



# FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

## ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS Y GENES DE RESISTENCIA EN LAS AGUAS RESIDUALES Y EL PAPEL DE LAS DEPURADORAS EN SU POSIBLE ELIMINACIÓN.

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2021

**Autor:** Patricia Navarro Ribera

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutor/es: Enrique Barrañón Catalán y María Pellín Amorós (cotutora)

# ÍNDICE

<b>1- RESUMEN</b>	4
ABSTRACT	4
<b>2- ABREVIATURAS</b>	5
<b>3- INTRODUCCIÓN</b>	5
3.1 AGUAS RESIDUALES	7
3.2 ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES	8
3.3 TRATAMIENTOS TERCARIOS	10
3.4 ANTIBIÓTICOS	11
3.4.1 Mecanismo de acción de los antibióticos	11
3.4.2 Mecanismos de resistencia de las bacterias	12
TRANSDUCCIÓN	13
TRANSFORMACIÓN	13
CONJUGACIÓN	14
<b>4- OBJETIVOS</b>	14
<b>5- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	15
5.1 Diseño	15
5.2 Estrategia de búsqueda	15
5.3 Criterios de inclusión y exclusión	16
5.4 Extracción de los datos	16
<b>6-RESULTADOS</b>	17
6.1 Análisis de una zona con limitación de recursos	18
6.2 Análisis de un país sin limitación de recursos	21
6.3 Incorporación de nuevos contaminantes	27
6.4 Importancia de conocer el resistoma ambiental	29
6.5 Los lodos de depuradora	32
<b>7- DISCUSIÓN</b>	35
<b>8- CONCLUSIONES</b>	37
<b>9- REFERENCIAS</b>	38



## INFORME DE EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE DE 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)

Elche, a 16 de noviembre del 2020

Nombre del tutor/a	Enrique Barrajón Catalán
Nombre del alumno/a	Patricia Navarro Ribera
Tipo de actividad	1. Revisión bibliográfica (no incluye revisión de historias clínicas ni ninguna fuente con datos personales)
Título del 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)	Impacto ambiental debido a la fabricación de productos sanitarios
Código/s GIS estancias	
Evaluación Riesgos Laborales	No procede
Evaluación Ética	No procede
Registro provisional	201113093849
Código de Investigación Responsable	<b>TFG.GFA.EBC.PNR.201113</b>
Caducidad	2 años

Se considera que el presente proyecto carece de riesgos laborales significativos para las personas que participan en el mismo, ya sean de la UMH o de otras organizaciones.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: 1. TFG (Trabajo Fin de Grado) ha sido realizada de manera automática en base a la información aportada en el formulario online: "TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", habiéndose determinado que no requiere someterse a dicha evaluación. Dicha información se adjunta en el presente informe. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, se **autoriza** la realización de la presente actividad.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos  
Secretario del CEII  
Vicerrectorado de Investigación

Domingo L. Orozco Beltrán  
Presidente del CEII  
Vicerrectorado de Investigación

Información adicional:

- En caso de que la presente actividad se desarrolle total o parcialmente en otras instituciones es responsabilidad del investigador principal solicitar cuantas autorizaciones sean pertinentes, de manera que se garantice, al menos, que los responsables de las mismas están informados.
- Le recordamos que durante la realización de este trabajo debe cumplir con las exigencias en materia de prevención de riesgos laborales. En concreto: las recogidas en el plan de prevención de la UMH y en las planificaciones preventivas de las unidades en las que se integra la investigación. Igualmente, debe promover la realización de reconocimientos médicos periódicos entre su personal; cumplir con los procedimientos sobre coordinación de actividades empresariales en el caso de que trabaje en el centro de trabajo de otra empresa o que personal de otra empresa se desplace a las instalaciones de la UMH; y atender a las obligaciones formativas del personal en materia de



prevención de riesgos laborales. Le indicamos que tiene a su disposición al Servicio de Prevención de la UMH para asesorarle en esta materia.

La información descriptiva básica del presente trabajo será incorporada al repositorio público de Trabajos fin de Grado y Trabajos Fin de Máster autorizados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández en el curso académico 2020/2021. También se puede acceder a través de <https://oir.umh.es/tfg-tfm/>



## 1- RESUMEN

Una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) tiene que cumplir su propósito de depurar el agua y devolverla al efluente sin residuos. En los artículos seleccionados para este trabajo fin de grado se ha puesto de manifiesto la presencia de antibióticos, patógenos, así como de metales pesados en las aguas efluentes, dejando claro que las EDARs no consiguen devolver el agua sin contaminantes y estableciendo la posibilidad de que estos contaminantes pueden aumentar la tasa de intercambio de genes resistentes entre las bacterias y los patógenos. Analizando procesos posteriores a las EDARs se dieron cuenta que hay una tendencia a la baja de la concentración de ciertos antibióticos, pero no de otros, poniendo de manifiesto que no todos los procesos utilizados son válidos. Uno de los problemas que hay cuando los contaminantes emergentes están presentes en las aguas receptoras en países menos desarrollados, es que su vida cotidiana es muy probable que se lleve a cabo con esta agua, por ello, tiene suma importancia conocer la filogenética y resistomas de estas zonas. También se debe tener en cuenta el papel que tienen los lodos de depuradora en la inserción de contaminantes, pues su uso más habitual es como fertilizantes para la tierra.

## ABSTRACT

A sewage station (sewage treatment plant) has to serve the purpose of purifying the water and giving it back to the effluent without waste particles. However, in the articles reviewed for this Degree Final Project, it has been identified the presence of antibiotics, antibiotic resistance genes, pathogens and a double resistance to antibiotics and heavy metals in the receiving water. The analysis of some processes following the sewage station, has shown the downtrend in the concentration of some antibiotics and the increase of some other ones. The main problem of finding pollutants in the receiving water is that underdeveloped countries use this water to undergo basic household tasks. Hence the importance

of knowing the phylogenetic and resitome of these areas. Also, it is key to understand the role of the sewage station mud in the incorporation of pollutants since it usually serves as a fertilizer.

**Keywords:** “anti-bacterial agents”, “drug resistance, microbial”, “wastewater treatment plants” and “waste water”.

## 2- ABREVIATURAS

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

ECDC: Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades.

RAM: Reacción Adversa del Medicamento.

UE: Unión Europea.

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales.

RA: Resistencia a los Antibióticos

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

ARB: Bacterias resistentes a los antibióticos.

ARG: Genes de resistencia a los antibióticos.

MGE: Elementos genéticos móviles.

## 3- INTRODUCCIÓN

La eliminación de productos farmacéuticos, así como de medicamentos y residuos sanitarios es un tema que desde hace varias décadas preocupa y se tiene muy en cuenta a la hora de investigar posibles nuevas alternativas, puesto que el medio ambiente es el principal perjudicado por estos contaminantes y con él, el resto de las especies<sup>1</sup>.

En especial, dentro del grupo de los contaminantes emergentes se encuentran los antibióticos (siendo éstos un subgrupo de los compuestos farmacéuticos), los cuales se están convirtiendo en un foco principal de atención, debido a que son potentes contaminantes emergentes por su amplia producción y consumo, provocando así peligros para el entorno ecológico y la salud humana<sup>2</sup>.

Las pruebas científicas están demostrando claramente que el uso en exceso de los antibióticos en los animales puede contribuir a la aparición de resistencia a estos fármacos<sup>3</sup>.

A ello también contribuyen el uso incorrecto por parte del ser humano, tanto por administración excesiva como por no finalizar el tratamiento prescrito por parte del facultativo. Otro de los motivos es la incorrecta eliminación de estas sustancias y la posterior liberación, con lo que se consigue que se viertan en el medio ambiente desde diversas fuentes como son: aguas residuales industriales, hospitalarias y domésticas<sup>4</sup>. Se debe tener en cuenta que cuando se administra un antibiótico se metaboliza parcialmente, por lo tanto, gran parte del antibiótico llegará a las EDARs a través de las orinas y heces<sup>3</sup>.

Una vez que los antibióticos han sido vertidos en las aguas residuales efluentes, es más probable que se produzca la interacción entre especies, lo cual es un mecanismo esencial para que las comunidades bacterianas desarrollen resistencias a los antibióticos mediante la transferencia horizontal de genes<sup>5</sup>. Por ello, para que esto no tenga lugar, se debe intentar eliminar la mayor concentración posible de antibiótico, tanto si llega en su forma original como si lo hace en metabolitos<sup>6</sup>.

Según declaraciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), si no se toman medidas de forma inmediata, en 2050 la práctica totalidad de los antibióticos que hoy día conocemos serán ineficaces para prevenir y tratar enfermedades humanas (OMS, 2017).

En la 68.<sup>a</sup> Asamblea Mundial de la Salud, en mayo de 2015, los Estados Miembros aprobaron un plan de acción para poder hacer frente a la resistencia a los antimicrobianos cuyo objetivo final es garantizar durante el máximo tiempo posible la continuidad del tratamiento y la prevención de las enfermedades infecciosas con medicamentos eficaces, seguros y de calidad.

Por parte de la OMS se está alentando a los países a que elaboren planes de acción para poder alcanzar los objetivos planteados. Hasta la fecha, 79 países los han elaborado, frente a 49 que siguen en el proceso de elaboración.

Según datos publicados en 2019 por Centers for Disease Control and Prevention (CDC), más de 2,8 millones de infecciones resistentes a antibióticos suceden

cada año en Estados Unidos, muriendo más de 35.000 personas como consecuencia de ello. Según el informe publicado en 2017 por European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), la resistencia a los antibióticos supone una grave amenaza para Europa.

En 1994 se realizó una encuesta a nivel nacional en España sobre 48.076 pacientes atendidos en atención primaria. En la encuesta se recoge que, se prescribieron antibióticos en las dos terceras partes de los casos que se diagnosticaron como enfermedad de origen infeccioso, aunque las prescripciones fueron consideradas como inapropiadas en el 36,5% de los casos<sup>7</sup>.

Hoy día los Estados miembros de la UE recogen cada año datos relevantes sobre las resistencias a los antibióticos (RA) de las bacterias zoonóticas e indicadoras de los seres humanos, los animales y los alimentos, que son analizadas conjuntamente por la EFSA y el ECDC y que recogen un informe de síntesis anual de la UE<sup>8</sup>.

El Reglamento 178/2002 establece en su artículo 33 que la EFSA es responsable de examinar los datos sobre la RA recogidos en los Estados Miembros de acuerdo con la Directiva 2003/99/CE y de preparar un informe de síntesis de la UE a partir de los resultados<sup>9</sup>.

La Decisión de Ejecución 2013/652/UE sobre la vigilancia y notificación de la resistencia a los antimicrobianos se viene aplicando desde 2014 y establece prioridades para la vigilancia de la RAM desde la perspectiva de la salud pública<sup>10</sup>.

