



Evaluación de tratamientos para la eliminación de resistencia a antibióticos en aguas residuales

Los antibióticos son vitales para mejorar la salud humana y animal, pero su uso excesivo causa la aparición de bacterias resistentes a los mismos que suponen una amenaza al dificultar el tratamiento de infecciones bacterianas. Su liberación en el medio ambiente a través de las aguas residuales depuradas provoca la diseminación de genes y bacterias resistentes con consecuencias imprevistas. En este estudio se han investigado tratamientos a escala laboratorio para la eliminación de este problema, como la nanofiltración directa, electro-peroxi-coagulación (EPC), adsorción con carbón activado y oxidación avanzada con luz ultravioleta (UV) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estos tratamientos avanzados ofrecen estrategias prometedoras para mitigar el impacto ambiental y promover prácticas sostenibles de gestión de aguas residuales. Los resultados muestran la nanofiltración y EPC como los tratamientos más eficaces para enfrentar el problema.

Palabras clave

Agua residual, antibióticos, bacterias resistentes a antibióticos (ARB), genes de resistencia a antibióticos (ARG), tratamientos de eliminación.

TREATMENT EVALUATION FOR THE ELIMINATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN WASTEWATER

Antibiotics are vital for improving human and animal health, but their excessive use causes the emergence of resistant bacteria that pose a threat by making it difficult to treat bacterial infections. Its release into the environment through treated wastewater has led to the spread of resistant genes and bacteria with unintended consequences. This study investigated laboratory-scale treatments such as direct nanofiltration, electroperoxocoagulation (EPC), activated carbon adsorption, and advanced oxidation with ultraviolet (UV) light and hydrogen peroxide (H_2O_2). These advanced treatments offer promising strategies for mitigating the environmental impact and promoting sustainable wastewater management practices. The results demonstrate that nanofiltration and EPC are the most effective treatments to address the problem.

Keywords

Wastewater, antibiotics, antibiotic resistant bacteria (ARB), antibiotic resistance genes (ARG), disposal treatments.

Ioanna Karakatsanidou,
técnica de apoyo de Cetaqua - Centro Tecnológico de Agua

Albert Serra Compte
project manager de de Cetaqua - Centro Tecnológico de Agua

Susana González Blanco
responsable técnica de Cetaqua - Centro Tecnológico de Agua

Clara Díaz García
técnica de Innovación de Labaqua

Mariana Fittipaldi
project manager de Labaqua

Elena Soria
responsable de Microbiología de Labaqua

M. Adela Yáñez Amorós
directora de Innovación de Labaqua

Inmaculada Gómez Sánchez
técnica de Laboratorio del Parc Taulí Institut d'Investigació i Innovació (I3PT)

Mateu Espasa Soley
coordinador de Microbiología del Parc Taulí Institut d'Investigació i Innovació (I3PT)

Jordi Vinyoles Cartanya
responsable de Operaciones de Saneamiento e Innovación de Aigües de Sabadell



1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son compuestos naturales o sintéticos ampliamente utilizados para mejorar la salud humana y animal y prevenir o tratar infecciones causadas por bacterias patógenas. Su utilización (y sobreutilización en algunos casos), combinada con la limitada eliminación de los mismos en las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) convencionales, ha resultado en la liberación continua de antibióticos al medio ambiente. Esto está relacionado con el desarrollo de genes de resistencia a los antibióticos (ARG) y bacterias resistentes (ARB), que reducen el potencial terapéutico contra patógenos humanos y animales.

Estos genes y bacterias resistentes a los antibióticos, como macrólidos, tetraciclinas, beta-lactámicos y sulfonamidas, entre otros, se han detectado en masas de agua ambiental en diferentes regiones de Europa. Es por ello que es esencial invertir esfuerzos para abordar este problema, especialmente en el sur y este de Europa, donde las tasas de resistencia son más altas y algunos antibióticos están perdiendo eficacia en el tratamiento de infecciones (ECDC, 2022).

