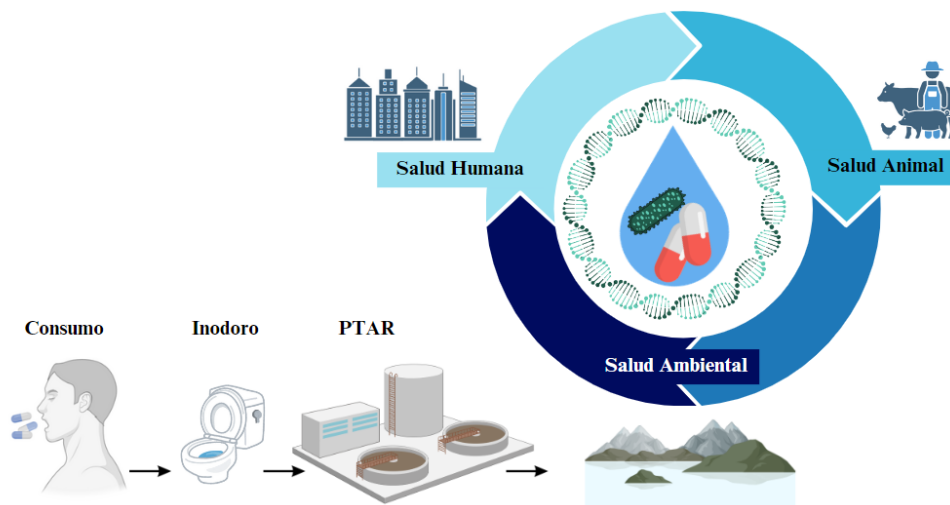


Figura 3.2. PTARs como reservorios de ARGs. Adaptado de: [6].

A pesar de que estos ecosistemas tengan un papel importante en la conservación, eliminación o propagación de ARGs, las PTARs convencionales son diseñadas para la eliminación de contaminantes tradicionales como sólidos suspendidos, materia orgánica o coliformes totales; rara vez se centra en la resistencia a antibióticos [30]. Debido a esto, las PTARs municipales generalmente no remueven ni las formas inalteradas de los compuestos farmacéuticos (CFs) ni sus metabolitos de las aguas residuales [31]. Por ejemplo, en [32] y [33] se demostró la presencia de CFs en efluentes de PTARs municipales e, incluso, en [34] se encontró que en áreas residenciales la concentración de antimicrobianos es mayor que en sistemas de tratamiento de aguas residuales provenientes de hospitales.

Por otra parte, en las PTARs municipales la sobreexposición a CFs ejerce una presión selectiva sobre las comunidades bacterianas presentes en estos ambientes acuáticos, por lo que solo los organismos que poseen resistencia a los antibióticos logran sobrevivir y, por ende, se multiplican a un ritmo más acelerado [35]. Agregando a lo anterior, las aguas residuales proporcionan un escenario ideal para HGT, en donde los distintos organismos pueden adquirir nuevos genes de otras cepas bacterianas cercanas [36], debido a la presencia de nutrientes y otros contaminantes fisicoquímicos [37].

Si esta proliferación de ARGs y ARBs no se controla, dichos patógenos bacterianos llegarán a ser mucho más letales en el futuro de lo que son hoy en día, por lo que las áreas residenciales son un contribuidor importante en el tema de AMR [38].

Por ello, es crucial generar información sobre la magnitud actual de la carga de ARGs presente en las PTARs, la tendencia en Costa Rica y el papel de distintos contaminantes en la presión selectiva sobre comunidades resistentes

3.4. PTAR DE LA COMUNIDAD MONSERRAT

La urbanización Monserrat es un complejo habitacional de aproximadamente 813 casas; el cual está ubicado en la provincia de Cartago, en el cantón de La Unión y en el distrito de Concepción de Costa Rica. La comunidad es suplida por un sistema de tratamiento de aguas residuales localizada dentro de la propiedad, con las coordenadas $9^{\circ}55'25.7''N$ $84^{\circ}00'17''W$, ver Figura 2.3. [39].

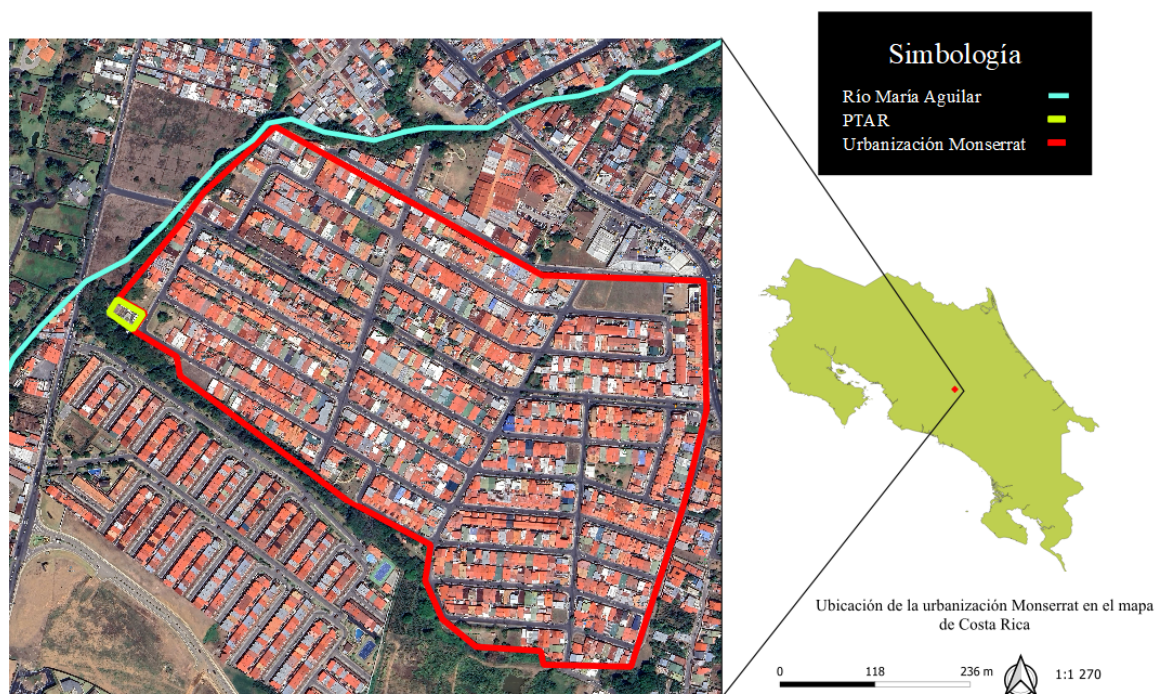


Figura 3.3. Localización de la PTAR Monserrat. Adaptado de: [39].

La PTAR Monserrat es un sistema de lodos activados operado bajo la configuración de lotes o SBR (reactor discontinuo secuencial, por sus siglas en inglés) que cuenta con varias etapas operativas descritas en [39] (Figura 2.4.).

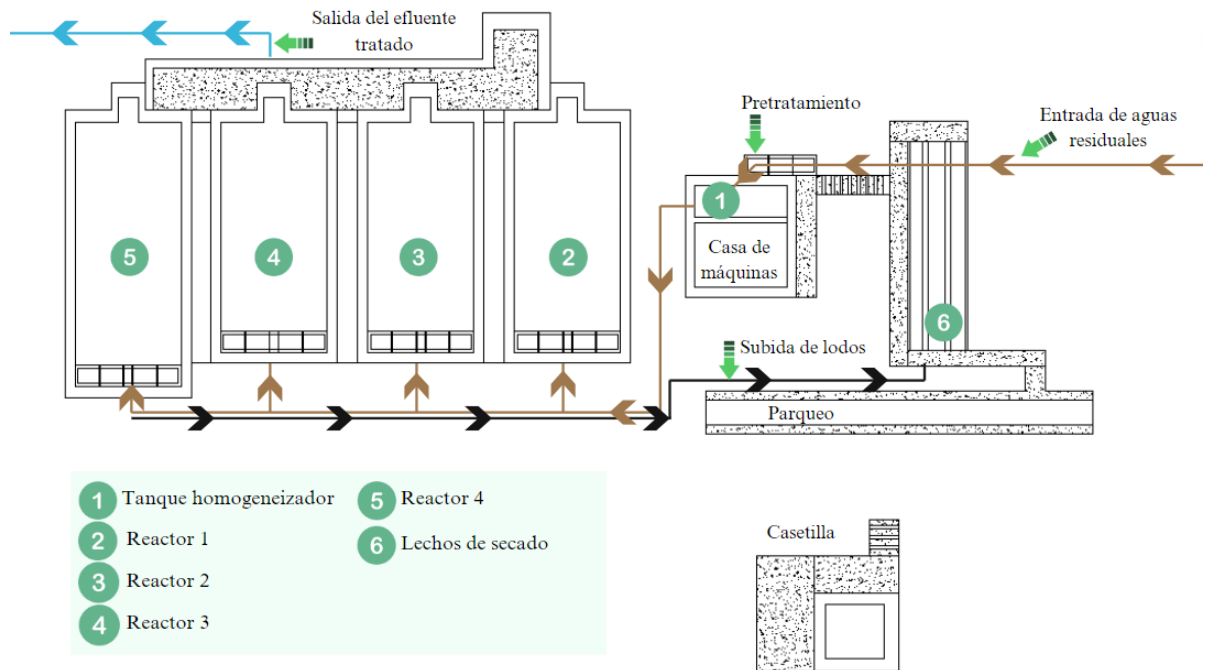


Figura 3.4. Distribución de las etapas de tratamiento de la PTAR. Adaptado de: [39].

Primeramente, el agua cruda pasa por una serie de rejillas de operación manual, que funcionan como un pretratamiento del agua para proteger las etapas de tratamiento posteriores, optimizar su eficiencia y reducir tanto olores, como problemas estéticos [39].

Luego, esta pasa por un tanque homogeneizador que regula y almacena el agua residual mientras se cumplen los ciclos de cada reactor. Esta etapa facilita el control de las condiciones del sistema, como la carga de aguas residuales, y ayuda a mantener una mezcla homogénea, lo cual favorece la eficiencia del proceso de tratamiento [39].

Allí, el agua es bombeada a alguno de los cuatro reactores biológicos SBR que cuentan con un bioselector al ingreso, en donde se recircula una cantidad de lodo activado al agua cruda. Su fin, es el de poner en contacto los microorganismos y la carga orgánica desde antes de la fase de reacción. Una vez acaba el proceso de tratamiento del agua, el efluente es finalmente vertido en el cuerpo receptor: río María Aguilar; mientras que el exceso de lodos generado es redirigido hacia los lechos de secado [39].

3.4.1. Configuración SBR

Los lodos activados son un proceso biológico, el cual consiste en que las aguas residuales se pongan en contacto con una población microbiana en suspensión floculante (lodo activado), por medio de un sistema aireado y agitado [40]. Una parte de los contaminantes se descompone por medio del metabolismo de los microorganismos al ser oxidados a sustancias más simples; mientras que otra parte se incorpora a su biomasa. Una vez el agua ha sido tratada se separa del lodo activado por medio del asentamiento y consecuente clarificación del agua [41]. Su finalidad es remover carga orgánica, nitrógeno (N) y fósforo (P) [40].

Una de las configuraciones que puede tener un sistema de tratamiento por lodos activados, es el tanque SBR. Este se caracteriza por que todas las etapas del proceso de tratamiento de aguas residuales se llevan a cabo en un mismo reactor que opera en ciclos secuenciales, donde cada ciclo incluye las distintas etapas de tratamiento [42], detalladas en la Figura 2.5. Esta característica le brinda al SBR una flexibilidad asociada al tiempo en lugar de espacio, por lo que puede operarse según las necesidades económicas o técnicas que prevalezcan; simplemente modificando los ajustes del mecanismo de control [43].

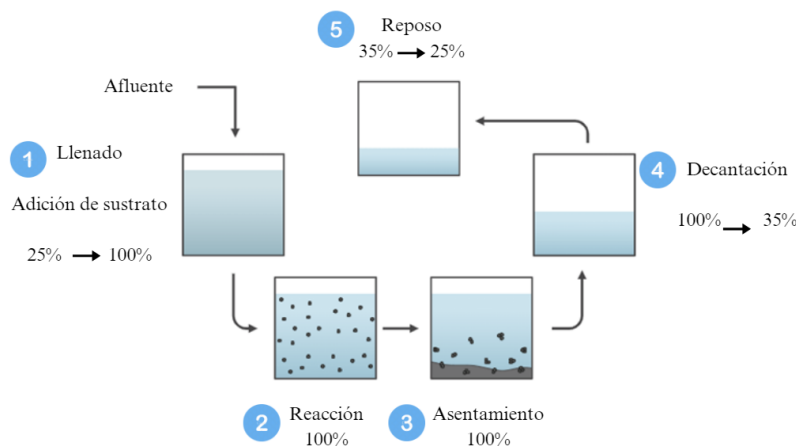


Figura 3.5. Diagrama esquemático del funcionamiento de un SBR. Adaptado de: [42].

El ciclo de tratamiento se divide en varias fases. En la fase de llenado (1), el tanque se llena con afluente, alcanzando del 25 % al 100 % de su capacidad mientras se añade el sustrato. Luego, en la fase de reacción (2), el contenido del tanque permanece al 100 % de capacidad mientras los microorganismos degradan los contaminantes. A continuación, el lodo se asienta en el fondo (3), manteniéndose al 100 % de capacidad.

Después, en la fase de decantación (4), el agua tratada se extrae del tanque, reduciendo su volumen del 100 % al 35 %. Finalmente, en la fase de reposo (5), el nivel del agua baja gradualmente del 35 % al 25 %, en donde queda una población microbiana suficiente para actuar como inóculo para el próximo ciclo de tratamiento.

Ahora bien, la tasa de carga orgánica, el tiempo de retención hidráulico (HRT), el tiempo de retención de sólidos (SRT), el oxígeno disuelto (DO); así como las características del afluente: la demanda química de oxígeno (DQO), contenido de sólidos y la relación C/N son los principales parámetros que afectan su rendimiento [44]. Idealmente, se busca la remoción de todos estos contaminantes durante la fase de reacción, por medio de una secuencia adecuada de condiciones aeróbicas, anóxicas y anaeróbicas [45].

3.4.2. Remoción de contaminantes

Durante la fase aeróbica del ciclo de operación, los microorganismos aerobios presentes en el SBR utilizan el DO para oxidar y descomponer la materia orgánica en productos más simples como dióxido de carbono (CO_2), agua (H_2O) y metano (CH_4) [46]. Por otra parte, la eliminación de N básicamente implica la conversión aeróbica de amonio (NH_4^+) a nitratos (NO_3^-), por medio de bacterias aerobias obligadas que realizan este proceso llamado nitrificación. Posteriormente, las bacterias heterótrofas que pueden utilizar NO_3^- en lugar de oxígeno (O_2) bajo condiciones anaeróbicas/anóxicas, realizan la desnitrificación al convertir el NO_3^- a gas nitrógeno (N_2) [47].

Respecto a la eliminación de P (EBPR, por sus siglas en inglés), esta consiste en incorporar el P presente en el afluente en la biomasa celular, que posteriormente se elimina del sistema como resultado del desperdicio de lodo. Los organismos responsables de esta tarea son los organismos acumuladores de fósforo (PAOs, por sus siglas en inglés), que requieren de condiciones aeróbicas y anaeróbicas, para la absorción de este nutriente [47].

Entonces, la remoción conjunta de N y P se puede alcanzar con la incorporación inicial de una etapa anaeróbica, en la cual se pretende que las bacterias PAOs se reproduzcan y por medio de su metabolismo liberen fósforo. Posteriormente, en la fase aerobia el P es retenido por estos organismos, se descompone la materia orgánica y se da lugar la nitrificación, en la cual se consume el oxígeno. Finalmente, la desnitrificación ocurre durante la fase anóxica con solo presencia de oxígeno combinado [45].

Para ello, en la PTAR de la urbanización en estudio se operan los cuatro tanques en ciclos de tres horas: (1) llenado y (2) reacción por 90 minutos completos. En la (2) reacción, se alternan 20 minutos de aireación y 10 minutos de reposo. Posteriormente, 45 minutos de (3) sedimentación y finalmente 45 minutos de (4) decantación [39]. En el Cuadro 2.1. se describen los procesos unitarios de la PTAR de estudio.

Cuadro 3.1. Procesos unitarios del SBR de la PTAR Monserrat. Adaptado de: [39].

Fase de funcionamiento	Descripción	Duración por etapa de un ciclo completo (horas)
Llenado	Se añade sustrato (agua residual cruda) al agua remanente (25% de su capacidad) de la etapa de reposo para alcanzar el 100% de la capacidad volumétrica del tanque.	1,5
Reacción	La biomasa consume el sustrato bajo condiciones ambientales controladas.	0,7
Sedimentación	Los sólidos se separan del líquido en condiciones de quietud, lo que resulta en un sobrenadante clarificado.	0,7
Decantación	El sobrenadante es removido (alrededor del 75%) por mecanismos de decantación.	0,7

Sin embargo, la PTAR Monserrat fue diseñada principalmente para la remoción de aquellos parámetros de cumplimiento obligatorio, establecidos en la normativa costarricense, siendo además los únicos parámetros que se analizan. Según [48] los parámetros de análisis obligatorio para el efluente de PTARs de aguas residuales de tipo ordinario, es decir aquellas que provienen principalmente de actividades domésticas, son: caudal, demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), demanda química de oxígeno (DQO), potencial de hidrógeno (pH), grasas y aceites (GyA), sólidos sedimentables (SSed), sólidos suspendidos totales (SST), sustancias activas al azul de metileno (SAAM) y temperatura (T).

Debido a esto, no hay información de la PTAR en estudio sobre la remoción de contaminantes como ARGs, nutrientes u otros. En el Cuadro 2.2. se describen los parámetros de análisis obligatorio durante los años 2021, 2022 y 2023.

Cuadro 3.2. Análisis fisicoquímicos del efluente en la PTAR Monserrat por época, 2021, 2022 y 2023, n=10.
Adaptado de: [49], [50], [51].