### **3.1 AGUAS RESIDUALES**

Se definen las aguas residuales como aquellas procedentes de procesos productivos o del consumo humano. Bajo un tratamiento previo, pueden llegar a ser aguas regeneradas capaces de reutilizarse si alcanzan los criterios de calidad adecuados para cada tipo de uso<sup>11</sup>.

El Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, establece las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. Bajo esa ley se establecen las diferentes medidas para conseguir una mejor calidad de las

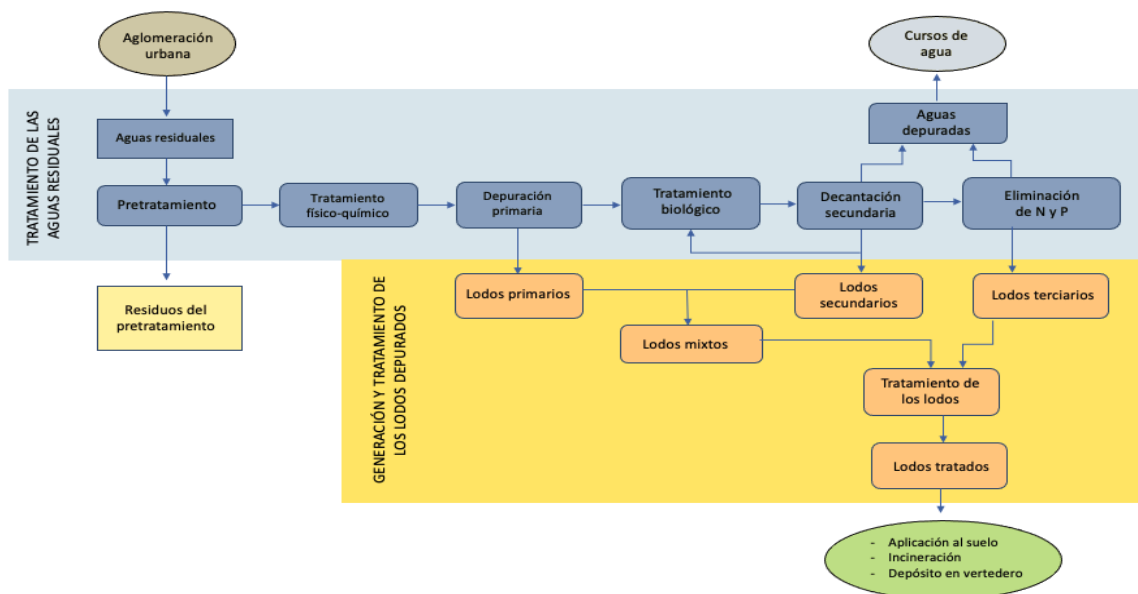


aguas, tanto continentales como marítimas, también incluyen protección frente a los vertidos de las aguas residuales urbanas, puesto que previamente se debe hacer una serie de tratamientos e instalaciones adecuadas, para limitar los efectos contaminantes de dichas aguas residuales, con el objetivo final de garantizar la protección del medio ambiente<sup>12</sup>.

Con este fin, la Unión Europea aprobó la Directiva 91/271/CEE, del Consejo, de 21 de mayo, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. En la cual queda establecido que los Estados miembros adoptarán las medidas necesarias para garantizar que las aguas residuales son tratadas correctamente antes de su vertido, de manera que la depuración de las aguas residuales ha de asegurar el cumplimiento de los límites establecidos. Para saber que tratamiento se le ha de hacer a las aguas residuales se tiene en cuenta el número de "habitantes-equivalentes" y las "aglomeraciones urbanas"<sup>13</sup>.

### 3.2 ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES

Las EDAR son las plantas dedicadas a la depuración de aguas residuales cuya función es recoger las aguas y reducir la contaminación que pueda estar presente en ellas, con el fin de devolverla a un cauce receptor, habiendo eliminado o reducido la contaminación o características no deseables de las aguas, mediante un conjunto de operaciones unitarias de tipo físico, químico y biológico<sup>14</sup>.



**FIGURA 1:** Esquema general de una estación depuradora de aguas residuales, línea de aguas<sup>15</sup>.

Con el pretratamiento se consigue eliminar los sólidos grandes, arenas y grasas, utilizando dispositivos como: pozo de gruesos, desbaste de gruesos, desbaste de finos, desarenado-desengrasado. El fin del tratamiento primarios es eliminar los sólidos en suspensión, con decantadores primarios, flotadores por aire disuelto, así como tratamientos químicos; en el tratamiento secundarios se persigue transformar la materia orgánica del agua residual en materia celular, gases, energía y agua mediante un tratamiento biológico, que puede ser en condiciones aerobias o anaerobias.

El tratamiento terciario es sólo necesario en aquellos casos donde las aguas residuales se viertan a una zona protegida y su objetivo es eliminar los nutrientes que puedan estar presentes<sup>16</sup>.

Después vendría la línea de fangos o lodos, los cuales se han generado durante el tratamiento primario o en el secundario, y su tratamiento tiene como objetivo conseguir la estabilidad de éstos para una posterior gestión. Los lodos se pueden tratar por espesamiento, digestión o deshidratación<sup>17</sup>.

El primero de ellos trata de reducir el volumen de fangos mediante eliminación de agua, utilizando dos técnicas diferentes: espesamiento por gravedad-decantación o espesamiento por flotación. Ambas técnicas tratan los lodos procedentes del tratamiento secundario, es decir, del biológico.

Estos fangos, se van a separar del fluido con la ayuda de un gas que normalmente es aire, las burbujas de aire se van a unir a las partículas del fango arrastrándose hacia la superficie por flotación. El fango que se vaya concentrando en la superficie, será recogido para seguir con el siguiente tratamiento.

El segundo paso, la digestión, tiene como objetivo fundamental conseguir la estabilización de los lodos para que la materia orgánica residual resultante sea lo más inocua posible para el medio ambiente. La gran mayoría de los digestores existentes en las depuradoras convencionales son anaerobios y el proceso consiste en una fermentación bacteriana. Como productos intermedios de esta reacción se produce: metano, sulfuro de hidrógeno, amoníaco, dióxido de

carbono, agua y algunos otros componentes de estructura más simples y estables que la materia orgánica de la que se ha partido.

La última fase, se trata de la deshidratación y secado, cuyo fin es disminuir el contenido de agua para facilitar el transporte y manejo de los lodos, los cuales tienen una humedad que ronda el 90%, una vez han pasado por los digestores; para obtener la deshidratación se puede utilizar eras de secado, este método es el más económico, ya que los lodos se depositan y se extienden sobre una capa de material drenante, como inconveniente cabe destacar que es un proceso muy lento cuya duración depende del clima del lugar y de la época del año.

En cuanto a la fase de secado o deshidratación mecánica, se dispone de varias técnicas, por ejemplo: filtros de vacío, filtros de banda, filtros de prensa o por centrífuga.

El fin último de esta cadena de procesos es, conseguir por una parte que las aguas residuales estén lo más libres posibles de contaminantes e intentar que los fangos que se han producido a consecuencia del tratamiento de las aguas tengan el menor volumen posible para facilitar su futura eliminación<sup>18</sup>.

Después de estos tratamientos, no deberían quedar prácticamente antibióticos ni otros residuos en las aguas residuales, pero la realidad no es así y por ello, se llevan a cabo una serie más de tratamientos, denominados tratamientos terciarios.

La presencia de antibióticos en el efluente secundario es gravemente preocupante debido a que los tratamientos terciarios no son siempre obligatorios, sólo lo son en los países de la Unión Europea y sólo cuando el efluente se vierte en zonas sensibles<sup>19</sup>. Además, estos tratamientos terciarios, cuando se aplican, no aseguran la total eliminación de los antibióticos, agravando más aún el problema

### **3.3 TRATAMIENTOS TERCIARIOS**

El tratamiento terciario puede implicar una combinación de procesos unitarios y puede eliminar aún más los sólidos en suspensión residuales y la demanda biológica de oxígeno, así como desinfectar el efluente antes de descargarlo en su lugar de destino.

En estos procesos se incluyen principalmente la filtración de medios como: carbón de antracita, arena y grava, y la desinfección con: cloración, irradiación ultravioleta y ozonización<sup>20</sup>.

Pese a que en Estados Unidos los tratamientos terciarios no son obligatorios, según la Encuesta de Necesidades de Cuencas Limpias de 2012 de la Agencia de Protección Ambiental (EPA), entre las 4.376 instalaciones con datos reportados en los EE. UU., la cloración se utiliza o se utilizará en 1.133 de las 2.181 instalaciones que utilizan la desinfección en el proceso terciario. La irradiación UV se utiliza o se utilizará en 285 instalaciones, y la filtración por arena en 245 instalaciones<sup>21</sup>.

Pese a estos datos, hay que tener también en cuenta que, de acuerdo con UN World Water Development Report 2017, estima que alrededor del 80 por ciento de los países en vías de desarrollo no tratan sus aguas residuales, vertiéndose directamente a los cauces de ríos cercanos generando así problemas de salud pública y ambiental<sup>22</sup>.

Por otro lado, se estima que alrededor de 4.5 millones de personas no tienen acceso a un correcto saneamiento, causando la muerte de 340.000 niños al año<sup>23</sup>.

Por todo ello, la situación es especialmente preocupante en los países en desarrollo, donde muchas personas siguen dependiendo del agua no tratada como único suministro de agua para sus actividades diarias (OMS, 2015).

### **3.4 ANTIBIÓTICOS**

Los antibióticos son una familia de medicamentos que combaten las infecciones bacterias en personas y animales. Son ineficaces contra las infecciones víricas y la mayoría del resto de infecciones. Se pueden agrupar de acuerdo con su estructura química o según su mecanismo de acción<sup>24</sup>.

#### **3.4.1 Mecanismo de acción de los antibióticos**

Los antibióticos deben destruir o inhibir el crecimiento de los microorganismos, por ello, tienen que atravesar la barrera superficial de la bacteria y después fijarse sobre su diana, la cual será alguna de las estructuras o mecanismos

bioquímicos que le son necesarios para multiplicarse o para vivir<sup>25</sup>. Los mecanismos de acción son variados y a veces múltiples, pero todos desembocan en alguno de los siguientes puntos: impidiendo la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular o bien alterando la membrana celular de la bacteria sobre la que están actuando<sup>26</sup>.

MECANISMO DE ACCIÓN	DESCRIPCIÓN	FAMILIAS DE ANTIBIÓTICOS
Inhibidores de los ácidos nucleicos (ADN/ARN)	Bloquean la síntesis de los ácidos nucleicos, impidiendo la multiplicación de las bacterias.	QUINOLONAS SULFONAMIDAS TRIMETOPRIMA
Antimicrobianos que actúan sobre las membranas celulares	Actúan provocando una lesión de manera directa o indirecta a la célula, al bloquear la capacidad de protección de la membrana celular.	POLOMIXINA B GRAMIDICINA
Inhibidores de la síntesis de la pared celular	Se impide que la bacteria fabrique su pared celular, dejando a la célula indefensa frente a las grandes presiones osmóticas para que finalmente se muera y rompa.	BETALACTÁMICOS GLUCOPÉPTIDOS BACITRACINA FOSFOMICINA
Inhibidores de la síntesis de proteínas	Impiden que las bacterias puedan fabricar proteínas por inhibición de los ribosomas bacterianos	MACRÓLIDOS AMINOGLUCÓSIDOS CETÓLIDOS TETRACICLINAS LINCOSAMIDAS LIPOGLUCOPÉPTIDOSOXAZ OLIDINONAS

**TABLA 1:** Clasificación por mecanismo de acción de los antibióticos<sup>27</sup> y principales familias que cumplen estos mecanismos.