Las plantas de tratamiento de aguas residuales son receptores principales de estos agentes, especialmente procedentes de hospitales y áreas residenciales. El tratamiento de las aguas residuales en las plantas depuradoras a menudo no logra eliminar eficazmente los antibióticos, lo que conduce a la proliferación de ARB y ARG en el medio ambiente.

El presente estudio tiene como objetivo proponer estrategias de tratamiento eficaces para eliminar ARB y ARG en los puntos de generación (efluente de agua de hospital) y como tratamiento de afino en

las plantas depuradoras de aguas residuales. En este estudio se han evaluado a escala laboratorio las siguientes tecnologías de eliminación: la nanofiltración, la electro-peroxi-coagulación, la adsorción con carbón activado y el proceso de UV/H₂O₂ para la eliminación de genes y bacterias resistentes a los antibióticos. Además, se ha caracterizado la eliminación de genes resistentes a escala real en dos EDAR de Sabadell (Riu Sec y Riu Ripoll) que tienen tratamientos diferentes de depuración.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE MUESTRAS

El área de estudio se centró en la zona de Sabadell (provincia de Barcelona, España). Para llevar a cabo los ensayos de los tratamientos de eliminación se recogieron muestras de agua residual del efluente del Hospital Parc Taulí Sabadell, principal centro sanitario de la zona, y de la salida de la EDAR de Riu Ripoll, que trata el agua residual proveniente del hospital, junto con el resto de agua residual de la zona y que cuenta con tratamiento primario seguido de un tratamiento biológico de fangos activados con eliminación de nutrientes.

Los resultados de los tratamientos de eliminación se obtuvieron, por un

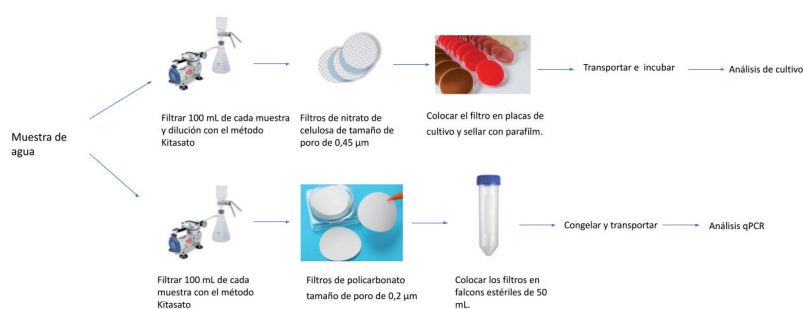
lado, mediante el análisis de cultivos bacterianos, realizado en el laboratorio de Microbiología del Hospital Parc Taulí, y, por otro lado, mediante la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) de cuatro genes de resistencia específicos realizada por Labaqua. El proceso de análisis de las muestras se describe en la **Figura 1**.

Además, se recogieron muestras en dos EDAR de Sabadell: Riu Ripoll y Riu Sec. La EDAR de Riu Sec cuenta con un pretratamiento, que posteriormente se divide en dos líneas, de modo que se aplica un tratamiento biológico convencional a una parte del agua y un tratamiento biológico de membranas (MBR) al resto del caudal influente. La EDAR de Riu Ripoll cuenta con un pretratamiento seguido de un tratamiento biológico convencional. En las dos EDAR se aplican tratamientos de eliminación de nutrientes (N y P) en todos los casos. Para ambas EDAR se recogió muestra de entrada y salida, además en Riu Sec se recogieron muestras de salida del tratamiento convencional. Estas muestras se caracterizaron a través de qPCR para evaluar la eliminación de resistencias.

2.2. ANÁLISIS MEDIANTE QPCR

Previo al análisis mediante qPCR se realizó la extracción y purificación del ADN. Para cada muestra se

FIGURA 1. Tratamiento de muestras para análisis de cultivo (arriba) y análisis qPCR (abajo).



cuantificó la concentración de ADN obtenida. Posteriormente, se realizó el análisis de qPCR por duplicado. En todas las reacciones de qPCR se incorporó un control positivo interno para el control de la inhibición de qPCR (Applied Biosystem). Los diseños utilizados son específicos y están validados para la amplificación de esos genes. Las reacciones de amplificación se realizaron bajo las condiciones siguientes: 2 minutos a 50°C; 10 minutos a 95°C; 42 ciclos 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°. La concentración obtenida se normalizó por el volumen para facilitar la comparación entre los distintos tratamientos.

