

**Evaluación de genes de resistencia a antibióticos y su remoción en la planta de tratamiento
de agua residual de la Universidad de Boyacá en Tunja**

Pablo Alberto Juan Camilo Vargas Henao

**Universidad de Boyacá
Facultad de Ciencias e Ingeniería
Ingeniería Ambiental
Tunja
2024**

**Evaluación de genes de resistencia a antibióticos y su remoción en la planta de tratamiento
de agua residual de la Universidad de Boyacá en Tunja**

Pablo Alberto Juan Camilo Vargas Henao

**Trabajo de grado para optar al título de:
Ingeniero Ambiental**

Directora:

**Zilpa Adriana Sánchez Quitian
PhD Cellular and Molecular Biology**

Codirector:

**Jaime Díaz Gómez
MSc. Environmental Science and Technology**

**Universidad de Boyacá
Facultad de Ciencias e Ingeniería
Ingeniería Ambiental**

**Tunja
2024**

Nota de Aceptación:

Firma del Presidente del Jurado

Firma del jurado

Firma del Jurado

Tunja, de 31 de Mayo de 2024.

“Únicamente el graduando es responsable de las ideas expuestas en el presente trabajo”.
(Lineamientos constitucionales, legales e institucionales que rigen la propiedad intelectual).

A mis padres,

En el sendero de la vida, su amor ha sido mi luz, su guía, mi refugio. En cada paso, en cada sueño, en cada logro, siempre estarán presentes. Gracias por ser mi mayor inspiración

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero reconocimiento a mis asesores, Zilpa Adriana Sánchez Quitian y Jaime Díaz Gómez, por su invaluable dirección y apoyo durante el desarrollo de este trabajo. Agradezco profundamente el tiempo y la paciencia que dedicaron para ayudarme a sortear los obstáculos que surgieron en el camino. Sus conocimientos compartidos fueron fundamentales para el desarrollo de este proyecto, y su constante apoyo no solo ha sido una guía, sino también un estímulo para mí. La claridad de su orientación y la confianza que depositaron en mí fueron fundamentales para alcanzar los objetivos propuestos en este trabajo de investigación.

También quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Universidad de Boyacá y a la Facultad de Ciencias e Ingeniería por brindarme su apoyo material y entorno institucional para el desarrollo de este trabajo. Su respaldo ha sido fundamental para llevar a cabo esta investigación de manera exitosa. La infraestructura, los recursos y el ambiente académico proporcionados por la universidad crearon las condiciones óptimas para llevar a cabo este proyecto de investigación. La oportunidad de formar parte de esta institución me ha permitido crecer tanto académica como personalmente, y estoy enormemente gratificado por ello.

Contenido

	Pág.
Introducción	18
Estandarizar los protocolos de extracción de ADN y PCR cuantitativa (qPCR) para la identificación y cuantificación de genes de resistencia	19
Muestreo.....	19
Toma de muestras	19
Procesamiento de muestras.....	20
Obtención de biomasa	20
Extracción y purificación de ADN.....	20
Determinación de la calidad y cantidad del ADN.....	21
Amplificación del gen ribosomal 16s para establecer ausencia de inhibidores	24
Amplificación de los genes de resistencia a antibióticos mediante PCR.....	25
Establecer cuáles genes de resistencia a antibióticos seleccionados, están presentes y su abundancia relativa en el afluente, efluente reactor UASB y efluente de la planta de tratamiento de agua residual de la Universidad de Boyacá.....	26
Cuantificación de genes de resistencia.....	27
Construcción del control de cuantificación.	27
Identificación de genes de resistencia.	27
Discusión de resultados	32
bla _{TEM}	32
tet(w):.....	32
bla _{CTX}	32
bla _{SHV}	33

Comparar la presencia de genes de resistencia encontrados en la PTAR de la Universidad de Boyacá con otros sistemas de tratamiento de aguas residuales que presenten parámetros operativos similares	34
Conclusiones	39
Recomendaciones	40
Referencias.....	41
Anexos	45

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Muestras obtenidas de la planta piloto de la Universidad de Boyacá.....	19
Tabla 2. Concentración de las muestras del afluente medidas en el Nanodrop	23
Tabla 3. Concentración de las muestras del efluente del reactor UASB medidas en el Nanodrop.....	23
Tabla 4. Concentración de las muestras del Efluente medidas en el Nanodrop	23
Tabla 5. Programas de termociclado establecidos para las condiciones de qPCR en el equipo CFX96 de BioRad.....	25
Tabla 6. Controles seleccionados.....	28
Tabla 7. Presencia de ARGs en diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales.....	36

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa para determinar la integridad del ADN, Pozo 1: Marcador de peso molecular, Pozo 2: AfR1 in house, Pozo 3: AfR1 Purificado, Pozo 4: AfR2 in house, Pozo 5: AfR2 Purificado, Pozo 6: UASBR1 in house, Pozo 7: UASBR1 Purificado, Pozo 8: UASBR2 in house, Pozo 9: UASBR2 Purificado, Pozo 10: EfR1 in house, Pozo 11, EfR1 Purificado, Pozo 12: EfR2 in house, Pozo 13: EfR2 Purificado.....	21
Figura 2. Pozo 1: Marcador de peso molecular, Pozo 2: AfR1, Pozo 3: AfR2, Pozo 4: UASBR1, Pozo 5: UASBR2, Pozo 6: EfR1, Pozo 7: EfR2.....	24
Figura 3. Resultado de la estandarización de la qPCR para los genes bla _{TEM} (Rojo), bla _{SHV} (Azul), bla _{CTX} (Verde), tet(w) (Amarillo).....	26
Figura 4. Amplificación de controles positivo, negativo y NTC para bla _{TEM} , tet(w), bla _{CTX} y bla _{SHV}	28
Figura 5. Amplificación de las muestras del afluente (Rojo), UASB (Azul) y efluente de la PTAR (Verde) para bla _{TEM}	29
Figura 6. Amplificación de las muestras del afluente (rojo), UASB (Azul) y efluente de la PTAR (Verde) para tet(w).....	30
Figura 7. Amplificación de las muestras afluente (rojo), UASB (Azul) y efluente de la PTAR (Verde) bla _{CTX}	31
Figura 8. Amplificación de las muestras del afluente (rojo), UASB (Azul) y efluente de la PTAR (Verde) bla _{SHV}	31
Figura 9. Presencia de los genes de resistencia bla _{TEM} , tet(w), bla _{CTX} y bla _{SHV} en la PTAR de la UdB.....	33

Lista de Anexos

	Pág.
Anexo A. Anteproyecto.....	46

Glosario

Agua residual: aguas usadas en actividades humanas que contienen diversos contaminantes, como residuos domésticos, industriales o agrícolas.

Antibióticos: sustancias químicas utilizadas para tratar infecciones bacterianas al inhibir el crecimiento o destruir las bacterias.

Bacterias resistentes: bacterias que han desarrollado la capacidad de resistir los efectos de los antibióticos y otros antimicrobianos.

Contaminantes emergentes: sustancias químicas o biológicas que representan un riesgo para la salud humana y el medio ambiente y cuya presencia en el agua ha sido identificada recientemente.

Ct (Cycle threshold): el ciclo de umbral refleja el número de ciclo en el que la fluorescencia generada dentro de una reacción cruza el umbral. Está inversamente correlacionado con el logaritmo del número de copia inicial. El valor C, asignado a un pocillo particular refleja así el punto durante la reacción en el que se ha acumulado un número suficiente de amplicones. También llamado punto de cruce (C) en la terminología de LightCycler.

Elementos genéticos móviles: secuencias de ADN que tienen la capacidad de moverse dentro del genoma de un organismo, como los plásmidos, transposones y fagos.

Fagos: virus que infecta bacterias y utiliza la maquinaria celular de estas últimas para replicarse y producir más virus.

Genes de resistencia antimicrobiana: secuencias de ADN que proporcionan a los microorganismos la capacidad de resistir los efectos de los antimicrobianos, como los antibióticos.

Plásmidos: fragmentos de ADN circulares que se replican de forma independiente del

cromosoma bacteriano y que pueden contener genes de resistencia a antibióticos.

PTAR (Planta de Tratamiento de Aguas Residuales): instalación diseñada para eliminar los contaminantes presentes en el agua residual antes de su descarga al medio ambiente.

qPCR cuantitativa en tiempo real: es una técnica de biología molecular ampliamente utilizada para cuantificar la cantidad de ADN presente en una muestra. A diferencia de la PCR convencional, la qPCR permite no solo amplificar, sino también cuantificar el ADN en tiempo real durante el proceso de amplificación. Esto se logra mediante la detección de la fluorescencia generada por una sonda específica que se une al ADN amplificado. La cantidad de fluorescencia emitida está directamente relacionada con la cantidad inicial de ADN presente en la muestra, lo que permite una medición precisa de la cantidad de ADN.

Transposones: segmentos de ADN que pueden moverse de un lugar a otro en el genoma de un organismo, transportando consigo genes de resistencia a antibióticos.

