

## Desarrollo y validación de método cromatográfico para la detección y cuantificación de residuos de Ivermectina en agua residual

### Development and validation of a chromatographic method for the detection and quantification of Ivermectin residues in wastewater

### Desenvolvimento e validação de um método cromatográfico para a detecção e quantificação de resíduos de Ivermectina em águas residuais

Elvis Jack Colque-Ayma<sup>1,2</sup>, Donald Efrain Merma-Chacca<sup>1,2</sup> Alejandro Manuel Ecos-Espino<sup>1,3</sup> Clara Nely Campos-Quiróz<sup>2,3</sup> José Luis Ramos-Tejada<sup>1,2</sup> Anyela Pierina Veja-Quispe<sup>1</sup>, Franz Zirena-Vilca<sup>1,2</sup>

DOI: <https://doi.org/10.55996/dekamuagropec.v4i2.192>

## RESUMEN

Este estudio desarrolló y validó un método de análisis por UHPL-DAD para detectar y cuantificar residuos de Ivermectina (IVM) en agua residual. La implementación de este método, consistió en poder realizar un método robusto y eficiente; donde el tiempo de retención para este residuo en mención fue de 3.1 min. No obstante, los parámetros considerados en el proceso de validación del método analítico fueron: selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y porcentaje de recuperación; el método es selectivo, el coeficiente de correlación es  $R^2 \geq 0,99$ , presenta un límite de detección (LD) de  $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$ , un límite de cuantificación (LQ) de  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ , y un porcentaje de recuperación del 90% (con fortificación de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

**Palabras claves:** Validación, Antiparasitario, Ivermectina, Cromatógrafo, Cuantificación.

## ABSTRACT

This study developed and validated a method of analysis by UHPL-DAD to detect and quantify Ivermectin (IVM) residues in wastewater. The implementation of this method consisted of a robust and efficient method, where the retention time for this residue was 3.1 min. However, the parameters considered in the validation process of the analytical method were: selectivity, linearity, detection limit, quantification limit and recovery percentage; the method is selective, the correlation coefficient is  $R^2 \geq 0.99$ , it presents a detection limit (LD) of  $0.003 \mu\text{g L}^{-1}$ , a quantification limit (LQ) of  $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ , and a recovery percentage of 90% (with fortification of  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

<sup>1</sup> Escuela profesional de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Moquegua, Perú; correo [colqueaymajack@gmail.com](mailto:colqueaymajack@gmail.com), [donald.merma@gmail.com](mailto:donald.merma@gmail.com), [jramost@unam.edu.pe](mailto:jramost@unam.edu.pe), [anyelapierina\\_2000\\_15@hotmail.com](mailto:anyelapierina_2000_15@hotmail.com)

<sup>2</sup> Laboratorio de Contaminantes Orgánicos y Ambiente del IINDEP de la Universidad Nacional de Moquegua, Perú. Correo: [claracampos23@gmail.com](mailto:claracampos23@gmail.com), [fzirenav@unam.edu.pe](mailto:fzirenav@unam.edu.pe)

<sup>3</sup> SAMYECO S.R.L. Urb. Las Terrazas, Mz I lote 30, Pacocha-Ilo, Perú. [claracampos23@gmail.com](mailto:claracampos23@gmail.com)

**Keywords:** Validation, Antiparasitic, Ivermectin, Chromatograph, Quantification.

## RESUMO

Este estudo desenvolveu e validou um método de análise por UHPL-DAD para detectar e quantificar resíduos de Ivermectina (IVM) em águas residuais. A implementação deste método consistiu num método robusto e eficiente, onde o tempo de retenção para este resíduo foi de 3,1 min. No entanto, os parâmetros considerados no processo de validação do método analítico foram: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e percentagem de recuperação; o método é seletivo, o coeficiente de correlação é  $R^2 \geq 0,99$ , apresenta um limite de detecção (LD) de  $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$ , um limite de quantificação (LQ) de  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ , e uma percentagem de recuperação de 90% (com fortificação de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