Parámetros	2021		2022		2023	
	Época Seca	Época Lluviosa	Época Seca	Época Lluviosa	Época Seca	Época Lluviosa
SSed (mL/L)	*(4,000±0,177)	*(4,00±0,177)	(0,15±0,071)	(0,0±0,071)	(0,1±0,0)	(0,1±0,0)
SST (mg/L)	*(59,00±6,647)	(23,25±1,202)	(11,6±0,580)	(10,6±0,629)	(9±0,9)	(5,0±0,48)
pH	(7,2±0,028)	(7,4±0,071)	(7,3±0,092)	(7,0±0,025)	(7±0,09)	(7,5±0,098)
GyA (mg/L)	(12,1±0,212)	(11±0,95)	(15,00±1,273)	(15,0±0,778)	(9±0)	(9±0)
DQO (mg/L)	*(181,75±16,971)	(69,90±4,278)	(83,05±1,768)	(36,35±3,041)	(39±4,1)	(34±3,6)
DBO (mg/L)	*(106,5±4,950)	(23,25±4,738)	(30,30±1,485)	(16,90±1,061)	(4±0)	(12,9±3,10)
SAAM (mg/L)	(0,9±0,007)	(1±0,007)	(0,045±0,014)	(0,17±0,014)	(0,1±0,0)	(0,1±0,0)
T (°C)	(24,4±0,141)	(24,4±0,141)	(24,3±0,354)	(24,5±0,354)	(23,5±0,200)	(24,4±0,200)
Caudal (m ³ /d)	(331,5±4,688)	(346,5±4,900)	(262,2±1,202)	(263,9±1,174)	(320±3,20)	(170±1,70)

Nota: *: Parámetros no cumplen con el límite máximo permisible por la normativa nacional (Anexo I).

Los datos históricos reflejan una mejora significativa conforme pasan los años en la eficiencia de la PTAR, en términos de reducción de sólidos, GyA, así como en la DQO y en la DBO. Además, se destaca una considerable disminución del caudal en época lluviosa del 2023. Por el contrario, la temperatura y las SAAM varían en menor medida; manteniéndose relativamente estables a lo largo de los años.

3.5. COMPORTAMIENTO DE ARGS Y ARBS EN PTARS

La remoción de ARGs en las PTARs es un proceso complejo que depende de una combinación de procesos físicos, químicos y biológicos. Por ejemplo, en [52] se encontró que la calidad del agua residual, en especial la DQO, y los elementos genéticos móviles como los transposones e integrones, influyen en la remoción de los ARGs. Además, en [52] aseguran que es necesario mejorar tanto la eliminación de nutrientes, como el proceso de desinfección para beneficiar la eliminación de ARGs y ARBs.

Sin embargo, en [6] se demostró que la abundancia de ARGs puede persistir e incluso aumentar en el efluente de una PTAR. En dicho estudio, se encontró una alta abundancia relativa, tanto en aguas residuales como en cuerpos receptores, de genes asociados a MGEs como *intl1*, *tnpA*, e *intl3*; y ARGs de alta prevalencia como *qepA*, *aadA2*, *merA*, *sul1*, *qacF/H*, *sul2*, *aadB* y *ereA*.

Aún más alarmante, se encontró una mayor abundancia de los genes *blaVIM*, *intl3*, *mcr-1*, *mexB*, *qepA*, *vanA*, y *vanB* en el efluente y en el cuerpo receptor, que en el afluente. Con esto, se demostró que las PTARs aumentaron significativamente la concentración de ARGs relacionados con antibióticos de última línea, como los carbapenémicos, colistina y vancomicina. Dichos antibióticos son considerados como último recurso para tratar infecciones graves causadas por bacterias multirresistentes, por lo que la propagación de estos genes en el medio ambiente puede aumentar la incidencia de infecciones bacterianas y limitar la efectividad de los antibióticos para tratarlas [14].

No obstante, la prevalencia de ciertos genes va a variar según el país y el sistema de tratamiento [6], por lo que es crucial determinar de manera integral la carga relativa de ARGs presentes en cada PTAR de estudio, con el fin de valorar su eliminación y evaluar la presión selectiva que ejercen diferentes contaminantes sobre ellos [53].

Además, su identificación y cuantificación son importantes debido a su prevalencia, su asociación con antibióticos en específico (detallados en el Apéndice I) y la diversidad de mecanismos de resistencia que codifican (detallados en el Apéndice II) [13].

3.5.1. Métodos de detección y cuantificación de ARGs

Debido a la grave dispersión de ARGs en distintos entornos, ha emergido la necesidad de desarrollar métodos para detectar su ocurrencia, destino y transporte [54]. En los últimos años, la aplicación de técnicas moleculares ha ampliado nuestra perspectiva para estudiar la diversidad de microorganismos y sus interacciones en los distintos sistemas ambientales [54].

Hasta ahora, se han utilizado varios métodos para este propósito, como la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR), PCR múltiple, PCR cuantitativa (qPCR), secuenciación de ADN y el Microarray de ADN [35].

De estos, la qPCR es la técnica más empleada para determinar la abundancia de ARGs en muestras ambientales, ya que permite la cuantificación precisa del material genético por medio de una curva de calibración [54]. Su uso, se realiza por medio de una dilución en serie de un control positivo, que contiene cantidades conocidas de las copias del gen de interés, para generar una curva estándar (Figura 2.6.) [55].

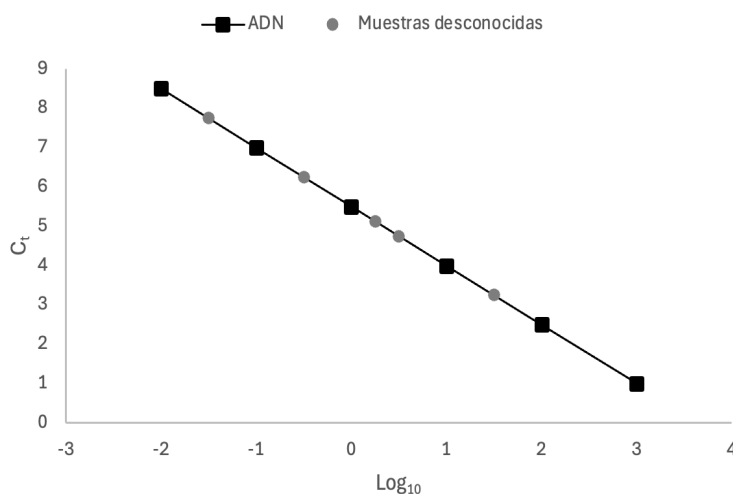


Figura 3.6. Gráfico de amplificación hipotético qPCR. Adaptado de: [55].

En esta curva estándar (Figura 2.6.), el eje X representa el logaritmo base 10 (Log_{10}) de la concentración de copias de ADN, mientras que el eje Y muestra el C_t (threshold cycle) que es una medida que refleja la cantidad relativa de la molécula objetivo en la muestra. Los puntos representados con cuadrados negros corresponden a muestras con concentraciones conocidas de ADN, que permiten generar dicha curva. Finalmente, los puntos con círculos grises son las muestras desconocidas que se desean determinar, para lo cual, estas son interpoladas a partir de la curva generada por las muestras conocidas [55].

Cabe resaltar que este método de qPCR utiliza cebadores diseñados específicamente para los genes de resistencia a antibióticos de interés, típicamente expresados por copia del gen de 16SrRNA a fin de normalizar las cantidades entre diferentes muestras. Esto permite proporcionar datos cuantitativos sobre la abundancia o carga relativa de estos genes en comparación con otros componentes genéticos en una muestra [56]

3.5.2. Prevalencia de ARGs en PTARs

La resistencia a un antibiótico en específico puede estar asociada con ARGs que confieren uno o más mecanismos de resistencia. Su correspondiente cuantificación puede brindar información valiosa sobre la capacidad de los microorganismos en la muestra ambiental para resistir los efectos de un antibiótico determinado [2]. En el Apéndice III se detallan los principales ARGs de interés según las fuentes ambientales de estudio, no obstante, en el Cuadro 2.3. se detallan algunos de los ARGs asociados a antibióticos usualmente encontrados en aguas residuales, que serán analizados en esta investigación.

Cuadro 3.3. ARGs asociados a antibióticos en ambientes de interés [13], [14].

Gen	Fuente biológica	Fuente ambiental
ARGs tetraciclinas		
<i>tetA</i>	<i>Aeromonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Comamonas, Escherichia, Listeria, Pseudomonas, Salmonella, Serratia and Vibrio</i> ; plásmidos pB10, pTB11 y pRSB101	A, LA, E
ARGs Macrólidos, Lincomisinas y Estreptograminas (MLS)		
<i>ermB</i>	<i>Bacillus, Enterococcus</i>	E
ARGs trimetropina		
<i>dfrA12</i>	<i>Aeromonas, E. coli</i>	E
ARGs sulfonamida		
<i>sul1</i>	<i>Aeromonas, Escherichia, Listeria, comunidad microbiana</i> ; plásmidos pB2, pB3, pB8, y pB10	LA
<i>sul2</i>	<i>Aeromonas, E. coli, comunidad microbiana</i>	E
ARGs β -lactámicos		
<i>bla_{TEM}</i>	<i>E. coli, Citrobacter</i>	E

Nota: Los ARGs descritos pueden encontrarse en una o más de las siguientes matrices de una PTAR: Agua residual no tratada (A), lodo activado (LA), efluente (E).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se establecieron tres sitios específicos de la PTAR ubicada en la urbanización Monserrat para tomar las muestras del afluente, de los lodos y del efluente (Figura 3.1.). Posteriormente se realizó un muestreo compuesto no probabilístico, de acuerdo con lo establecido en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (SMEWW) [57], entre febrero y junio del 2024. Se obtuvieron tres muestreos por época de estudio del año 2024: seca (13 de febrero, 19 de febrero, 11 de marzo) y lluviosa (03 de junio, 10 de junio, 17 de junio).

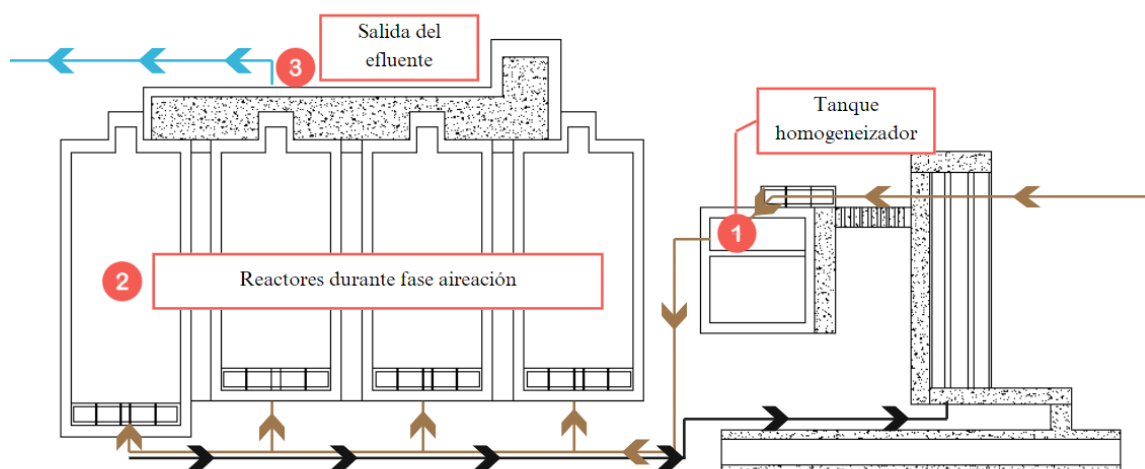


Figura 4.1. Puntos de muestreo de la PTAR Monserrat.

Una vez en la PTAR de estudio, se realizó un muestreo estratificado según el momento del día (8.00-10.30) am y la composición del agua residual: alrededor de 1 L del agua residual afluente en el tanque homogeneizador de la planta (1), al menos 300 mL de lodos en el tanque de reacción del SBR durante la fase de aireación (2) y, una vez finalizada la etapa de sedimentación, al menos 1 L del agua residual efluente en la salida del SBR (3). Para ello, se usaron botellas de copolímero de polipropileno y bolsas plásticas estériles con banda para toma de muestras microbiológicas. El equipo de muestreo fue adecuado y ambientado según los requisitos específicos de cada análisis. Tras la recolección, las muestras se transportaron hacia el CEQIATEC en una hielera de 40 L a una temperatura <10 °C y se almacenaron a una temperatura de (1- 4) °C.

4.1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA RELATIVA DE ARGs

4.1.1. Extracción del ADN

La extracción de ADN de las muestras se realizó en un periodo < 24 h luego de su recolección. Los filtros S-Pak GSWG047S6 Millipore se emplearon para filtrar 50 mL de las muestras de agua del afluente y el efluente y la extracción se realizó con el kit DNeasy® PowerWater de QIAGEN Group. El kit QIAamp® PowerFecal® Pro-DNA de QIAGEN Group se empleó para la extracción de ADN de 250 mg de la muestra de lodo.

Finalizado el proceso de extracción, el ADN recuperado fue cuantificado con un espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop 2000c (ThermoFisher, USA) y almacenado a -20 °C dentro de las instalaciones del CEQIATEC.

4.1.2. Detección y cuantificación de ARGs

Posteriormente, las extracciones de ADN de las muestras de ambas épocas de estudio fueron transportadas a una temperatura <10 °C desde el CEQIATEC hasta el INISA, en donde se almacenaron a -80°C para su respectivo análisis.

Respecto al análisis de los ARGs, se evaluó por medio del termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo Fisher, USA), la qPCR para los genes *intl1*, *tetA*, *ermB*, *drfA*, *sul1* y *sul2*, *bla_{TEM}*, *qacE/qacEΔ*; así como para el gen *16SrRNA* que fue utilizado para normalizar la abundancia de los otros ARGs. Las curvas de calibración se llevaron a cabo utilizando como control positivo de cuantificación un gBlock® (IDT®) y concentraciones estándar entre 10⁶-10¹ copias por reacción. Para los ensayos de qPCR, se utilizó PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™, USA) según las instrucciones del fabricante, utilizando 5 µL de ADN de cada muestra. Los detalles de la qPCR, los cebadores y las condiciones de ciclado se detallan en el Cuadro 3.1.

Cuadro 4.1. Primers y condiciones para las reacciones de qPCR.

Gen	Antimicrobiano asociado	Primer	Condiciones del ciclo	Referencia
<i>16sRNA</i>	Normaliza la abundancia de ARGs	Bact1369F:5'-CGGTGAATACGTTTCYCGG-3' Prok1492R: 5'-GGHTACCTTGTTACGACTT-3'	Desnaturalización inicial: 95 °C, 2 min; Desnaturalización: 95 °C, 15 s; Alineamiento: 55 °C, 60 s	[58]
<i>tetA</i>	Tetraciclina	tetA-F: 5'-TCAATTCCTGACGGGCTG-3' tetA-R: 5'GAAGCGAGCGGGTTGAGAG-3'	Desnaturalización inicial: 95 °C, 2 min; Desnaturalización: 95 °C, 15 s; Alineamiento: 55 °C, 60 s	[59]
<i>ermB</i>	Macrólidos	ermB1: 3'-CCGAACACTAGGGTTGCTC-3' ermB2: 3ATCTGGAACATCTGTGGTATG-3'	Desnaturalización inicial: 95 °C, 2 min; Desnaturalización: 95 °C, 15 s; Alineamiento: 55 °C, 60 s	[60]
<i>drfA</i>	Trimetoprima	dfrA12-F: 5'-GAGCTGAGATATACTCTGGCACT-3' dfrA12-R: 5'-GTACGGAATTACAGCTTGAATGGT-3'	Desnaturalización inicial: 95 °C, 2 min; Desnaturalización: 95 °C, 15 s; Alineamiento: 55 °C, 60 s	[58]
<i>sul1</i>	Sulfonamidas	sulI-F: 5'-CACCGGAAACATCGCTGCA-3' sulI-R: 5'-AAGTTCCGCCGCAAGGCT-3'	Desnaturalización inicial: 95 °C, 2 min; Desnaturalización: 95 °C, 15 s; Alineamiento: 55 °C, 60 s	[58]
<i>sul2</i>	Sulfonamidas	Sul2-F: 5'-CTCCGATGGAGGCCGGTAT-3' Sul2-R: 5'-GGGAATGCCATCTGCCTTGA-3'	Desnaturalización inicial: 95 °C, 2 min; Desnaturalización: 95 °C, 15 s; Alineamiento: 55 °C, 60 s	[58]
<i>qacE/qacEA</i>	Aminas cuaternarias	qacEF: 5'-GGCTTTACTAAGCTTGCCCC-3' qacER: 5'-CATACCTACAAAGCCCCACG-3'	Desnaturalización inicial: 95 °C, 2 min; Desnaturalización: 95 °C, 15 s; Alineamiento: 55 °C, 60 s	[61]
<i>intI1</i>	Integrasa asociada a integrones	qINT3: 5'-TGCCGTGATCGAAATCCAGATCCT-3' qINT4: 5'-TTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTG-3'	Desnaturalización inicial: 95 °C, 2 min; Desnaturalización: 95 °C, 15 s; Alineamiento: 55 °C, 60 s	[58]
<i>bla_{TEM}</i>	Betalactámicos	blaTEMF: 5'-CACTATTCTCAGAATGA CTTGGT-3' blaTEMR: 5'-TGCATAATTCTTACTGTCATG-3'	Desnaturalización inicial: 95 °C, 2 min; Desnaturalización: 95 °C, 15 s; Alineamiento: 55 °C, 60 s	[62]

4.2. CONTAMINANTES FISICOQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS

Por otra parte, en el Centro de Investigación en Protección Ambiental (CIPA) del Instituto Tecnológico de Costa Rica se realizaron los análisis fisicoquímicos de las muestras, ya sea por medio de HACH® kits o por métodos establecidos en el SMEWW [57] como se indica en el Cuadro 3.2. El acondicionamiento, la preservación y el posterior almacenamiento de las muestras se realizó según lo establecido para cada uno de los análisis respectivos.

Cuadro 4.2. Parámetros evaluados por etapa de tratamiento.