Resumen

Evaluación de genes de resistencia a antibióticos y su remoción en la planta de tratamiento de agua residual de la Universidad de Boyacá en Tunja:

La creciente resistencia antimicrobiana (RAM) plantea importantes desafíos para la salud pública y la conservación del medio ambiente a nivel global. Los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) se han identificado como contaminantes emergentes, encontrándose en concentraciones más elevadas en entornos acuáticos, especialmente en aguas residuales. Estos genes representan un riesgo potencial tanto para la salud humana como para la salud de los ecosistemas, ya que los sistemas de tratamiento de aguas residuales no logran eliminarlos de manera efectiva.

El objetivo de este estudio fue identificar 11 genes de resistencia a antibióticos en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de la Universidad de Boyacá. Para esto se tomaron muestras de agua residual del afluente de la planta, el afluente del reactor UASB y del efluente de la PTAR. Así mismo se logró estandarizar los protocolos de extracción de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), esta última para los genes *bla_{TEM}*, *tet(w)*, *bla_{CTX}* y *bla_{SHV}*, cuatro de los 11 genes de resistencia planteados inicialmente.

Los resultados evidenciaron la presencia de los genes *bla_{TEM}*, *tet(w)*, *bla_{CTX}* y *bla_{SHV}* en todas las muestras recolectadas. Para los siete genes restantes no se logró estandarizar el protocolo de amplificación debido a que los controles positivos de estos otros genes no amplificaron correctamente. Estos resultados sugieren que, durante el tratamiento del agua residual, que incluye el paso por el reactor UASB, los genes de resistencia a antibióticos estudiados no fueron removidos.

Así mismo, al comparar los resultados obtenidos con lo encontrado en otras plantas de tratamiento similares, como la PTAR de Cataluña-España, Beijín-China y en Antioquia-Colombia, coinciden en reportar una mayor abundancia de los genes *bla_{TEM}* y *bla_{CTX}*, sugiriendo que los procesos de tratamiento de agua residual, que para estas plantas incluyen el reactor UASB y el humedal, presentan una capacidad de remoción de genes de resistencia muy limitada. Esto refuerza la

asociación de las PTARs como fuentes de proliferación de genes de resistencia.

Palabras clave: Agua residual (AR), Genes de Resistencia a Antibióticos (ARGs), Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR), Reactor UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket).

Abstract

Assessment of antibiotic resistance genes and their removal in the wastewater treatment plant of the University of Boyacá in Tunja:

The increasing antimicrobial resistance (AMR) poses significant challenges for public health and environmental conservation at a global level. Antibiotic resistance genes (ARGs) have been identified as emerging contaminants, found in higher concentrations in aquatic environments, especially in wastewater. These genes represent a potential risk for both human health and ecosystem health, as wastewater treatment systems fail to effectively eliminate them.

The objective of this study was to identify 11 antibiotic resistance genes in the Wastewater Treatment Plant (WWTP) at the University of Boyacá. For this purpose, wastewater samples were taken from the plant's influent, the UASB reactor influent, and the WWTP effluent. Additionally, protocols for DNA extraction and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were standardized, the latter for the genes *bla_{TEM}*, *tet(w)*, *bla_{CTX}*, and *bla_{SHV}*, four of the 11 initially proposed resistance genes.

The results showed the presence of the *bla_{TEM}*, *tet(w)*, *bla_{CTX}*, and *bla_{SHV}* genes in all collected samples. For the remaining seven genes, the amplification protocol could not be standardized because the positive controls for these other genes did not amplify correctly. These results suggest that, during wastewater treatment, which includes passing through the UASB reactor, the studied antibiotic resistance genes were not removed.

Moreover, when comparing the obtained results with those found in similar treatment plants, such as the WWTP in Catalonia-Spain, Beijing-China, and Antioquia-Colombia, they consistently reported a higher abundance of the *bla_{TEM}* and *bla_{CTX}* genes, suggesting that the wastewater treatment processes in these plants, which include the UASB reactor and the wetland, have a very limited capacity to remove resistance genes. This reinforces the association of WWTPs as sources of the proliferation of resistance genes.

Keywords: Wastewater (WW), Antibiotic Resistance Genes (ARGs), Wastewater Treatment Plants (WWTPs), Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor (UASB)

Introducción

La resistencia antimicrobiana (RAM) es una preocupación creciente en la salud pública y el medio ambiente a nivel mundial. Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, los antibióticos han sido una herramienta fundamental en la lucha contra las infecciones bacterianas. Sin embargo, el uso excesivo e inadecuado de estos medicamentos ha acelerado la evolución de la RAM, dificultando el tratamiento de infecciones comunes y aumentando el riesgo de propagación de enfermedades más graves (World health organization, 2021).

La resistencia antimicrobiana ha evolucionado a lo largo de la historia como resultado de la exposición de microorganismos a agentes antimicrobianos. Desde la introducción de los primeros antimicrobianos, como las sulfamidas y las penicilinas, se ha observado un aumento constante en la resistencia bacteriana a estos fármacos (Unemo et al., 2016).

Los ARGs son secuencias de ADN que confieren a las bacterias la capacidad de resistir los efectos de los antibióticos, lo que les permite sobrevivir y proliferar en presencia de estos fármacos. Estos genes pueden encontrarse en bacterias patógenas, así como en bacterias no patógenas presentes en el medio ambiente. La presencia de ARGs en las PTAR plantea un riesgo para la salud pública y el medio ambiente, ya que pueden transferirse a bacterias patógenas y propagar la resistencia a los antibióticos.

Las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) juegan un papel crucial en la dispersión de dichos genes de resistencia. Estas instalaciones se encargan de tratar las aguas residuales antes de ser liberadas al medio ambiente, con el objetivo de eliminar contaminantes y proteger la salud humana y ambiental. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las PTAR pueden ser una fuente importante de contaminación por genes de resistencia a antibióticos.

En el contexto de esta problemática, esta investigación se centra en identificar los genes de resistencia a antibióticos presentes en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de la Universidad de Boyacá, con el objetivo de comprender la capacidad de remoción de estos genes, contribuyendo así al cumplimiento del Objetivo de Desarrollo Sostenible ODS 6: Agua limpia y saneamiento

Estandarizar los protocolos de extracción de ADN y PCR cuantitativa (qPCR) para la identificación y cuantificación de genes de resistencia

Para la estandarización de los procesos de extracción de ADN y amplificación de ARGs mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) presentes en la PTAR de la Universidad de Boyacá se llevaron a cabo los protocolos descritos a continuación:

Muestreo

Toma de muestras

Se llevó a cabo un muestreo de tipo compuesto el cual consistió en la toma de una alícuota determinada a cada hora, durante 24 horas para la conformación final de una muestra, esto basado en la variabilidad del caudal durante el tiempo determinado del muestreo, estos volúmenes tomados se mezclaron para formar una muestra total representativa de la composición del agua residual a lo largo del tiempo de muestreo. De esta manera se tomó un litro de muestra para cada uno de los tres puntos seleccionados; afluente, efluente del reactor UASB y efluente de la PTAR, cada punto el muestro se realizó por duplicado para un resultado final de 6 muestras compuestas de 1 L cada una, como se muestra en la tabla 1. El muestreo se realizó según la Guía Técnica Colombiana GTC 28 (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Calidad, 2015).

Tabla 1

Muestras obtenidas de la planta piloto de la Universidad de Boyacá

Origen	Replica	Designación
<i>Afluente</i>	R1	AfR1
<i>Afluente</i>	R2	AfR2
<i>Efluente del UASB</i>	R1	UASBR1
<i>Efluente del UASB</i>	R2	UASBR2
<i>Efluente PTAR</i>	R1	EfIR1
<i>Efluente PTAR</i>	R2	EfIR2

Fuente: autor de la investigación

Procesamiento de muestras

Las muestras se filtraron primero por una membrana de 0,45 μm y luego con una de 0,22 μm . Los filtros se almacenaron en tubos Falcon de 50 mL, asegurándose de que cada uno contuviera al menos 8 filtros. Estos tubos se conservaron a 4°C hasta el inicio del proceso de obtención de la biomasa (Posada-Perlaza et al., 2019).

Obtención de biomasa

Para obtener la biomasa retenida en los filtros, estos fueron resuspendieron con 25 mL de solución fosfato salina (PBS) 1X más Tween 20, llevándolos a incubar por 30 minutos a 30°C y 200 RPM. Durante este tiempo, se sometieron a Vortex tres veces por 1 minuto cada 10 minutos. Posteriormente, se removieron y descartaron los filtros y se centrifugo a 5000 g durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se pesaron los tubos Falcon para determinar la cantidad de biomasa que se obtuvo (Posada-Perlaza et al., 2019).