**Palavras-chave:** Validação, Antiparasitário, Ivermectina, Cromatógrafo, Quantificação

## INTRODUCCIÓN

El inicio de la pandemia COVID-19, tuvo lugar a principios de 2020 y este se propagó de manera muy rápida. Incrementándose así los casos confirmados y un alto número de fallecimientos como consecuencia de esta pandemia (Elsaid et al., 2021). Frente a este problema de salud pública, comenzaron a surgir una serie de medicamentos con capacidad de contrarrestar dicho mal (Chedid et al., 2021). Es relevante señalar que, en esta lista se incluyeron medicamentos que podrían mostrar eficacia contra el COVID-19, como la Ivermectina, la cual ha recibido la aprobación de la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) como un antiparasitario para uso solo en animales. Dicho ello, gran parte de este antiparasitarios es utilizado en países europeos y es relevante observar que estos países han continuado utilizando una cantidad significativa de antibióticos durante un extenso período de tiempo, tal como lo indican los datos proporcionados por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) (Ammon, 2020).

Indudablemente, se desencadenó una crisis sin precedentes que afectó significativamente a los sistemas de atención médica y a los recursos en varias partes del mundo; subrayando así la relevancia de tomar medidas preventivas y de control de infecciones; y como consecuencia de estas medidas, los pacientes se veían más expuestos (Rawson et al., 2020). Por otro lado, se notó un incremento en la cantidad de reportes que registran los efectos en la angustia psicológicas en las personas; y en donde los síntomas más frecuentes incluyen ansiedad, depresión y estrés, lo cual podría conducir a la automedicación (Gras et al., 2020). Por otro lado, la Ivermectina se clasifica como uno de los medicamentos de amplio espectro y es aprobado para consumo de personas. De modo que, es muy probable que estos residuos tiendan a parar

en últimas instancias a las redes sanitarias (Koch et al., 2005). De hecho, en la actualidad se informa sobre la detección de estos residuos, lo que lleva a la identificación de sus efectos ecotoxicológicos en cuerpos de agua superficiales como ríos y también en aguas subterráneas (Nieto-Juárez et al., 2021).

La sobrecarga en el consumo de medicamentos es evidente, lo que incrementa la posibilidad de que los residuos de estos fármacos lleguen a las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs), transformándolas en fuentes de propagación de contaminantes emergentes. No obstante, la limitada tecnología utilizada en varios países suele afectar la capacidad para eliminar estos contaminantes de manera efectiva (Pazda et al., 2019) y como resultado, provocando la acumulación en los lodos y sedimentos (Hiller et al., 2019). Además, cantidades considerables aún continúa siendo liberados en los sistemas de alcantarillado antes de llegar a las PTARs; y que a raíz de los sistemas tecnológicos actuales tienden a no ser eficientes en la eliminación de estos compuestos, lo que resulta en una preocupante presión sobre los cuerpos de agua receptores, generando así una seria amenaza para la salud de las personas y el ambiente. Es por ello que, se desarrolló y validó un método de análisis cromatográfico para detectar y cuantificar residuos de Ivermectina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó un reactivo patrón de la marca Sigma Aldrich con una pureza del 99.9 % para llevar a cabo la identificación del antiparasitario. Los análisis se ejecutaron utilizando un sistema UHPLC (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.), el cual se encuentra equipado con una bomba analítica cuaternaria de serie 1290 (Flexible Pump) demás, se empleó un muestreador automático 1290 Infinity diseñado para manejar volúmenes de hasta 900 mL, junto con un horno de columna de la serie

1200 y una válvula de conmutación de 10 puertas. También se aplicó un procedimiento de carga de muestra que implicó el uso de una columna analítica C18 de dimensiones 150 mm x 2.1 mm x 1,9  $\mu\text{m}$ , colocada a 35 °C. Se aplicó una fase móvil en proporción 70:20:10 (A / B / C), que consiste en acetonitrilo (solvente A), agua (solvente B) y metanol (solvente C) en modo isocrático. Se estableció un caudal de 0.6 mL por minuto a una temperatura de 35 °C utilizando una bomba analítica. Se inyectó una muestra de 10  $\mu\text{L}$  y se mantuvo una presión aproximada de 600 bar con una longitud de onda de detección de 245.4 nm (Monteiro et al., 2015).