Etapa de tratamiento	Parámetros	Tipo de análisis	Método de análisis
Afluente	Sólidos Sedimentables (SSed)	SMEWW	2540 D
	Sólidos Suspendidos Totales (SST)		2540 F
	Demanda Química de Oxígeno (DQO)		8178 Reagent Solution
	Nitrato (NO ₃ ⁻ -N)	HACH® kits	10020 Test N'Tube™ Vials
	Amoníaco (NH ₃ -N)		10031 Test N'Tube™ Vials
	Fosfato (PO ₄ ³⁻)		8000
Tanque de reacción	Coliformes Fecales	SMEWW	9221 B
	Sólidos Sedimentables (SSed)	SMEWW	2540 D
Efluente	Sólidos Suspendidos Totales (SST)		2540 F
	Sólidos Sedimentables (SSed)	SMEWW	2540 D
	Sólidos Suspendidos Totales (SST)		2540 F
	Demanda Química de Oxígeno (DQO)		8178 Reagent Solution
	Nitrato (NO ₃ ⁻ -N)	HACH® kits	10020 Test N'Tube™ Vials
	Amoníaco (NH ₃ -N)		10031 Test N'Tube™ Vials
	Fosfato (PO ₄ ³⁻)		8000
	Coliformes Fecales	SMEWW	9221

4.2.1. Transformación de nitrógeno amoniacal

El nitrógeno amoniacal puede existir en solución acuosa ya sea como ion amonio (NH₄⁺) o como gas amoníaco (NH₃), dependiendo del pH de la solución [42]. Según las condiciones de estudio, con un pH neutro y temperatura ambiente, casi todo el nitrógeno amoniacal está presente en forma de NH₄⁺, por lo que los resultados de NH₃ serán reportados como NH₄⁺ según las siguientes ecuaciones:

$$[NH_4^+] = [NH_3] \times \frac{\text{Masa Molar } NH_4^+}{\text{Masa Molar } NH_3} \quad 3.1.$$

Siendo la masa molar de NH_4^+ =18,04 g/mol y la de NH_3 =17,03 g/mol, se obtiene:

$$mg/L NH_4^+ = mg/L NH_3 \times \frac{18 g/mol NH_4^+}{17,03 g/mol NH_3} \quad 3.2.$$

4.2.2. Cálculo del Índice Volumétrico de Lodos (IVL)

Por otra parte, el IVL es un parámetro comúnmente utilizado como indicador de la capacidad de los sólidos para sedimentar, por lo que se calculó mediante la fórmula 3.3. descrita en [42]:

$$IVL (mL/g) = \frac{V_{SSed,30}}{X_{SST}} \quad 3.3.$$

Siendo:

$V_{SSed,30}$: volumen de lodo sedimentado en 30 min (mL/L)

X_{SST} : Concentración de sólidos suspendidos totales en licor mezclado (g/L)

Interpretación del IVL:

IVL Bajo (< 100 mL/g): Buena sedimentación y compactación.

IVL Medio (100-150 mL/g): Condiciones de operación normales.

IVL Alto (> 150 mL/g): Lodos abultados. Hay un exceso de crecimiento de microorganismos filamentosos, lo que disminuye la densidad del lodo y genera una pobre capacidad de sedimentación.

4.3. ANÁLISIS DE INFORMACIÓN

Los distintos análisis exploratorios que se describen a continuación fueron realizados por medio de RStudio, utilizando la versión de R (4.3.1). Se utilizaron los paquetes nortest, ggplot2, stringr, tidyverse y factoextra. Primeramente, se visualizó la abundancia y variabilidad de los ARGs en las muestras de agua residual (afluente y efluente), así como en las muestras de lodos, en las dos épocas de estudio por medio de gráficos de cajas y bigotes. Posteriormente, se utilizó un gráfico de barras para visualizar la abundancia de cada gen en las diferentes matrices y épocas, permitiendo identificar tendencias y posibles riesgos de aumento en la abundancia de ARGs.

Una vez finalizado, se determinó la normalidad de los datos por medio de la prueba Shapiro-Wilk, cuyos resultados se pueden encontrar en el Apéndice IV, y se aplicaron pruebas estadísticas con el fin de determinar si el tratamiento de la PTAR verdaderamente influyó en la abundancia de los ARGs o si los cambios observados en la abundancia debido a variaciones estacionales son significativos.

En primer lugar, se aplicó la prueba t-Student para cada gen que asumió una distribución normal durante la época seca (*tetA*, *ermB*, *drfA12*, *qacE*, *intl1*, *blaTEM*), mientras que para los genes cuya distribución no es normal (*sul1* y *sul2*), se utilizó una prueba de Wilcoxon pareada. Este procedimiento se aplicó nuevamente a la época lluviosa para los genes de distribución normal (*drfA12*, *sul1*, *sul2*, *qacE*, *blaTEM*) y los de distribución no normal (*tetA*, *ermB*, *intl1*). Esta comparación permitió identificar si el tratamiento en la PTAR está generando un aumento en la abundancia de estos genes.

Por otra parte, los análisis de las diferencias en la abundancia de genes entre las épocas seca y lluviosa, realizados en el afluente, lodos y efluente, permitieron determinar si las condiciones estacionales afectaron la presencia de ARGs en la PTAR. Para los conjuntos de genes que asumen una distribución normal (*drfA12*, *qacE*, *blaTEM*), se realizó un análisis de varianza (ANOVA), mientras que para los genes que no siguen una distribución normal (*tetA*, *ermB*, *sul1*, *sul2*, *intl1*), se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

Posteriormente, se realizó una evaluación de la capacidad de remoción de parámetros físicoquímicos y microbiológicos de la PTAR. Primeramente, se determinaron los promedios para la serie de datos de cada parámetro analizado, así como su desviación estándar. Luego, se determinó la normalidad del conjunto de datos del afluente y del efluente por medio de la prueba Shapiro-Wilk, resultados descritos en el Apéndice IV. A partir de ella, se aplicó la prueba paramétrica t-Student a conjuntos que asumieron una distribución normal y la prueba no paramétrica Wilcoxon de rangos con signos (muestras relacionadas) a conjuntos que no asumieron una distribución normal; con el fin de comparar las medianas entre los datos de afluente en época lluviosa y época seca. Este procedimiento se repitió con los datos de efluente para comparar esta matriz entre la época seca y la época lluviosa.

Se procedió a calcular las eficiencias de remoción para cada parámetro en la PTAR y se aplicaron de nuevo las pruebas estadísticas previamente mencionadas con las mismas consideraciones para comparar la eficiencia de la PTAR en época seca y la eficiencia de la PTAR en época lluviosa. Finalmente, se caracterizaron los lodos por medio del promedio y desviación de los parámetros ST, SSed e IVL. La prueba estadística t-Student se aplicó a cada uno de estos con el fin de comparar las características del lodo en ambas épocas, ya que todo el conjunto de datos asumió una distribución normal (Apéndice IV).

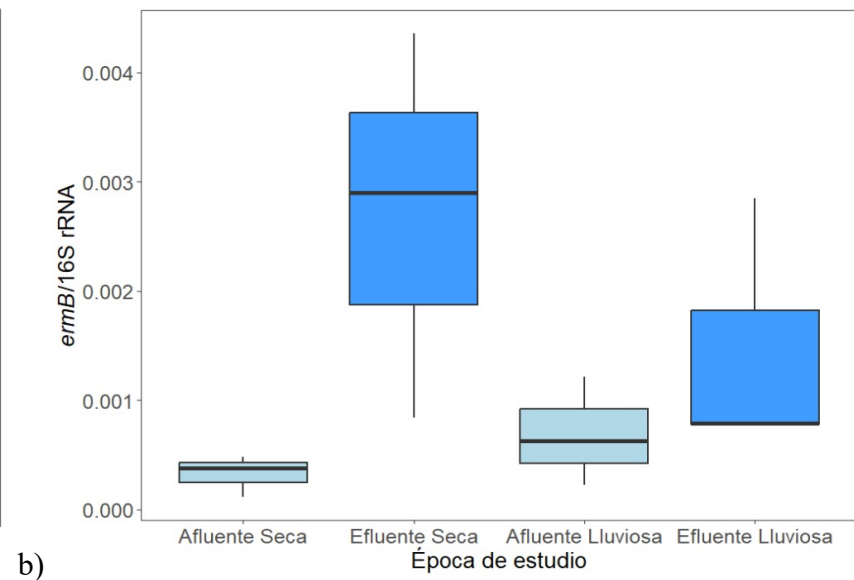
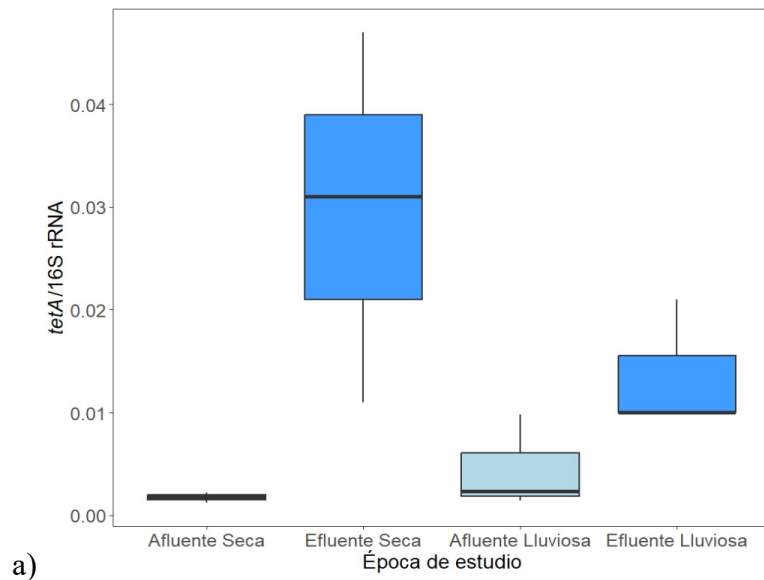
Finalmente, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) que incluyera todas las variables de este estudio mezcladas: las matrices (afluente, lodos y efluente) y las épocas estacionales (época seca y época lluviosa). De esta forma, se logró tanto reducir la dimensionalidad de los datos, como visualizar patrones generales sobre correlaciones entre las matrices y las épocas de estudio.

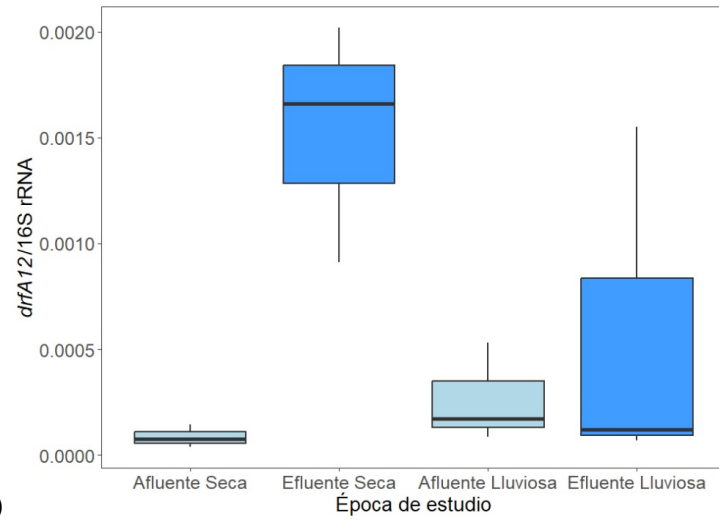
Para ello, se tomaron en cuenta las concentraciones de cada variable, las cuales fueron representadas en el gráfico mediante vectores cuya longitud reflejó su importancia relativa en cada componente principal. La dirección de estos vectores fue fundamental para comprender las correlaciones entre cada variable. Los vectores que apuntaron en direcciones similares indicaban una correlación positiva, mientras que aquellos que formaron un ángulo de 90° se consideraron independientes. Por otra parte, si los vectores apuntaban en direcciones opuestas, las variables se interpretaron como negativamente correlacionadas. A partir de la visualización del gráfico, se identificaron grupos principales de variables que permitieron resaltar tendencias clave e interpretar la información obtenida.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

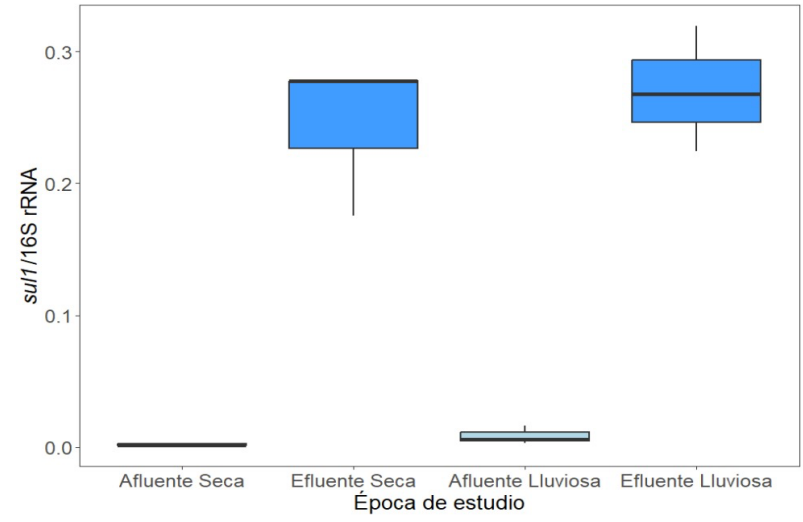
5.1. CARGA RELATIVA DE ARGS DE LA PTAR

La Figura 4.1. presenta gráficos de cajas y bigotes que ilustran la distribución de la proporción de distintos genes en relación con el *16S rRNA* en la matriz de aguas residuales (afluente-efluente) durante la época seca y la época lluviosa, siendo estos: a) *tetA*, b) *ermB*, c) *drfA12*, d) *sul1*, e) *sul2*, f) *qacE*, g) *intl1* y h) *bla_{TEM}*. Ahora bien, cabe mencionar que se realizó una separación de los gráficos de las matrices de agua y lodos, ya que las muestras difieren tanto en su composición, como en su forma de procesamiento. En este primer caso, para las aguas residuales se recolectaron 50 mL de muestra.

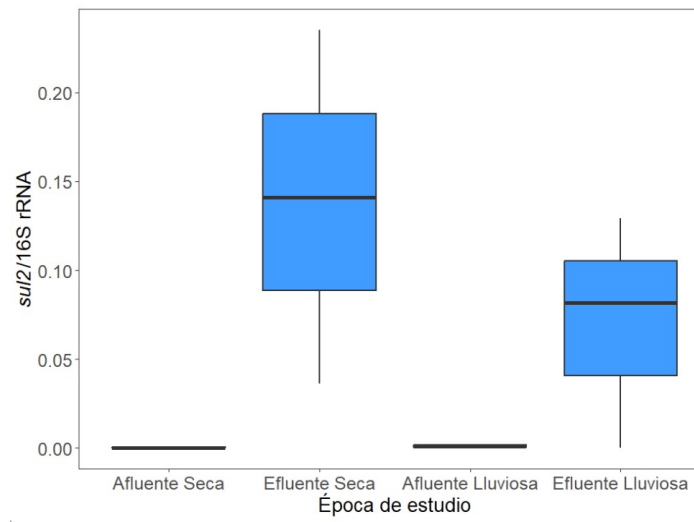




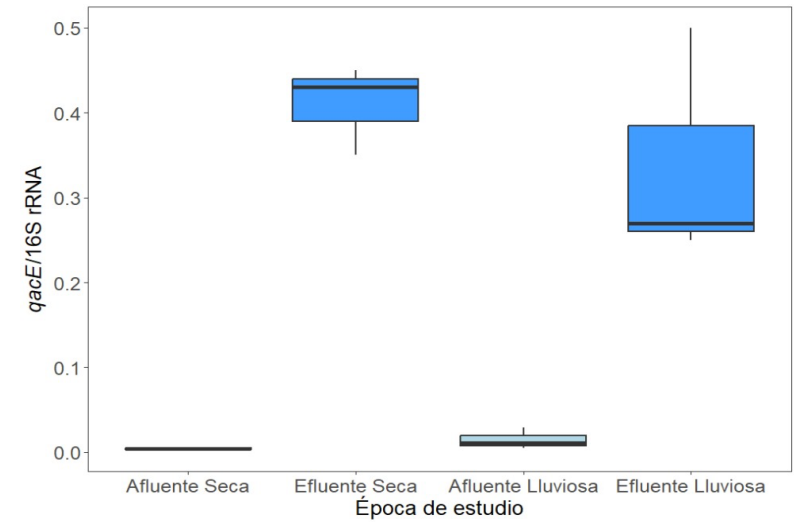
c)



d)



e)



f)