Extracción y purificación de ADN

La extracción de ADN se realizó según lo reportado por Posada-Perlaza (2019) con algunas modificaciones, este protocolo fue denominado *in house* dado que se realiza con reactivos preparados en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Boyacá y no corresponde a un kit o estuche comercial. Para esto, la biomasa obtenida en el paso anterior, se resuspendió en 500 μL de EDTA 50 mM adicionando 125 μL de lisozima y se incubo a 37 °C por 1 hora. Luego, se agregó 5 μL de proteinasa K y se incubo durante 1 hora a 56 °C, seguido de un proceso de extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (Posada-Perlaza et al., 2019). Posteriormente, cada una de las muestras de ADN extraído se purificó con el kit de extracción de suelos E.Z.N.A OMEGA, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El ADN obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

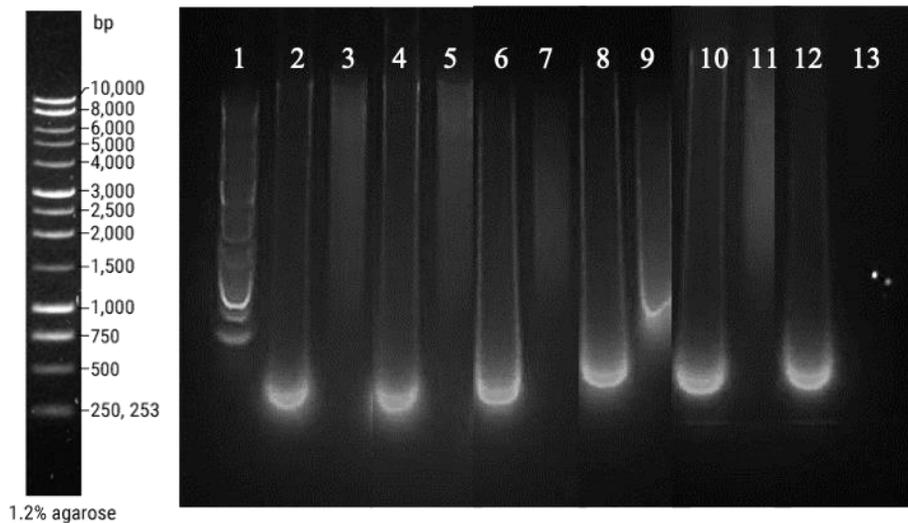
Determinación de la calidad y cantidad del ADN

La calidad y cantidad de ADN se evaluó tanto para el ADN obtenido después del protocolo de extracción *in house* como después de realizar el proceso de purificación. Esta evaluación se estableció mediante electroforesis en gel de agarosa para determinar la integridad del material genético y por espectrofotometría para determinar tanto la concentración como la posible presencia de contaminantes mediante la relación 260/280 y 260/230nm.

La electroforesis reveló diferencias en la integridad del ADN antes y después del proceso de purificación. El ADN resultante del proceso de extracción *in house* presentó degradación (Figura 1), mientras que después de la purificación, buena parte del ADN degradado no es retenido en las columnas de purificación y se observa ADN de mejor calidad (Desjardins y Conklin, 2010).

Figura 1

Electroforesis en gel de agarosa para determinar la integridad del ADN, Pozo 1: Marcador de peso molecular, Pozo 2: AfR1 in house, Pozo 3: AfR1 Purificado, Pozo 4: AfR2 in house, Pozo 5: AfR2 Purificado, Pozo 6: UASBR1 in house, Pozo 7: UASBR1 Purificado, Pozo 8: UASBR2 in house, Pozo 9: UASBR2 Purificado, Pozo 10: Efr1 in house, Pozo 11, Efr1 Purificado, Pozo 12: Efr2 in house, Pozo 13: Efr2 Purificado.



Fuente: autor de la investigación

En las tablas 2, 3 y 4 se presentan los resultados de cuantificación obtenidos mediante Nanodrop. La relación 260/280 permite evaluar la pureza del ADN, este debe estar en un rango de

1.8 a 2.0, si la relación es inferior a 1.8, podría indicar la presencia de contaminantes como proteínas u otros compuestos que absorben a 280 nm (Desjardins y Conklin, 2010). El ADN obtenido después del proceso de extracción *in house* presentó en promedio valores fuera de este rango ideal de 1.8, lo que refleja gran cantidad de impurezas, estas impurezas pueden ser hidratos de carbono, péptidos, fenoles, sales tampón, y otros compuestos aromáticos. Por otro lado, las muestras de ADN después del proceso de purificación mostraron valores más cercanos a 1.8 lo que indica que la purificación permitió la eliminación de algunos contaminantes. En cuanto a la relación 260/230 donde un valor ideal de esta relación se sitúa entre 1.8 y 2.2, valores menores a 1.8 pueden sugerir la presencia de contaminantes como EDTA, carbohidratos y fenoles, mientras que valores mayores a 2.2 podrían indicar contaminación con polisacáridos y polifenoles (Desjardins y Conklin, 2010). Los valores de 260/230 establecidos en las muestras son muy lejanos al valor ideal de pureza esperado para esta relación, en promedio las muestras de ADN de los diferentes puntos presentaron valores cercanos a 1,0 lo que indica la presencia de contaminantes. A pesar de estos resultados, se evidenció una disminución en los contaminantes después de la purificación del ADN.

En relación a la concentración de este ácido nucleico, las réplicas de cada punto de muestreo tienen valores similares, siendo estos bastante altos (desde 322 ng/μL hasta 640 ng/μL) para el ADN resultante de la extracción *in house*. Sin embargo, una vez purificado el ADN, la concentración disminuyó drásticamente, llegando a valores cercanos a los 20 ng/μL, exceptuando el ADN de las muestras del efluente de la PTAR que presentaron valores inferiores, de 13 ng/μL y 2,6 ng/μL para las réplicas 1 y 2 respectivamente. Esta variación en la concentración antes y después del proceso de purificación pueden darse debido a la eliminación de contaminantes que pueden aumentar artificialmente la concentración medida por espectrofotometría, debido a que absorben luz a 260 nm junto con el ADN, como algunas proteínas, que, aunque absorben fuertemente a 280 nm, también tienen cierta absorción a 260 nm. Además, la presencia de ARN en la muestra también contribuye a una sobreestimación de la concentración de ADN, ya que ambos absorben a 260 nm (Bruijns et al., 2022).

Tabla 2*Concentración de las muestras del afluente medidas en el Nanodrop*

Tipo de muestra	[ng/μL]	260/280	260/230
<i>AfR1</i>	568,945	1,6165	1,136
<i>AfR1 Purificado Kit Omega</i>	22,945	1,792	1,4135
<i>AfR2</i>	540,055	1,6595	0,5615
<i>AfR2 Purificado kit Omega</i>	20,94	1,887	1,67

Fuente: autor de la investigación

Tabla 3*Concentración de las muestras del efluente del reactor UASB medidas en el Nanodrop*

Tipo de muestra	[ng/μL]	260/280	260/230
<i>UASBR1</i>	322,025	1,4585	0,5545
<i>UASBR1 Purificado Kit Omega</i>	25,605	1,481	0,643
<i>UASBR2</i>	540,055	1,6595	0,5615
<i>UASBR2 Purificado kit Omega</i>	24,715	1,7055	1,448

Fuente: autor de la investigación

Tabla 4*Concentración de las muestras del Efluente medidas en el Nanodrop*

Tipo de muestra	[ng/μL]	260/280	260/230
<i>EfR1</i>	640,52	1,575	0,672
<i>EfR1 Purificado Kit Omega</i>	13,865	2,113	1,508
<i>EfR2</i>	545,465	1,517	0,5625
<i>EfR2 Purificado kit Omega</i>	2,595	2,7335	1,0345

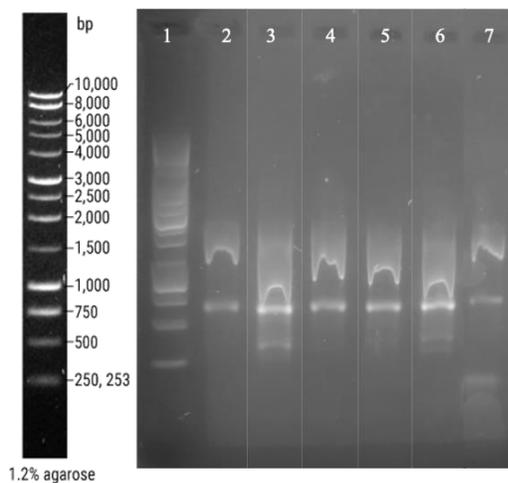
Fuente: autor de la investigación

Amplificación del gen ribosomal 16s para establecer ausencia de inhibidores

Se seleccionó el gen ribosomal 16s para determinar la ausencia de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el ADN extraído y purificado. Para la amplificación de este gen se utilizaron los iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Heuer, 1997). La mezcla contenía 12 µl de MsterMix 2X (abm), 5 pmol de Primer 27F y 1492R y 8 ng de ADN, llevados hasta un volumen final de 30 µL con agua ultrapura. La PCR fue realizada en un termociclador Axygen® MaxyGene II Thermal Cycler iniciando con un ciclo de 4 min a 96 °C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 57 °C y 1 min a 72 °C y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 min. Los productos de amplificación se analizaron en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TBE 1X (figura 2).