Se elaboró una curva de calibración utilizando concentraciones de 0.01, 0.5, 1, 2 y 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Ivermectina, con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) superior a 0.99, la determinación de los límites de detección y cuantificación se basó en la relación señal-ruido. Se obtuvo un porcentaje de recuperación del 90%, similar al obtenido en la prueba de repetibilidad realizada una semana después, que fue del 92%. Estos resultados cumplen con los estándares de análisis para antibióticos según el Instituto Nacional de Metrología y Tecnología de Calidad (Analíticos, 2020).

Seguidamente se empleó agua de río como muestra en blanco y, además, para llevar a cabo los procedimientos de recuperación. Estas muestras de agua se sometieron a un proceso de filtrado a través de filtros de fibra de vidrio de 0.45  $\mu\text{m}$ , con el fin de eliminar las partículas en suspensión más grandes y prevenir cualquier obstrucción durante la extracción en fase sólida (SPE) (Cristina & Fontes, 2010). Las extracciones se llevaron a cabo utilizando cartuchos C18 (500 mg, 3 mL, 60 A), los

cuales se acondicionaron con 10 mL de metanol seguido de 10 mL de agua ultrapura. Luego, la muestra de agua residual se pasó a través de los cartuchos a una velocidad de 3 mL por minuto. Para mejorar este proceso de extracción, se utilizó una bomba peristáltica de la marca Ismatec IPC 932D y una bomba de vacío de la marca Marathon. Después de pasar toda la muestra por el cartucho C18, se procedió a eluir con 10 mL de metanol y se transfirió a tubos de ensayo. Luego, se evaporó el solvente utilizando nitrógeno. Una vez evaporado, se volvió a suspender en 1 mL de acetonitrilo después de pasar por una filtración mediante filtros de fibra de vidrio de 0.2  $\mu\text{m}$ . Finalmente, estas muestras se analizaron en un sistema UHPLC-DAD (Xu et al., 2014).

## RESULTADOS

En términos de la validación, se empleó una columna Infinitylab poroshell C18 (Octadecilsilano) (Tabla 1). Instalado en un sistema UHPLC-DAD una columna Infinitylab poroshell C18. La fase móvil utilizada fue una mezcla isocrática de acetonitrilo (70%), metanol (10%), y agua ultrapura (20%) a un caudal de 0.6 mL/min. De acuerdo con las condiciones cromatográficas establecidas en el método actual (Tabla 1), se observa una señal analítica de la Ivermectina a los 3.1 minutos. Es importante destacar que la validación se llevó a cabo siguiendo las pautas de la guía DOQ-CGCRE-008, que incluyen criterios de selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y porcentaje de recuperación. Este último se determinó utilizando la metodología de extracción en fase sólida (SPE).

Tabla 1. Características del método para UHPLC-DAD

CARACTERISTICAS	COLUMNA COMATOGRÁFICA
	C18 (Octadecilsilano)
Dimensiones	2.1 x 150 mm
Diámetro de partícula	1.9 µm
Presión aprox.	600 bar
Volumen de muestra	10 µL
Temperatura utilizada	35 °C
Solventes	MEOH –ACN –H2O (10-70-20 %)

Además, la validación se llevó a cabo siguiendo los criterios de la normativa DOQ-CGCRE-008, en la que se estableció la sensibilidad del método en función del límite de detección (LOD). El LOD se definió como la concentración mínima detectable mediante una relación señal-ruido (S/N = 3) (Ribani et al., 2004), el cual nos otorgó un resultado de 0.003 µg L<sup>-1</sup>. Asimismo, el límite

de cuantificación definido por una relación señal-ruido de 10 (S/N = 10), permitió una cuantificación a partir de 0.01 µg L<sup>-1</sup>. Así como también se obtuvo un porcentaje de recuperación del 90%, lo cual cumple con los criterios establecidos, que se encuentran en el rango del 60 al 120% (Analíticos, 2020).