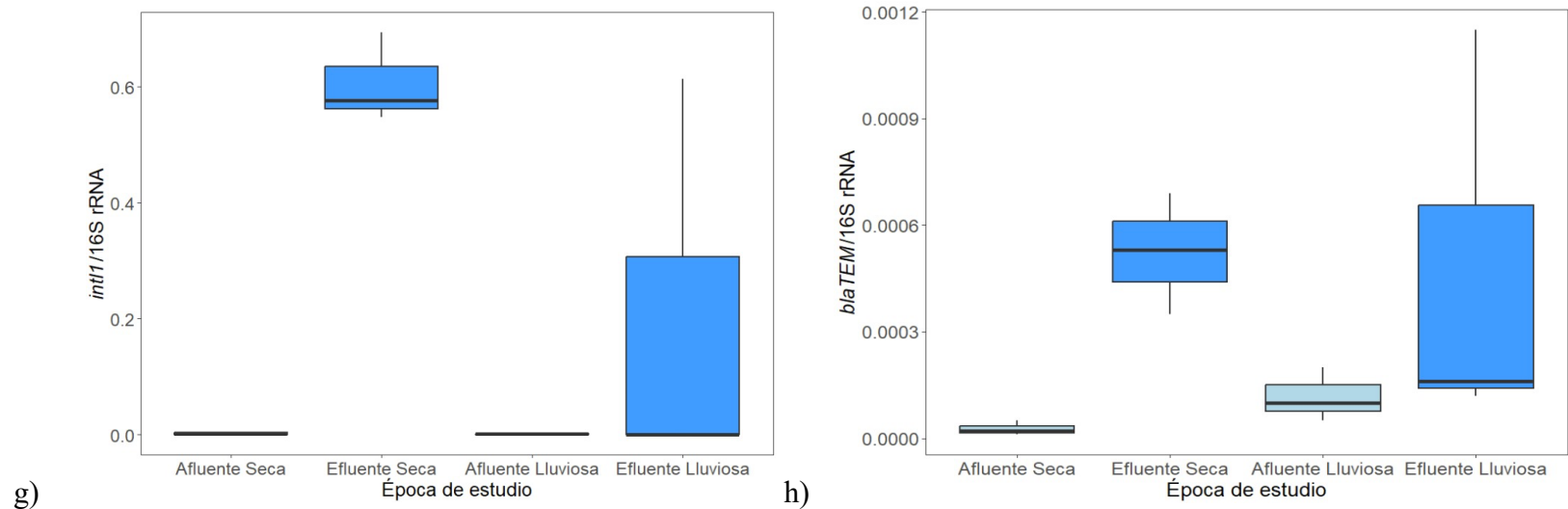
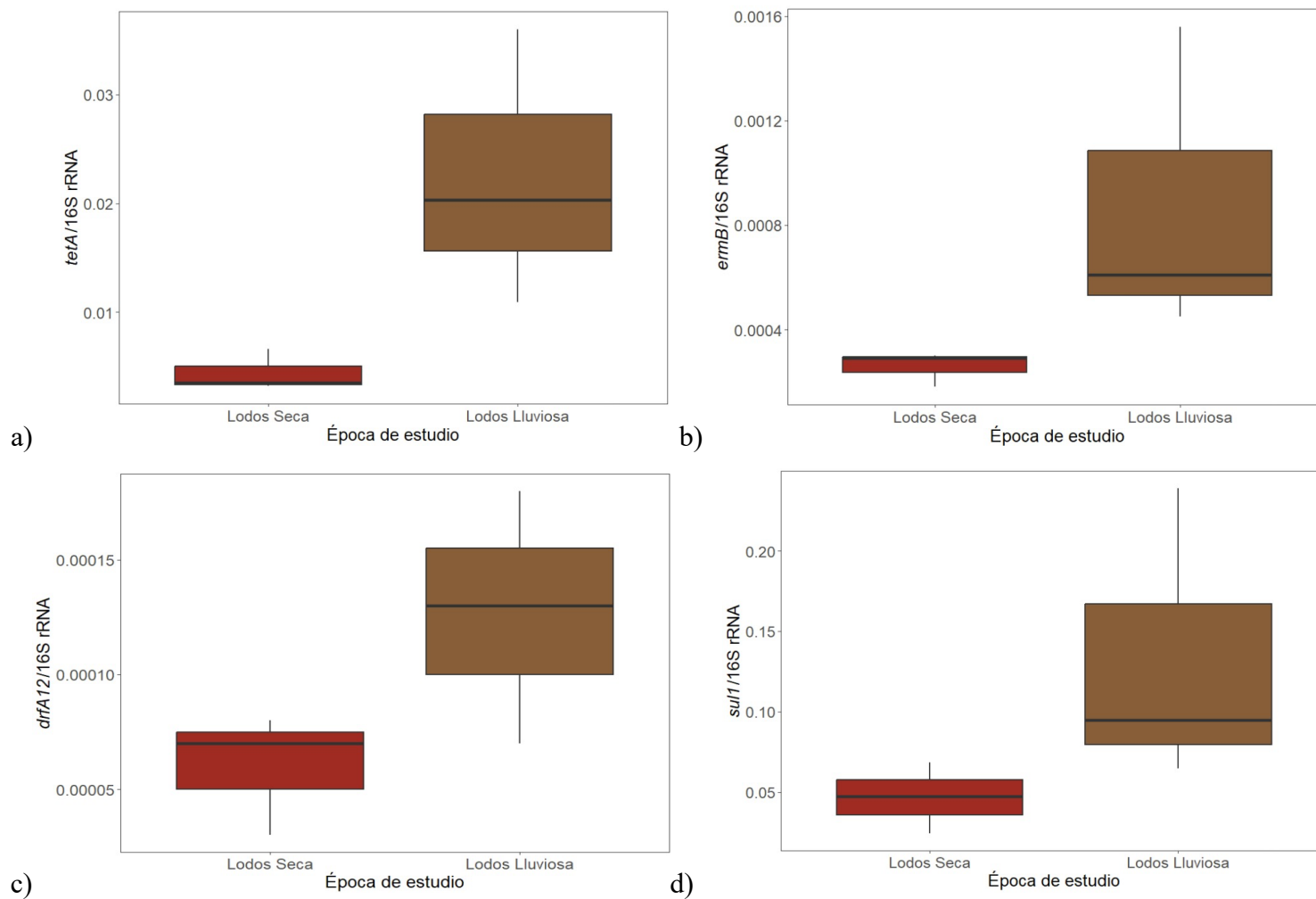


Figura 5.1. Gráficos de cajas y bigotes para la distribución en la matriz de agua de los genes: a) *tetA*, b) *ermB*, c) *drfA12*, d) *sul1*, e) *sul2*, f) *qacE*, g) *int1* y h) *blaTEM*, PTAR Monserrat, febrero a junio 2024, n=6.

En la Figura 4.1. se observó que las concentraciones de todos los ARGs en el agua residual afluente de la PTAR fueron bajas y con poca variabilidad en ambas épocas de estudio. En contraste, el efluente mostró una mayor variabilidad y concentración, lo que sugiere que los procesos internos de tratamiento en la PTAR incrementan la presencia de genes a la salida de la planta. Comportamientos similares han sido observados en aguas residuales de países tropicales, como se reporta en [63], [64] y [65]; lo cual demuestra el riesgo latente de aumento y liberación de ARGs al ambiente que hay en la zona. No obstante, en la figura es claro que este impacto varía según la estación. La concentración de los genes *tetA*, *ermB*, *drfA12*, *sul2*, *qacE* e *int1* en el efluente es mayor en la época seca; mientras que la abundancia de los genes *sul1* y *blaTEM* es mayor en la época lluviosa.

En cuanto a la Figura 4.2., se describen los gráficos de estos mismos genes para la matriz de lodos, para la cual se recolectaron 250 mg de muestra. En esta, la variabilidad y concentración de los genes varía ligeramente. Estas son mayores en la época seca para los genes *intl1* y *bla_{TEM}*; mientras que en la época lluviosa lo son para los genes *tetA*, *ermB*, *drfA12*, *sul1*, *sul2* y *qacE*.



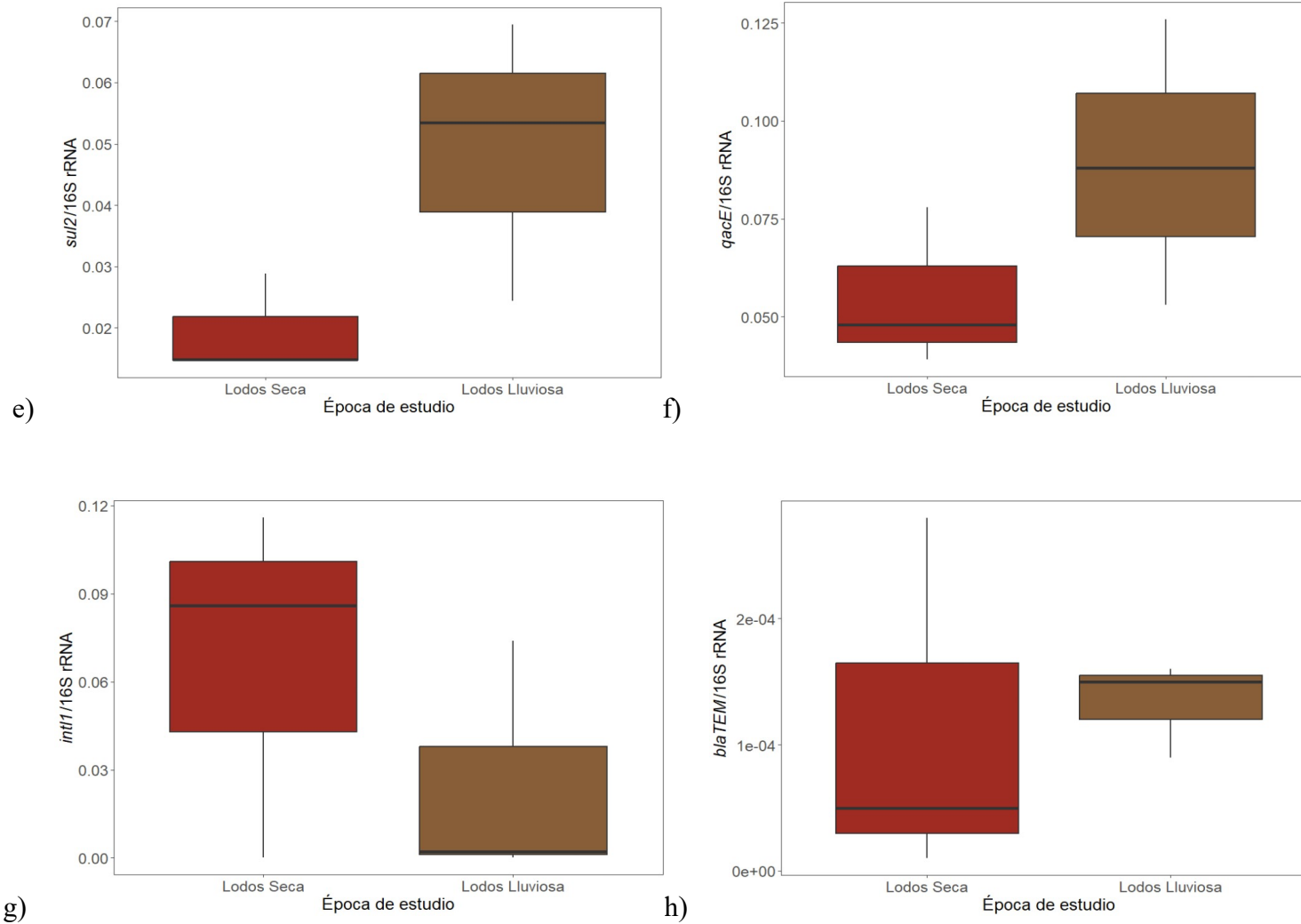


Figura 5.2. Gráficos de cajas y bigotes para la distribución en la matriz de lodo de los genes: a) *tetA*, b) *ermB*, c) *drfA12*, d) *sul1*, e) *sul2*, f) *qacE*, g) *int11* y h) *bla*TEM, PTAR Monserrat, febrero a junio 2024, n=6.

Ahora bien, en la Figura 4.3. se logra apreciar una comparación más directa entre los ARGs estudiados en la matriz de aguas residuales (50 mL de muestra), lo cual facilita observar las tendencias en la abundancia de cada gen a lo largo de las épocas seca y lluviosa.

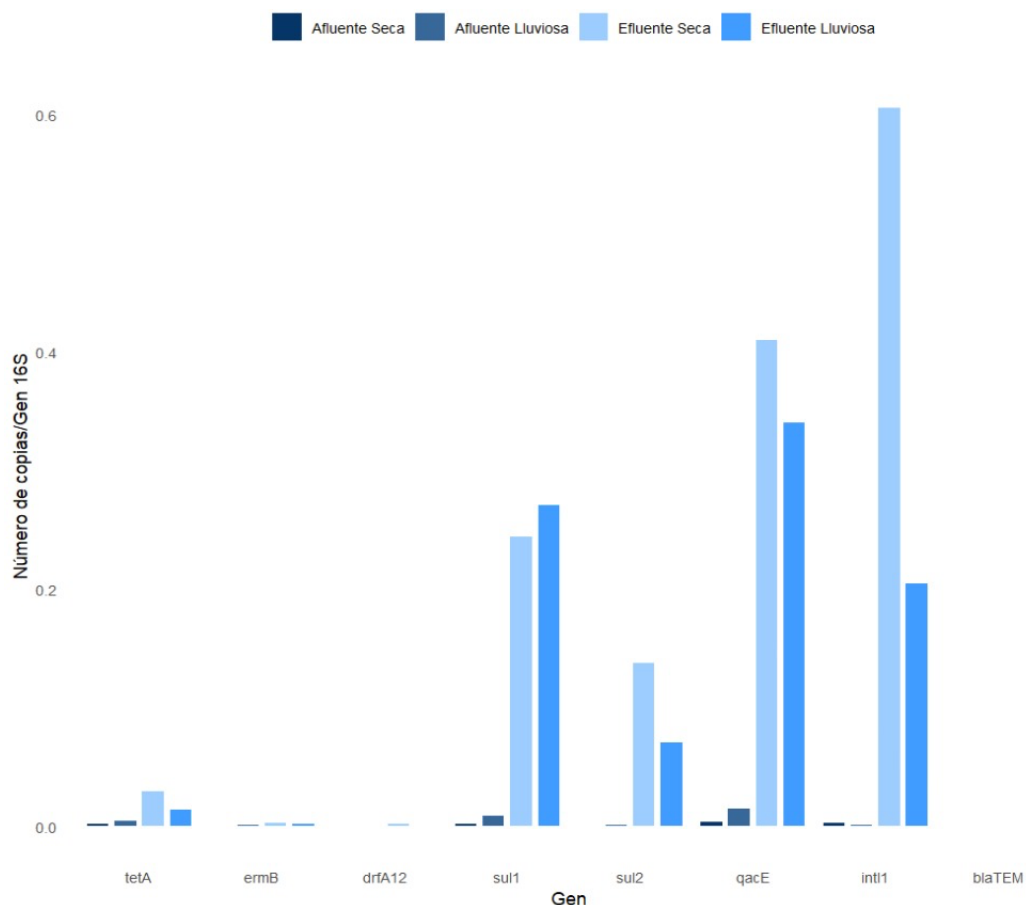


Figura 5.3. Comparación entre las abundancias relativas de ARGs en la matriz de agua, febrero a junio 2024, n=6.

Se puede observar (Figura 4.3.) que la mayor abundancia de genes en la matriz de agua residual durante la época seca sigue el siguiente orden ascendente: *tetA*, *sul2*, *sul1*, *qacE* e *intl1*. En cambio, para la época lluviosa la mayor abundancia de genes se presenta en el orden ascendente: *tetA*, *sul2*, *intl1*, *sul1* y *qacE*.

Además, al igual que en la Figura 4.1., es posible visualizar en la Figura 4.3. que para los genes previamente mencionados, su abundancia en la salida de la planta (efluente) es mucho mayor que la abundancia de entrada al sistema (afluente) en ambas épocas. Dicho comportamiento sugiere que los procesos biológicos dentro del sistema incrementan la abundancia de ARGs que provienen del afluente.

En la Figura 4.4. se detalla la misma comparación aplicada en la Figura 4.3., pero a la matriz de lodos (250 mg de muestra).

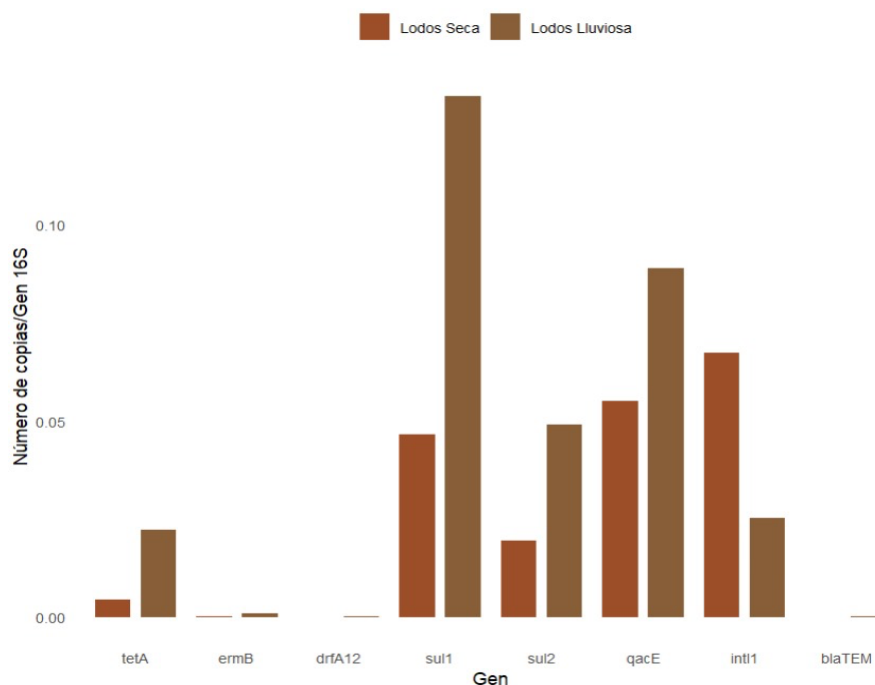


Figura 5.4. Comparación entre las abundancias relativas de ARGs en la matriz de lodo, febrero a junio 2024, n=6.

En el caso de los lodos (Figura 4.4.), la mayor abundancia de genes en orden ascendente durante la época seca son: *tetA*, *sul2*, *sul1*, *qacE* e *intl1*. En la época lluviosa, el orden de mayor abundancia es ligeramente distinto: *tetA*, *intl1*, *sul2*, *qacE* y *sul1*. Se observa también que, en general, la abundancia de los ARGs es mayor en la época lluviosa en comparación con la época seca, lo que sugiere que las condiciones de tratamiento y la dinámica de lodos durante la temporada lluviosa favorece el aumento de estos genes.

Ahora bien, de estos análisis se pudo visualizar que para ambas épocas y para las distintas matrices de estudio, los genes *tetA*, *sul1*, *sul2*, *qacE* e *intl1* prevalecen dentro del sistema en comparación con los otros ARGs analizados.

Respecto a los primeros tres genes, en [66] se reporta de forma similar la prevalencia de tetraciclinas y sulfonamidas. Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos de amplio espectro que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas en bacterias. Actualmente, se controla su uso en la medicina humana, pero permanecen con una amplia aplicación en los animales [67]. En el caso de las sulfonamidas, estas tienen un uso limitado en la medicina humana, pero en algunos países llegan a alcanzar hasta un 12% del consumo total de antibióticos [68].

En Costa Rica, su preponderancia llega a alcanzar hasta un 43% del total de los compuestos farmacéuticos presentes en aguas superficiales [69]. Este antibiótico está principalmente enfocado en el tratamiento de infecciones respiratorias, del tracto urinario y de *Chlamydia* o, como formulaciones tópicas, en infecciones oculares y vaginales [66].

Respecto al gen *qacE*, este está asociado a compuestos de amonio cuaternario (QACs), los cuales son usados para controlar la propagación de patógenos en espacios domiciliarios debido a sus propiedades antimicrobianas de amplio espectro. Aproximadamente el 75% de los QACs son recolectados en PTARs, por lo que es común encontrar grandes abundancias de este gen en sistemas similares [70]. Por otra parte, su acumulación tiene un impacto profundo sobre las poblaciones microbianas, ya que ejercen una fuerte presión selectiva. Este es un fenómeno que ocurre cuando la exposición constante a un agente antimicrobiano favorece la supervivencia de aquellos microorganismos que poseen mecanismos de resistencia frente a dicho agente [35]. En este contexto, las bacterias susceptibles a los QACs son eliminadas, mientras que las bacterias resistentes, con *qacE* y otros ARGs, proliferan y dominan las comunidades microbianas en la PTAR [71].

Esta selección dirigida no solo incrementa la abundancia de microorganismos resistentes, sino que también propicia la HGT [72]. Esto explica, a su vez, la abundancia tan elevada en la matriz de agua residual del último gen, *intl1*, que fue observada a la salida del sistema. En [73], por ejemplo, se demostró que los aislados resistentes a desinfectantes como el *qacE* están altamente asociados a una alta prevalencia de integrones; en donde el 74,06% de los aislados positivos para *intl1* portaba gen *qacE*. Además de esta correlación, las PTARs juegan un rol importante como reservorios comunes en donde los EMGs aumentan de forma alarmante, ya que se comparten entre bacterias y patógenos [74].