Figura 2

Pozo 1: Marcador de peso molecular, Pozo 2: AfR1, Pozo 3: AfR2, Pozo 4: UASBR1, Pozo 5: UASBR2, Pozo 6: Efr1, Pozo 7: Efr2.



Fuente: autor de la investigación, electroforesis para la identificación del gen ribosomal 16s

La electroforesis muestra amplificación del gen 16s en todas las muestras, evidenciando una banda cercana a 1500 pb que es el tamaño reportado para este gen bacteriano. Así mismo, se evidenció amplificación de otras bandas de menor tamaño que pueden corresponder a inespecificidades de los iniciadores o a la heterogeneidad que el gen ribosomal 16s presenta en las diferentes especies bacterianas (Fogel et al., 1999).

Amplificación de los genes de resistencia a antibióticos mediante PCR

Para realizar amplificación por PCR se siguió las condiciones reportadas por Pajaro-Herazo 2019 con modificaciones, para esto se usará un volumen total de 20 μL , en el cual 1 μL correspondió a ADN obtenido a partir de agua residual y 19 μL a la mezcla reacción. La mezcla contuvo 10 μL de Master Mix *iTaq Universal SYBR® Green Supermix*, 0.6 μL de cada primer (Forward y reverse), el volumen final por muestra se completa con 7,8 μL de agua grado molecular (Pajaro-Herazo, 2019). Las condiciones de termociclado estandarizadas para los genes *bla_{TEM}*, *tet(w)*, *bla_{CTX}* y *bla_{SHV}* que se utilizaron se describen en la tabla 5.

Tabla 5

Programas de termociclado establecidos para las condiciones de qPCR en el equipo CFX96 de BioRad

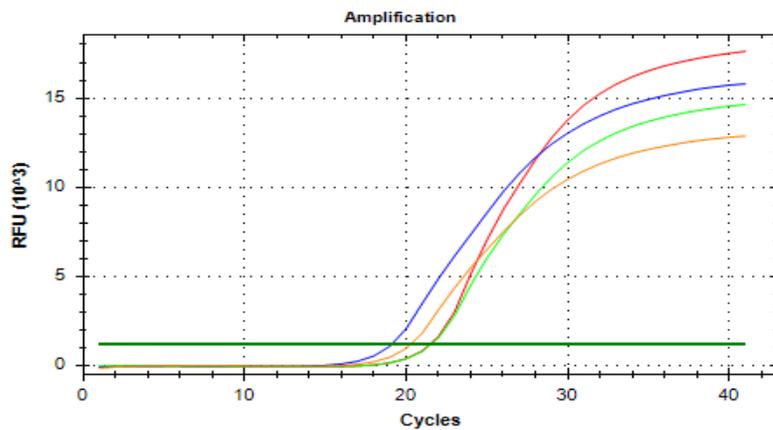
Programa	Gen	Condición de qPCR
Res 1	<i>bla_{TEM}</i>	95°C (3 min); 95°C (15 seg); 60°C (20 seg). (40 ciclos)
	<i>tet(w)</i>	
	<i>bla_{CTX}</i>	
Res 7	<i>bla_{SHV}</i>	95°C (3 min); 95°C (15 seg); 64°C (30 seg). (40 ciclos)

Fuente: autor de la investigación

Los resultados de la amplificación por PCR utilizando las condiciones reportadas por Pájaro 2019 con modificaciones muestran una exitosa amplificación de los genes *bla_{TEM}*, *tet(w)*, *bla_{CTX}* y *bla_{SHV}*, a partir del ADN obtenido de aguas residuales, esto evidenciado a partir de las curvas de amplificación que se explican en detalle en el siguiente capítulo. Así mismo, como observado en la Figura 3, las condiciones estandarizadas de termociclado para cada gen descritas en la Tabla 5 garantizaron la amplificación específica de los genes objetivo. El uso de un Master Mix, como *iTaq Universal SYBR® Green Supermix*, simplificó la configuración de la PCR y aumentó la reproducibilidad de los resultados. El uso de cebadores específicos para cada gen permitió la amplificación selectiva de los genes objetivo, mientras que el agua de grado molecular garantizó la pureza de la mezcla de reacción.

Figura 3

Resultado de la estandarización de la qPCR para los genes *bla_{TEM}* (Rojo), *bla_{SHV}* (Azul), *bla_{CTX}* (Verde), *tet(w)* (Amarillo).



Fuente: autor de la investigación

Establecer cuáles genes de resistencia a antibióticos seleccionados, están presentes y su abundancia relativa en el afluente, efluente reactor UASB y efluente de la planta de tratamiento de agua residual de la Universidad de Boyacá

Cuantificación de genes de resistencia

Construcción del control de cuantificación

Para realizar la cuantificación de los ARGs fue necesario construir un control con concentración conocida en pares de bases y ng/ μ L. Para esto se seleccionó la cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 que presenta el gen de resistencia a betalactámicos de primera generación *bla*_{TEM}. El ADN del gen fue amplificado empleado las condiciones de PCR descritas en la Tabla 5.

El producto de PCR fue clonado en el vector TOPO, empleando el kit de clonación pCR2.1-TOPO y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Posteriormente, se realizó la transformación de las células competentes de *E. coli* One Shot TOP10 Cells (Invitrogen) e inoculadas en medios de cultivo LB con 50mg/ μ L de ampicilina. Las colonias obtenidas fueron sembradas en caldo LB y posteriormente se realizó la extracción de ADN plasmidial empleando el kit comercial FastGene Plasmid Mini.

Para la confirmación de la clonación del gen *bla*_{TEM} se realizó la electroforesis donde se esperaba evidenciar el tamaño del vector más el gen de resistencia clonado, sin embargo, no fue posible confirmar la clonación.

Identificación de genes de resistencia

Los genes *bla*_{TEM}, *tet*(w), *bla*_{CTX}, y *bla*_{SHV} se identificaron utilizando el equipo CFX96 de BioRad. Para qPCR se realizó una mezcla de reacción con un volumen final de 20 μ L que contenía 10 μ L de qPCR Mastermix iTaq Universal SYBR® Green Supermix 1X, 0,6 μ L de cada uno de los iniciadores forward y reverse para cada gen, 7,8 μ L de agua de grado molecular y 1,0 de ADN previamente extraído. El protocolo de amplificación empleado fue descrito en el capítulo 1, tabla 5. Cada reacción se realizó por duplicado, incluyendo controles positivos, negativos y control de esterilidad de reactivos o NTC (No template control) (Huy et al., 2021).

En cuanto a los controles, se realizó la selección de las cepas control (positivo y negativo) para cada ARGs a evaluar, amplificando ADN de 11 cepas bacterianas ATCC. Los controles (positivos y negativos) empleados para los genes de resistencia *bla_{TEM}*, *tet(w)*, *bla_{CTX}* y *bla_{SHV}* se muestran en la tabla 6 y las curvas de amplificación están en la figura 4sjejdbfidj.

Tabla 6

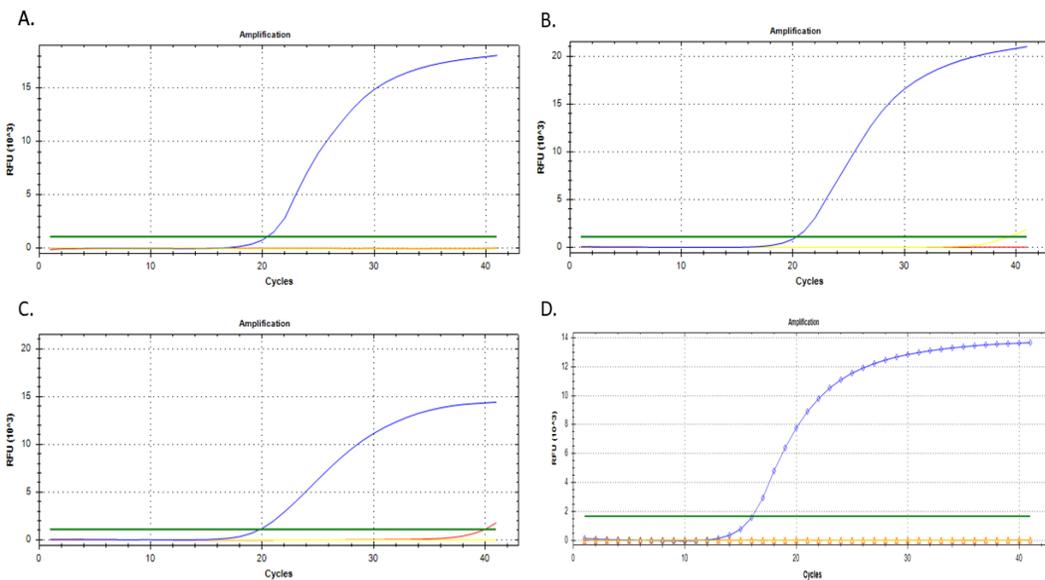
Controles seleccionados

<i>Control</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>tet(w)</i>	<i>bla_{CTX}</i>	<i>bla_{SHV}</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>Positivo</i>	<i>pneumoniae</i> ATCC 1706	<i>brevis</i> ATCC 14869	<i>coli</i> ATCC 25922	<i>pneumoniae</i> ATCC 1706
<i>Negativo</i>	<i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> ATCC 13882	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> ATCC 13882	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> ATCC 51331