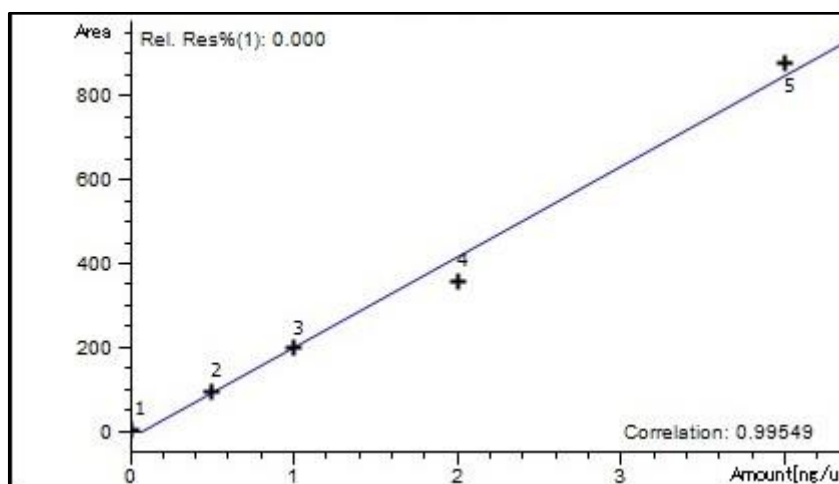
Tabla 2. Características analíticas del antiparasitario estudiado en UHPLC

Compuesto	TR (min)	LO D (µg L <sup>-1</sup> )	LOQ (µg L <sup>-1</sup> )	Ecuación	Cod	Área de recuperac ión	Rec (%)	SD	CV %
Ivermectina (IVM)	3.1	0.003	0.01	Y = 170.23X+5.7861 R <sup>2</sup> = 0.99549	A-1	151.8	88.89	0.042	4.64
					A-2	157.3	92.11		
					A-3	142.9	83.67		
					A-4	161.3	94.45		
					A-5	157.6	92.28		

TR: Tiempo de retención, LOD: Limite de detección, LOQ: Limite de cuantificación, SD: desviación estándar, CV: coeficiente de variación Rec (%): porcentaje de recuperación, R<sup>2</sup>: coeficiente de Pearson.

Dado los resultados del sistema obtenidos a partir de la curva de calibración con concentraciones de: 0.01, 0.5, 1, 2 y 4 µg mL<sup>-1</sup> de IVM, y mediante los análisis respectivos, nos otorgó un coeficiente de correlación de 0.99549 (Figura 1), mostrando de alguna manera una alta relación entre las concentraciones propuestas, los mismos que también, son directamente proporcional al tipo de transformación

matemática a aplicar. Cabe mencionar que, la determinación de la curva utiliza la relación presente entre la respuesta obtenida (área de pico cromatográfico) y la concentración del analito de IVM; es así que, dicha estandarización es formulada mediante una expresión matemática, el cual sirva para la realización del cálculo de la concentración del analito a ser determinado en la muestra.



**Figura 1.** Correlación entre el área y las concentraciones de preparaciones a distintas concentraciones del analito de IVM.

El resultado obtenido una semana después de validar el método para poder cumplir con la validación de la repetibilidad, bajo un conjunto de condiciones como: el mismo procedimiento de extracción en fases sólida, el mismo operador, y las mismas condiciones de funcionamiento y mismo equipo; nos dio como resultado una recuperación promedio similar, con un porcentaje del 92.39 %. Asimismo, los

resultados obtenidos de la desviación estándar en relación a la recuperación de la fortificación (fortificado con  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) dieron una DESV = 0.041 y un coeficiente de variabilidad de 4.46 % cumpliendo de alguna manera con el procedimiento de Validación donde se considera un coeficiente de variabilidad del 20%.