Ahora bien, con el fin de determinar si el tratamiento de la PTAR verdaderamente influyó en la abundancia de los ARGs o si existen variaciones estacionales en ellas, se evaluó si existen diferencias significativas en la abundancia de los genes entre la entrada y la salida de la PTAR; así como entre las diferentes épocas del año. Los resultados de las pruebas estadísticas aplicadas se describen en el Cuadro 4.1.

En primer lugar, al analizar la abundancia de los genes en el efluente respecto al afluente utilizando las pruebas t-Student o Wilcoxon, se demuestra que, durante la época seca, la abundancia de los genes *drfA12*, *qacE*, *intl1* y *blaTEM* en el efluente es significativamente mayor ($p < 0,05$) que en el afluente. En cuanto a la época lluviosa, esta tendencia se observó para los genes *sul1* y *qacE*. Esto sugiere que la PTAR en estudio puede actuar como un reservorio para estos ARGs, lo que potencialmente incrementa su abundancia en el efluente y, consecuentemente, su liberación al medio ambiente [63].

Cuadro 5.1. Resultados de pruebas estadísticas relacionadas con la abundancia relativa de ARGs, PTAR Monserrat, febrero a junio 2024, n=6.

Gen	<i>tetA</i>		<i>ermB</i>		<i>drfA12</i>		<i>sul1</i>		<i>sul2</i>		<i>qacE</i>		<i>intl1</i>		<i>blaTEM</i>	
	ES	EL	ES	EL	ES	EL	ES	EL	ES	EL	ES	EL	ES	EL	ES	EL
t-Student	0,06	N/A	0,06	N/A	0,02	0,3	N/A	0,007	N/A	0,1	0,003	0,03	0,003	N/A	0,02	0,2
Wilcoxon	N/A	0,1	N/A	0,3	N/A	N/A	0,1	N/A	0,1	N/A	N/A	N/A	N/A	0,6	N/A	N/A
ANOVA	N/A		N/A		0,5		N/A		N/A		0,9		N/A		0,9	
Kruskal-Wallis	0,4		0,3		N/A		0,4		1,0		N/A		0,2		N/A	

Nota: ES: Época Seca; EL: Época Lluviosa; N/A: no aplica; **significativo: p-value < 0,05**, no significativo: $p \geq 0,05$.

Este aumento significativo puede explicarse principalmente por el aumento del tiempo de retención que se obtiene a medida que avanzan las etapas de tratamiento del agua, lo que promueve una interacción más prolongada entre las bacterias [75] y, de esta forma, facilita la HGT. En este proceso, los MGEs como los integrones (*intl1*) actúan como vehículos que propagan los ARGs, por lo que la alta prevalencia observada en este estudio es igualmente alarmante, ya que constituyen uno de los elementos más importantes en el desarrollo y transmisión de ARGs entre bacterias [76].

Así que, durante el proceso de tratamiento las bacterias están sometidas a presiones selectivas, como las QACs, que favorecen la supervivencia de aquellos organismos que portan ARGs. Estas bacterias resistentes no solo sobreviven, sino que proliferan durante el tratamiento, y a mayor tiempo de retención en el sistema más fácil es su acumulación [71]. Por lo tanto, se sugiere que estos son los tres principales factores que contribuyen al aumento significativo en la abundancia de los ARGs dentro del sistema. Además de esto, una vez terminadas las etapas finales del ciclo del SBR, el lodo remanente en el reactor que se reutiliza en el siguiente ciclo de tratamiento, contribuye a la acumulación, persistencia y aumento de, tanto las bacterias, como los ARGs que fueron introducidos a la planta [77].

Ahora bien, en segundo lugar, en ninguno de los genes se observó diferencias significativas ($p \geq 0,05$) al analizar el impacto de las variaciones estacionales en las tres matrices de estudio (afluente, lodos y efluente). Estos resultados sugieren que las condiciones climáticas no afectaron la presencia de ARGs en la PTAR.

No obstante, la identificación de patrones estacionales en la abundancia de ARGs dentro de sistemas similares es compleja, ya que diversas variables como el uso de antibióticos, los periodos de muestreo y las condiciones operativas de la planta influyen en los resultados [78]. Por ejemplo, mientras que [78] y [79] han reportado que la temporada cálida es óptima para la proliferación de ARGs, en [80] se detectaron picos de abundancia en temperaturas más bajas. Esta variabilidad puede explicarse por la correlación positiva que hay entre el uso de antibióticos y la abundancia de ARGs en la PTAR [81].

En [82] se menciona que la estacionalidad es un factor importante que influye en la cantidad de prescripciones de antibióticos para pacientes ambulatorios, lo que contribuye de significativamente a la liberación de ARBs en las aguas residuales a través de las excreciones humanas. Esto quiere decir que los resultados obtenidos en este estudio, donde no se observaron diferencias estacionales significativas en la abundancia de ARGs en la PTAR de la urbanización Monserrat, están sujetos al consumo de antibióticos que hubo en la población atendida por el sistema de tratamiento durante el periodo de estudio. Por esta razón, para próximas investigaciones es fundamental realizar un análisis de las tendencias de consumo de antibióticos en la población en paralelo con el estudio de la PTAR, para comprender mejor su impacto en la dinámica de los ARGs.

5.2. REMOCIÓN DE CONTAMINANTES FISICOQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS

En el Cuadro 4.2. se pueden observar los resultados de los parámetros fisicoquímicos analizados en el afluente y efluente de la PTAR, así como las pruebas estadísticas aplicadas. En caso de que algún parámetro en el efluente no cumpliera con la normativa nacional (Anexo I), se señaló con: “*”; mientras que si no se aplicó ninguna prueba, se detalla como: “N/A”.

Cuadro 5.2. Parámetros fisicoquímicos procesados del afluente y efluente, PTAR Monserrat, febrero a junio 2024, n=6.

Parámetros	Época seca		Época lluviosa		Comparación de medianas afluente		Comparación de medianas efluente	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	t-Student p-value	Wilcoxon p-value	t-Student p-value	Wilcoxon p-value
SSed (mL/L)	(0,3±0,2)	(0,07±0,06)	(0,2±0,06)	(0,07±0,06)	N/A	0,8	N/A	1
SST (mg/L)	(82,43±23,31)	(44,6±1,98)	(57,0±3,47)	(39±0,99)	0,2	N/A	0,07	N/A
pH	(6,7±0,58)	(6,7±0,58)	(7±0)	(7±0)	N/A	N/A	N/A	N/A
DQO (mg/L)	(133,6±48,99)	(7,00±9,64)	(180,0±25,87)	(22,67±21,78)	0,4	N/A	0,2	N/A
NO ₃ ⁻ (mg/L)	(0,63±0,71)	(5,63±9,24)	(1,10±1,91)	(8,17±7,41)	N/A	1	N/A	0,8
NH ₄ ⁺ (mg/L)	(31,36±18,19)	(2,01±2,18)	(26,9±8,36)	(3,87±3,40)	N/A	0,8	0,6	N/A
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	(20,37±12,62)	(1,49±1,88)	(25,5±4,02)	(16,93±12,77)	0,4	N/A	0,2	N/A
Coliformes Fecales (log ₁₀ NMP/100 mL)	(5,4±0,59)	(2,24±1,28)	(6,6±0,14)	(3,2±0,0)	0,1	N/A	N/A	0,4

Nota: Mediana±desviación estándar; N/A: No aplica; *: Parámetro no cumple con la normativa (Anexo I); **significativo: p-value<0,05**, no significativo: p≥0,05.

Primeramente, fue posible observar altas desviaciones estándar en las mediciones de NO_3^- , NH_4^+ , DQO y PO_4^{3-} , lo que demuestra una posible variabilidad en las concentraciones de contaminantes en las aguas residuales tratadas a lo largo del tiempo. Esta variabilidad se puede atribuir a múltiples factores [83], entre ellos, la diversidad de composición en las fuentes de contaminación doméstica que alimentan la planta, las fluctuaciones estacionales y las variaciones en la eficiencia del proceso de tratamiento [42].

Durante la época seca, el 19 de febrero se observó una variación notable en las mediciones de NO_3^- y NH_4^+ debido a una carga elevada de todos los contaminantes, exceptuando la DQO. Por otra parte, en este mismo día hubo una baja eficiencia de remoción de la DQO, alterando la desviación de este parámetro en el efluente. De forma similar, el 11 de marzo se registró una entrada muy baja de PO_4^{3-} , mientras que la concentración de NO_3^- en el efluente fue alta. En la última fecha de muestreo, el 13 de febrero, se presentaron eficiencias deficientes en la remoción del NH_4^+ y PO_4^{3-} .

En este periodo, fue posible visualizar cómo las fluctuaciones en la carga de entrada pueden influir en la eficiencia de los procesos de remoción. En [84], por ejemplo, se demostró que para lograr una calidad de efluente aceptable es necesario una considerable carga de contaminantes a la entrada, dado que las bajas cargas pueden representar una dificultad para el proceso de remoción. Debido a esto, durante la época lluviosa fue aún más notorio las desviaciones en las mediciones, ya que hubo una dilución de la concentración de contaminantes en el afluente conforme avanzaban las semanas. Esto llevó a una disminución progresiva en las eficiencias de remoción del NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-} (Cuadro 4.3.), lo que consecuentemente aumentó la variabilidad en las muestras recolectadas.

Ahora bien, para determinar si en la entrada de la PTAR hubo variaciones significativas en relación con la dilución observada durante la época lluviosa, se aplicaron las pruebas de Wilcoxon y t-Student a las concentraciones del afluente en ambas épocas. De forma similar, se aplicaron las mismas pruebas a las concentraciones del efluente para cada época de estudio, con el propósito de determinar si la capacidad de remoción de estos contaminantes es constante o no a través del cambio estacional. La prueba de Wilcoxon se utilizó para datos que no siguen una distribución normal, y la prueba t-Student para aquellos que sí la siguen (Apéndice IV). En los casos en que una prueba ya hubiera sido aplicada, se indicó: “N/A”.

Según el Cuadro 4.2., no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en las concentraciones de contaminantes en el afluente entre la época seca y la época lluviosa para todos los parámetros estudiados. Esto sugiere que las condiciones de ingreso de contaminantes a la PTAR son consistentes a lo largo del año, independientemente de las variaciones estacionales.

Respecto a los parámetros analizados en el efluente, dado que los procesos en el SBR son altamente no lineales, cualquier variación significativa en la concentración de entrada podría afectar la calidad de salida [85]. No obstante, al ser consistentes las condiciones de ingreso en la PTAR de estudio se espera que la eficiencia de remoción de esta permanezca estable a lo largo del año. La afirmación anterior pudo confirmarse con la comparación de medianas del efluente para ambas épocas (Cuadro 4.2.). Según los resultados de las pruebas estadísticas aplicadas, no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en el efluente entre la época seca y la época lluviosa para todos los parámetros estudiados. Esto indica que, en términos de calidad del agua tratada que sale de la PTAR, las condiciones climáticas estacionales no ejercen un impacto significativo. Además en ambas épocas todos los parámetros del efluente (Cuadro 4.2.) cumplen con el límite máximo permitido en la normativa nacional (Anexo I) [48].

Ahora bien, aunque las condiciones climáticas estacionales parecen no ejercer un impacto significativo en la calidad del efluente, se determinaron las eficiencias de remoción y se aplicaron análisis estadísticos (Cuadro 4.3.) a cada parámetro. De esta forma, fue posible identificar áreas donde el proceso puede mejorarse y pudo observarse si realmente las eficiencias de remoción de los contaminantes no son afectadas por la estación del año. Las consideraciones de los cuadros anteriores aplican de igual manera para este.

En este caso, se puede observar que las eficiencias de remoción están por encima del 30% para todos los parámetros y, en el caso del NO_3^- , su concentración en el efluente es mayor que en el afluente gracias a la nitrificación que ocurre en la fase de aireación. En esta etapa, el NH_3 y el NH_4^+ del afluente se oxidan a NO_2^- y luego a NO_3^- . Según [42], en efluentes de PTARs las concentraciones de NO_3^- pueden variar (0-20) mg/L. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio se encuentran dentro de un rango típico del proceso. Debido a esto se colocó “N/A” para los cálculos de este parámetro.

Cuadro 5.3. Eficiencias de remoción de los parámetros analizados en la matriz de agua, febrero a junio 2024, n=6.

Parámetros	Eficiencia de remoción época seca	Eficiencia de remoción época lluviosa	t-Student p-value	Wilcoxon p-value
SSed (mL/L)	77,78%	60,00%	N/A	0,7
SST (mg/L)	45,86%	31,70%	N/A	0,1
DQO (mg/L)	94,76%	87,41%	0,05	N/A
NO ₃ ⁻ (mg/L)	N/A	N/A	N/A	N/A
NH ₄ ⁺ (mg/L)	93,60%	85,59%	0,3	N/A
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	92,68%	33,68%	0,1	N/A
Coliformes Fecales (log ₁₀ NMP/100 mL)	58,77%	51,32%	0,3	N/A

Nota: **significativo: p-value<0,05**, no significativo: p≥0,05.

Respecto a los otros parámetros, las pruebas estadísticas utilizadas indicaron que las eficiencias de la época seca no son significativamente mayores ($p \geq 0,05$) a las eficiencias de la época lluviosa. Esto quiere decir que el proceso de tratamiento de la PTAR mantiene una eficiencia consistente en la remoción de contaminantes fisicoquímicos y microbiológicos a lo largo del año.

Sin embargo, aunque haya una remoción de los contaminantes para ambas épocas, se puede observar que en la época lluviosa todas las eficiencias descritas en el Cuadro 4.3. disminuyen; siendo la más pronunciada la remoción del PO₄³⁻, pasando de un 92,68% de remoción en la época seca a tan solo un 33,68% en la época lluviosa. Este fenómeno está relacionado con la disminución en la capacidad de sedimentabilidad.

En comparación con otros estudios, en [86] se observó durante la época lluviosa una disminución en la tasa de carga orgánica del afluente, al igual que en la capacidad de sedimentación, siendo esta última atribuida al sobrecrecimiento de bacterias filamentosas en el lodo. Ambas condiciones afectaron simultáneamente la eficiencia de eliminación de contaminantes como el P y N.

Respecto a las condiciones de la PTAR en estudio, en la época lluviosa se pudo observar un aumento de la DQO en el afluente (Cuadro 4.2.), pero se observaron indicios de bacterias filamentosas durante la visita de campo. Al recolectar y analizar los lodos muestreados, se observaron flóculos largos y poco compactos.

Así que, en el Cuadro 4.4. se evaluó la capacidad de sedimentación de los lodos por medio de la caracterización del licor mezclado. En este, se detallan los resultados de SSed, ST y el cálculo del IVL durante la época seca y lluviosa. Además, se aplicó la prueba t-Student a los distintos parámetros analizados con el fin de determinar si hay diferencias significativas entre ambas épocas, dado que todo el conjunto de datos asume una distribución normal (Apéndice IV).

Como resultado, no se presentaron diferencias significativas entre los SSed, los ST y el IVL de ambas épocas de estudio ($p \geq 0,05$), lo que sugiere una operación estable y efectiva de la PTAR gracias a la uniformidad en las condiciones de entrada que se determinó con anterioridad. No obstante, según el cálculo de IVL, los lodos pasan de una capacidad normal de sedimentación durante la época seca (IVL=100) a lodos con poca capacidad de sedimentación (IVL>150) en época lluviosa.

Cuadro 5.4. Caracterización del lodo en el licor mezclado, febrero a junio 2024, n=6.

Parámetros	Lodos seca	Lodos lluviosa	t-Student p-value
SSed (mL/L)	903,3±15,28	900±20,0	1,0
ST (g/L)	7,60±2,31	5,28±2,54	0,7
IVL (mL/g)	100,4±26,35	160,6±78,09	0,8

Nota: Mediana±desviación estándar; N/A: No aplica; **significativo: p-value<0,05**, no significativo: $p \geq 0,05$.

Según [87], el lodo se puede considerar filamentosos cuando el IVL es mayor a 120 y, por ende, recomienda para la remoción de nutrientes a partir de lodos en sistemas biológicos como estos, valores menores a 100 mL/g. Por lo tanto, la PTAR en estudio puede sufrir de una proliferación de microorganismos filamentosos durante la época lluviosa. Esto podría ser una de las razones por las cuales se haya observado una baja capacidad de sedimentación [84] y de remoción de nutrientes como el N y el P [88].

Aun así, se puede observar que la eficiencia de remoción del PO_4^{3-} disminuye en mayor medida que la remoción del NH_4^+ , con una reducción de un 59% en comparación con un 8,01%, respectivamente. Esto pudo deberse a la disminución de la temperatura ambiental que conlleva la época lluviosa. En [89] se demostró que, al bajar la temperatura por el cambio de estaciones, las tasas de reacción de las bacterias y sus funciones metabólicas se ven afectadas, reduciendo su capacidad de remoción del N y del P. Además, se menciona que bajo estas condiciones también aumentaba la concentración de PO_4^{3-} en la etapa de sedimentación debido a la liberación secundaria de fósforo; resultando en una deficiencia de remoción aún mayor. Sin embargo, en el caso de estudio, no se realizaron mediciones de temperatura, por lo que se recomienda para próximas investigaciones incluir este análisis dentro de la metodología a realizar.

Ahora bien, en el caso de la PTAR Monserrat, la liberación secundaria de fósforo previamente mencionada podría ocurrir en la fase de sedimentación si el sistema utiliza EBPR, lo cual no fue comprobado en esta investigación. Este fenómeno se produce cuando las PAOs, que en condiciones aerobias absorben y almacenan fósforo en forma de polifosfatos, se encuentran en un entorno con baja disponibilidad de oxígeno; como podría ser el fondo de un reactor durante la fase de clarificación [90]. En estas condiciones, las PAOs liberarían el fósforo almacenado de vuelta al agua circundante, ya que metabolizan las reservas de polifosfatos almacenadas para consumir fuentes de ácidos grasos volátiles (VFAs) y así obtener energía [91]. Este fenómeno, conocido como liberación secundaria, podría ser contraproducente para la eficiencia global del sistema, ya que el fósforo que debería haber sido removido durante el tratamiento es reintroducido en el efluente final [92].

5.3. RELACIÓN DE LA OPERATIVIDAD DE LA PTAR CON LA CARGA DE ARGs

El gráfico presentado en la Figura 4.3. corresponde a un Análisis de Componentes Principales (PCA) que permite visualizar la relación entre las variables de estudio y su contribución a la varianza total del conjunto de datos. Para este análisis se tomaron en cuenta las concentraciones de cada variable y se representaron por medio de un vector cuya longitud refleja la importancia relativa de la variable en cada dimensión. Las variables que tienen vectores que apuntan en direcciones similares están positivamente correlacionadas y, entre más cerrado sea el ángulo entre dos vectores, mayor es la correlación positiva entre las variables que representan.