Fuente: autor de la investigación

Figura 4

Amplificación de controles positivo, negativo y NTC para bla_{TEM}, tet(w), bla_{CTX} y bla_{SHV}



Fuente: autor de la investigación

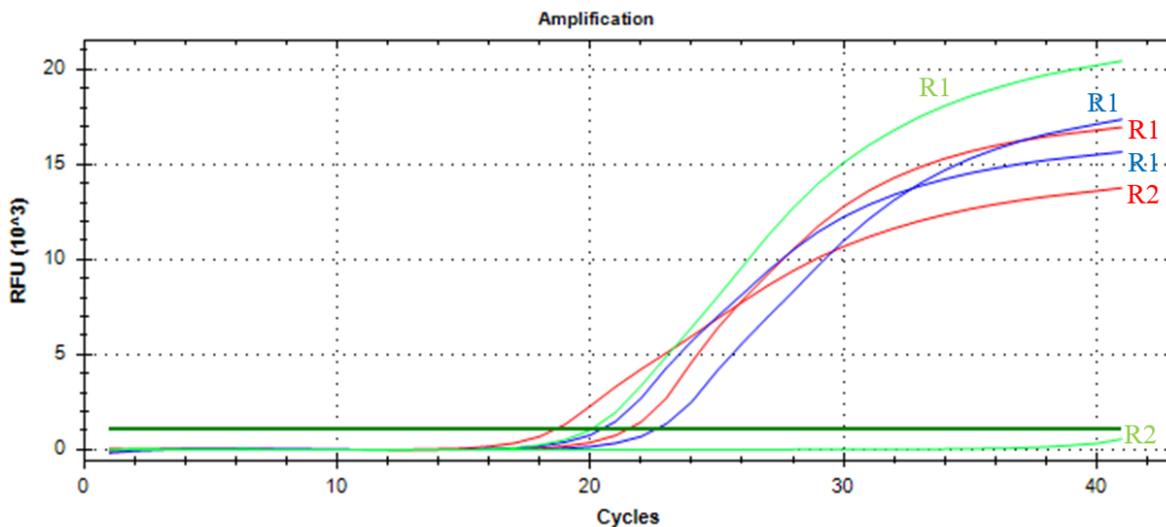
En la figura 4, se observa la amplificación del control positivo (azul), así como la no

amplificación del control negativo (amarillo) y NTC (verde) para cada uno de los genes de resistencia seleccionados A. *bla_{TEM}*, B. *tet(w)*, C. *bla_{CTX}* y D. *bla_{SHV}*, se puede observar que en todos los casos se obtuvo las cepas control y se pudo proceder a la identificación de cada uno de los genes en las muestras.

Amplificación gen *bla_{TEM}*. La amplificación del gen *bla_{TEM}* ocurrió en todas las muestras, como se muestra en la Figura 5. Sin embargo, en la réplica 2 del efluente de la planta, no se observó una curva de amplificación debido a la concentración insuficiente de ADN en la muestra, por lo que fue necesaria repetirla aumentando la cantidad de ADN adicionada a la mezcla, evidenciado la amplificación correspondiente al gen *bla_{TEM}*. Las curvas de amplificación en las muestras del afluyente, el reactor UASB y el efluente indicaron la presencia del gen en todos los puntos de muestreo.

Figura 5

*Amplificación de las muestras del afluyente (Rojo), UASB (Azul) y efluente de la PTAR (Verde) para *bla_{TEM}**



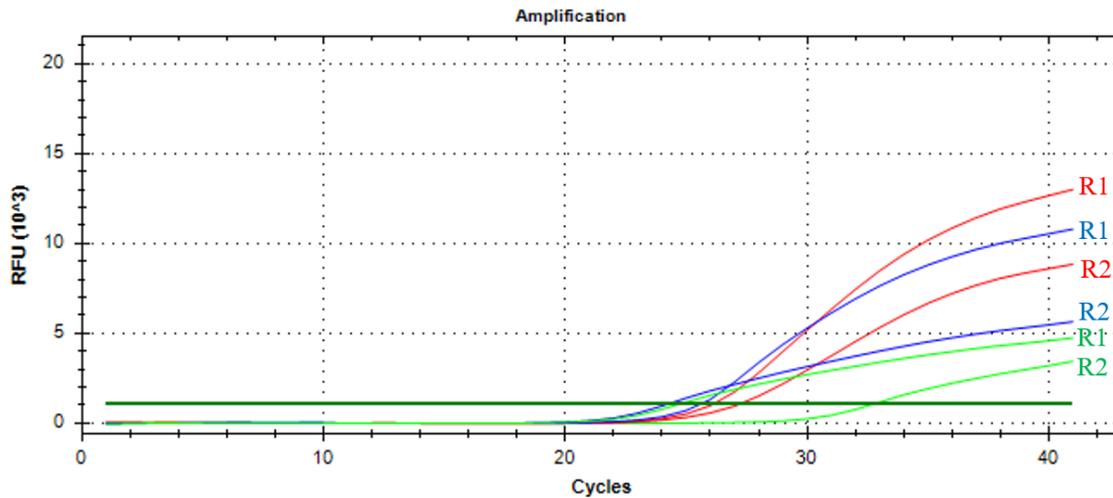
Fuente: autor de la investigación

Amplificación gen *tet(w)*: Todas las muestras presentaron el gen *tet(w)*, en la figura 6 se observan las curvas de amplificación, sin embargo, para las dos réplicas del efluente de la PTAR, no se observa una curva sigmoidal si no curvas tardías, difiriendo en los tiempos en que supera el

umbral o Threshold, lo que sugiere baja cantidad del gen blanco o interferencias en la PCR.

Figura 6

Amplificación de las muestras del afluente (rojo), UASB (Azul) y efluente de la PTAR (Verde) para tet(w)

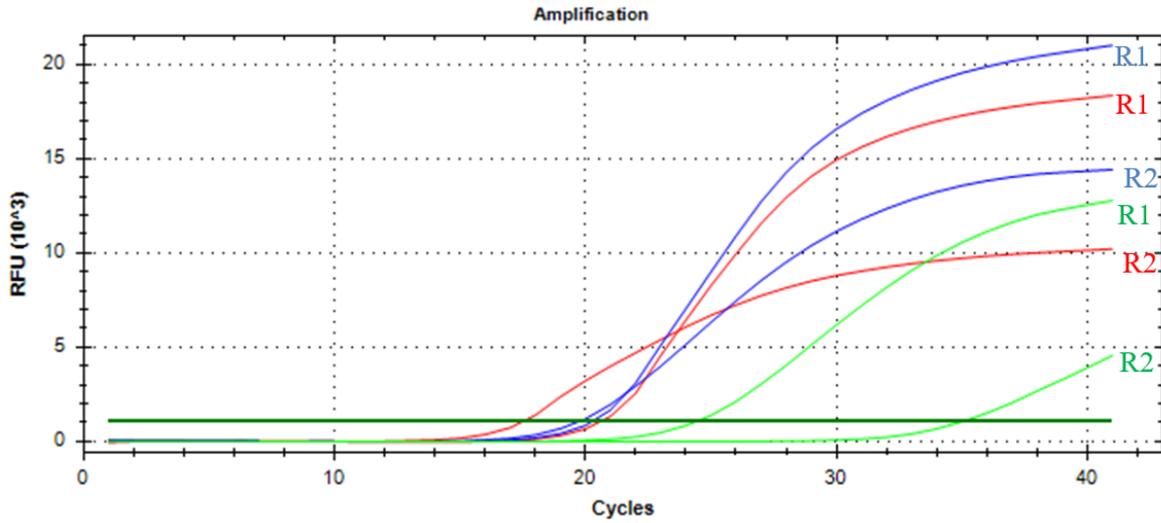


Fuente: autor de la investigación

Amplificación gen *bla_{CTX}*. Todas las muestras presentaron el gen *bla_{CTX}*, no obstante, en la réplica 2 del efluente de la planta la curva que se evidenció es de amplificación tardía, esto debido a la concentración de ADN de la muestra. En la figura 7 se observan las curvas de amplificación para las muestras del afluente (R1 y R2), reactor UASB (R1 y R2) y del efluente de la planta (R1 y R2).