**Tabla 3.** Repetibilidad del método para la recuperación de Ivermectina

Com pue sto	T. R	Conc.	Ár ea	Ecuación de la recta	Código de muestr a	Área de recupera ción	Recuperaci ón de fortificaci ón	Porcentaje de recuperac ión (%)	Promedio (X)	DE SV	CV %
IV M	3. 1	1	1	Y =	B-1	160.7	0.901	90.12	92.39	0.0 41	4. 46
			9	178.31X+	B-2	167	0.937	93.66			
			3.	5.6337	B-3	154	0.864	86.37			
			3	R <sup>2</sup> =	B-4	171.9	0.964	96.41			
			8	0.9995	B-5	170.1	0.954	95.4			

## DISCUSIÓN

El método propuesto, propone algunas ventajas sobre lo desarrollado por (Padivitage et al., 2022; Pawar et al., 2021); esto debido a la obtención de un límite de detección (LD) con un valor de  $0.003 \mu\text{g L}^{-1}$ , además el límite de

cuantificación (LQ) calculado es de  $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ . Demostrando así mayor sensibilidad para este tipo de antiparasitario para análisis en cuerpos de agua. No obstante, la detección se dio en menos tiempo (min 3.1), lo que significaría ahorro en solventes y otros. Por otro lado, se

reporta una recuperación poco más del 90 % mediante la aplicación de metodología de SPE, lo que significaría una similitud en cuanto a lo reportado por Padivitage et al., (2022), quienes a su vez señalan una estabilidad para IVM; a raíz de la persistencia en relación a su estabilidad el cual es de 8 días, a temperaturas de entre (2 y 8 °C). Dicho ello, los cambios que se dan después de los 7 días transcurridos (>7 días); tienden a presentar deformaciones (posible degradación) del pico cromatográfico representativo del analito, lo que más adelante generaría ciertas alteraciones al momento de realizar los cálculos. Es así que, todo ello recae en la consistencia del mecanismo de retención, impacto ambiental y riesgo en el trabajo (Fatoki et al., 2018).

El antiparasitario de la Ivermectina estudiado para ser validado mediante el método cromatográfico acoplado a un sistema UHPLC – DAD demostró ser selectivo y específico. Asimismo, las fases móviles utilizadas durante el proceso de movilidad (ACN - MEOH - H<sub>2</sub>O) retienen la concentración de la Ivermectina, debido a su alta hidrofobicidad que la caracteriza; el mismo que le permite una relación oportuna con la fase estacionaria; optimizando de alguna manera la resolución del analito mediante un pico cromatográfico bien definido (Pawar et al., 2021); en ese sentido, la sensibilidad lograda fue lo suficientemente eficiente para detectar también los niveles bajos de Ivermectina.

Las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva de calibración presentaron un coeficiente de correlación de  $r = 0.995$  siendo este mayor a lo esperado el cual

fue de 0.99; despejando algún comportamiento anómalo (o resultados atípicos) para la IVM durante la recuperación y cumpliendo con lo establecido por (Analíticos, 2020). De hecho, la data obtenida para esta validación es mejor o igual que lo obtenido por Pawar et al. (2021). Asimismo, los resultados muestran un coeficiente de correlación eficiente para este método; en donde cuyas concentraciones tomadas para la elaboración de la curva de calibración son de 0.01, 0.5, 1, 2 y 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente.