Por el contrario, aquellos vectores que poseen un ángulo perpendicular indica que las variables son independientes y si apuntan en direcciones opuestas o un ángulo abierto, estas están negativamente correlacionadas. A partir de esto, se identificaron visualmente tres grupos principales de variables o “clusters”, cada uno de ellos encerrados en un círculo de color diferente. Estos grupos fueron identificados a partir de la proximidad de las variables en el gráfico PCA, con el fin de resaltar patrones generales en los datos de estudio.

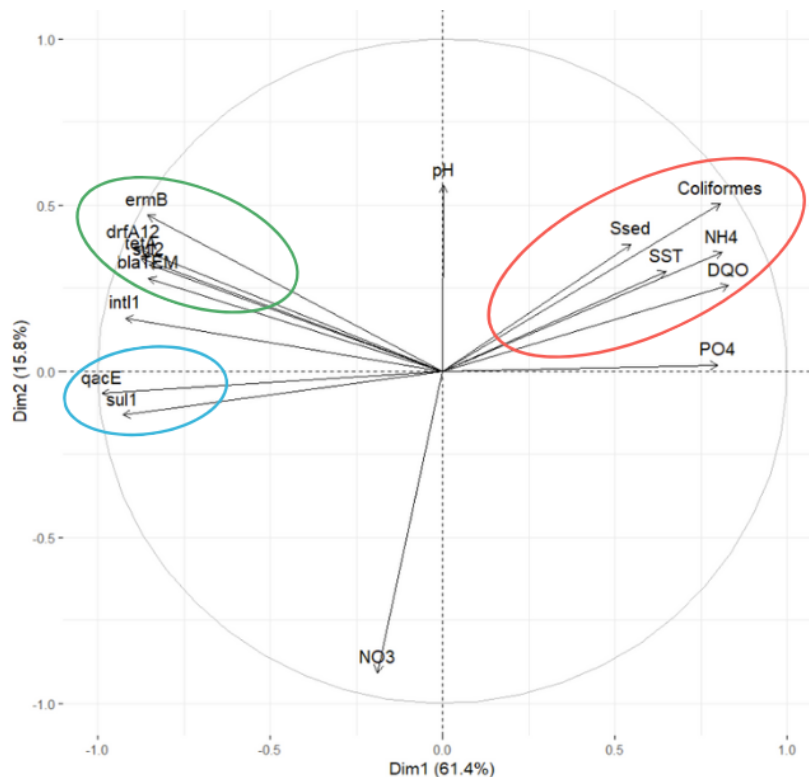


Figura 5.5. Evaluación del efecto de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en la abundancia relativa de ARGs presentes en la PTAR Monserrat por medio de un PCA, febrero a junio 2024, n=6.

El primer grupo, representado por un círculo verde, incluye las variables *tetA*, *ermB*, *drfA12*, *sul2* y *blaTEM*. Esto sugiere que los ARGs previamente mencionados están fuertemente correlacionados entre sí, indicando un posible mecanismo o proceso compartido. El segundo cluster, dentro del círculo azul, indica que los ARGs *qacE* y *sull* están correlacionados. Finalmente, se puede observar que ambos clusters están igualmente correlacionados con el gen *intl1*. Esta correlación significativa entre los ARGs y el gen *intl1* resalta el riesgo potencial de diseminación a través de la HGT tras la reutilización del lodo activado en el tratamiento biológico o la descarga del efluente de la PTAR en el cuerpo de agua receptor [93]. Además, la fuerte correlación entre casi todos los ARGs, indica un enlace genético impulsado por la co-ocurrencia y co-transferencia de ARGs, lo que puede contribuir a la resistencia a múltiples fármacos en las bacterias [93].

Por otra parte, se puede observar que el cluster azul, de los genes *qacE* y *sull*, se encuentra ligeramente en orientación contraria al tercer grupo circunscrito en un círculo rojo, el cual está compuesto por las variables Ssed, Coliformes, SST, NH₄ y DQO. Esto indica una posible relación inversa, en la cual los ARGs aumentan conforme las concentraciones de dichos parámetros disminuyen. No obstante, en [94] se demuestra que no hay influencia alguna de los parámetros fisicoquímicos o microbiológicos en la abundancia de ARGs; siendo la única excepción la temperatura del agua. No obstante, en este estudio no se realizó la medición de la temperatura del agua, por lo que se recomienda incluir esta medición para próximas investigaciones, ya que según [94], la temperatura es el único parámetro que posee una correlación significativa con la abundancia de ARGs, especialmente con el gen *sull*.

Esto refuerza la idea de que los procesos biológicos en los sistemas de tratamiento, están modulados por la temperatura. A su vez, esto podría estar relacionado con la capacidad de ciertos organismos resistentes para prosperar en condiciones específicas, donde el control de los parámetros fisicoquímicos habituales no es suficiente para mitigar la proliferación de ARGs [95]. Por ejemplo, en [96] y en [97] se demostró que tanto la proliferación, como la propagación de los ARGs, están principalmente gobernadas por la comunidad microbiana y MGEs. Debido a esto, en [98] y [99] se encontró que la desinfección desempeña un papel primordial en la eliminación de ARBs, al igual que de ARGs.

Ahora bien, cabe resaltar que en estudios de detección y cuantificación de ARGs, la presencia de inhibidores de la qPCR, como sustancias húmicas, iones metálicos y polisacáridos complejos [100], pueden afectar la amplificación del ADN y generar falsos negativos o subestimaciones en la abundancia de ARGs [101]. Estos inhibidores son comunes en matrices complejas como las aguas residuales y su interferencia podría explicar en parte por qué no se encuentran correlaciones entre parámetros fisicoquímicos o microbiológicos y la abundancia de ARGs [100].

Por otra parte, en el Cuadro 4.2. se observa que, aunque no haya una diferencia significativa en la remoción de coliformes entre afluente y efluente, la detección de algunos genes es significativamente mayor en el efluente. Esta aparente discrepancia entre la detección bacteriana y la detección de ARGs puede explicarse por dos razones. La primera es que el tratamiento del agua podría haber eliminado inhibidores presentes en el afluente, los cuales hayan afectado la cuantificación inicial de los genes, llevando a un aumento aparente de ARGs en el efluente. La segunda razón es que, dado que se trata de una cuantificación de abundancia relativa, aunque el número total de genes no haya cambiado, la proporción de genes en el efluente sea mayor.

Esto último sucedería si el número total de bacterias disminuye, pero las bacterias que quedan tienen una mayor proporción de ARGs. Entonces, la abundancia relativa de esos genes aumentará. En caso de que esto suceda, se podría requerir una estrategia adicional, como la cuantificación absoluta de ARGs, para obtener una mejor comprensión de su dinámica a lo largo del proceso de tratamiento.

6. CONCLUSIONES

El análisis realizado de la carga relativa de ARGs en la PTAR de la urbanización Monserrat en La Unión de Cartago, demostró de manera consistente que el proceso de tratamiento es deficiente en la disminución de ARGs, y, más bien, incrementa significativamente la presencia de ciertos genes en el efluente.

Por otra parte, aunque las condiciones climáticas no parecieron afectar la presencia de ARGs en la PTAR, el estudio sugiere que el aumento de ARGs, como *tetA*, *sul1*, *sul2*, *qacE* e *intl1*, podría estar influenciado por tres condiciones: la prolongada interacción entre bacterias durante el tratamiento, la presencia de MGEs que faciliten la HGT y por presiones selectivas derivadas de compuestos como los QACs. Estas consideraciones requieren de más estudios para ser confirmadas, lo que permitiría corroborar si la PTAR de estudio actúa como un reservorio donde ciertos ARGs, especialmente los integrones (*intl1*), proliferan de manera preocupante a lo largo del año.

Respecto al análisis de la remoción de contaminantes fisicoquímicos y microbiológicos, no se encontraron diferencias significativas en la calidad del agua tratada entre las épocas seca y lluviosa, lo que indica que el sistema de tratamiento opera de manera estable y eficiente, a pesar de las variaciones estacionales. Debido a esto, todos los parámetros analizados cumplen con la normativa nacional a lo largo del año. No obstante, se observaron fluctuaciones en la eficiencia de remoción, especialmente en la época lluviosa. Esto fue causado posiblemente por la proliferación de bacterias filamentosas, lo que afectó negativamente la capacidad de sedimentación de los lodos y, por consecuencia, su capacidad de remoción del PO_4^{3-} y del NH_4^+ .

Finalmente, el PCA reveló que varios ARGs están estrechamente correlacionados entre sí, específicamente con el gen *intl1*, lo que sugiere un riesgo en el aumento de su abundancia relativa a través de la HGT. Esta situación demuestra la importancia de estudiar la co-transferencia de ARGs en ambientes receptores, siendo uno de los aspectos que debería recibir más atención en futuras investigaciones.

Además, los resultados de la PCA también destacan que, a pesar de la falta de correlaciones claras entre parámetros fisicoquímicos y microbiológicos con la abundancia de ARGs; la interferencia de inhibidores en la qPCR debe ser considerada, ya que es común en matrices complejas como las aguas residuales.

Dichos inhibidores podrían afectar la precisión y fiabilidad de las mediciones, por lo que en futuras investigaciones será necesario tomar en cuenta las medidas correspondientes para mitigar sus efectos y lograr una cuantificación más precisa de la carga de ARGs. No obstante, los hallazgos del presente estudio sugieren que los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua residual a lo largo del sistema de tratamiento no parecen desempeñar un rol crucial en la proliferación de ARGs, lo que resalta la importancia de implementar métodos de desinfección como tratamiento terciario del agua residual para reducir la carga de ARGs que será posteriormente liberada al ambiente.

7. RECOMENDACIONES

Asociado al primer objetivo específico; se recomienda realizar un análisis exhaustivo de las tendencias de consumo de antibióticos en la población que utiliza el servicio de tratamiento de aguas residuales, dado que esta información es crucial para entender la dinámica de los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en la PTAR durante el período de estudio. A largo plazo, conocer estos patrones de consumo les permitiría a los operadores de la planta identificar fuentes de ARGs en el agua residual, para así ajustar el sistema de tratamiento con el fin de evitar la proliferación de estos genes.

Asociado al segundo objetivo específico; aunque los valores reportados para el NO_3^- se encuentren dentro de valores típicos del proceso de tratamiento de aguas residuales, este contaminante puede tener efectos significativos en el medio ambiente, la salud pública y la agricultura [42]. Por ello, es crucial controlar su dispersión en cuerpos de agua. En [102] se menciona que, al usar estrategias de alimentación única como en la PTAR de estudio, es común observar cantidades sustanciales de este contaminante en el efluente, ya que en la fase anóxica donde ocurre la desnitrificación endógena, la materia orgánica puede llegar a reducir hasta que no quede un donante de electrones orgánico; afectando de esta forma la eficiente transformación del NO_3^- [103]. Además, para mejorar el proceso desnitrificación, en [89] se menciona que la alimentación por etapas mejoraría las eficiencias de remoción del nitrógeno inorgánico soluble (NH_4^+ y NO_3^-) en un 93% y 89%, respectivamente, sin agregar una fuente externa de carbono o energía.

Por otra parte, dado que se ha observado que la liberación secundaria de fósforo puede ocurrir en la fase de sedimentación, especialmente en sistemas donde las PAOs son predominantes, es crucial determinar si la PTAR de estudio está utilizando EBPR por medio de un análisis de las comunidades microbianas presentes en el sistema. De esta forma, se podrían identificar factores que puedan estar contribuyendo a la posible liberación secundaria de fósforo, permitiendo ajustes en el proceso para mejorar la calidad del efluente.

Finalmente, asociado al tercer objetivo específico, se recomienda incluir métodos de desinfección como tratamiento terciario con el fin de reducir la abundancia de ARGs en el efluente final de la PTAR. Este tipo de intervención es crucial debido al riesgo de diseminación de ARGs en cuerpos de agua receptores. Estudios previos han demostrado la efectividad de diversos métodos de desinfección en la reducción de ARGs. En [104], por ejemplo, se demostró que la abundancia de ARGs disminuyó exponencialmente a medida que se aumentó la dosis de luz ultravioleta (UV), luego disminuyó linealmente a medida que se aumentaba la concentración de cloro y, por último, la eficiencia de eliminación de ARGs fue mayor con una desinfección de ozono (O₃).

Respecto a los desafíos relacionados con la inhibición en los ensayos de qPCR, se recomienda considerar la implementación de métodos que incluyan estándares internos o pasos de dilución. En [105] se menciona que muchos laboratorios ambientales que utilizan qPCR han intentado controlar y comprender la inhibición por medio de un estándar interno de recuperación. Esto podría tomar la forma de una reacción multiplex como el ensayo SPUD, en el cual se utilizan cebadores diseñados específicamente para amplificar un fragmento de ADN que no se encuentra en las muestras; con el fin de mantener un control interno, detectar inhibidores y validar los resultados obtenidos [105]. Otro enfoque común, encontrado en [106] y [107], es diluir las muestras hasta el punto en que la inhibición ya no afecte el ensayo, lo que disminuye el impacto consecuente de los inhibidores.

Adicionalmente, asociado al segundo y al tercer objetivo específico, es recomendable analizar la temperatura del agua. A partir de esto se podría determinar si las condiciones relacionadas con los procesos biológicos que ocurren dentro del sistema de tratamiento, como la actividad microbiana que aumenta la carga de ARGs o que genera la liberación secundaria de fósforo, están modulados por la temperatura.

8. REFERENCIAS

- [1] N. Wu *et al*, "New insight into the bioaccumulation and trophic transfer of free and conjugated antibiotics in an estuarine food web based on multimedia fate and model simulation", *J. Hazard. Mater.*, vol. 465, pp. 133088, 2024. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2023.133088.
- [2] D. Julian and D. Dorothy, "Origins and Evolution of Antibiotic Resistance", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 74, (3), pp. 417–433, 2010. DOI: 10.1128/mubr.00016-10.
- [3] L. J. Shallcross *et al*, "Tackling the threat of antimicrobial resistance: from policy to sustainable action", *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 370, (1670), pp. 20140082, 2015. DOI: 10.1098/rstb.2014.0082.
- [4] D. J. Hong *et al*, "Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*", *Infect Chemother*, vol. 47, (2), pp. 81–97, 2015. DOI: 10.3947/ic.2015.47.2.81.
- [5] K. Barrantes Jiménez, L. Chacón Jiménez and M. Arias, "El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible", *Revista UCR*, 2022. DOI: 10.15517/psm.v0i19.47590.
- [6] T. Srathongneam *et al*, "High throughput qPCR unveils shared antibiotic resistance genes in tropical wastewater and river water", *Sci. Total Environ.*, vol. 908, pp. 167867, 2024. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.167867.
- [7] D. Wu, J. Dolfing and B. Xie, "Bacterial perspectives on the dissemination of antibiotic resistance genes in domestic wastewater bio-treatment systems: beneficiary to victim", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, (2), pp. 597–604, 2018. DOI: 10.1007/s00253-017-8665-y.
- [8] C. U. Schwermer and W. Uhl, "Calculating expected effects of treatment effectivity and river flow rates on the contribution of WWTP effluent to the ARG load of a receiving river", *J. Environ. Manage.*, vol. 288, pp. 112445, 2021. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.112445.
- [9] K. Hardy *et al*, "Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus", *Naturwissenschaften*, vol. 99, (8), pp. 617–626, 2012. DOI: 10.1007/s00114-012-0942-0.
- [10] J. M. Munita and C. A. Arias, "Mechanisms of antibiotic resistance", in *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 2016. DOI: 10.1128/9781555819286.ch17.
- [11] J. L. Martinez, "Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants", *Environ. Pollut.*, vol. 157, (11), pp. 2893–2902, 2009. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.05.051.

- [12] B. Jiang *et al*, "Microbial extracellular vesicles contribute to antimicrobial resistance", *PLoS Pathog*, vol. 20, (5), 2024. DOI: 10.1371/journal.ppat.1012143.
- [13] E. Marti and J. L. Balcázar, "Chapter 19 - Antibiotic Resistance in the Aquatic Environment", *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 62, pp. 671–684, 2013. DOI: 10.1016/B978-0-444-62657-8.00019-7.
- [14] Z. Jian *et al*, "Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control", *J. Basic Microbiol.*, vol. 61, (12), pp. 1049–1070, 2021. DOI: 10.1002/jobm.202100201.
- [15] W. C. Ratcliff and R. F. Denison, "Microbiology. Alternative actions for antibiotics", *Science*, vol. 332, (6029), pp. 547–548, 2011. DOI: 10.1126/science.1205970.
- [16] D. W. Graham *et al*, "Appearance of β -lactam Resistance Genes in Agricultural Soils and Clinical Isolates over the 20th Century", *Scientific Reports*, vol. 6, (1), pp. 21550, 2016. DOI: 10.1038/srep21550.
- [17] E. C. Pehrsson *et al*, "Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats", *Nature*, vol. 533, (7602), pp. 212–216, 2016. DOI: 10.1038/nature17672.
- [18] T. Ternes, "Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances - The Challenge of Micropollutants in Urban Water Management", *Water Intelligence Online*, vol. 5, 2006. DOI: 10.2166/9781780402468.
- [19] T. P. Van Boeckel *et al*, "Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data", *Lancet Infect. Dis.*, vol. 14, (8), pp. 742–750, 2014. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7.
- [20] E. Y. Klein *et al*, "Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, (15), pp. 3463–3470, 2018. DOI: 10.1073/pnas.1717295115.
- [21] M. Saleem *et al*, "Antibiotics Overuse and Bacterial Resistance", *Annals of Microbiology and Research*, vol. 3, 2019. DOI: 10.36959/958/573.
- [22] C. A. Michael, D. Dominey-Howes and M. Labbate, "The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management", *Front. Public Health.*, vol. 2, pp. 145, 2014. DOI: 10.3389/fpubh.2014.00145.
- [23] C. Luyt *et al*, "Antibiotic stewardship in the intensive care unit", *Crit. Care*, vol. 18, (5), pp. 480–6, 2014. DOI: 10.1186/s13054-014-0480-6.
- [24] E. Zavaleta *et al*, "Antibiotic Consumption in Primary Care in Costa Rica and Italy: A Retrospective Cross-Country Analysis", *Cureus*, vol. 15, (7), pp. 41414, 2023. DOI: 10.7759/cureus.41414.