Figura 7

Amplificación de las muestras afluyente (rojo), UASB (Azul) y efluente de la PTAR (Verde) *bla_{CTX}*

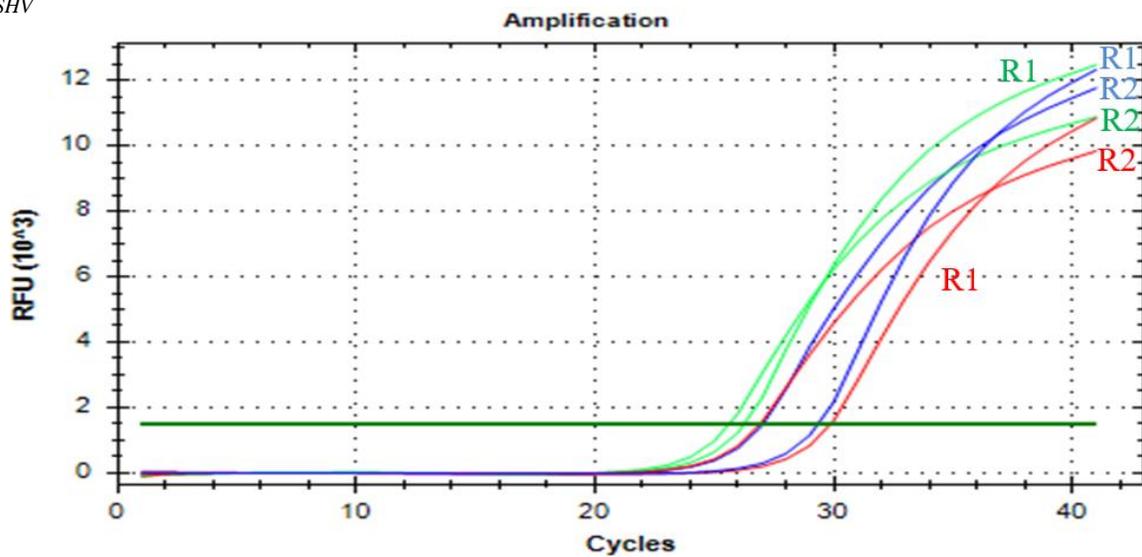


Fuente: autor de la investigación

Amplificación del gen *bla_{SHV}*: Se evidenció la presencia del gen en los 3 puntos de muestreo, ya que presentan curvas de amplificación del gen que permiten inferir la correcta amplificación del gen, sin embargo, la réplica uno del efluente presentó un Ct tardío (Figura 8).

Figura 8

Amplificación de las muestras del afluyente (rojo), UASB (Azul) y efluente de la PTAR (Verde) *bla_{SHV}*



Fuente: autor de la investigación

Discusión de resultados

bla_{TEM}

Como observado en la figura 9, la presencia de *bla_{TEM}* es notablemente más alta en el afluente y el reactor UASB, con valores de Ct (Threshold cycle) entre 18.63 y 22.61, lo que sugiere una mayor concentración de este gen en las aguas residuales crudas y durante el tratamiento primario. Sin embargo, la concentración de *bla_{TEM}* en el efluente es ligeramente más baja, con valores entre 20.06 y 21.49. Además, en la réplica dos del efluente, no se detectó la amplificación del gen *bla_{TEM}*, lo que sugiere una concentración insuficiente de ADN en esa muestra.

tet(w)

Aunque la presencia de *tet(w)* es similar en todos los puntos de muestreo, con valores de Ct entre 24.3 y 27.25 en el afluente y el reactor UASB respectivamente y entre 24.79 y 32.8 en el efluente, llama la atención que en el efluente R2, la amplificación del gen *tet(w)* fue significativamente más tardía, con un valor de 35.1. Esto podría indicar una concentración más baja de ADN en esa muestra, lo que sugiere que el proceso de tratamiento no elimina completamente este gen de resistencia.

bla_{CTX}

La presencia de *bla_{CTX}* es más alta en el afluente y el reactor UASB, con valores de Ct entre 17.55 y 20.3, mientras que en el efluente es ligeramente más alta, con valores entre 20.64 y 24.47. Al igual que con *bla_{TEM}*, en el efluente R2, la amplificación del gen *bla_{CTX}* fue significativamente más tardía, con un valor de 35.1, lo que podría indicar una concentración más baja de ADN en esa muestra. Los resultados sugieren que los genes *bla_{TEM}*, *tet(w)* y *bla_{CTX}* tienen una mayor concentración en las etapas iniciales del tratamiento de aguas residuales, pero aún persisten en el efluente tratado. Esto resalta la necesidad de implementar medidas más efectivas para reducir la presencia de estos genes de resistencia en el efluente final de las plantas de tratamiento de aguas residuales.

bla_{SHV}

Se observa una concentración similar en todos los puntos de muestreo, tanto en el afluente, en el efluente del reactor UASB y el efluente de la planta, con valores de Ct entre 26.24 y 29.87, lo que sugiere una presencia constante a lo largo del proceso de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, en el efluente R2, la concentración es ligeramente más baja, con un valor de Ct de 25.61.

Figura 9

Presencia de los genes de resistencia bla_{TEM} , $tet(w)$, bla_{CTX} y bla_{SHV} en la PTAR de la UdB

MX	Punto de corte Ct (Threshold cycle)			
	<i>bla_{TEM}</i>	<i>tet(w)</i>	<i>bla_{CTX}</i>	<i>bla_{SHV}</i>
Afluente R1	18,63	27,25	17,55	26,91
Afluente R2	21,49	25,15	20,64	29,87
UASB R1	22,61	25,63	20,3	27,04
UASB R2	20,45	24,3	19,8	29,34
Efluente R1	20,06	24,79	24,47	26,24
Efluente R2	N/A	32,8	35,1	25,61

Fuente: autor de la investigación, obtenido del termociclador CFX96

A diferencia de los genes *bla_{TEM}*, *tet(w)* y *bla_{CTX}*, la presencia del gen *bla_{SHV}* no parece variar significativamente a lo largo del proceso de tratamiento de aguas residuales. Aunque la concentración es ligeramente más baja en el efluente R2, la diferencia no es tan marcada como en los otros genes de resistencia.

Estos hallazgos indican que los sistemas de tratamiento de aguas residuales con características similares tienden a albergar una diversidad similar de ARGs, independientemente de la ubicación geográfica. Además, permite demostrar la importancia de monitorear y controlar la liberación de ARGs desde las PTAR al medio ambiente, con el fin de prevenir la propagación de resistencia antimicrobiana.

Comparar la presencia de genes de resistencia encontrados en la PTAR de la Universidad de Boyacá con otros sistemas de tratamiento de aguas residuales que presenten parámetros operativos similares

Para comparar la presencia de genes de resistencia en la PTAR de la Universidad de Boyacá con otros sistemas similares, se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica en bases de datos como Science Direct, PubMed, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre otras. Esta búsqueda abarcó estudios a nivel nacional e internacional, con el objetivo de identificar y analizar los diferentes de genes de resistencia presentes en PTARs y aguas residuales para su comparación con los resultados obtenidos en la evaluación de ARGs realizada en la universidad de Boyacá.

La tabla 7 proporciona una visión general de varios estudios realizados en diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en diversos países, donde se evaluó la presencia de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en el efluente tratado. Se han seleccionado estudios que investigaron la presencia de ARGs en PTAR con un sistema de tratamiento similar al de la PTAR piloto de la Universidad de Boyacá, que implica un tratamiento preliminar y primario, seguido de procesos biológicos de degradación bacteriana mediante tratamiento de lodos activados, y finalmente, un tratamiento terciario que puede incluir humedales (carrizales) y/o medios filtrantes.

Los estudios demostraron que los ARGs suelen transmitirse mediante transferencia genética vertical y horizontal, es decir, desde los progenitores y entre diferentes microorganismos. Una vez que los ARG confieren resistencia a los microorganismos patógenos o se propagan entre ellos, las aguas residuales pueden convertirse en una importante reserva de estos genes, con consecuencias ecológicas y de salud potencialmente desastrosas, reducir la cantidad total de microorganismos en las aguas residuales puede limitar con éxito la transmisión de ARG (Song et al., 2018). Por lo tanto, la eliminación de ARG mediante tratamientos biológicos sigue siendo un desafío considerable.

Los estudios seleccionados abarcan diferentes regiones geográficas y evalúan una variedad de ARGs. Por ejemplo, Werth et al. (2013) evaluaron la presencia de 11 ARGs en un río influenciado por una PTAR en España, mientras que Xu et al. (2014) estudiaron 19 ARGs en una PTAR en China. Además, algunos estudios, como el de Rodríguez et al. (2021) en Colombia, se

centraron en la metagenómica para analizar el resistoma y el mobiloma de una PTAR urbana.

En el estudio de la PTAR piloto de la Universidad de Boyacá, se identificaron varios genes de resistencia a antibióticos, entre los cuales se encontraron los genes *bla_{CTX}*, *bla_{TEM}* y *tet(w)*. Estos genes son especialmente relevantes, ya que confieren resistencia a importantes clases de antibióticos, como las cefalosporinas de amplio espectro (*bla_{CTX}* y *bla_{TEM}*) y las tetraciclinas (*tet(w)*).