### 3.4.2 Mecanismos de resistencia de las bacterias

La bacteria es un microorganismo con una tremenda capacidad de adaptación, lo que le lleva a poder desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos.

Existen tres tipos de resistencias<sup>28</sup>. La primera es la resistencia natural o intrínseca, se da cuando todas las cepas pertenecientes a la misma especie son

resistentes a un antibiótico. La segunda es la resistencia adquirida, sucede cuando la resistencia bacteriana sólo aparece en algunas de las cepas pertenecientes a una misma especie, se presenta cuando existe mutación cromosómica o adquisición de nuevos genes. Y, por último, la resistencia transmisible, la cual está mediada por plásmidos, transposones e integrones y lo que ocurre aquí es que hay una transferencia de genes que van de una bacteria a otra.

El mecanismo de transferencia de genes entre bacterias permite una difusión rápida y extensa de la información genética, esta transferencia se da tanto en bacterias gram positivas como en las gram negativas. Se le atribuye el calificativo de horizontal, ya que se da con independencia de todo mecanismo de reproducción, el cual se le calificaría como vertical.

Los mecanismos que permiten que se de esta transferencia horizontal son: la transducción, transformación y la conjugación<sup>29</sup>.

### **1. TRANSDUCCIÓN**

El vector es un bacteriófago, el cual es capaz de transferir un fragmento de ADN de una bacteria a otra. El virus bacteriano o fago ingresa en la bacteria candidata a ser infectada e induce una nucleasa que fragmenta el cromosoma bacteriano, al mismo tiempo que se está formando el ADN y sus proteínas de envoltura.

Algunos de los viriones resultantes tras la infección pueden incluir ADN fragmentado bacteriano que al infectar a una bacteria nueva puede ser que introduzca algunos nuevos genes, entre los que podrían estar los causantes de la resistencia bacteriana a los antibióticos<sup>30</sup>.

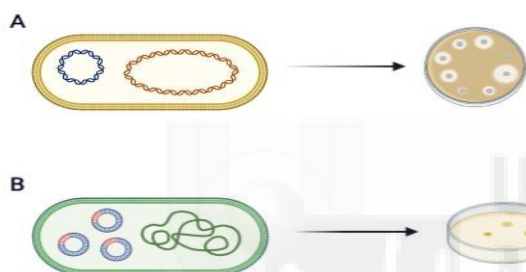
### **2. TRANSFORMACIÓN**

Se consigue que el ADN exógeno desnudo, se adquiera y se incorpore a la bacteria una vez que ha sido captado. El ADN se capta cuando la bacteria muere y su membrana ha sido en su gran mayoría destruida, liberando así fragmentos de ADN que pueden ser incorporados a otras bacterias<sup>31</sup>.

### 3. CONJUGACIÓN

Mecanismo por el cual se transfiere ADN desde una bacteria donante a una bacteria receptora por medio de un mecanismo que implica un estrecho contacto celular. De los dos filamentos de ADN del cromosoma bacteriano sólo uno es el que se transfiere a la bacteria receptora. De esta forma, la bacteria receptora consigue la resistencia a través de ese filamento, al mismo tiempo que la bacteria donante conserva su propiedad inicial<sup>32</sup>.

Ambas bacterias sintetizan de nuevo una hebra complementaria, de tal forma que al final de este mecanismo, cada uno de los microorganismos poseerá una doble hebra de ADN, lo que hará más probable que ocurran futuras resistencias<sup>33</sup>.



**FIGURA 2.** A) bacteria que no presenta genes de resistencia, con placa Petri con antibióticos que crean halo de inhibición, ya que los antibióticos sí tiene efecto. B) bacteria que presenta genes de resistencia (marcados en rojo) y su placa Petri no tiene halo debido a que los antibióticos no tienen efecto por tener resistencia.

### 4- OBJETIVOS

El objetivo general que persigue este TFG es conseguir una visión global de qué son las aguas residuales, qué antibióticos se encuentran en los vertidos, así como los tratamientos que se realizan para eliminarlos y, por último, recopilar qué antibióticos son los más habituales y qué problemas pueden acarrear. Para conseguir este fin, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Demostrar la correlación directa que existe entre el aumento del consumo de antibióticos y el aumento de las resistencias hacia ellos, mediante la evaluación de una EDAR.
2. Exponer la relación que existe entre la resistencia a los antibióticos y a los metales pesados.

3. Señalar la importancia de descifrar el resistoma ambiental de aguas residuales y ambientes acuáticos.
4. Mostrar una visión general de la urgente necesidad de evaluar el riesgo de propagación de resistencias a través de la aplicación en tierra de los lodos de depuradoras.

## 5- MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Diseño

Para la redacción de este trabajo de fin de grado se llevó a cabo una búsqueda intensiva a través de una revisión sistemática, para tratar de dar explicación a cuál es el motivo por el cual no se acaban de eliminar la suficiente cantidad de antibióticos de las aguas residuales, para que no tenga lugar la transferencia de genes o cualquier otro tipo de mecanismos que den como resultado final la aparición de resistencias a antibióticos.

La búsqueda de los datos se llevó a cabo principalmente mediante Medline, la principal base de datos biomédica, a través de su buscador Pubmed, utilizando también la base de datos SCOPUS y Google académico para acabar de ampliar la búsqueda.

### 5.2 Estrategia de búsqueda

Se consultaron las palabras clave "resistencia a antibióticos", "aguas residuales" y "medición de riesgo" como términos Mesh (Medical Subject Headings) en el tesoro DeCS (Descriptores en Ciencia de la Salud). Los descriptores obtenidos fueron: "Drug Resistance, Microbial", "waste water" y "risk assesment".

Se utilizó una única ecuación de búsqueda usando "AND" como conector que relaciona los descriptores y aumentar así la especificidad y sensibilidad de la búsqueda. Se utilizó el filtro "10 years" para conseguir artículos publicados en la última década, así como el filtro "Humans" puesto que, el fin de este trabajo fin de grado es obtener una reflexión acerca del riesgo que puede traer con sí la presencia de antibióticos en aguas residuales en el ser humano.



### 5.3 Criterios de inclusión y exclusión

La selección de los estudios incluidos en la revisión se llevó a cabo en base a los siguientes criterios: se incluyeron tanto revisiones sistemáticas como estudios experimentales que establecen una relación directa entre la presencia de los antibióticos en las aguas residuales y el riesgo para la salud. Desde el año 2011 hasta febrero de 2021, en humanos, idiomas inglés y español.

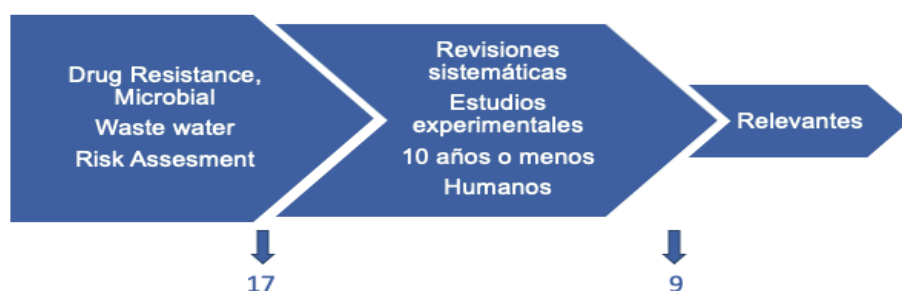
También se analizó las referencias bibliográficas de los artículos que fueron seleccionados, con el fin de destacar otros estudios potencialmente incluibles en la revisión o que sirvieran de ayuda para comprender ciertos términos.

En lo que se refiere a los artículos excluidos, se descartaron los artículos irrelevantes para el objetivo final del estudio y sin interés para el tema de investigación, es decir, aquellos que por cualquier motivo no contenían los criterios de inclusión anteriormente nombrados.

### 5.4 Extracción de los datos

Para comenzar con la búsqueda primero se busca en la base de datos MeSH del NCBI "Drug Resistance, Microbial", "Waste Water" y "Risk Assessment" con lo que se obtienen 17 resultados, de los cuales permanecen 9 tras aplicar que los seleccionados sean de los últimos 10 años y tengan que ver con los humanos. Tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión restantes y después de su lectura exhaustiva son seleccionados 5 de los 9 artículos (figura 4). Un breve resumen de los seleccionados se muestra en la Tabla 2.

Obteniendo como fórmula: (("Risk Assessment"[Mesh]) AND ("Drug Resistance, Microbial"[Mesh])) AND ("Waste water"[Mesh]) Filters: in the last 10 years, Humans



FIGURURA 4. Resumen de la búsqueda realizada.

TÍTULO	AUTOR(ES)	AÑO	TEMA
Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats.	Erica C. Pehrsson,. et al.	2016	Analiza ecosistemas microbianos críticamente subestudiados utilizando muestras fecales de origen humano y animal.
Occurrence and fate of antibiotics, antimicrobial resistance determinants and potential human pathogens in a wastewater treatment plant and their effects on receiving waters in Nanjing, China.	Yu Chen,. et al.	2020	Analizan una EDAR como punto de entrada para explorar la eficiencia de eliminación de antibióticos, determinantes de resistencia antimicrobiana y patógenos humanos. Evalúan el impacto del efluente de la EDAR en las aguas receptoras.
Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard.	Kinga Bondarczuk,, et al.	2016	Se investigó la posible asociación entre la resistencia a la tetraciclina y a los metales pesados de dos <i>Pseudomonas</i> resistentes a la tetraciclina para poder ver si este perfil de resistencia se correlacionaba con la presencia de plásmidos conjugativos en estas cepas.
Environmental resistance risks of wastewater and aquatic environments deciphered by shotgun metagenomic assembly.	Mutshiene Deogratias Ekwanzala,, et al.	2020	Mediante un estudio de metagenómica secuenciaron ADN para determinar con exactitud todos los ARB y ARG de dos muestras recogidas en dos ambientes diferentes.
The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application.	Vinicius Vicente Martins,. et al.	2014	Hacen un recorrido por algunos de los estudios más relevantes que hay acerca de las ARB y ARG en los lodos de depuradora, poniendo de manifiesto la necesidad de más estudios y unas leyes más estrictas.