Se analizaron cuatro genes de resistencia a antibióticos de las familias: sulfonamidas, aminoglicósidos, tetraciclinas, y B-lactamasas: sul1, aadA1, tetX y blaOXA-205, tal y como muestra la **Tabla 1**.

2.3. ANÁLISIS MEDIANTE CULTIVO BACTERIOLÓGICO

Las placas con los filtros se incubaron a 36°C con lectura a las 24 y 48 horas. Los medios de cultivo utilizados fueron selectivos para el aislamiento de bacterias de relevancia clínica resistentes a: cefalospori-

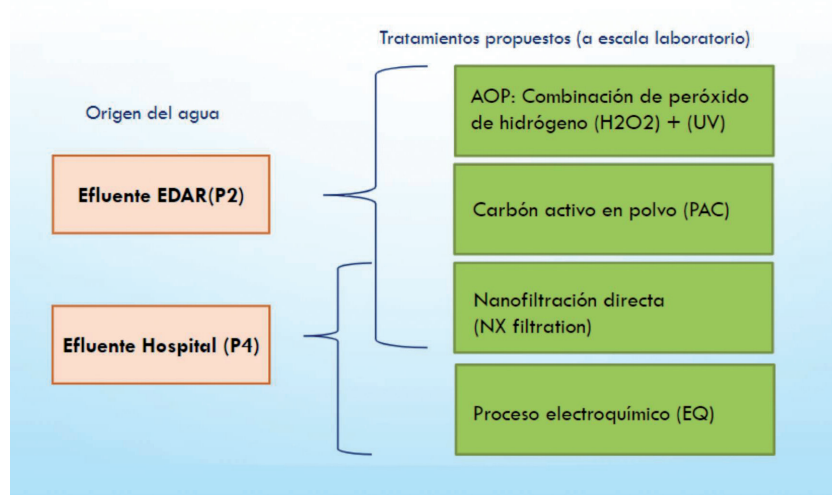
Diana	Tipo de antibiótico	Rol
sul1	Sulfonamidas	Persistente después de los tratamientos de aguas residuales, ampliamente diseminado en el medio ambiente
aadA1	Aminoglicosidos	Relevancia clínica, ampliamente empleado
blaOXA-205	Beta-lactamasas	Relevancia clínica, ampliamente empleado
tetX	Tetraciclinas	Efectividad de eliminación en los distintos tratamientos, relevancia veterinaria

nas de tercera generación (Chromid ESBL, bioMérieux); carbapenems (Chromid Carba, bioMérieux); y meticilina/cloxacilina (Chromid MRSA, bioMérieux). Como control de crecimiento se utilizaron medios de Agar MacConkey y Agar Columbia CNA con 5% sangre (Becton-Dickinson). Se aislaron las colonias de bacterias de los medios selectivos para ser identificadas por espectrofotometría de masas (Malditof, Bruker) y el estudio de sensibilidad antibiótica por microdilución (Phoenix, Becton-Dickinson). En las bacterias resistentes a carbapenems se utilizaron pruebas de inmunocromatografía para detección de carbapenemasas (NDM, VIM, OXA y KPC, NG-Test Carba-5, NG-Biotech).

2.4. TRATAMIENTOS DE ELIMINACIÓN A ESCALA LABORATORIO

Los tratamientos de eliminación seleccionados fueron: proceso de oxidación avanzada (AOP), que incluye la combinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y luz ultravioleta (UV); así como el proceso de carbón activado en polvo (PAC), como tratamiento de afino para el efluente de la EDAR de Riu Ripoll. Además, se seleccionó el proceso electroquímico de electro-peroxi-coagulación (EPC) para estudiar la eliminación del efluente de agua residual sin tratar del sector del hospital, mientras el uso de nanofiltración directa fue para el estudio del tratamiento tanto del efluente de la EDAR como del Hospital (**Figura 2**).

