



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Estudio de las resistencias a antibióticos presentes en
aguas de riego que vierten a la Albufera (Valencia)

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Colomer Buigues, María

Tutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

Cotutor/a: Castillo López, María Ángeles

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural

Universitat Politècnica de València

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del
Medi Natural

**Estudio de las resistencias a antibióticos presentes
en aguas de riego que vierten a La Albufera
(Valencia)**

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Alumna: Maria Colomer Buigues

Tutoras: Ana Isabel Jiménez Belenguer

M^a Ángeles Castillo López

Curso Académico: 2022-2023

Valencia, julio 2023

Estudio de las resistencias a antibióticos presentes en aguas de riego que vierten a La Albufera (Valencia)

La resistencia a los agentes antimicrobianos ha irrumpido en los últimos 50 años y constituye una importante amenaza para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo, poniendo en peligro la eficacia de los antibióticos y la capacidad para prevenir y tratar muchas enfermedades. La OMS la ha declarado como una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad, debido a la alarmante propagación mundial de bacterias multirresistentes (MDR), siendo su principal objetivo frenar el aumento de los genes de resistencia a los antibióticos. El resistoma a los antibióticos se define como la suma de todos los genes que contribuyen de forma directa o indirecta a la resistencia a los antibióticos tanto en clínica como en el medio ambiente. Existe un problema creciente en la presencia y la propagación de antibióticos en el medio ambiente, debido a la presión selectiva ejercida por factores antropogénicos, situando los ecosistemas acuáticos como el principal reservorio de bacterias y genes resistentes a los antibióticos. Las bacterias gram negativas han desarrollado el espectro más amplio de resistencia. Así, en 1983 se identificaron las primeras cepas productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL) y desde ese momento, se han observado en todo el mundo. Los antibióticos carbapenémicos representan, actualmente, el agente más activo contra patógenos gram negativos MDR, siendo tratamiento de último recurso. Pero la actual aparición de gramnegativos productores de carbapenemasas ha despertado una nueva preocupación debido a la falta de antibióticos que combatan a las cepas multirresistentes. En 2019, los CDC, contabilizaron más de 2,8 millones de infecciones resistentes a antibióticos; siendo las infecciones causadas por enterobacterias productoras de ESBL las de mayor aumento (50%). Esta situación ha llevado a que las ESBL, como *E. coli* y *Enterococcus* spp., y las CRE como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y otras Enterobacterias, figuren entre las principales amenazas graves de resistencia y, han sido incluidas en la lista de patógenos prioritarios de la OMS. En este trabajo se han analizado muestras de agua de diferentes acequias destinadas al riego, situadas en el parque Natural de La Albufera de Valencia con el fin de detectar bacterias resistentes a antibióticos, productoras de beta-lactamasas y carbapenemasas, mediante técnicas culturales y moleculares. Así mismo, se ha analizado la calidad microbiológica de las mismas mediante la detección de coliformes y *E. coli*, superando en todos los puntos los límites establecidos de *E. coli*. Además, se encontraron 18 patrones de resistencia diferentes y un 31,8% de los aislados fueron multirresistentes. Se detectaron genes de resistencia a β -lactámicos, carbapenemes y quinolonas, tanto en las muestras de aguas sin cultivar como en los aislados, poniendo de manifiesto la prevalencia de ARB y ARG en las aguas de riego. Este trabajo se relaciona con los siguientes ODS de la Agenda 2030: 3, 6, 12 y 14.

Palabras clave: aguas de riego; antibiograma; antibióticos; β -lactámicos; carbapenémicos; coliformes; genes de resistencia.

Alumna: Maria Colomer Buigues

Tutoras: Ana Isabel Jiménez Belenguer

M^a Ángeles Castillo López

Valencia, julio 2023

Estudi de les resistències a antibiòtics presents en aigües de reg que aboquen a L'Albufera (València)