Comparando estos resultados con los estudios seleccionados, se observa una similitud en la presencia de genes de resistencia en las diferentes PTAR evaluadas. Por ejemplo, en el estudio de Xu et al. (2014) en una PTAR en China, se identificaron genes como *tet(A)*, *sul I*, *sul II*, *qnrC* y *qnrD*, que confieren resistencia a tetraciclinas y quinolonas, y en el estudio de Marti et al. (2013) en España, se detectaron genes como *bla_{TEM}*, *qnrB*, *ermB* y *sul II*, que también confieren resistencia a beta-lactámicos y otros antibióticos.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en la PTAR de la Universidad de Boyacá, se observó una similitud en la presencia de genes de resistencia. En la PTAR de la Universidad de Boyacá, se detectaron los genes *bla_{TEM}*, *tet(w)*, *bla_{CTX}* y *bla_{SVH}* en todas las etapas del tratamiento, lo que evidencia la distribución de genes de resistencia en el sistema de tratamiento de aguas residuales. Estos hallazgos resaltan la necesidad de implementar estrategias efectivas de tratamiento en la PTAR para reducir la propagación de estos genes en el medio ambiente y prevenir posibles riesgos para la salud pública.

Tabla 7*Presencia de ARGs en diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales*

Año	Publicación	País	Lugar evaluado	Objeto de estudio	ARGs encontrados	Referencia
2013	Prevalencia de genes de resistencia a antibióticos y composición de la comunidad bacteriana en un río influenciado por una PTAR.	España	Río Ter, aguas arriba y abajo de la PTAR en Ripoll	11 ARGs (<i>bla</i> _{TEM} , <i>qnrB</i> , <i>ermB</i> , <i>Sul II</i> , entre otros).	<i>tet(O)</i> , <i>bla</i> _{TEM} , <i>Sul I</i> , <i>bla</i> _{SVH} .	Marti, Jofre y Balcazar, 2013
2013	β -lactamasa de espectro extendido que produce <i>E. coli</i> en aguas residuales hospitalarias y plantas de tratamiento de aguas residuales en Queensland, Australia.	Australia	Aguas residuales hospitalarias y plantas de tratamiento de aguas residuales en Queensland.	<i>E. coli</i> productora de BLEE de IN y HW	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M}	Gündoğdu <i>et al</i> , 2013
2013	Beta-lactamasa producida por Enterobacteriaceae en efluentes hospitalarios.	Polonia	Aguas residuales de 3 hospitales	Genes que estuvieran presentes en el efluente hospitalario.	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX} , <i>bla</i> _{OXA} y <i>bla</i> _{SVH}	Korzeniewska y Harnisz, 2013.
2014	Presencia de antibióticos y genes de resistencia a antibióticos en una planta de tratamiento de aguas residuales y en el río que recibe su efluente.	China	Muestras de una PTAR de Beijin y muestras del río receptor, antes y después del lugar de descarga.	19 ARGs (9 resistentes a la tetraciclina, 4 resistentes a la sulfonamida y 6 resistentes a la quinolona)	<i>tet(A)</i> , <i>sul I</i> , <i>sul II</i> , <i>qnrC</i> , <i>qnrD</i> .	Xu <i>et al.</i> , 2015.
2017	Caracterización de enzimas CTX-M, determinantes de resistencia a quinolonas y residuos antimicrobianos en aguas residuales hospitalarias, plantas de tratamiento de aguas residuales y agua de río.	Brasil	Aguas residuales hospitalarias, plantas de tratamiento de aguas residuales y aguas fluviales.	Bacterias Gram-negativas resistentes a cefotaxima procedentes de IN, SS, EF, hospitalarios, efluentes sanitarios y RR	<i>Se evaluaron los genes de la β-lactamasa (<i>bla</i>_{CTX}), los genes de resistencia a las quinolonas.</i>	Conte <i>et al.</i> 2017

2018	Destino de Enterobacteriaceae resistentes a cefotaxima y productoras de BLEE a lo largo de un proceso de tratamiento de aguas residuales a escala completa con desinfección UV.	Portugal	PTAR a gran escala, ubicada en el norte de Portugal diseñada para una población de aproximadamente 170.000 habitantes	Enterobacteriales productores de BLEE y resistentes a cefotaxima en diferentes etapas de tratamiento	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i>	Silva <i>et al.</i> , 2018.
2019	Vigilancia genómica de <i>Escherichia coli</i> en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales como indicador de patógenos clínicamente relevantes y sus genes de resistencia.	Reino Unido	Efluentes de 20 PTAR del Reino Unido, el tipo de tratamiento proporcionado al agua consiste en tratamiento preliminar y primario e involucra procesos de tratamiento biológicos, mediante un proceso de lodos activados o lechos filtrantes y tratamiento terciario lagunaje (carrizales) o filtración de arena.	Celulas de <i>E.coli</i> inoculadas con el gen de resistencia <i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{CTX-m}</i>	Raven <i>et al.</i> , 2019
2020	Papel de las plantas de tratamiento de aguas residuales en la abundancia ambiental de genes de resistencia antimicrobiana en los ríos chilenos.	Chile	Muestras de 3 PTAR, aguas arriba y aguas debajo de estas. Además, se tomaron muestras fecales de aves salvajes que estuvieran alrededor de una de estas PTAR.	Se evaluaron 48 ARGs incluyendo el 16s rRNA.	Los genes más abundantes fueron <i>sul(I)</i> , <i>sul(II)</i> , <i>qnrS</i> y <i>strB</i> en las muestras de agua y <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SVH}</i> , <i>sul(I)</i> y <i>sul(II)</i> en las muestras que se tomaron de aves.	Bueno <i>et al.</i> , 2020.
2021	Análisis metagenómico del resistoma y mobiloma de aguas residuales urbanas: un apoyo a la resistencia a los antimicrobianos.	Colombia	Efluente, tanque de aireación, lodo activado de retorno y efluente final de una PTAR en Antioquia	Bacterias de importancia clínica (Moraxellas, enterobacterias)	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX}</i> , <i>mexD</i> , <i>acrB</i>	Rodríguez <i>et al.</i> , 2021.

Fuente: Autor de la investigación

En cuanto a la remoción de los ARGs diversos estudios sugieren que los tratamientos anaeróbicos y los humedales artificiales, especialmente aquellos construidos con flujo subterráneo, son altamente efectivos en la eliminación de genes de resistencia a antibióticos de las aguas residuales (Chen et al., 2016; Christgen et al., 2015). Tanto los tratamientos anaeróbicos como los humedales artificiales han demostrado una eficacia significativa en la reducción de la carga de ARG, con tasas de eliminación que oscilan entre el 62% y el 98,6% (Chen et al., 2016; Christgen et al., 2015). Además, los biorreactores de secuencia anaeróbica-aeróbica (AAS) han mostrado una eficiencia aún mayor, eliminando más del 85% de los ARG en el afluente (Christgen et al., 2015). Por otro lado, aunque los tratamientos aeróbicos pueden ser menos efectivos que los anaeróbicos, también contribuyen a la eliminación de ARG, especialmente cuando se utilizan en combinación con tratamientos anaeróbicos (Du et al., 2015). En este sentido, la combinación de tratamientos biológicos con tecnologías basadas en membranas, como los biorreactores de membrana (MBR), podría ofrecer una mejor eficiencia en la eliminación de ARG (Christgen et al., 2015). Además, la desinfección del agua residual mediante cloración, ozono, radiación ultravioleta u otros procesos de oxidación avanzados sería crucial para inactivar microorganismos patógenos y reducir aún más la propagación de genes de resistencia a antibióticos en el medio ambiente acuático (Pang et al., 2016). Aunque los humedales artificiales han demostrado ser efectivos en la eliminación de genes de resistencia a antibióticos de las aguas residuales, es importante destacar que su eficiencia puede variar dependiendo de las características del sistema (Chen et al., 2016; Fang et al., 2017).

Por ejemplo, se ha observado que los humedales artificiales construidos con flujo superficial pueden tener una eficacia reducida en comparación con aquellos construidos con flujo subterráneo (Chen et al., 2016; Fang et al., 2017). Además, mientras que los humedales artificiales son eficaces en la eliminación de contaminantes como los antibióticos y los ARG acuosos, también pueden actuar como reservorios de ARG específicos (Fang et al., 2017). Esto sugiere que, si bien los humedales artificiales pueden ser parte de una estrategia integral de tratamiento de aguas residuales, su uso exclusivo puede no ser suficiente para una remoción completa y segura de los ARG (Chen et al., 2016; Fang et al., 2017). Por lo tanto, es crucial considerar la combinación de diferentes tecnologías de tratamiento, como los tratamientos anaeróbicos y aeróbicos, junto con la desinfección, para lograr una eliminación efectiva de los genes de resistencia a antibióticos de las aguas residuales de la universidad.

Conclusiones

Durante el desarrollo de este estudio, se establecieron los procesos de estandarización de extracción y purificación de ADN, así como la generación de controles positivos y negativos para cada gen de resistencia a antibióticos (ARG) evaluado. Además, se llevó a cabo la estandarización de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en el termociclador CFX96 de BioRad.