FIGURA 2. Configuración esquemática de los tratamientos de eliminación.

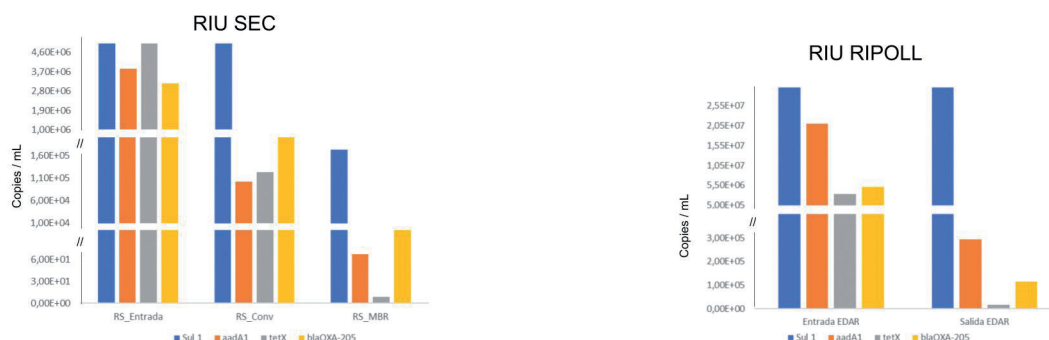


2.4.1. Nanofiltración directa

En el caso de la nanofiltración directa, se recirculó el agua mediante una bomba a través de un prefiltro de 150 micras y, seguidamente, a través de la membrana de nanofiltración con un tamaño de poro de la membrana de 400 Daltons. En este estudio, se seleccionó un porcentaje de recuperación específico del 55% para el proceso de filtración, lo cual indica la proporción de solutos o componentes deseados que se retienen o concentran exitosamente



FIGURA 3. Representación de la concentración (copias/mL) de los cuatro ARG analizados. Los gráficos comparan la eliminación de los genes de interés en las EDAR de Riu Sec (izquierda) y Riu Ripoll (derecha).



en comparación con la solución inicial. La selección de este porcentaje se basó en estándares de la industria y recomendaciones de NX Filtration, quien proporcionó el equipo. De este tratamiento se analizaron las muestras de entrada y salida (permeado) para conocer la presencia de ARG y ARB.

2.4.2. Electro-peroxi-coagulación (EPC)

En el proceso de electro-peroxi-coagulación (EPC), se aplicó una corriente continua entre un ánodo de hierro (Fe) y un cátodo de acero inoxidable para liberar iones en la solución. Además, se introdujo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% para llevar a cabo la reacción de Fenton en un entorno ácido con pH 3 ajustado mediante ácido sulfúrico (H_2SO_4), manteniendo la presión y temperatura ambientales. La proporción utilizada para llevar a cabo la experimentación fue de $DQO:H_2O_2:Fe$ de 1:2:0.4. Una vez que todo el H_2O_2 se consumió, se elevó el pH a 8-9 utilizando hidróxido de sodio (NaOH) para precipitar el hierro residual. La decantación/

floculación se eligió como método de tratamiento para separar el hierro precipitado de la solución. Se recogieron muestras de entrada y salida del tratamiento EPC para su posterior caracterización.

2.4.3. Carbón activo en polvo (PAC)

El proceso de PAC consistió en una prueba de Jar-Test con 5 concentraciones diferentes de carbón activado. Para lograr los mejores resultados, la experimentación con PAC se llevó a cabo con una duración total de 48 horas. El tipo de carbón utilizado fue NoritR GAC 1020 AF y se molió para poder utilizarlo en la experimentación en forma de PAC. Se recogieron muestras del efluente de la EDAR Riu Ripoll y después del tratamiento con PAC para su posterior caracterización.