**TABLA 2:** Resumen de los artículos utilizados en este trabajo fin de grado.

## 6-RESULTADOS

En los artículos seleccionados, los estudios que analizan y comentan tuvieron como punto de partida una EDAR, para así explorar la eficiencia de eliminación

de antibióticos y, por consiguiente, analizar qué es lo que recibe realmente el agua efluente de la EDAR.

## 6.1 Análisis de una zona con limitación de recursos

Uno de los estudios<sup>34</sup> utilizó un método de mapeo para poder caracterizar la estructura de la comunidad bacteriana y las redes de intercambio de resistencia de cientos de muestras fecales y ambientales humanas interconectadas, procedentes de dos países latinoamericanos de bajos ingresos.

La importancia de destacar que la zona a estudiar tiene recursos limitados recae en que hay una enorme facilidad de conseguir antibióticos sin receta, a la vez que, la zona en cuestión no dispone de una red de alcantarillado ni depuradoras de aguas residuales preparadas para toda la zona que abarca<sup>34</sup>, por lo que, se dispone de dos variantes a tener en cuenta a la hora de comparar los resultados de zonas en las que su economía difiere por completo.

La situación es especialmente preocupante en los países en desarrollo, debido a que muchas personas siguen dependiendo del agua no tratada como único suministro para sus actividades diarias (OMS,2015).

Se analizaron 263 muestras fecales de 115 individuos en 27 casas a lo largo de 2 años, así como 209 muestras ambientales de los hogares de los donantes y de las zonas circundantes a esta comunidad. Las muestras ambientales incluían heces de animales domésticos, suelo, agua, así como muestras de las instalaciones sanitarias de cada comunidad: letrinas de compostaje en <sup>1</sup>RES y un sistema de alcantarillado de todo el distrito con una moderna planta de tratamiento de aguas residuales (EDAR) en <sup>2</sup>PST. En este estudio utilizaron una combinación de secuenciación 16S, selecciones metagenómicas funcionales de alto rendimiento y secuenciación shotgun de todo el metagenoma con el fin de poder comparar las arquitecturas filogenéticas de estas poblaciones microbianas y sus resistomas asociados.

---

<sup>1</sup> RES: una aldea rural de agricultores de subsistencia en El Salvador.

<sup>2</sup> PST: un barrio marginal periurbano en Lima, Perú.

Lo primero que realizaron fue recoger la metagenómica de *Escherichia coli* construida a partir de 51 muestras fecales humanas y 45 muestras ambientales de RES y PST para la resistencia funcional frente a 17 antibióticos. La secuenciación de estas selecciones metagenómicas identificó 1.100 proteínas codificadas de resistencia a antibióticos únicas que, confieren colectivamente resistencia contra todos los antibióticos excepto a el meropenem. De todas las proteínas de resistencia a antibióticos obtenidas 121 eran nuevas, ya que menos del 60% de la identidad de los aminoácidos coincide con alguna proteína recogida en el NCBI. La mayoría de estas nuevas proteínas (72%) eran modificadoras de antibióticos.

A raíz de los resultados anteriores los autores plantearon un siguiente estudio con una cantidad de muestra superior, obtuvieron la confirmación de que la resistencia a los antibióticos está significativamente correlacionada con la composición de la comunidad, y no se distribuye al azar entre los hábitats.

Cuando se realizó el estudio para supervisar el impacto del tratamiento de las aguas residuales en los resistomas, se tomaron muestras de las aguas residuales en los puntos de acceso más cercanos a los hogares participantes en el PST y del afluente y efluente de la EDAR local.

A continuación, compararon su composición filogenética y el resistoma con el microbiota fecal de los residentes de la PST. Obtuvieron que, en general, los residuos humanos de PST sufrieron cambios drásticos en la composición microbiana a medida que avanzaban por el tratamiento de aguas residuales, disminuyendo sus semejanzas con el microbiota fecal humana en cada etapa posterior. Los resistomas de las aguas residuales también disminuyeron su similitud con los fecales humanos de PST en cada etapa de tratamiento, pese a que las aguas residuales de acceso a la calle y el afluente de la EDAR fueron igualmente similares a las heces humanas en cuanto a contenido de resistencia a los antibióticos.

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos de eflujo de fármacos fueron más altos por lo general en los resistomas pertenecientes a las heces humanas de PST frente a los de las aguas residuales. Por el contrario, las aguas residuales fueron más ricas en acetiltransferasas de aminoglucósidos, beta lactamasas

pertencientes a la clase D y dihidrofolato reductasas resistentes. Por lo tanto, la contribución de las heces humanas a la composición filogenética de los efluentes de las EDAR fue menor que la de las aguas residuales con acceso a la calle o el afluente de las EDAR. Esta diferencia no fue significativa en el caso de los resistomas, donde la entrada de heces humanas fue alta en todas las etapas de tratamiento de las aguas residuales. Por lo tanto, aunque el tratamiento de las aguas residuales consiguiera reducir el transporte general de genes de resistencia a los antibióticos, así como agotar el microbiota fecal humana, los genes de resistencia a los antibióticos de origen fecal sobrevivieron y pudieron reintroducirse en los entornos naturales donde se vierten los efluentes.

El siguiente paso que realizaron los autores<sup>34</sup> fue utilizar un protocolo modificado de extracción en fase sólida y espectrometría de masas para detectar 16 antibióticos de 7 clases distintas en 22 muestras de afluentes y efluentes de la EDAR, los resultados obtenidos fueron que: el cloranfenicol, la ciprofloxacina, la tetraciclina, la trimetoprima y el sulfametoxazol se detectaron sistemáticamente en el afluente durante todo el periodo de muestreo, en cambio, la eritromicina se detectó en el 36% de las muestras del afluente y en el efluente sólo detectaron sulfametoxazol. Estos antibióticos nombrados coinciden con ser los más vendidos en Perú, haciendo posible la relación entre la aparición de éstos en las aguas residuales y el aumento de la resistencia hacia ellos en las comunidades bacterianas.

Como punto de inflexión está que no detectaron betalactámicos en ninguna muestra de EDAR, a pesar de la alta abundancia de genes de resistencia hacia ellos encontrados en los estudios metagenómicos que realizaron, lo que les sugirió que estos antibióticos se degradan hasta niveles indetectables en los seres humanos o en el sistema de saneamiento, antes de llegar a la EDAR.

Cuando analizaron el resistoma y la composición filogenética se dieron cuenta de que, a pesar de estar estrechamente ligados en prácticamente todas las comunidades microbianas, algunas proteínas de resistencia a los antibióticos como: TEM, CTX-M, KPC, AAC-6 se han diseminado a nivel global a través de

la expansión clonar y la transferencia horizontal de genes entre múltiples huéspedes patógenos<sup>35</sup>.

## 6.2 Análisis de un país sin limitación de recursos

En contraste con el artículo anterior se analiza este, el cual se ha llevado a cabo en China, siendo el país con mayor tasa de consumo de antibióticos<sup>33</sup>. La cantidad final de antibióticos utilizados en este país en 2013 asciende a 162.000 toneladas, de las cuales el 48% se le atribuye a los antibióticos humanos y el resto, a veterinarios. Se han encontrado varios antibióticos en muchos sistemas acuáticos, como el mar, los ríos, los lagos e incluso el agua potable<sup>36</sup>, esto ha demostrado que supone un riesgo ecológico para los organismos acuáticos, además, de que agrava el problema de la resistencia bacteriana. Los patógenos humanos se detectaron a menudo en los medios acuáticos, y éstos proceden principalmente de las aguas residuales tratadas o no tratadas y del estiércol aplicado en las granjas. Aunque la gran mayoría de los patógenos humanos no sobreviven a los entornos acuáticos, aún se puede encontrar grandes cantidades de patógenos humanos en las aguas superficiales que reciben aguas residuales. Las principales bacterias detectadas fueron<sup>37</sup>: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, y especies del género: *Salmonella* y *Legionella*.

Por esta serie de circunstancias parece evidente la necesidad de este estudio de explorar la eficiencia de eliminación de antibióticos, determinantes de resistencias antimicrobianas (genes de resistencia a los antibióticos y genes de la integrasa) y patógenos humanos de la EDAR, así como analizar el impacto que ha tenido la EDAR una vez que las aguas han pasado por ella.

Para realizar el estudio seleccionaron 12 antibióticos, por su extensa aplicación en el tratamiento médico y en la ganadería, con los que realizar el análisis.

FAMILIAS	TIPO(S)
Fluoroquinolonas	Norfloxacin(NOR), Ofloxacin(OFX).
Macrólidos	Azitromicina(AZM), Roxitromicina(ROX) y Claritromicina(CLR)
Lincomicina	Clindamicina(CLI) y Lincomicina(LIN).
Sulfonamidas	Sulfapiridina(SNM), Sulfadiazina(SDZ) y Trimetoprima(TRI)

Tetraciclina	Oxitetraciclina(OXY)
Cloranfenicol	Cloranfenicol (CHL)

**TABLA 3:** Resumen de los antibióticos que analizaron.

Para realizar el estudio, los autores tomaron muestras de agua de una EDAR que trataba el agua de dos ríos diferentes: el río Jinchuan y el río Yangtze. La capacidad de la que se dispone en la planta de tratamiento es de 300.000 toneladas al día y la calidad del agua del efluente debe cumplir la norma de grado A, según las Normas Nacionales de la República Popular China. La EDAR recibía agua de: hospitales, escuelas y calles comerciales, zonas residenciales y otros edificios funcionales con distintos tipos de fuentes de aguas residuales. Las aguas residuales urbanas fueron tratadas con el digestato Unitank antes de precipitar el lodo activo en un ST y liberar las aguas residuales tratadas para su posterior desnitrificación, nitrificación y desinfección con cloro.

Las muestras que extrajeron fueron del agua del afluente (antes de entrar en la EDAR), del proceso Unitank y del agua efluente (después de salir de la EDAR), el efluente desemboca en los ríos anteriormente nombrados, por ello aquí se recogieron varias muestras diferentes muestras.