## CONCLUSIONES

El método desarrollado y validado para la detección y cuantificación de residuo de ivermectina se realizó por UHPL-DAD, presenta un límite de detección y cuantificación de 0.003 y 0.01  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente, con un coeficiente de correlación  $r^2 > 0.99$  y con un porcentaje de recuperación 90.28 %, estos valores se encuentran dentro de los parámetros establecidos en el DOQ-CGCRE-008. Estas cualidades la convierten en una opción apropiada y fiable para el propósito deseado. No obstante, la metodología que se describe es sencilla y se ejecuta en un período de tiempo adecuado en comparación con otras técnicas mencionadas en la literatura. Además, la fase móvil utilizada es menos agresiva para la fase estacionaria, lo que mejora su respuesta en el tiempo de retención. La metodología validada permite la detección de este antiparasitario y puede aplicarse igualmente para la identificación en fuentes de aguas superficiales.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ammon, A. (2020). Contributing to health security in Europe since 2005 – ECDC’s 15th anniversary. *Eurosurveillance*, 25(20), 1–4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.20.2000975>
- Analíticos, M. (2020). *Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008. Brasil*. [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa\\_link.asp?seq\\_tipo\\_documento=5&cod\\_uo\\_numeracao=00774&num\\_documento=008](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=008)
- Chedid, M., Waked, R., Haddad, E., Chetata, N., Saliba, G., & Choucair, J. (2021). Antibiotics in treatment of COVID-19 complications: a review of frequency, indications, and efficacy. *Journal of Infection and Public Health*, 14(5), 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.02.001>
- Cristina, I., & Fontes, S. (2010). *Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas*. 2, 13–25.
- Elsaid, K., Olabi, V., Sayed, E. T., Wilberforce, T., & Abdelkareem, M. A. (2021). Effects of COVID-19 on the environment: An overview on air, water, wastewater, and solid waste. *Journal of Environmental Management*, 292(April), 112694. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112694>
- Fatoki, O. S., Opeolu, B. O., Genthe, B., & Olatunji, O. S. (2018). Multi-residue method for the determination of selected veterinary pharmaceutical residues in surface water around Livestock Agricultural farms. *Heliyon*, 4(12), e01066. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.01066>
- Gras, M., Champel, V., Masmoudi, K., & Liabeuf, S. (2020). Self-medication practices and their characteristics among French university students. *Therapie*. <https://doi.org/10.1016/j.therap.2020.02.019>
- Hiller, C. X., Hübner, U., Fajnorova, S., Schwartz, T., & Drewes, J. E. (2019). Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review. *Science of the Total Environment*, 685, 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.315>
- Koch, D. E., Bhandari, A., Close, L., & Hunter, R. P. (2005). Azithromycin extraction from municipal wastewater and quantitation using liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1074(1–2), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.052>
- Monteiro, S. H., Francisco, J. G., Campion, T. F., Pimpinato, R. F., Moura Andrade,



- G. C. R., Garcia, F., & Tornisiello, V. L. (2015). Multiresidue antimicrobial determination in Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) cage farming by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Aquaculture*, 447, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.002>
- Nieto-Juárez, J. I., Torres-Palma, R. A., Botero-Coy, A. M., & Hernández, F. (2021). Pharmaceuticals and environmental risk assessment in municipal wastewater treatment plants and rivers from Peru. *Environment International*, 155(March). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106674>
- Padivitage, N., Adhikari, S., & Rustum, A. M. (2022). Simultaneous determination of ivermectin, clorsulon and their related substances in an injectable finished product by a stability-indicating RP-HPLC method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 210, 114580. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114580>
- Pawar, R. P., Durgbanshi, A., Bose, D., Peris-Vicente, J., Albiol-Chiva, J., Esteve-Romero, J., & Carda-Broch, S. (2021). Determination of albendazole and ivermectin residues in cattle and poultry-derived samples from India by micellar liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103(March), 104111. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104111>
- Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., & Mulkiewicz, E. (2019). Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Science of the Total Environment*, 697, 134023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>
- Rawson, T. M., Ming, D., Ahmad, R., Moore, L. S. P., & Holmes, A. H. (2020). Antimicrobial use, drug-resistant infections and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 18(8), 409–410. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0395-y>
- Ribani, M., Grespan Bottoli, C. B., Collins, C. H., Fontes Jardim, I. C. S., & Costa Melo, L. F. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771–780. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., & Zhang, Y. (2014). Chemosphere Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *CHEMOSPHERE*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040>