2.4.4. Proceso de oxidación avanzada: luz ultravioleta (UV) con peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

En el caso de la AOP:UV/ H_2O_2 , la muestra se recirculó mediante una bomba a través de un caudalímetro

hasta la lámpara de UV y el punto de recogida de muestra del sistema. El tipo de lámpara del que se componía el piloto es una lámpara de baja presión y las condiciones probadas fueron dosis de UV de 20 mJ/cm^2 con H_2O_2 10 ppm y dosis de UV de 20 mJ/cm^2 con H_2O_2 30 ppm.

3. RESULTADOS

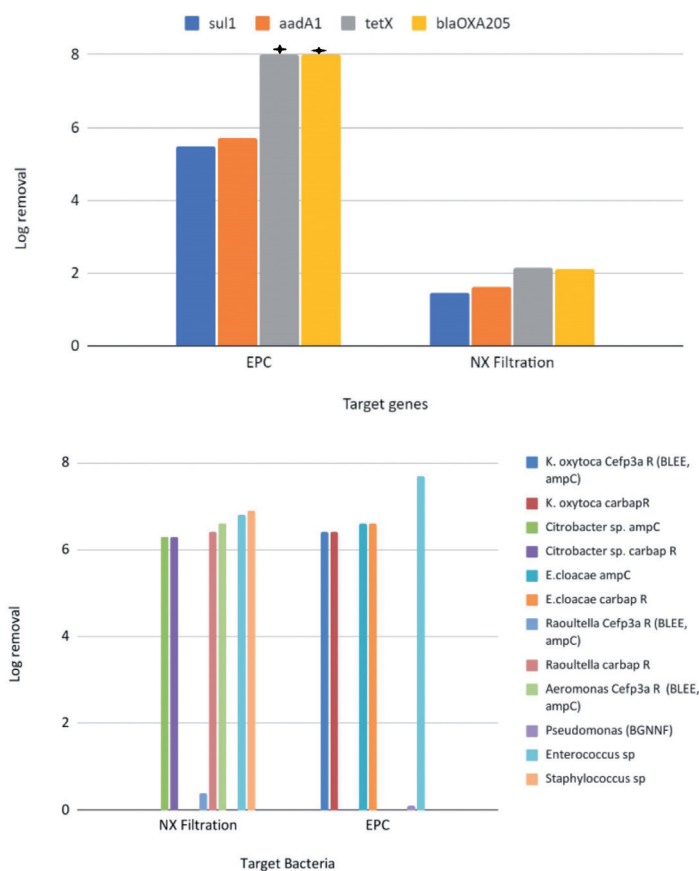
3.1. ELIMINACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN EDAR

Este análisis tuvo como objetivo evaluar la eficacia de la eliminación de genes en cada planta y determinar la efectividad de sus respectivos métodos de tratamiento. Los resultados obtenidos para cada EDAR se muestran en la **Figura 3**.

Se observa que el tratamiento biológico convencional en la EDAR de Riu Sec y de Riu Ripoll permite una eliminación de genes de resistencia a los antibióticos (ARG) de más de un 90% (1-log) en ambas EDAR. Sin embargo, el tratamiento más efectivo en términos de eliminación de ARG se encuentra en el sistema de biorreactor de membrana (MBR) uti-

» Es importante implementar tecnologías avanzadas, como los MBR u otras, en el tratamiento de aguas residuales para mejorar la eliminación de ARG y reducir el riesgo de propagación de la resistencia a los antibióticos en el medio ambiente

FIGURA 4. Comparación de resultados qPCR (arriba) y cultivo (abajo) en el sector de Hospital Parc Tauli. Nota: los asteriscos indican eliminación por debajo del LOD de las técnicas empleadas.



lizado en la planta de tratamiento Riu Sec, donde se logra una eliminación superior al 99,9% (más de 3-log) para la mayoría de los ARG estudiados. Por lo tanto, se manifiesta la relevancia de incorporar tratamientos avanzados como MBR para obtener eliminaciones significativas de estos compuestos y reducir así la emisión en los medios receptores.