Río Jinchuan	Río Yangtze
Recogida aguas arriba de la EDAR→ S1	Aguas arriba de el estuario→ S4
Agua del río mezclada con el efluente→ S2	Agua del estuario en el que el río Jinchuan desemboca en el río Yangtze → S5
Aguas abajo de la EDAR → S3	Aguas abajo del estuario → S6

**TABLA 4.** Resumen de las diferentes muestras recogidas para la realización del estudio.

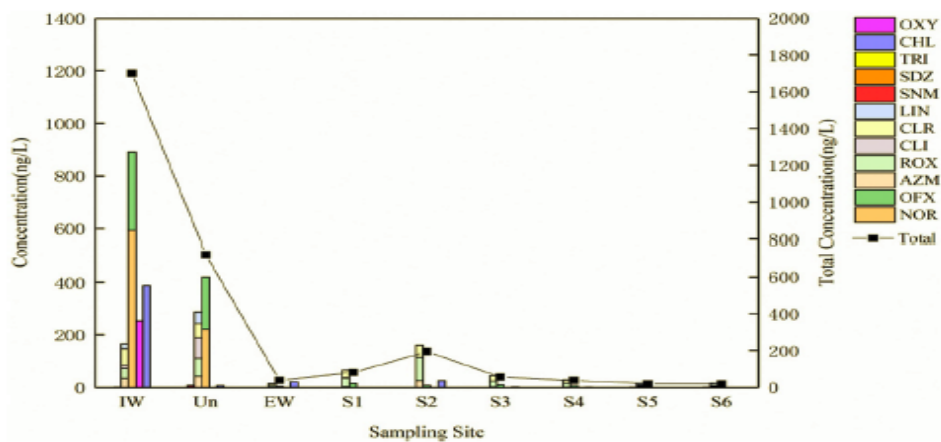
Recogieron muestras de agua de un litro de agua superficial, agua media y agua de fondo, tras recoger las muestras se mezclaron y se filtraron. A continuación, prepararon tres muestras parciales para cada sitio de muestreo y el ADN se extrajo mediante un método similar al nombrado anteriormente<sup>38</sup>. Para la comprobación de la presencia de genes resistentes a los antibióticos y genes



codificantes de la integrasa en cada muestra, realizaron PCRs utilizando para ello cebadores dirigidos directamente a los genes resistentes a antibióticos primarios y genes codificantes de la integrasa.

Respecto a los resultados en contenido de antibióticos en las EDAR y en las aguas receptoras, de los 12 antibióticos objetivo, 10 se detectaron en el agua afluyente, mientras que sólo 5 de ellos se detectaron en el agua efluente y a unas concentraciones bajas. Después de ser tratados por el proceso Unitank, la abundancia de AZM, ROX, CLI, LIN y SNM fue en aumento, en cambio la de NOR, OFX, CLR, TRI y OXY disminuyó. De este acontecimiento sacaron la conclusión de que, el proceso de Unitank es efectivo para reducir ciertas concentraciones de antibióticos, pero nada beneficioso para otra serie de éstos, puesto que, Unitank es un sistema cíclico de fangos activos, formado por un reactor de 3 compartimentos, donde se va reduciendo el volumen y concentrando el exceso de biosólidos y de ahí que algunos antibióticos aumentasen su concentración respecto a la inicial.

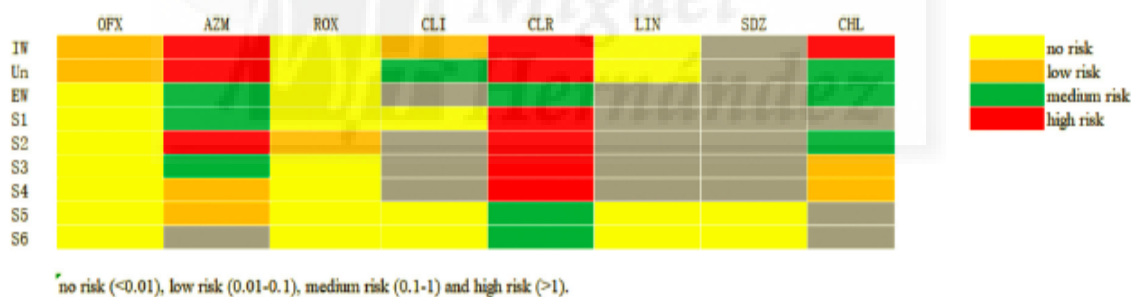
En el agua efluente, los niveles de todos los antibióticos se redujeron en más de un 90% respecto a el agua afluyente. Los procesos de desnitrificación, nitrificación y desinfección con cloro tuvieron una alta eficiencia de eliminación para la mayoría de los antibióticos, pero el contenido de cloranfenicol aumentó en comparación con los valores del proceso de Unitank en el agua efluente; de lo que concluyeron que, el cloranfenicol puede que posea características complicadas de eliminar con las medidas señaladas. La visión general respecto a la EDAR es que, posee una alta eficacia de eliminación de antibióticos.





**FIGURA 5** Niveles de antibióticos en la EDAR y en las aguas receptoras. IW, hace referencia a las aguas afluentes, Un a las muestras del proceso Unitank y EW a las aguas después de la EDAR, es decir, las aguas efluentes. La S son las muestras que se tomaron, explicadas en una tabla superior.

Siguiendo la línea del estudio anterior, los autores realizaron una evaluación del riesgo medioambiental de los antibióticos, utilizando para ello la ecuación:  $RQ = MEC / PNEC$ , donde MEC es la concentración de antibióticos real medida y PNEC es la concentración prevista de antibióticos sin efectos nocivos. Dividieron los criterios de riesgo ecológico en cuatro niveles: sin riesgo ( $< 0.01$ ), riesgo bajo ( $0.01-0.1$ ), riesgo medio ( $0.1-1$ ) y riesgo alto ( $>1$ ). Los resultados desvelan que la azitromicina, la claritromicina y el cloranfenicol suponían un riesgo alto para los organismos en las aguas afluentes, lo que pone de manifiesto la necesidad que hay de evitar que las aguas residuales se viertan al medio ambiente sin tratamiento. Por otro lado, los riesgos ecológicos de las aguas efluentes fueron menores, lo que sugiere que la EDAR puede reducir eficazmente el RQ que suponen los antibióticos.



**FIGURA 6.** Riesgos ecológicos en muestras de agua de la EDAR y de las aguas receptoras.

De la Figura 6 cabe resaltar que la claritromicina presenta un riesgo alto en la mayoría de las muestras seleccionadas, por lo que presentaba una toxicidad ecológica relativamente persistente.

Respecto a la presencia y abundancia de genes de resistencia a antibióticos e integrones en la EDAR y en las aguas receptoras, se detectó: un gen de resistencia al cloranfenicol (cmIA), 2 genes de resistencia a las sulfonamidas (sul1, sul3), y un gen integrón de clase 1 (intl1); para medir la eficiencia de eliminación de los determinantes de resistencia antimicrobiana en la EDAR se utilizó los ratios relativos (determinantes de resistencia antimicrobiana /16S

ADNr). Una vez aplicado el tratamiento Unitank, las ratios relativas de sul3 y intl1 aumentaron, en cambio, el cmlA y sul1 no variaron.

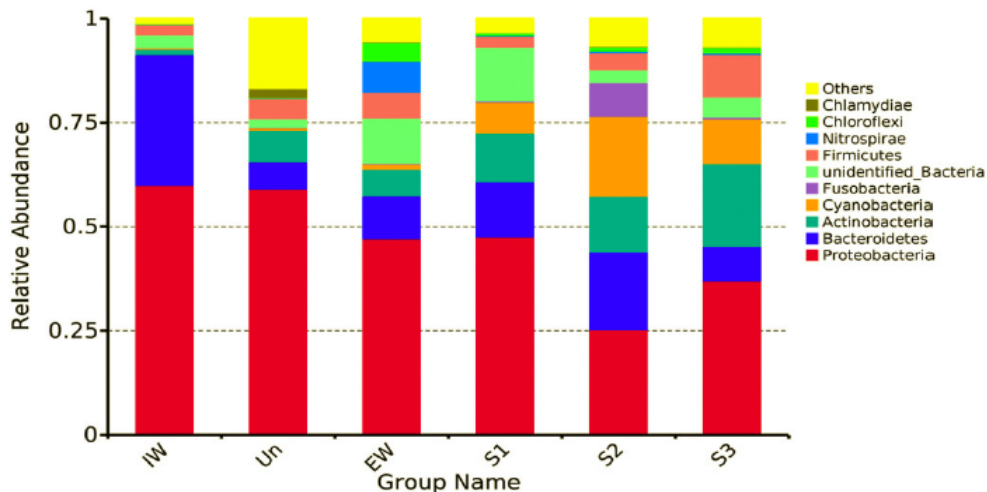
En las aguas efluentes, sólo disminuyó la proporción relativa de cmlA, mientras que las proporciones relativas de sul1, sul3 e intl1 aumentaron. La eliminación de los determinantes de resistencia antimicrobiana por parte de la EDAR no fue del todo satisfactoria y la eficiencia de eliminación de los distintos determinantes de resistencia antimicrobianos en la EDAR fue diferente. Utilizaron la abundancia absoluta de los 3 ARGs e intl1 para evaluar su variación en las aguas residuales. Se dieron cuenta que los 3 ARGs y el intl1 eran abundantes en S1, siendo éste más alto que en las aguas efluentes; lo que indica que la contaminación por determinantes de resistencia antimicrobiana en el río Jinchuan es grave. La abundancia de ARGs en S2 fue menor que en S1, por el contrario, en S3 fue del orden de magnitud de la de S2. En S4 los valores fueron menores que en los de S1, una posible explicación a este fenómeno podría ser que hay diferentes fuentes de contaminación por antibióticos en los ríos de Jinchuan y Yangtze y a que el río Jinchuan recibe mayor cantidad de aguas residuales que llevan en ellas antibióticos.

La abundancia de la gran mayoría de los determinantes de resistencia antimicrobiana aumentó en S5, donde el río Jinchuan fluye lentamente, lo que propicia una mayor deposición y absorción de bacterias y determinantes de resistencia antimicrobiana.

En S6, la presencia de sul3 e intl1 aumentó, probablemente debido a la proliferación de bacterias resistentes. Todo este conjunto de resultados indican que el efluente de la EDAR tiene poco efecto sobre el tipo y la abundancia de los determinantes de resistencias antimicrobianas sobre el agua que sale de la EDAR y, el cual tiene como destino un cauce receptor.

A continuación, procedieron a determinar la abundancia de bacterias en todos los procesos por los que pasan las aguas residuales, así como en el agua receptora. Los resultados que obtuvieron los llevaron a afirmar que la abundancia de bacterias en las aguas residuales disminuyó durante los procesos de tratamiento. Después de haber pasado por el tratamiento Unitank, la cantidad era 10 veces inferior. En cambio, en el efluente era  $10^{-3}$  veces mayor que en el

agua afluyente, lo que demuestra que la nitrificación y desnitrificación simultáneas combinadas con la cloración son mejores que el Unitank para eliminar los posibles microorganismos existentes en las aguas residuales.



**FIGURA 7** Estructura de la comunidad bacteriana a nivel de filos en la EDAR y en las aguas receptoras.

En la Figura 7 se puede ver los cambios que observaron respecto a las bacterias dependiendo de la muestra seleccionada y del punto de la EDAR donde habían tomado ésta. Para la salud humana consideraron que es importante explorar los cambios en la abundancia de patógenos y consideraron que la abundancia de géneros bacterianos que contienen patógenos humanos en las muestras de agua puede llegar a reflejar hasta cierto punto el contenido de patógenos humanos.

*Acinetobacter* fue el principal patógeno humano en potencia en el agua afluyente, con un 49,05%. Esta cifra descendió hasta el 2,04% una vez finalizado el tratamiento de las aguas residuales. A pesar de esto, seguía estando presente en S1, S2 y S3; por lo que concluyeron que se debía de seguir prestando atención a los posibles riesgos ecológicos que plantea.