Los resultados obtenidos evidenciaron la presencia de los genes de resistencia *bla_{TEM}*, *tet(w)*, *bla_{CTX}* y *bla_{SHV}* en el afluente, reactor UASB y efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de la Universidad de Boyacá. Estos hallazgos indican que los procesos de tratamiento implementados en la PTAR no poseen una capacidad de remoción efectiva frente a este tipo de contaminantes. Es importante destacar que los genes *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}* y *bla_{SHV}* presentaron curvas de amplificación más concordantes con un correcto proceso de replicación del gen, lo que garantiza la identificación de estos en las muestras, si están presentes.

La revisión bibliográfica realizada sobre genes de resistencia en plantas de tratamiento permitió identificar que los genes encontrados en la PTAR de la Universidad de Boyacá son consistentes con los reportados en otras plantas de tratamiento a nivel internacional. Específicamente, la presencia de genes de resistencia a beta-lactámicos como *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}* y *bla_{SHV}*, así como de genes de resistencia a tetraciclinas como *tet(w)*, es congruente con los resultados obtenidos en estudios previos.

Estos hallazgos sugieren que los sistemas de tratamiento de aguas residuales con características similares tienden a albergar una diversidad similar de ARGs, independientemente de la ubicación geográfica. Además, destacan la importancia de monitorear y controlar la liberación de ARGs desde las PTAR al medio ambiente, con el fin de prevenir la propagación de resistencia antimicrobiana.

Recomendaciones

Se sugiere implementar técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS) para realizar un análisis exhaustivo de la diversidad y abundancia de ARGs en muestras de aguas residuales tratadas y no tratadas. Además, para futuras investigaciones, se recomienda evaluar los mecanismos de remoción de los genes identificados en la PTAR de la Universidad. Se propone realizar estudios que permitan determinar la eficacia de los procesos de tratamiento utilizados en la remoción de ARGs y evaluar la posible transferencia horizontal de estos genes durante el tratamiento de aguas residuales.

Es crucial determinar si los ARGs presentes en la PTAR de Tunja alcanzan las fuentes receptoras, lo cual se puede lograr mediante la evaluación del efluente. Se sugiere realizar un monitoreo continuo del efluente de la PTAR y de las fuentes receptoras (ríos, cuerpos de agua) para determinar la presencia y persistencia de los ARGs en el medio ambiente acuático circundante.

Finalmente, se recomienda iniciar la búsqueda de ARGs en otros sistemas de aguas residuales del departamento. Esto permitirá obtener una visión más completa del panorama de resistencia a antibióticos en la región y facilitará la implementación de estrategias de gestión y control de la resistencia antimicrobiana a nivel local.

Referencias

- Alexander, J., Hembach, N., y Schwartz, T. (2020). Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany. *Scientific Reports*, 10(1), 8952. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65635-4>
- Bueno, I., Verdugo, C., Jimenez-Lopez, O., Álvarez, P., González-Rocha, G., Lima, C., Travis, D., Wass, B., Zhang, Q., Ishii, S., y Singer, R. (2020). Role of wastewater treatment plants on environmental abundance of Antimicrobial Resistance Genes in Chilean rivers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 223(1), 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.006>.
- Bueno, I., Travis, D., González-Rocha, G., Álvarez, J., Lima, C., Benítez, C., Phelps, N., Wass, B., Johnson, T., Zhang, Q., Ishii, S., y Singer, R. (2019). Antibiotic resistance genes in freshwater trout farms in a watershed in Chile. *Journal of Environmental Quality*, 48(5), 1462-1471. <https://doi.org/10.2134/jeq2018.12.0431>
- Brujins, B., Hoekema, T., Oomens, L., Tiggelaar, R., y Gardeniers, H. (2022). Performance of spectrophotometric and fluorometric DNA quantification methods. *Analytica*, 3(3), 371-384. <https://doi.org/10.3390/analytica3030025>
- Chen, J., Ying, G. G., Wei, X. D., Liu, Y. S., Liu, S. S., Hu, L. X., He, L. Y., Chen, Z. F., Chen, F. R., y Yang, Y. Q. (2016). Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes from domestic sewage by constructed wetlands: Effect of flow configuration and plant species. *The Science of The Total Environment*, 571, 974–982. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.085>
- Collignon, P. C., Conly, J. M., Andremont, A., McEwen, S. A., Aidara-Kane, A., Agerso, Y., Woo, G.-J. (2016). World Health Organization Ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. *Clinical Infectious Diseases*, 63(8), 1087–1093. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw475>
- Conte, D., Palmeiro, J. K., da Silva Nogueira, K., de Lima, T. M., Cardoso, M. A., Pontarolo, R., Degaut Pontes, F. L., y Dalla-Costa, L. M. (2017). Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage,

- wastewater treatment plant, and river water. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 136, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.031>
- Christgen, B., Yang, Y., Ahammad, S. Z., Li, B., Rodriguez, D. C., Zhang, T., y Graham, D. W. (2015). Metagenomics shows that low-energy anaerobic-aerobic treatment reactors reduce antibiotic resistance gene levels from domestic wastewater. *Environmental science y technology*, 49(4), 2577–2584. <https://doi.org/10.1021/es505521w>
- Desjardins, P., y Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, (45), 2565. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Du, J., Geng, J., Ren, H., Ding, L., Xu, K., y Zhang, Y. (2015). Variation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater treatment plant with A(2)O-MBR system. *Environmental Science And Pollution Research International*, 22(5), 3715–3726. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3552-x>
- Fang, H., Zhang, Q., Nie, X., Chen, B., Xiao, Y., Zhou, Q., Liao, W., y Liang, X. (2017). Occurrence and elimination of antibiotic resistance genes in a long-term operation integrated surface flow constructed wetland. *Chemosphere*, 173, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.027>
- Fogel, G. B., Collins, C. R., Li, J., y Brunk, C. F. (1999). Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microbial Ecology*, 38, 93-113. <https://doi.org/10.1007/s002489900162>
- Gündoğdu, A., Jennison, A., Smith, H., Stratton, H., y Katouli, M. (2013). Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in hospital wastewaters and sewage treatment plants in Queensland, Australia. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(11), 737-745. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0515>
- Hu, Y., Jin, L., Zhao, Y., Jiang, L., Yao, S., Zhou, W. y Cui, C. (2021). Annual trends and health risks of antibiotics and antibiotic resistance genes in a drinking water source in East China. *Science of the Total Environment*, 791, 148152. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148152>
- Huggett, J., Foy, C., Beneš, V., Emslie, K., Garson, J., Haynes, R, y Bustin, S. (2013). The digital miqe guidelines: minimum information for publication of quantitative digital per experiments. *Clinical Chemistry*, 59(6), 892-902. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206375>

- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, subdirección de hidrología grupo laboratorio de calidad ambiental (2007) Instructivo para la toma de muestras de aguas residuales. Muestreo de aguas residuales. IDEAM.
- Korzeniewska, E., y Harnisz, M. (2013). Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital effluents. *Journal of Environmental Management*, 123, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.03.024>
- Marti, E., Jofre, J., y Balcazar, J. L. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PloS One*, 8(10), e78906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078906>
- Martínez, J. L., Coque, T. M., y Baquero, F. (2015). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(2), 116–123. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3399>
- Pájaro-Herazo, P. A. (2019) *Identificación de resistencia antibiótica tetQ, tetM, qnrS, qnrB en bacilos entéricos aislados de cavidad oral*. (Tesis de Maestría. Universidad el Bosque.) Repositorio institucional de la Universidad del Bosque. <https://repositorio.unbosque.edu.co/server/api/core/bitstreams/5ef3debd-6d2a-4157-8d9f-e652bd9a743e/content>
- Pang, Y., Huang, J., Xi, J., et al. (2016). Effect of ultraviolet irradiation and chlorination on ampicillin-resistant *Escherichia coli* and its ampicillin resistance gene. *Frontiers of Environmental Science y Engineering*, 10, 522–530. <https://doi.org/10.1007/s11783-015-0779-9>
- Raven, K. E., Ludden, C., Gouliouris, T., Blane, B., Naydenova, P., Brown, N. M., Parkhill, J., y Peacock, S. J. (2019). Genomic surveillance of *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plants as an indicator of clinically relevant pathogens and their resistance genes. *Microbial Genomics*, 5(5), e000267. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000267>
- Rodríguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C. M., Barceló, D., y Balcázar, J. L. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- Silva, I., Tação, M., Tavares, R. D. S., Miranda, R., Araújo, S., Manaia, C. M., y Henriques, I. (2018). Fate of cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae and ESBL producers over a full scale

wastewater treatment process with UV disinfection. *The Science Of The Total Environment*, 639, 1028–1037. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.229>

Unemo, M., y Shafer, W. M. (2011). Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1230, E19–E28. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06215.x>

World Health Organization (WHO). (2021). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., Zhang, Y., Li, X., y Meng, W. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*, 119, 1379-1385. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040>