3.2. ELIMINACIÓN DE GENES Y BACTERIAS RESISTENTES A ESCALA LABORATORIO

3.2.1 Resultados de los tratamientos de agua residual sin tratar del efluente del hospital

La evaluación de los tratamientos de eliminación aplicados al efluente del hospital se llevó a cabo para obte-

ner una comprensión completa de la eficacia general de eliminación para cada tipo de tratamiento. En este caso se evaluó la EPC y la nanofiltración. La eficiencia de eliminación está representada como log (C aguas residuales crudas/C aguas residuales tratadas) para los ARG y los ARB.

Como se ilustra en la **Figura 4**, los resultados muestran una notable diferencia en el rango de eliminación entre EPC y la nanofiltración directa en cuanto a ARG. Específicamente, el tratamiento de EPC mostró un rango de eliminación significativamente mayor en comparación con la nanofiltración directa, siendo cercano al 100% de eliminación (obteniendo entre 5 y 8 logs) para la EPC y de alrededor del 99% (entre 1,5 y 2 logs) para nanofiltración. En el caso de la EPC, la eliminación logarít-

mica demostró alta eliminación para los genes de interés mientras dos de ellos (tetX, blaOXA-205) fueron completamente eliminados (indicado por el asterisco). Por el contrario, la eliminación logarítmica lograda mediante la nanofiltración directa llegó a un nivel moderado de eficiencia de eliminación en comparación con EPC, sin lograr la eliminación completa de ninguno de los ARG estudiados.

En el caso de la eliminación de bacterias resistentes, se puede observar la misma tendencia de eliminación observada en los ARG, donde todas las bacterias que presentan una eliminación de más de 6 logaritmos se consideran completamente eliminadas. En general, al comparar la nanofiltración directa y la EPC se aprecia una tendencia similar en la eliminación de bacterias resistentes,.

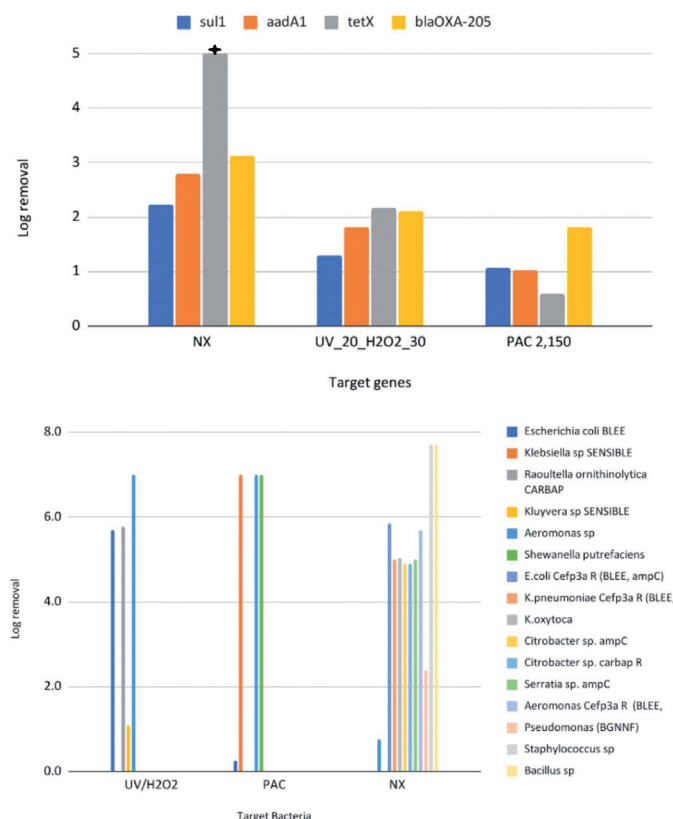
3.2.2. Resultados tratamientos efluente EDAR Riu Ripoll

El mismo análisis comparativo se llevó a cabo para evaluar los tratamientos de eliminación aplicados en la salida de la EDAR de Riu Ripoll, como se muestra en la **Figura 5**. Entre los tres tratamientos examinados, la nanofiltración directa se destacó como la más efectiva en la eliminación de ARG. Es importante destacar que se logró una eliminación hasta niveles por debajo del límite de detección (tanto para los análisis mediante qPCR como los de cultivo) del gen tetX, lo que indica la alta eficiencia de la nanofiltración directa.