Después de toda esta serie de datos llegaron a la conclusión de que, debido a la lentitud a la hora de incorporar nuevos avances tecnológicos en las instalaciones de saneamiento y tratamiento de aguas residuales, las masas de agua receptoras a menudo superan su posible capacidad máxima, lo que da

lugar a un aumento de la contaminación ambiental del agua como otros autores habían visto previamente<sup>39</sup>.

### **6.3 Incorporación de nuevos contaminantes**

Una nueva línea de investigación<sup>40</sup> pone de manifiesto la posibilidad de nuevos contaminantes emergentes, investigando así una posible simbiosis entre metales pesados y antibióticos; para poder comprobarlo realizaron un estudio investigando la posible asociación entre la resistencia a la tetraciclina y a los metales pesados de dos *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a este antibiótico (EW32 y EW33), aisladas de ambientes acuáticos próximos a industrias y a un hospital del sudeste de Brasil. El aislado EW32 poseía un plásmido conjugativo con resistencia a la tetraciclina y al cobre, lo que daba peso a la hipótesis de que la resistencia a los antibióticos por adquisición de plásmidos puede ser introducida por la presión selectiva de los metales pesados en el medio ambiente.

Los metales pesados no son perjudiciales en su presencia, puesto que algunos de ellos son esenciales para la supervivencia de muchos seres vivos, el inconveniente está en las altas concentraciones que se están encontrando, ya que ahí sí son tóxicos. Los organismos más desarrollados suelen someterse a los efectos tóxicos de los metales pesados, en cambio, los microorganismos tienen una variabilidad genética que les permite superar el estrés causado por estos elementos. Puesto que la concentración de metales ha ido aumentando vertiginosamente en el hábitat microbiana, parte de esto es por culpa de las actividades humanas. Fruto de esta situación los microorganismos han sido capaces de desarrollar diversos mecanismos de resistencia que permiten sobrevivir en presencia de metales<sup>41</sup>. El inconveniente de la aparición de esta resistencia es que va acompañada a la evolución de genes resistentes a los antibióticos. La aparición a la vez de resistencia a los metales pesados y a los antibióticos se ha convertido en una gran amenaza en potencia para la salud humana y sobre todo para el equilibrio del medio ambiente.

En el aspecto clínico, algunos estudios han sido capaces de demostrar una co-selección de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia a antimicrobianos y metales pesados. Otros autores<sup>42,43</sup> demostraron una correlación directa entre la resistencia al antibiótico imipenem y al metal pesado zinc. En este estudio se plantearon la hipótesis de la resistencia simultánea de las tetraciclinas y metales pesados debido al gran aumento a nivel mundial en el consumo de estos antibióticos y con ello el aumento de la resistencia a estos fármacos.

Lo primero que realizaron fue recoger muestras del río Pardo (EW32), en Brasil y de un lago de de la Universidad de São Paulo (EW33), de ahí se aislaron las especies de *P. aeruginosa* las cuales se confirmaron de manera molecular mediante la realización de una PCR del gen *oprL* siguiente paso que llevaron a cabo fue comprobar la susceptibilidad antimicrobiana con 17 fármacos diferentes mediante difusión en disco, posteriormente determinaron el valor de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para la tetraciclina, y ambos aislados demostraron una CIM > 250 µg/mL. Después de esto, utilizaron una vez más la PCR para la detección de resistencia a los metales, a través de los genes: *copA*, *copB*, *czcA* y *merA*. Obtuvieron que el aislado EW32 tenía todos los genes de resistencia a los metales pesados, pero fue capaz de crecer en presencia de 1mM de cobre y 10 mM de mercurio. El aislado EW33 poseía el gen *czcA*, pero no era resistente a la mayoría de los metales pesados, siendo capaz de crecer en presencia de 0,5 mM de cobre. Cuando ya tenían a su disposición los datos referentes a la resistencia a la tetraciclina y el perfil de resistencia del metal, llevaron a cabo los ensayos de conjugación para poder afirmar que los genes de resistencia a la tetraciclina y a los metales pesados pertenecían a los mismos plásmidos conjugados, siguieron las pautas descritas por Azevedo y Da Costa (1973). Realizaron una transmisión de plásmidos de los aislados EW32 y EW33 a la *E. coli* HB10, la cual es una cepa receptora que presenta resistencia a la estreptomicina y es sensible a la tetraciclina y positiva para el gen *czcA*, lo que dió como resultado los transconjugantes TrEW32 y TrEW33, que se apropiaron los plásmidos con 22,5 y 48 MDa de los aislados EW32 y EW33, respectivamente, y pasaron a llamarse pEW32 y pEW33. Para poder hacer la

confirmación de que la resistencia a la tetraciclina tenía una asociación a estos plásmidos, llevaron a cabo una PCR para poder amplificar el gen *tetA* con el donante, el receptor y también los transconjugantes; el resultado fue que los donantes y los transconjugantes poseían este gen. También analizaron el perfil de resistencia a los metales pesados, de lo que obtuvieron que el aislado EW32 mostraba todos los genes que habían analizado y su transconjugante presentaba los mismos genes menos *merA*. El aislado EW33 sólo presentaba el gen *czcA*, al igual que su transconjugante; ante este resultado quisieron amplificar este gen en los donantes y en los transconjugantes pero como se detectó en la cepa receptora no pudieron investigar la transferencia del gen. Por otro lado, a pesar de que el transconjugante de EW32 obtuviese los genes *copA* y *copB*, no pudo crecer en presencia de estas sales de metales pesados.

Por lo tanto, con este estudio pudieron demostrar que un plásmido conjugativo presente en *P. aeruginosa* aislada del agua podría presentar co-resistencia a la tetraciclina y al cobre, lo que sirve como refuerzo para la preocupación de que la resistencia a los antibióticos mediante la adquisición de plásmidos puede ser propulsada por la presión selectiva de los metales pesados en el medio ambiente<sup>44</sup>.

#### **6.4 Importancia de conocer el resistoma ambiental**

En este trabajo<sup>45</sup>, los autores realizan el estudio de resistencia a antibióticos mediante una novedosa técnica de secuenciación de nueva generación, donde se pueden detectar tanto las bacterias como los genes resistentes a los antibióticos que estén presentes en una muestra. A lo largo del estudio recogieron 18 muestras metagenómicas, con un número medio de lecturas brutas generado por muestra de alrededor de 25.780.855. En un principio, lo que realizaron fue una evaluación de la composición taxonómica a nivel de género de las diferentes matrices de las muestras, utilizando para ello la base de datos SILVA, como el fin que perseguían los autores era estudiar el perfil de la composición bacteriana de matrices diferentes, a las diferentes lecturas

generadas se le atribuyó taxones bacterianos ya conocidos, a través de la base de datos anteriormente mencionada (Tabla 4).

<i>Shewanella spp</i>	<i>Psychrobacter spp</i>	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Vibrio spp</i>	<i>Marinoscillum spp</i>
<i>Salmonella spp</i>	<i>Flavobacterium spp</i>	<i>Rhodobacteraceae spp</i>	<i>Spumella spp</i>	<i>Limnohabitans spp</i>
<i>Acinetobacter spp</i>	<i>Escherichia-Shigella spp</i>	<i>Sphingomonas spp</i>	<i>Hydrogenophaga spp</i>	<i>Caenimonas spp</i>
<i>Lactococcus spp</i>	<i>Pseudomonas spp</i>	<i>Poteroiochromonas spp</i>	Candidatus - Nitrotoga	<i>Novosphingobium spp</i>

**TABLA 5.** Los 20 tipos de géneros de bacterias más abundantes en las matrices de las muestras recogidas en el trabajo<sup>44</sup>.

La presencia de taxones se redujo considerablemente una vez que las aguas habían pasado por las EDAR, lo que pone de manifiesto que este paso es esencial para poder llegar a reducir la contaminación fecal pero que no es eficiente del todo, puesto que, en las aguas efluentes se sigue demostrando la presencia de organismos relevantes a nivel clínico.

Realizaron un análisis acerca de la diversidad, donde encontraron que la más alta la presenta el agua afluyente, seguido de los lodos de depuradoras y el valor más bajo lo presentaban las aguas fluviales.

Para poder hacer una valoración del contenido de genes de resistencia a los antibióticos de cada matriz, consultaron las secuencias metagenómicas en la base de datos CARD, los resultados que obtuvieron revelaron una gama amplia de genes. Identificaron una media de 156, 202, 217, 116, 36 y 161 genes de resistencia en aguas residuales hospitalarias, agua afluyente, lodos de depuradora, agua efluente, aguas y sedimentos fluviales, respectivamente. Los perfiles de genes fueron comparables, porcentualmente entre todos, excepto en los perfiles fluviales debido a que mostraban una incidencia diferente de perfiles. En un análisis más detallado, destacaron que los 8 primeros genes de resistencia a antibióticos más abundantes estaban asociados principalmente a *Pseudomonas spp.* y *Acinetobacter spp.* Con este hallazgo los autores sugieren



que la composición bacteriana de las aguas residuales no solo es reflejo de la composición bacteriana fecal, sino que también están presentes los cambios que se producen en los sistemas de alcantarillado.

*P. aeruginosa* y *A. baumannii* son resistentes a los carbapenemes y ambos figuran en la lista de patógenos prioritarios según la OMS para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos que permitan hacer frente a estas bacterias<sup>45</sup>. Ambas especies tenían una presencia de peso en las aguas residuales hospitalarias por ello, los autores determinaron que en un futuro sería conveniente realizar una serie de estudios para poder llegar a descifrar la distribución holística de estos géneros en los entornos ambientales y en los clínicos.

La mayoría de los genes encontrados en el estudio pertenecían a estos antibióticos: diaminopirimidina, colistina, aminoglucósidos, betalactámicos, fluoroquinolonas, rifampicina, glicopéptidos, tetraciclinas, lincosamidas, aminocumarina, sulfonamidas, macrólido, fenicol y estreptogramina.

Para darle valor al resistoma, definieron el resistoma central como los genes de resistencia a antibióticos compartidos en todas las matrices evaluadas, dando como resultado un valor de 36, donde el valor más alto lo obtuvieron los lodos de depuradoras, seguido por el agua afluyente.

También llevaron a cabo otros análisis para revelar el plasmidoma, el moviloma y el viruloma de cada matriz evaluada; para el plasmidoma encontraron 249 secuencias de plásmidos centrales, los cuales fueron compartidos entre todas las matrices y al igual que pasó con el valor del resistoma, aquí los valores más altos los volvían a presentar los lodos de depuradoras y el agua afluyente, el valor más bajo se dio en la matriz de las aguas fluviales.

No es de sorprender que, respecto a los resultados que fueron obteniendo, las aguas afluentes presentaran la mayor abundancia relativa de genes resistentes a los antibióticos, plásmidos, bacteriófagos, secuencias de inserción y transposones, así como de patógenos, seguido de los lodos de depuradoras. La menor abundancia relativa la presentó las aguas fluviales.