- [25] J. P. Díaz-Madriz *et al*, "Impact of a pharmacist-driven antimicrobial stewardship program in a private hospital in Costa Rica," *Pan American Journal of Public Health*, 2020. DOI: 10.26633/RPSP.2020.57.
- [26] Ministerio de Salud de Costa Rica, "Plan de acción nacional de lucha contra la resistencia a los antimicrobianos Costa Rica 2018-2025", 2018. [En línea]. Disponible: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos-left/documentos-ministerio-de-salud/vigilancia-de-la-salud/normas-protocolos-guias-y-lineamientos/resistencia-a-los-antimicrobianos>
- [27] K. M. M. Pärnänen *et al*, "Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence", *Sci. Adv.*, vol. 5, (3), pp. 9124, 2019. DOI: 10.1126/sciadv.aau9124.
- [28] P. K. Jjemba, "Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment", *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 63, (1), pp. 113–130, 2006. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2004.11.011.
- [29] M. Quintela-Baluja *et al*, "Spatial ecology of a wastewater network defines the antibiotic resistance genes in downstream receiving waters", *Water Res.*, vol. 162, pp. 347–357, 2019. DOI: 10.1016/j.watres.2019.06.075.
- [30] X. Guo *et al*, "Behavior of antibiotic resistance genes under extremely high-level antibiotic selection pressures in pharmaceutical wastewater treatment plants", *Sci. Total Environ.*, vol. 612, pp. 119–128, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.229.
- [31] D. Bendz *et al*, "Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden", *J. Hazard. Mater.*, vol. 122, (3), pp. 195–204, 2005. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2005.03.012.
- [32] A. Gulkowska *et al*, "Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China", *Water Res.*, vol. 42, (1-2), pp. 395–403, 2008. DOI: 10.1016/j.watres.2007.07.031.
- [33] L. Lishman *et al*, "Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada", *Sci. Total Environ.*, vol. 367, (2-3), pp. 544–558, 2006. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2006.03.021.
- [34] J. Li *et al*, "Antibiotic-resistant genes and antibiotic-resistant bacteria in the effluent of urban residential areas, hospitals, and a municipal wastewater treatment plant system", *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 22, (6), pp. 4587–4596, 2015. DOI: 10.1007/s11356-014-3665-2.
- [35] B. Yadav and R. D. Tyagi, "11 - development of molecular methods to detect and control emerging drug-resistance pathogens", in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-819722-6.00011-0.

- [36] X. Zhang, T. Zhang and H. H. P. Fang, "Antibiotic resistance genes in water environment", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 82, (3), pp. 397–414, 2009. DOI: 10.1007/s00253-008-1829-z.
- [37] M. Hazra *et al*, "An evaluation of conventional and nature-based technologies for controlling antibiotic-resistant bacteria and antibiotic-resistant genes in wastewater treatment plants", *Sci. Total Environ.*, vol. 917, pp. 170433, 2024. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.170433.
- [38] C. J. L. Murray *et al*, "Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis", *The Lancet*, vol. 399, (10325), pp. 629–655, 2022. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- [39] Ortiz and Ariana, "Diagnóstico Y Propuesta De Mejoras De La Planta De Tratamiento De Aguas Residuales De La Municipalidad De La Unión, En La Comunidad De Monserrat En Concepción, Cartago", Tesis de licenciatura, Esc. Ing. Ambiental, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 2016.
- [40] K. V. Gernaey *et al*, "Activated sludge wastewater treatment plant modelling and simulation: state of the art", *Environmental Modelling & Software*, vol. 19, (9), pp. 763–783, 2004. DOI: 10.1016/j.envsoft.2003.03.005.
- [41] H. Gulhan *et al*, "Use of water treatment plant sludge in high-rate activated sludge systems: A techno-economic investigation", *Sci. Total Environ.*, vol. 901, pp. 166431, 2023. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.166431.
- [42] George Tchabnoglous, Franklin L Burton and H David Stensel, *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*. Republic of China: McGraw-Hill Companies, 2003.
- [43] R. L. Irvine, L. H. Ketchum Jr. and T. Asano, "Sequencing batch reactors for biological wastewater treatment", *Critical Reviews in Environmental Control*, vol. 18, (4), pp. 255–294, 1989. DOI: 10.1080/10643388909388350.
- [44] S. Jafarinejad, "Recent developments in the application of sequencing batch reactor (SBR) technology for the petroleum industry wastewater treatment", *Chemistry International*, vol. 3, 2017. [En línea] Disponible: https://www.researchgate.net/publication/314002170_Recent_developments_in_the_application_of_sequencing_batch_reactor_SBR_technology_for_the_petroleum_industry_wastewater_treatment
- [45] J. Munoz Paredes and R. Ramos, "Reactores discontinuos secuenciales: Una tecnología versátil en el tratamiento de aguas residuales", *Ciencia E Ingeniería Neogranadina*, vol. 24, pp. 49–66, 2014. DOI: 10.18359/rcin.7.

- [46] S. Ishak, A. Malakahmad and M. H. Isa, "Refinery wastewater biological treatment: A short review", *Journal of Scientific and Industrial Research*, vol. 71, 2012. [En línea] Disponible: <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1870011>
- [47] D. M. Singh and D. R. Srivastava, "Sequencing Batch Reactor Technology for Biological Wastewater Treatment: A Review", *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, vol. 6, pp. 3–13, 2011. DOI: 10.1002/apj.490.
- [48] Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas Residuales, N° 33601, Sistema Costarricense de Información Jurídica, Costa Rica, 2024. [En línea]. Disponible: https://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=59524&nValor3=83250&strTipM=TC.
- [49] Laboratorio de Suministros y Servicios Integrales, "Informe de ensayo", La Unión de Cartago, Costa Rica. RRRO-704-15-AR, 2021.
- [50] Laboratorio de Suministros y Servicios Integrales, "Informe de ensayo", La Unión de Cartago, Costa Rica. RRRO-120-07-AR, 2022.
- [51] Laboratorio de Suministros y Servicios Integrales, "Informe de ensayo", La Unión de Cartago, Costa Rica. RRRO-388-09-AR, 2023.
- [52] Z. Wang *et al*, "The factors controlling antibiotic resistance genes in different treatment processes of mainstream full-scale wastewater treatment plants", *Sci. Total Environ.*, vol. 900, pp. 165815, 2023. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.165815.
- [53] K. Qin *et al*, "A review of ARGs in WWTPs: Sources, stressors and elimination", *Chinese Chemical Letters*, vol. 31, (10), pp. 2603–2613, 2020. DOI: 10.1016/j.ccllet.2020.04.057.
- [54] E. Grohmann and K. Arends, "Molecular detection of resistance and transfer genes in environmental samples", in *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development*, 2012. DOI: 10.1007/978-94-007-1591-2_5.
- [55] D. G. Ginzinger, "Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream", *Exp. Hematol.*, vol. 30, (6), pp. 503–512, 2002. DOI: 10.1016/S0301-472X(02)00806-8.
- [56] L. G. Leff, K. Fasina and J. Engohang-Ndong, "Detecting antibiotic resistance genes in anthropogenically impacted streams and rivers", *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 79, pp. 102878, 2023. DOI: 10.1016/j.copbio.2022.102878.
- [57] E. W. Rice, R.B. Eaton and L.S. Clesceri, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 24 ed., Washington DC, USA: American Public Health Association, American Water Works and Water Environment Federation, 2022.

- [58] L. Xu *et al*, "Use of synthesized double-stranded gene fragments as qPCR standards for the quantification of antibiotic resistance genes", *J. Microbiol. Methods*, vol. 164, pp. 105670, 2019. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.105670.
- [59] I. Keenum *et al*, "A framework for standardized qPCR-targets and protocols for quantifying antibiotic resistance in surface water, recycled water and wastewater", *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, vol. 52, (24), pp. 4395–4419, 2022. DOI: 10.1080/10643389.2021.2024739.
- [60] R. Tolosi *et al*, "Optimization of five qPCR protocols toward the detection and the quantification of antimicrobial resistance genes in environmental samples", *Methods X*, vol. 8, 2021. DOI: 10.1016/j.mex.2021.101488.
- [61] L. Chacón *et al*, "Short-term exposure to benzalkonium chloride in bacteria from activated sludge alters the community diversity and the antibiotic resistance profile", *J Water Health*, vol. 19, (6), pp. 895–906, 2021. DOI: 10.2166/wh.2021.171.
- [62] M. Mukherjee *et al*, "Increased Antimicrobial and Multidrug Resistance Downstream of Wastewater Treatment Plants in an Urban Watershed", *Front. Microbiol.*, vol. 12, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.657353.
- [63] T. Srathongneam *et al*, "High throughput qPCR unveils shared antibiotic resistance genes in tropical wastewater and river water", *Sci. Total Environ.*, vol. 908, pp. 167867, 2024. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.167867.
- [64] Y. Cuetero-Martínez *et al*, "Removal of intI1, ARGs, and SARS-CoV-2 and changes in bacterial communities in four sewage treatment facilities", *Sci. Total Environ.*, vol. 903, pp. 165984, 2023. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.165984.
- [65] D. Mao *et al*, "Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants", *Water Res.*, vol. 85, pp. 458–466, 2015. DOI: 10.1016/j.watres.2015.09.010.
- [66] J. Alexander *et al*, "Microbiological characterization of aquatic microbiomes targeting taxonomical marker genes and antibiotic resistance genes of opportunistic bacteria", *Sci. Total Environ.*, vol. 512-513, pp. 316–325, 2015. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.01.046.
- [67] S. Sczesny, H. Nau and G. Hamscher, "Residue Analysis of Tetracyclines and Their Metabolites in Eggs and in the Environment by HPLC Coupled with a Microbiological Assay and Tandem Mass Spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, (3), pp. 697–703, 2003. DOI: 10.1021/jf0258407.
- [68] A. Göbel *et al*, "Occurrence and Sorption Behavior of Sulfonamides, Macrolides, and Trimethoprim in Activated Sludge Treatment", *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, (11), pp. 3981–3989, 2005. DOI: 10.1021/es048550a.

- [69] A. L. Spongberg *et al*, "Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters", *Water Res.*, vol. 45, (20), pp. 6709–6717, 2011. DOI: 10.1016/j.watres.2011.10.004.
- [70] I. Mulder *et al*, "Quaternary ammonium compounds in soil: implications for antibiotic resistance development", *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 17, (1), pp. 159–185, 2018. DOI: 10.1007/s11157-017-9457-7.
- [71] Z. Lu *et al*, "Quaternary ammonium compounds in disinfectant products: evaluating the potential for promoting antibiotic resistance and disrupting wastewater treatment plant performance", *Environmental Science Advances*, vol. 3, (2), pp. 208–226, 2024. DOI: 10.1039/d3va00063j.
- [72] H. Xu *et al*, "Antibiotic Resistance Gene-Carrying Plasmid Spreads into the Plant Endophytic Bacteria using Soil Bacteria as Carriers", *Environ. Sci. Technol.*, vol. 55, (15), pp. 10462–10470, 2021. DOI: 10.1021/acs.est.1c01615.
- [73] S. Chen *et al*, "Class 1 integron carrying qacEΔ1 gene confers resistance to disinfectant and antibiotics in Salmonella", *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 404, pp. 110319, 2023. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110319.
- [74] Y. Li *et al*, "Molecular characterisation of antimicrobial resistance determinants and class 1 integrons of Salmonella enterica subsp. enterica serotype Enteritidis strains from retail food in China", *Food Control*, vol. 128, pp. 108191, 2021. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108191.
- [75] B. Liu *et al*, "Occurrence and removal prediction of pharmaceuticals positively correlated with antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes", *Environmental Technology & Innovation*, vol. 32, pp. 103425, 2023. DOI: 10.1016/j.eti.2023.103425.
- [76] S. Niestępski *et al*, "Environmental fate of Bacteroidetes, with particular emphasis on Bacteroides fragilis group bacteria and their specific antibiotic resistance genes, in activated sludge wastewater treatment plants", *J. Hazard. Mater.*, vol. 394, pp. 122544, 2020. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122544.
- [77] L. Zhang *et al*, "Mass-immigration shapes the antibiotic resistome of wastewater treatment plants", *Sci. Total Environ.*, vol. 908, pp. 168193, 2024. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.168193.
- [78] N. A. Sabri *et al*, "Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 8, (1), pp. 102245, 2020. DOI: 10.1016/j.jece.2018.03.004.

- [79] X. Jiang *et al*, "Antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in a rural river in Southeast China: Occurrence, seasonal variation and association with the antibiotics", *Sci. Total Environ.*, vol. 778, pp. 146131, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146131.
- [80] M. Harnisz *et al*, "The impact of WWTP size and sampling season on the prevalence of antibiotic resistance genes in wastewater and the river system", *Sci. Total Environ.*, vol. 741, pp. 140466, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140466.
- [81] L. Sun, E. Y. Klein and R. Laxminarayan, "Seasonality and temporal correlation between community antibiotic use and resistance in the United States", *Clin. Infect. Dis.*, vol. 55, (5), pp. 687–694, 2012. DOI: 10.1093/cid/cis509.
- [82] K. J. Suda *et al*, "Trends and seasonal variation in outpatient antibiotic prescription rates in the United States, 2006 to 2010", *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, (5), pp. 2763–2766, 2014. DOI: 10.1128/AAC.02239-13.
- [83] S. S. Askari *et al*, "Enhancing sequencing batch reactors for efficient wastewater treatment across diverse applications: A comprehensive review", *Environ. Res.*, vol. 260, pp. 119656, 2024. DOI: 10.1016/j.envres.2024.119656.
- [84] D. P. Whichard, "Nitrogen Removal from Dairy Manure Wastewater using Sequencing Batch Reactors", 2001. [En línea]. Disponible: <https://vtechworks.lib.vt.edu/items/ec3de516-a2ab-484a-9876-9175ca3ff897>
- [85] J. Colomer *et al*, "Qualitative estimation of SBR biological nutrient removal performance for wastewater treatment", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 88, (7), pp. 1305–1313, 2013. DOI: 10.1002/jctb.3976.
- [86] D. Li *et al*, "Performance and operational strategy of simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal system under the condition of low organic loading rate in wet weather", *Chemosphere*, vol. 270, pp. 129464, 2021. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129464.
- [87] C. López *et al*, "Tratamiento Biológico De Aguas Residuales: Principios, Modelación Y Diseño", *IWA*, vol 16, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2166/9781780409146>.
- [88] U. Showkat and I. A. Najar, "Study on the efficiency of sequential batch reactor (SBR)-based sewage treatment plant", *Applied Water Science*, vol. 9, (1), pp. 2, 2018. DOI: 10.1007/s13201-018-0882-8.
- [89] D. Mulkerrins *et al*, "Evaluation of the parameters affecting nitrogen and phosphorus removal in anaerobic/anoxic/oxic (A/A/O) biological nutrient removal systems", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 75, (4), pp. 261–268, 2000. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4660(200004)75:4.

- [90] A. Mikola, J. Rautiainen and R. Vahala, "Secondary clarifier conditions conducting to secondary phosphorus release in a BNR plant", *Water Sci. Technol.*, vol. 60, (9), pp. 2413–2418, 2009. DOI: 10.2166/wst.2009.601.
- [91] Minnesota Pollution Control Agency, "Phosphorus Treatment and Removal Technologies", 2006. [En línea]. Disponible: <https://www.pca.state.mn.us/sites/default/files/wq-wwtp9-02.pdf>
- [92] G. T. Daigger and H. X. Littleton, "Simultaneous biological nutrient removal: a state-of-the-art review", *Water Environ. Res.*, vol. 86, (3), pp. 245–257, 2014. DOI: 10.2175/106143013x13736496908555.
- [93] W. Ben *et al*, "Distribution of antibiotic resistance in the effluents of ten municipal wastewater treatment plants in China and the effect of treatment processes", *Chemosphere*, vol. 172, pp. 392–398, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.041.
- [94] Z. Shamsizadeh *et al*, "Wastewater surveillance of antibiotic resistance and class 1 integron-integrase genes: Potential impact of wastewater characteristics on genes profile", *Heliyon*, vol. 10, (9), pp. 29601, 2024. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e29601.
- [95] M. Foroughi *et al*, "Effect of ozonation-based disinfection methods on the removal of antibiotic resistant bacteria and resistance genes (ARB/ARGs) in water and wastewater treatment: a systematic review", *Sci. Total Environ.*, vol. 811, pp. 151404, 2022. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.151404.
- [96] L. Zhang *et al*, "Antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in different rivers: The link with antibiotics, microbial communities, and human activities", *Sci. Total Environ.*, vol. 919, pp. 170788, 2024. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.170788.
- [97] H. Yang *et al*, "The fate of antibiotic resistance genes and their correlation with microbial communities and wastewater quality/parameters in a wastewater treatment plant under different seasons", *Journal of Water Process Engineering*, vol. 60, pp. 105156, 2024. DOI: 10.1016/j.jwpe.2024.105156.
- [98] M. C. Dodd, "Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment", *J. Environ. Monit.*, vol. 14, (7), pp. 1754–1771, 2012. DOI: 10.1039/C2EM00006G.
- [99] C. W. McKinney and A. Pruden, "Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater", *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, (24), pp. 13393–13400, 2012. DOI: 10.1021/es303652q.
- [100] C. Schrader *et al*, "PCR inhibitors – occurrence, properties and removal", *J. Appl. Microbiol.*, vol. 113, (5), pp. 1014–1026, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.

- [101] M. Sidstedt, P. Rådström and J. Hedman, "PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions", *Anal. Bioanal Chem.*, vol. 412, (9), pp. 2009–2023, 2020. DOI: 10.1007/s00216-020-02490-2.
- [102] B. S. Akin and A. Ugurlu, "The effect of an anoxic zone on biological phosphorus removal by a sequential batch reactor", *Bioresour. Technol.*, vol. 94, (1), pp. 1–7, 2004. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.11.022.
- [103] S. Puig *et al*, "Biological nutrient removal by applying SBR technology in small wastewater treatment plants: carbon source and C/N/P ratio effects", *Water Sci. Technol.*, vol. 55, (7), pp. 135–141, 2007. DOI: 10.2166/wst.2007.137.
- [104] J. Zheng *et al*, "Effects and mechanisms of ultraviolet, chlorination, and ozone disinfection on antibiotic resistance genes in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants", *Chem. Eng. J.*, vol. 317, pp. 309–316, 2017. DOI: 10.1016/j.cej.2017.02.076.
- [105] T. Nolan *et al*, "SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations", *Anal. Biochem.*, vol. 351, (2), pp. 308–310, 2006. DOI: 10.1016/j.ab.2006.01.051.
- [106] S. Schneider, J. Enkerli and F. Widmer, "A generally applicable assay for the quantification of inhibitory effects on PCR", *J. Microbiol. Methods*, vol. 78, (3), pp. 351–353, 2009. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.06.010.
- [107] H. Wang *et al*, "A re-evaluation of dilution for eliminating PCR inhibition in soil DNA samples", *Soil Biol. Biochem.*, vol. 106, pp. 109–118, 2017. DOI: 10.1016/j.soilbio.2016.12.011.
- [108] M. C. Roberts, "Update on acquired tetracycline resistance genes", *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 245, (2), pp. 195–203, 2005. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.02.034.
- [109] B. Vakulenko Sergei and M. Shahriar, "Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future", *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 16, (3), pp. 430–450, 2003. DOI: 10.1128/cmr.16.3.430-450.2003.
- [110] M. C. Roberts, "Update on macrolide–lincosamide–streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes", *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 282, (2), pp. 147–159, 2008. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01145.x.
- [111] S. Schwarz *et al*, "Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol", *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 28, (5), pp. 519–542, 2004. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.04.001.