Después de este tratamiento, el tratamiento UV/H₂O₂ demostró una eficacia considerablemente alta, con una eliminación alrededor del 99% de eliminación (promedio de 2-log) para los ARG investigados. En comparación, el tratamiento PAC (a una dosis de 2,15 gramos por litro) mostró una eliminación del 90% (1-log)



FIGURA 5. Co Comparación de resultados qPCR (arriba) y cultivo (abajo) en la EDAR Riu Ripoll. Nota: el asterisco indica eliminación completa.



para tres de los cuatro ARG estudiados, con una eliminación ligeramente mayor observada para blaOXA-205 (eliminación de 2 logaritmos).

Los resultados obtenidos en el análisis de bacterias resistentes respaldan los hallazgos previos, mostrando que la nanofiltración directa logró una reducción más alta, seguida por el tratamiento UV/H₂O₂ y, por último, el tratamiento de eliminación con PAC. Una vez más, se observa que una eliminación de más de 6-log indica una completa eliminación de las bacterias.

4. CONCLUSIONES

Los resultados de eliminación a escala real para las dos EDAR muestran que el sistema MBR tiene una mayor eficacia en la reducción de la presencia de ARG en comparación con el tratamiento biológico convencional. Estos resultados resaltan la importancia de

implementar tecnologías avanzadas, como el sistema MBR u otros, en el tratamiento de aguas residuales para mejorar la eliminación de ARG y reducir el riesgo de propagación de la resistencia a los antibióticos en el medio ambiente. Por eso, se probaron los cuatro diferentes tratamientos de eliminación (nanofiltración directa, EPC, PAC y AOP: UV/H₂O₂).

El análisis comparativo de los tratamientos de eliminación para el efluente del hospital y la salida de la EDAR proporcionó resultados relevantes. Por ello, las conclusiones obtenidas en los tratamientos de eliminación probados son las siguientes:

- La nanofiltración directa demostró una eficacia superior en la eliminación de bacterias y ARG en ambos tipos de aguas (aguas residuales crudas (99% eliminación y efluentes de tratamiento secundario,

desde >99% hasta prácticamente 100%), lo que la convierte en una opción de tratamiento prometedora para mitigar la propagación de la resistencia a los antibióticos, especialmente como tratamiento terciario.

- El tratamiento EPC mostró una alta eficacia en la eliminación de ARBs y ARG del efluente del hospital (eliminaciones cercanas al 100%).
- El tratamiento UV/H₂O₂ mostró resultados variables con la reducción de la mayoría de bacterias y ARG analizados pero sin llegar a una completa eliminación (99% de eliminación), lo que enfatiza la necesidad de una investigación y optimización adicionales.
- El tratamiento con carbón activado mostró una efectividad limitada en la eliminación de bacterias y ARG (90% de eliminación). Se requiere investigación adicional para optimizar su uso.

Las reducciones logarítmicas presentadas en este artículo se realizaron a través del análisis de qPCR como herramienta de diagnóstico rápido. Para complementar y profundizar en estos resultados sería necesario realizar estudios de viabilidad celular por cultivo, siguiendo las distintas normativas. Además, como próximos pasos, se recomienda abordar el problema de la diseminación de resistencias a través experimentos a escala piloto para validar los resultados obtenidos en laboratorio.

Bibliografía

[1] European Center for Disease Prevention and Control (2022). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022-2020 data. Última visita: 16/06/2023. Link directo: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2022-2020-data>.

[2] Liguori, K.; Keenum Ishi, D.J.B.; Calarco, J.; Milligan, E.; Harwood, V.; Pruden, A. (2022). Antimicrobial resistance monitoring of water environments: a framework for standardized methods and quality control. Environmental Science Technology, vol. 56, págs. 9.149-9.160.