Pese a este hecho, el mayor riesgo de resistoma ambiental lo poseen las aguas residuales de hospitales con una puntuación media de riesgo de 46,34%, le



siguen las aguas afluentes con 39,67%, los lodos de depuradoras con 33,53%, aguas efluentes 28,84% y los sedimentos fluviales con 25,55%. Si se compara todas las puntuaciones de riesgo de resistoma relativa con la de las aguas fluviales, ésta es significativamente menor con un 15,11%.

Por lo tanto, según los datos anteriores los autores manifiestan la necesidad de que las aguas residuales, con puntuación más alta, deberían tener unas medidas estrictas de mitigación para conseguir minimizar la posibilidad de diseminación. Como se corrobora en unos de los trabajos<sup>46</sup>, entre las medidas más importantes y a la vez críticas para poder hacerle frente a las resistencias a los antibióticos, está la identificación de los puntos esenciales de control, que ponen de manifiesto el riesgo de resistoma ambiental, ayudando a la diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos así como a sus genes, por eso este estudio quiso caracterizar el núcleo del resistoma, el plasmidoma, el moviloma y el viruloma de los diferentes ambientes acuáticos para el control epidemiológico y las acciones de contención que se deberían llevar a cabo.

## **6.5 Los lodos de depuradora**

El último artículo recogido en este trabajo<sup>47</sup>, se trata de poner en manifiesto la necesidad de evaluar el riesgo de la evolución de la resistencia de los antibióticos a través de la aplicación en tierra de los lodos de depuradora, puesto que estos se han convertido en un subproducto cada día más presente en los procesos de tratamiento de las aguas residuales y que con frecuencia se usan como abono para el suelo, lo que traslada el problema de la resistencia a los antibióticos directamente a éste. Para que no tengan lugar futuros impactos en la fertilización, la Comisión Europea estableció algunos límites obligatorios de contenido de metales pesados, pero no se dice nada al respecto de los antibióticos pese a que, se han ido notificando nuevos contaminantes emergentes alrededor de todo el mundo.

Debido a la creciente contaminación farmacéutica en el medio ambiente, los autores de estos artículos consideraron que era el momento de evaluar el riesgo para la salud humana y medioambiental de la aplicación de lodos de depuradora

en el contexto de la propagación de la resistencia a los antibióticos y para ello, hacen un recorrido por los conocimientos que se tienen actualmente en este campo y así poder poner de manifiesto la falta que hacen más estudios en la materia.

La velocidad de adsorción que posee un fármaco depende de su estructura química, la movilidad, la hidrofobicidad, la biodegradación y la naturaleza del propio lodo; además a esto se le suma que los fármacos absorbidos son más estables en los lodos que en las aguas residuales. Debido al contenido de antibióticos, independientemente del método que se lleve a cabo, los lodos de depuradora tratados son ricos en bacterias resistentes a los antibióticos (ARB); los procesos de la digestión anaeróbica y la estabilización con cal reducen significativamente el número de ARB si se compara con los procesos de deshidratación simple y del espesamiento por gravedad.

Para poder saber la persistencia que puede tener los genes resistentes a los antibióticos (ARG), en los suelos fertilizados con lodos de depuradora se utilizaron diferentes métodos los cuales estaban basados en el cultivo, en estos estudios tuvieron en cuenta el tipo de abono que había sido utilizado, así como la dosis de residuos que se habían depositado, también utilizaron dos métodos: uno era basado en el cultivo y otro era independiente de éste. Los métodos basados en el cultivo sólo les permitieron cultivar una pequeña porción de las bacterias que están presentes en el suelo, aproximadamente el 1%, pese a este hecho, la información que les proporcionó era tan valiosa sobre el fenómeno de resistencia, que no les importó la poca variedad de bacterias que aportaba. Estos métodos les permitieron poder establecer el vínculo que existe entre los genes de resistencia a los antibióticos y sus huéspedes bacterianos.

Esperaban que, pese a que el número de bacterias transportadas con el fertilizante disminuyese con el paso del tiempo, pudieron ver algunos cambios en el conjunto de ARGs entre las bacterias que habitan en el suelo.

Los autores revisaron un estudio que tuvo una duración de 3 años realizado por Rahube et al., 2014, que sumó información relevante a la que ya había hasta el momento acerca de los impactos de la fertilización con lodos de depuradora crudos y biosólidos municipales deshidratados, lodos de depuradora dirigidos

anaeróbicamente, en la abundancia de ARB, patógenos y ARG en los suelos y en las plantas en el momento de la cosecha. En este estudio se verificó la presencia de bacterias tanto patógenas como coliformes, resistentes a los antibióticos mediante métodos dependientes del cultivo. Lo que obtuvieron fue que el número de bacterias viables evaluadas en los lodos de depuradora fue un valor mucho mayor en comparación con los biosólidos. El estudio no consiguió obtener diferencias significativas en el número de bacterias entéricas en el suelo y en las hortalizas en el momento de la cosecha, pero sí observaron un aumento en el número de *Clostridium perfringens* y el aumento de las bacterias coliformes resistentes a la cefoxitina en las zanahorias. No pudieron establecer un impacto coherente de las aplicaciones de biosólidos y lodos de depuradora.

Con otro enfoque de campo<sup>48</sup>, utilizaron los recuentos de placas viables para poder hacer una investigación sobre la influencia de los fertilizantes de residuos orgánicos animales y urbanos en la población de *Pseudomonas* en el suelo. La importancia de hacer el estudio sobre este género recae en que forman parte de las comunidades microbianas naturales del suelo y porque al ser patógenos oportunistas, la evaluación de las pseudomonas en el contexto de la resistencia a los antibióticos es de gran importancia. En su experimento trataron el suelo con estiércol, lodos de depuradora y residuos orgánicos domésticos separados en origen, a lo que le atribuyeron el nombre de compost. Determinaron que prevalencia había de la bacteria resistente a la tetraciclina y a la gentamicina, también analizaron los aislados resistentes para comprobar su multirresistencia. Como resultado obtuvieron que el número de aislados fue en aumento en los suelos tratados con aguas residuales y con compost directamente después de la fertilización, pero también se dieron cuenta que disminuyeron a una rápida velocidad conforme pasaba el tiempo.

Estos resultados pueden ser reflejo de la gran capacidad de supervivencia de las bacterias introducidas en el suelo con enriquecimiento transitorio de cepas resistentes autóctonas causado por la presión selectiva de los contaminantes derivados de los residuos. La mayoría de las pseudomonas resistentes a las tetraciclinas demostraron ser multirresistentes, lo que indica que, aunque la gran mayoría de las ARB mueren con el tiempo, algunas cepas multirresistentes

restantes o ARGs que se introdujeron una vez la comunidad microbiana puede ser que reaparezca en el suelo y contribuya a la reserva genética común.

Para llegar hacer una comparación sobre la persistencia de los determinantes de la resistencia a los antibióticos en los suelos fertilizados queda nombrar la evaluación por métodos independientes del cultivo, estos métodos aportan información sobre la diversidad de genes, así como de especies, limitación que poseían los métodos basados en el cultivo. Como inconveniente poseen que la extracción de ADN de alta calidad de matrices como pueden ser el suelo y los lodos de depuradora sigue siendo difícil. También la PCR y la qPCR que se realizan no son capaces de distinguir entre los genes derivados de bacterias vivas y muertas o si un producto de la PCR se amplifica en una plantilla genética completa y activa.

Se han utilizado para poder realizar diferentes estudios acerca de los MGE, debido a la gran importancia que tiene al ser portadores de resistencia a los antibióticos y a los metales pesados.

Los métodos de apareamiento que utilizan bacterias donantes recogidas directamente de una muestra permiten aislar determinantes de resistencia activos de las células vivas, lo que les permite determinar sus características estructurales y funcionales, incluida la dinámica de propagación. Con todos estos estudios lo que dejan claro es que hay un problema existente y claro, que son las bacterias en los lodos de depuradora y las consiguientes resistencias que aparecen y que tienen que empezar a tener solución.

## 7- DISCUSIÓN

Los antibióticos son medicamentos imprescindibles para la vida pues, estamos conviviendo con microorganismos y estos fármacos son la barrera que tenemos para defendernos.

Por la forma en la que el ser humano ha gestionado su uso, hoy día se han convertido en un problema que cada vez es más preocupante, estamos viviendo con resistencias a los antibióticos, genes de resistencias además de los patógenos; a lo que se le suma interacciones que dan como resultado una doble

resistencia, por una parte a los antibióticos y por otra a los metales pesados, mediante la hipótesis de que la adquisición de resistencia a los antibióticos por medio de la incorporación de un plásmido puede que también incorpore un gen de resistencia a los metales pesados, dando como fruto una doble resistencia<sup>36</sup>. Teniendo en cuenta los resultados de los artículos desarrollados en el apartado anterior, los autores consideraron que las EDAR realizan su papel a la hora de reducir el número de contaminantes, pues demostraron que se redujo el contenido de residuos humanos y de resistoma pero no las resistencias a los antibióticos. Uno de los artículos<sup>38</sup> trataba una EDAR en la que después de pasar el agua se la sometía a un proceso extra, Unitank en este caso, y después a otros procesos de desnitrificación, nitrificación y desinfección con cloro, apostando por el hecho de que después de estos procesos se redujese el número de contaminantes, los autores descubrieron que algunas concentraciones de antibióticos no disminuían mientras que otras sí lo hacían, una vez que se aplicaba el proceso Unitank (proceso cíclico de fangos activos). Esto puso de manifiesto que no todos los antibióticos necesitaban los mismos procesos, sino que había algunos que por sus características intrínsecas son más difíciles de eliminar<sup>37</sup>.

Analizando de forma concreta el resistoma, plasmidoma, moviloma y viruloma, los cuales dependen de la zona en la que se haya hecho el análisis, puesto que, la filogenética depende del hábitat y aquí tiene peso el nivel económico que presente la zona<sup>37</sup>. Muchos de los países que están luchando por conseguir su propio desarrollo no disponen de las plantas de tratamiento necesarias para depurar el agua y utilizan las aguas no tratadas para su vida cotidiana, lo que supone que todo lo que realicen con ella contenga bacterias, genes y más contaminantes emergentes que van surgiendo. Mientras que otros países sí que disponen de toda una red más avanzada de alcantarillado<sup>35</sup>, con incluso procesos extras que son una ayuda a la hora de eliminar los contaminantes, todo esto recogido en un marco legal que no es igual para todos los países y que difiere mucho entre los países desarrollados y los que están en vías de desarrollo.

Otro de los problemas que destacan los autores reside en los lodos<sup>38</sup>, pues estos son una prolongación de los contaminantes que puedan quedar después de la EDAR, su uso más habitual es como fertilizantes, estos contaminantes se instalan en la tierra directamente, incorporando los resistomas.