Resum

La resistència als agents antimicrobians ha irromput en els últims 50 anys i constitueix una important amenaça per a la salut mundial, la seguretat alimentària i el desenvolupament, posant en perill l'eficàcia dels antibiòtics i la capacitat per a previndre i tractar moltes malalties. L'OMS l'ha declarada com una de les 10 principals amenaces de salut pública a les quals s'enfronta la humanitat, a causa de l'alarmant propagació mundial de bacteris multiresistents (MDR), sent el seu principal objectiu frenar l'augment dels gens de resistència als antibiòtics. El resistoma als antibiòtics es defineix com la suma de tots els gens que contribueixen de manera directa o indirecta a la resistència als antibiòtics tant en clínica com en el medi ambient. Existeix un problema creixent en la presència i la propagació d'antibiòtics en el medi ambient, a causa de la pressió selectiva exercida per factors antropogènics, situant els ecosistemes aquàtics com el principal reservori de bacteris i gens resistents als antibiòtics. Els bacteris gram negatius han desenvolupat l'espectre més ampli de resistència. Així, en 1983 es van identificar les primeres cepes productores de beta-lactamases d'espectre estès (ESBL) i des d'aqueix moment, s'han observat a tot el món. Els antibiòtics carbapenèmics representen, actualment, l'agent més actiu contra patògens gram negatius MDR, sent tractament d'últim recurs. Però l'actual aparició de gramnegatius productores de carbapenemases ha despertat una nova preocupació a causa de la falta d'antibiòtics que combaten les cepes multiresistents. En 2019, els CDC, van comptabilitzar més de 2,8 milions d'infeccions resistents a antibiòtics; sent les infeccions causades per Enterobacteris productores de ESBL les de major augment (50%). Aquesta situació ha portat al fet que les ESBL, com a *E. coli* i *Enterococcus* spp., i les CRE com *A. baumannii*, *P. aeruginosa* i altres Enterobacteris, figuren entre les principals amenaces greus de resistència i, han sigut incloses en la llista de patògens prioritaris de l'OMS. En aquest treball s'han analitzat mostres d'aigua de diferents séquies destinades al reg, situades al parc Natural de l'Albufera de València amb la finalitat de detectar bacteris resistents a antibiòtics, productores de beta-lactamases i carbapenemases, mitjançant tècniques culturals i moleculars. Així mateix, s'ha analitzat la qualitat microbiològica de les mateixes mitjançant la detecció de coliformes i *E. coli*, superant en tots els punts els límits establits d'*E. coli*. A més, es van trobar 18 patrons de resistència diferents i un 31,8% dels aïllats van ser multiresistents. Es van detectar gens de resistència a β -lactàmics, carbapenems i quinolones, tant en les mostres d'aigües sense cultivar com en els aïllats, posant de manifest la prevalença de ARB i ARG en les aigües de reg. Aquest treball es relaciona amb els següents ODS de l'Agenda 2030: 3, 6, 12 i 14.

Paraules clau: aigües de reg; antibiograma; antibiòtics; β -lactàmics; carbapenèmics; coliformes; gens de resistència.

Alumna: Maria Colomer Buigues

Tutores: Ana Isabel Jiménez Belenguer

M^a Ángeles Castillo López

València, juliol 2023

Study of antibiotic resistance in irrigation water discharged into the Albufera (Valencia)

Abstract

Antimicrobial resistance has exploded over the past 50 years and is a major threat to global health, food security and development, jeopardising the effectiveness of antibiotics and the ability to prevent and treat many diseases. The WHO has declared it as one of the top 10 public health threats facing humanity, due to the alarming global spread of multidrug-resistant (MDR) bacteria, with the main objective being to curb the rise of antibiotic resistance genes. The antibiotic resistome is defined as the sum of all genes that contribute directly or indirectly to antibiotic resistance in both clinical and environmental settings. There is a growing problem in the presence and spread of antibiotics in the environment, due to the selective pressure exerted by anthropogenic factors, placing aquatic ecosystems as the main reservoir of antibiotic resistant bacteria and genes. Gram-negative bacteria have developed the broadest spectrum of resistance. The first extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains were identified in 1983 and since then they have been observed worldwide. Carbapenem antibiotics currently represent the most active agent against gram-negative MDR pathogens and are the treatment of last resort. But the current emergence of carbapenemase-producing gram-negatives has raised new concerns about the lack of antibiotics to combat multidrug-resistant strains. In 2019, the CDC counted more than 2.8 million antibiotic-resistant infections, with infections caused by ESBL-producing Enterobacteriaceae accounting for the largest increase (50%). This situation has led to ESBLs such as *E. coli* and *Enterococcus* spp. and CRE such as *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and other Enterobacteriaceae being listed as major serious resistance threats and have been included in the WHO list of priority pathogens. In this work, water samples from different irrigation ditches located in the Albufera Natural Park of Valencia have been analysed to detect antibiotic-resistant bacteria, producers of beta-lactamases and carbapenemases, by means of cultural and molecular techniques. The microbiological quality of these was also analysed by detecting coliforms and *E. coli*, exceeding the established limits for *E. coli* at all points. In addition, 18 different resistance patterns were found and 31.8% of the isolates were multi-resistant. Resistance genes to β -lactams, carbapenems and quinolones were detected in both uncultured water samples and isolates, highlighting the prevalence of ARB and ARG in irrigation water. This work relates to the following SDGs of the 2030 Agenda: 3, 6, 12 and 14.