[112] P. Messi *et al*, "Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples", *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 107, (2), pp. 218–222, 2006. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.026.

[113] Ola Sköld, "Resistance to trimethoprim and sulfonamides", *Vet.Res.*, vol. 32, (3-4), pp. 261–273, 2001. DOI: 10.1051/vetres:2001123.

[114] X. Li *et al*, " β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin", *Vet. Microbiol.*, vol. 121, (3), pp. 197–214, 2007. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.01.015.

[115] G. D. Wright, "Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, (10), pp. 1451–1470, 2005. DOI: 10.1016/j.addr.2005.04.002.

[116] A. Kumar and H. P. Schweizer, "Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, (10), pp. 1486–1513, 2005. DOI: 10.1016/j.addr.2005.04.004.

APÉNDICES

9. APÉNDICE I. ARGs ASOCIADOS A ANTIBIÓTICOS

La resistencia a un antibiótico en específico puede estar asociada con distintos ARGs que confieren uno o más mecanismos de resistencia. En el Cuadro 8.1. se detallan algunos ARGs y los mecanismos asociados a su resistencia.

Cuadro 9.1. Principales ARGs relacionados con antibióticos distintivos.

	Descripción	Referencia
ARGs relacionados con la resistencia a tetraciclinas	Se encontró que las bacterias resistentes a la tetraciclina emergen en entornos donde se haya introducido previamente dicho antibiótico. Se han caracterizado alrededor de 38 genes de resistencia a la tetraciclina (<i>tet</i>) y tres genes de resistencia a la oxitetraciclina (<i>otr</i>). De estos, 23 genes codifican proteínas asociadas a las bombas de eflujo, 11 genes para proteínas asociadas al mecanismo de modificación del sitio activo, tres para una enzima de inactivación y un gene para un mecanismo de resistencia no identificado.	[108]
ARGs relacionados a aminoglucósidos	El mecanismo más importante asociado a la resistencia de este fármaco es la desactivación directa por medio de modificación enzimática. Se han encontrado más de 50 enzimas de modificación, las cuales se dividen en tres grupos según sus acciones bioquímicas sobre los distintos sustratos. Estas enzimas están codificadas por tres tipos de genes: <i>aac</i> (acetiltransferasas), <i>aph</i> (fosfotrasferasas) y <i>ant/aad</i> (adeniltransferasas).	[109]
ARGs asociados a macrólidos-lincosamidas-estreptograminas	Aunque estructuralmente no estén relacionados entre sí, la resistencia a los macrólidos-lincosamidas-estreptograminas (MLS) se investiga simultáneamente, ya que algunos genes de resistencia a los macrólidos (<i>erm</i>) codifican resistencia a dos e incluso a los tres compuestos. Hay más de 60 genes diferentes que confieren la resistencia a este grupo de antibióticos y suelen ser adquiridos por medio de elementos móviles como plásmidos y transposones.	[110]
	Los mecanismos responsables de las resistencias al cloranfenicol y al florfenicol incluyen cloranfenicol acetiltransferasas (codificadas por los genes <i>cat</i>), exportadores específicos (codificados por los genes <i>cml</i>) y transportadores de múltiples fármacos.	

ARGs asociados a cloranfenicol		[111]
ARGs asociados a vancomicina	Se han identificado alrededor de seis tipos de genes asociados a la resistencia de la vancomicina (<i>van</i>), siendo <i>vanA</i> y <i>vanB</i> los genes predominantes en ambientes acuáticos.	[112]
ARGs asociados a sulfonamidas y a trimetoprimas	Esta resistencia suele estar codificada por mutaciones ubicadas en áreas conservadas de la dihidropteroato sintasa de las sulfonamidas, a partir del gen DHSP (<i>suI</i>), y de la dihidrofolato reductasa de las trimetoprimas, a partir del gen DHFR (<i>dfr</i>). Los genes <i>suI</i> suelen ser transmitidos por medio del <i>intI1</i> , mientras que los genes <i>dfr</i> por medio del <i>intI2</i> .	[113]
ARGs asociados a β -lactámicos	Se han identificado más de 400 β -lactamasas diferentes codificadas por cientos de genes (<i>bla</i>). Estas enzimas se dividen en cuatro clases moleculares (A, B, C y D), que median resistencias a una amplia gama de β -lactámicos; incluyendo penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas.	[114]

10. APÉNDICE II. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Hay una amplia diversidad de genes que pueden codificar una gran variedad de mecanismos que permiten a las ARBs adaptarse para sobrevivir [9]. Estas adaptaciones están asociadas a uno o más ARGs, por lo que, al estudiar un gen en específico, también se examinan los mecanismos asociados a este e incluyen principalmente los siguientes mecanismos [92], [115], [116]:

10.1. MODIFICACIÓN DEL SITIO ACTIVO

Corresponde a una mutación puntual en un gen determinado, lo cual resulta en un mecanismo rápido y fácil con un impacto mínimo en la célula. Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* puede generar pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos, lo que altera su estructura proteica de tal forma que impide la correcta unión del antibiótico.

10.2. BYPASS MOLECULAR

Este mecanismo consiste en la activación de vías metabólicas alternativas o la modificación de vías existentes que no son sensibles al antibiótico. Un ejemplo es la resistencia a antibióticos glucopéptidos como la vancomicina. Este es un proceso complejo y requiere de la acción de varios genes específicos.

10.3. BOMBAS DE EFLUJO

En la célula de algunas familias, se encuentran ciertas proteínas que son capaces de transportar el antibiótico hacia el exterior sin modificaciones y sin sufrir de la acción bactericida.

10.4. INACTIVACIÓN DEL ANTIBIÓTICO POR MEDIO DE HIDRÓLISIS

La inactivación de los fármacos por medio de la síntesis de enzimas es uno de los mecanismos más frecuentes. Especialmente la producción de la enzima β -lactamasa que hidroliza la unión peptídica del anillo β -lactámico del antimicrobiano, inhibiendo de esta forma su acción bactericida.

10.5. ALTERACIONES ESTRUCTURALES DE LA MEMBRANA CELULAR

Las bacterias pueden reducir la entrada de antibióticos a través de sus membranas celulares, disminuyendo así la cantidad de antibiótico que ingresa a la célula.

10.6. DESACTIVACIÓN DEL ANTIBIÓTICO POR MEDIO DE MODIFICACIÓN QUÍMICA

Enzimas bacterianas modifican la molécula del antibiótico por medio de la adición o eliminación de grupos químicos cruciales, desactivando su capacidad de interactuar con el microorganismo.

11. APÉNDICE III. ARGs PREVALENTES EN FUENTES AMBIENTALES DE INTERÉS

En el siguiente cuadro se presenta una lista detallada de los ARGs más prevalentes encontrados en diversas matrices ambientales de interés para esta investigación, relacionadas con las aguas residuales.

Cuadro 11.1. ARGs asociados a antibióticos en ambientes de interés [13], [14].

Gen	Fuente biológica	Fuente ambiental
ARGs fluoroquinolones		
<i>qnrB</i>	<i>E. coli</i> , <i>Citrobacter</i>	E
<i>qnrVC</i>	<i>Aeromonas</i> , <i>Vibrio</i>	E
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>Aeromonas</i> , <i>E. coli</i> , comunidad microbiana	E
ARGs rifamicina		
<i>arr-3</i>	<i>Aeromonas</i> , comunidad microbiana	E
ARGs tetraciclinas		
<i>tetA</i>	<i>Aeromonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Listeria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> and <i>Vibrio</i> ; plásmidos pB10, pTB11 y pRSB101	A, LA, E
<i>tetB</i>	<i>Afipia</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Vibrio</i>	A, LA, E
<i>tetC</i>	<i>Aeromonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Pseudomonas</i>	A, LA, E
<i>tetD</i>	<i>Aeromonas</i> , <i>Escherichia</i> , comunidad microbiana	A, LA, E
<i>tetE</i>	<i>Aeromonas</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Vibrio</i>	A, LA, E
<i>tetG</i>	<i>Pseudomonas</i> , comunidad microbiana	A, LA, E
<i>tetM</i>	<i>Aeromonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Vibrio</i> , comunidad microbiana	A, LA, E
<i>tetO</i>	<i>Paenibacillus</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Sporosarcina</i> , <i>Vibrio</i> , comunidad microbiana	A, LA, E
<i>tetQ</i>	Comunidad microbiana	A, LA, E

<i>tetS</i>	<i>Lactococcus, Vibrio</i> , comunidad microbiana	A, LA, E
<i>tetW</i>	comunidad microbiana	E
<i>otrA</i>	<i>Streptomyces</i> , comunidad microbiana	LA
<i>otrB</i>	<i>Streptomyces</i>	LA
ARGs aminoglucósidos		
<i>aacA4</i>	Plásmido <i>pTB11</i>	LA
<i>aacA29b</i>	Plásmido <i>pTB11</i>	LA
<i>aacC1</i>	Comunidad microbiana	A
<i>aacC2</i>	Comunidad microbiana	A
<i>aacC3</i>	Comunidad microbiana	A
<i>aacC4</i>	Comunidad microbiana	A
<i>aadA1</i>	<i>Aeromonas, Citrobacter, Shigella</i> , plásmido <i>pTB11</i>	A, LA, E
<i>aadA2</i>	<i>Aeromonas, Escherichia, Vibrio</i> ; plásmidos <i>pB2, pB3</i> y <i>pTB11</i>	A, LA
<i>aadA4</i>	Plásmido <i>pB8</i>	LA
<i>aadA5</i>	<i>Escherichia, Vibrio</i> ; plásmido <i>pTB11</i>	LA
<i>aadB</i>	<i>Aeromonas, E. coli</i>	LA
<i>aphD</i>	Comunidad microbiana	A
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>Aeromonas, E. coli</i> , comunidad microbiana	E
<i>sat1</i> y <i>sat2</i>	<i>Aeromonas, E. coli</i>	E
<i>strA</i>	<i>Listeria, Salmonella, Vibrio</i> ; plásmidos <i>pB4</i> y <i>pB10</i>	LA
<i>strB</i>	<i>Salmonella, Vibrio</i> ; plásmidos <i>pB4</i> y <i>pB10</i>	LA
ARGs MLS		
<i>ermA</i>	<i>Enterococcus</i>	E
<i>ermB</i>	<i>Bacillus, Enterococcus</i>	E

<i>ermC</i>	<i>Comunidad microbiana</i>	<i>E</i>
<i>ermF</i>	<i>Comunidad microbiana</i>	<i>E</i>
<i>ermT</i>	<i>Comunidad microbiana</i>	<i>E</i>
<i>ermX</i>	<i>Comunidad microbiana</i>	<i>E</i>
<i>mphA</i>	<i>Plásmido pRSB101</i>	<i>LA</i>
<i>mefA</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>E</i>
<i>mphA-mrx-mphR</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>E</i>
ARGs cloranfenicol		
<i>cmlA1</i>	<i>Plásmidos pB2 y pB3</i>	<i>LA</i>
<i>cmlA5</i>	<i>Plásmido pTB11</i>	<i>LA</i>
<i>catB2</i>	<i>Plásmido pTB11</i>	<i>LA</i>
<i>catB3</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>E</i>
<i>catII</i>	<i>Aeromonas, comunidad bacteriana</i>	<i>E</i>
ARGs vancomicina		
<i>vanA</i>	<i>Enterococcus, Staphylococci</i>	<i>E</i>
<i>vanB</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>E</i>
ARGs trimetropina		
<i>dfrA1</i>	<i>Aeromonas, E. coli</i>	<i>E</i>
<i>dfrA12</i>	<i>E. coli</i>	<i>E</i>
<i>dfrA13</i>	<i>E. coli</i>	<i>E</i>
<i>dfrA15</i>	<i>Vibrio</i>	<i>E</i>
ARGs sulfonamida		
<i>sulI</i>	<i>Aeromonas, Escherichia, Listeria, comunidad microbiana; plásmidos pB2, pB3, pB8, y pB10</i>	<i>LA</i>
<i>sulII</i>	<i>Aeromonas, E. coli, comunidad microbiana</i>	<i>E</i>

ARGs β -lactámicos

<i>ampC</i>	<i>Enterobacter, Salmonella</i>	A
<i>blaPSE-1</i>	<i>Aeromonas, Salmonella, Vibrio</i>	A
<i>blaCTX-M</i>	<i>E. coli</i>	E
<i>blaIMP</i>	<i>Pseudomonas</i>	E
<i>blaKPC</i>	<i>Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter</i>	E
<i>blaOXA-1</i>	Plásmido <i>pTB11</i>	LA
<i>blaOXA-2</i>	<i>Aeromonas</i> ; plásmidos <i>pB8, pB10</i> y <i>pTB11</i>	LA, E
<i>blaOXA-10</i>	Plásmido <i>pTB11</i>	LA
<i>blaTEM</i>	<i>E. coli, Citrobacter</i>	E
<i>blaVIM</i>	<i>Acinetobacter, Pseudomonas</i>	E
<i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i>	A

Nota: Los ARGs descritos pueden encontrarse en una o más de las siguientes matrices de una PTAR: Agua residual no tratada (A), lodo activado (LA), efluente (E).

12. APÉNDICE IV. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SHAPIRO-WILK

En los Cuadros 11.1., 11.2. y 11.3. se presentan los resultados de las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk aplicadas a los conjuntos de datos utilizados en la investigación. En estos se detallan los valores p correspondientes para cada variable evaluada durante las épocas seca y lluviosa. Los resultados indican si los datos se distribuyen normalmente ($p > 0,05$) o si sugieren una desviación significativa de la normalidad ($p < 0,05$). Para aquellos conjuntos de datos que fueron analizados con una prueba paramétrica (se ajustan a una distribución normal) la **p-value se detalla en negrita**, caso contrario se analizaron con una prueba no paramétrica.

Cuadro 12.1. Resultados de las pruebas Shapiro-Wilk aplicadas en los conjuntos de ARGs, PTAR Monserrat, febrero a junio del 2024, n=6.

Gen de resistencia a antibiótico (ARG)	Época seca			Época lluviosa		
	Shapiro-Wilk Afluente p-value	Shapiro-Wilk Lodos p-value	Shapiro-Wilk Efluente p-value	Shapiro-Wilk Afluente p-value	Shapiro-Wilk Lodos p-value	Shapiro-Wilk Efluente p-value
<i>tetA</i>	0,7804	0,1524	0,8777	0,1866	0,7252	2,2x10 ⁻¹⁶
<i>ermB</i>	0,5048	0,1436	0,8127	0,8113	0,2554	0,01598
<i>drfA12</i>	0,6892	0,3631	0,6178	0,3427	0,8999	0,05682
<i>sul1</i>	0,4627	0,9476	0,006299	0,3953	0,3953	0,898
<i>sul2</i>	0,312	0,03028	0,9416	0,485	0,485	0,7128
<i>qacE</i>	0,8428	0,4244	0,3631	0,434	0,9547	0,1376
<i>intl1</i>	0,6247	0,4809	0,347	0,4244	0,4244	2,694x10 ⁻⁵
<i>blaTEM</i>	0,4633	0,263	0,9352	0,6369	0,253	0,06548

Cuadro 12.2. Resultados de las pruebas Shapiro-Wilk aplicadas en los parámetros analizados en la matriz de agua, febrero a junio del 2024, n=6.

Parámetros	Época seca			Época lluviosa		
	Shapiro-Wilk Afluente p-value	Shapiro-Wilk Efluente p-value	Shapiro-Wilk Eficiencia	Shapiro-Wilk Afluente p-value	Shapiro-Wilk Efluente p-value	Shapiro-Wilk Eficiencia
SSed (mL/L)	1	2,2x10 ⁻¹⁶	0,3631	2,2x10 ⁻¹⁶	2,2x10 ⁻¹⁶	2,2x10 ⁻¹⁶
SST (mg/L)	0,1148	0,6917	0,08292	0,1101	0,1939	0,04347
DQO (mg/L)	0,5352	0,2983	0,1418	0,6788	0,4876	0,3782
NO ₃ ⁻ (mg/L)	0,6878	0,02067	N/A	2,2x10 ⁻¹⁶	0,9255	N/A
NH ₄ ⁺ (mg/L)	0,4481	0,7594	0,3458	2,2x10 ⁻¹⁶	0,2993	0,2993
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0,2276	0,4463	0,3963	0,07136	0,5068	0,9209
Coliformes Fecales (log10NMP/100 mL)	0,1787	0,3533	0,7277	0,6116	N/A	0,6314

Cuadro 12.3. Resultados de las pruebas Shapiro-Wilk aplicadas en los parámetros analizados en el lodo del licor mezclado, febrero a junio del 2024, n=6.

Parámetros	Shapiro-Wilk Lodos época seca	Shapiro-Wilk Lodos época lluviosa
SSed (mL/L)	0,6369	1
ST (mg/L)	0,4254	0,6624
IVL (mL/g)	0,7356	0,8023

ANEXOS

13. ANEXO I. LÍMITES MÁXIMOS PERMITIDOS EN LA NORMATIVA NACIONAL

En el reglamento nacional [48] se describen los límites máximos permitidos de análisis obligatorio de aguas residuales vertidas en un cuerpo receptor. Dichos parámetros y límites se describen en el Cuadro 12.1.

Cuadro 13.1. Límites máximos permisibles de análisis obligatorio.

Parámetro	Límite Máximo
Sólidos Sedimentables	1 mL/L
Sólidos Suspendidos Totales	50 mg/L
pH	5-9
Grasas/aceites	30 mg/L
Demanda Química de Oxígeno	150 mg/L
Demanda Bioquímica de Oxígeno	50 mg/L
Sustancias Activas al Azul de Metileno	5 mg/L
Temperatura	$15^{\circ}\text{C} \leq T \leq 40^{\circ}\text{C}$