Finalmente, todos los autores destacan la importancia de un futuro donde se puedan realizar estudios sobre los factores que promueven o restringen el intercambio de resistencia a los antibióticos entre el microbiota ambiental, los comensales humanos, así como los patógenos, especialmente durante el tratamiento de los residuos.

## 8- CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden sacar del análisis de todos los estudios que se han ido enumerando a lo largo de esta revisión sistemática son en primer lugar, la visión de una EDAR, entender su funcionamiento, sus ventajas y sus inconvenientes, sabiendo que son un punto caliente donde se concentran tanto los antibióticos como los genes de resistencia, sin olvidar a los patógenos que conviven en los entornos acuáticos y, pese a que, tengan procedimientos complementarias a la función básica que tiene la EDAR los contaminantes siguen estando presentes.

- Hay una relación directa entre la presencia de antibióticos y el aumento de la resistencia a ellos en las aguas residuales; a través de la EDAR se pudo comprobar que el agua efluente poseía genes de resistencia a los antibióticos y éstos coincidían con los antibióticos más utilizados en la zona.
- Se demostró que, a través de la corresponsencia, que se da cuando genes de resistencia separada se sitúan en el mismo elemento genético, hay una relación entre la resistencia a los antibióticos y los metales pesados y que se están dando conjuntamente dentro de las bacterias. Al aumentar la cantidad de metales pesados en el medio ambiente los microorganismos desarrollaron diversos mecanismos para hacerse resistentes a estos metales, de la misma forma que adquirieron

resistencia antibióticos, ambas formas se dieron a la vez dando lugar a una co-resistencia.

- El resistoma ambiental de las aguas residuales es característico de una zona, y esa zona tiene toda una serie de variantes que pueden condicionar el resistoma, por ello, es imprescindible conocerlo, saber caracterizarlo para así poder llegar a saber tratarlo.
- Los lodos de depuradora forman parte del tratamiento de las aguas residuales, son la separación de aguas y sólidos y su posterior tratamiento. Su fin último es ser utilizado como fertilizante, por lo que si no se consigue eliminar los contaminantes emergentes, como son los genes de resistencias, lo que se está propiciando es la reinsertión de éstos en el medio ambiente.

## 9- REFERENCIAS

1. Wang J, & Zhuan R. (2020). Degradation of antibiotics by advanced oxidation processes: An overview. *Science of the Total Environment*, 701, 135023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135023>
2. Lázaro-Bengoia E, De Abajo Iglesias FJ, López-Navas A, & Fernández-Cortizo MJ. (2010). Uso de antibióticos en España y marco regulador para su desarrollo clínico en la Unión Europea. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(SUPPL. 4), 10–16. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70036-7](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70036-7)
3. Pérez R.M. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. Vol.22-Nº 3. 1998
4. Assress H.A, Nyoni H, Mamba B B, & Msagati, T. A. M. (2020). Occurrence and risk assessment of azole antifungal drugs in water and wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187(November 2019), 109868. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109868>
5. Burch K D, Han B, Pichtel J, & Zubkov T. (2019). Removal efficiency of commonly prescribed antibiotics via tertiary wastewater treatment.



- Environmental Science and Pollution Research*, 26(7), 6301–6310.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04170-w>
6. CENTA. (2008). Manual de depuración de aguas residuales urbanas. *Centa, Secretariado de Alianza Por El Agua, Ecología y Desarrollo.*, 264.
  7. Alós J.I. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Enf Infec Microbial Clin.* 2015; 3(10): 692-699.
  8. European Center for Disease Prevention and Control, 2014 [Sede Web] (Consultado 15 de febrero de 2021) :Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data>
  9. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the EFSA and laying down procedures in matters of food safety. OJ L 31, 1.2.2002, p. 1-24.
  10. Commission Implementing Decision 2013/652/EU of 12 November 2013 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria. OJ L 303, 14.11.2013, p. 26-29.
  11. Comisión Europea[Sede Web]. Bruselas: 20.10.2016 [citado 20 de febrero 2021]. Disponible en: <https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/pdf/reports/ES.pdf>
  12. Real Decreto-Ley 11/1995, 28 de de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. Boletín Oficial del Estado, nº312, (30-12-1995).
  13. Directiva 91/271/CEE, por el que se establecen que los Estados miembros aportarán medidas necesarias para garantizar que las aguas residuales son tratadas correctamente. Boletín Oficial del Estado, nº135, (30-05-1991).
  14. López del Pino S, Calderón J.M. Depuración de aguas residuales.5.1. España: elearning S.L;2017.
  15. Ministerio para la transición ecológica y el reto demográfico [Sede Web]. Madrid, [citado 30 de abril 2021]. Disponible en: <https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/pdf/reports/ES.pdf>
  16. Aigües de Barcelona, E. M. de G. del C. I. de l'Aigua. (2015). *Saneamiento y depuración de aguas residuales - Aigües de Barcelona*, [24 de abril de 2021]



Disponible en: <http://www.aiguesdebarcelona.cat/saneamiento-y-depuracion-de-aguas-residuales>

17. Mendoza C, Izquierdo G, Martínez R, & Ma, D. (2010). Opciones de valorización de lodos de distintas estaciones depuradoras de aguas residuales. *Ingeniería*, 14(3), 177–190.
18. Montes, M. (2008). *Estudio técnico-económico de la digestión anaerobia conjunta de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos y lodos de depuradora para la obtención de biogás*. 287.
19. Comisión Europea [Sede Web]. Bruselas, 10 de septiembre de 2020 [4 de febrero de 2021]. Aguas residuales urbanas: Décimo sobre el estado de ejecución. Disponible en: [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/es/qanda\\_20\\_1562](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/es/qanda_20_1562)
20. Villanueva A C, Flores H E, Sahagún R, Silva ÁS, Zamora H.D., Rojas I. R, et al (2013). Depuración de aguas residuales municipales con humedales artificiales. *Universidad Politécnica de Cataluña*, 1(3), 39–51.
21. Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos [Sede Web]. Estados Unidos, [20 de abril de 2021]. Disponible en: <https://espanol.epa.gov/>
22. Alvariño, C. R. (2006). Los residuos en la industria farmacéutica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 37(1), 25–31.
23. Vilanova R, Santín I, & Pedret C. (2017). Control and operation of wastewater treatment plants (I). *RIAI - Revista Iberoamericana de Automatica e Informatica Industrial*, 14(3), 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.riai.2017.05.004>
24. Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. [Sede Web]. Estados Unidos, [20 de enero 2021/12 de diciembre 2019; 20 de abril 2021]. Medline Plus [Aprox 2 pantallas]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/antibiotics.html>
25. Alós J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
26. Burch K D, Han B, Pichtel J, & Zubkov T. (2019). Removal efficiency of commonly prescribed antibiotics via tertiary wastewater treatment.

- Environmental Science and Pollution Research*, 26(7), 6301–6310.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04170-w>
27. Clínico San Carlos Madrid H, & Suárez Moya, A. (2017). Microbiome and next generation sequencing Microbioma y secuenciación masiva. *Secuenciación Masiva Rev Esp Quimioter*, 30(5), 305.
28. Roy, C. (1983). Resistencia Bacteriana a Los Antibioticos Betalactamicos. *Medicina Clinica*, 81(7), 299–301.
29. Pérez R. M. D. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica Del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 57–67.
30. Martínez-Martínez L, & Calvo J. (2010). Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: Causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clinica*, 28(SUPPL. 4), 4–9.  
[https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70035-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70035-5)
31. Cabrera E. C. M. S, Gomez F. R. B. S, & Zúñiga E. A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisepticos y desinfectantes. *Colombia Medica*, vol.38(2), 149–158.
32. Mata D. P. (2011). *Estudio de protocolos de comunicación bacterianos: conjugación y quorum sensing*.
33. Hídricos, Y. G. D. E. R. (2019). *I Resistant Bacterias To Antibiotics in Wastewater Treatment Stations*.
34. Pehrsson E. C, Tsukayama P, Patel S, Mejía-Bautista M, Sosa-Soto G, Navarrete K. M, Calderon M, et al. (2016). Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature*, 533(7602), 212–216.  
<https://doi.org/10.1038/nature17672>
35. Chen Y, Shen W, Wang B, Zhao X, Su L, Kong M, Li H, et al(2020). Occurrence and fate of antibiotics, antimicrobial resistance determinants and potential human pathogens in a wastewater treatment plant and their effects on receiving waters in Nanjing, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206(July), 111371. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111371>

36. Li F, Chen W, Bao Y, Zheng Y, Huang B, Mu Q, Wen D, et al 2020. Antibiotics in coastal water and sediments of the East China Sea: distribution, ecological risk assessment and indicators screening. *Mar. Pollut Bull.* 151, 110810.
37. Yan L, Liu D, Wang X. H, Wang Y, Zhang B, Wang M, and Xu H. (2017). Bacterial plasmid-mediated quinolone resistance genes in aquatic environments in China. *Scientific Reports*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep40610>
38. Feichtmayer J, Deng L, Griebler C, 2017. Antagonistic microbial interactions: contributions and potential applications for controlling pathogens in the aquatic systems. *Front. Microbiol* 8.
39. Kovalova L, Siegrist H, Singer H, Wittmer A, & McArdell, C. S. (2012). Hospital wastewater treatment by membrane bioreactor: Performance and efficiency for organic micropollutant elimination. *Environmental Science and Technology*, 46(3), 1536–1545. <https://doi.org/10.1021/es203495d>
40. Martins, V. V., Zanetti, M. O. B., Pitondo-Silva, A., & Stehling, E. G. (2014). Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: A human health hazard. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(9), 5873–5878. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2509-4>
41. Valdan E, Erijman L, Pessoa FLP, Leite SGT (2001) Continuous Biosorption of Cu and Zn by immobilized waste biomass *Sargassum* sp. *Process Biochem* 26:869-873
42. Conejo MC, Garcia I, Martinez-Martinez L, Picabea L, Pascual A (2003) Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2313–2315
43. Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL, Kohler T (2004) CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 279:8761–8768
44. Ekwanzala, M. D., Dewar, J. B., & Momba, M. N. B. (2020). Environmental resistome risks of wastewaters and aquatic environments deciphered by shotgun metagenomic assembly. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197(January), 110612. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110612>

45. Tang J, Bu Y, Zhang X. X, Huang K, He X, Ye L, Shan Z, et al (2016). Metagenomic analysis of bacterial community composition and antibiotic resistance genes in a wastewater treatment plant and its receiving surface water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 132, 260–269.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.016>
46. Berendonk U, Manaia M, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, Walsh F, Bürgmann H, et al, 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol.* 13,310-317.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>.
47. Bondarczuk, K., Markowicz, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2016). The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. *Environment International*, 87, 49–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.11.011>
48. Youngquist CP, Liu J, Orfe LH, Jones S.S, Call D.R, 2014. Ciprofloxacin residues in municipal biosolid compost do not selectively enrich populations of resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7521–7526.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02899-14>.