Key words: irrigation water; antibiogram; antibiotics; β -lactams; carbapenems; coliforms; antibiotic resistance genes.

Alumn: Maria Colomer Buigues

Tutors: Ana Isabel Jiménez Belenguer

M^a Ángeles Castillo López

Valencia, July 2023

AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras Ana y M^a Ángeles, por confiar en mí para realizar este trabajo. Gracias por vuestra paciencia y ayuda en todo lo que ha sido necesario. Gracias por haberme dado la oportunidad de aprender de vosotras.

A los compañeros del laboratorio, en especial a Yolanda, por haber estado desde el primer día hasta el último a mi lado, sacando una sonrisa hasta en los momentos menos buenos.

A mis amigas por haber estado a mi lado durante los cuatro años apoyándome en este largo camino.

Por último, a mi familia, por el apoyo incondicional, pese a la distancia.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Historia de La Albufera de Valencia | 1 |
| 1.2. Contaminación de aguas dulces..... | 1 |
| 1.3. Antibióticos y Resistencias antimicrobianas | 2 |
| 1.3.1. Mecanismos de acción de los antibióticos β -lactámicos | 5 |
| 1.3.2. Mecanismos bacterianos de resistencia | 6 |
| 1.3.3. Genes de resistencia a antibióticos..... | 7 |
| 1.4. Fuentes de propagación de las resistencia antimicrobianas | 8 |
| 1.5. Iniciativa <i>One Health</i> | 8 |
| 1.6. Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)..... | 9 |
| 2. OBJETIVOS | 10 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 11 |
| 3.1. Origen de las muestras..... | 11 |
| 3.2. Filtración..... | 11 |
| 3.3. Estudio de la calidad higiénico-sanitaria..... | 12 |
| 3.3.1. Aislamiento de microorganismos gramnegativos resistentes a antibióticos β - lactámicos | 12 |
| 3.3.2. Aislamiento de microorganismos productoras de beta-lactamasas de espectro extendido | 13 |
| 3.3.3. Aislamiento de microorganismos resistentes a carbapenemes..... | 13 |
| 3.4. Identificación de los microorganismos aislados mediante pruebas bioquímicas..... | 14 |
| 3.4.1. Pruebas previas | 14 |
| 3.4.2. Identificación mediante Tira API 20E | 15 |
| 3.4.3. Identificación mediante métodos moleculares..... | 15 |
| 3.5. Estudio de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas | 16 |
| 3.6. Estudio de la presencia de genes de resistencia a antibióticos | 17 |
| 3.6.1. Extracción de ADN..... | 17 |
| 3.6.2. PCR multiplex para la detección de genes de resistencia a β -lactámicos, carbapenémicos y quinolonas..... | 17 |
| 3.6.3. Electroforesis en gel de agarosa..... | 19 |
| 3.7. Análisis estadístico | 19 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 20 |
| 4.1. Condiciones higiénico-sanitarias | 20 |
| 4.2. Identificación bioquímica y molecular de los aislados | 21 |
| 4.3. Perfil de resistencia antibiótica de los aislados..... | 23 |
| 4.4. Detección de genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos y quinolonas | 26 |
| 5. CONCLUSIONES | 30 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 31 |

ANEXOS

| | |
|--|----|
| A. Grado de relación del trabajo con los ODS | I |
| B. Ubicación de los puntos de muestreo..... | II |
| C. Resultados de la identificación molecular de los aislados | IV |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Apariencia de coliformes (rosa) y <i>E. coli</i> (azul) en medio CC | 12 |
| Figura 2. Apariencia colonias en medio ESBL..... | 13 |
| Figura 3. Apariencia colonias en medio mSuperCarba..... | 14 |
| Figura 4. Código de colores correspondiente a las pruebas negativas (-) y positivas (+) del sistema API 20E | 15 |
| Figura 5. Placas de las cepas M1-2 E R (izquierda) y M1-3 E R (derecha) sembradas en medio Mueller-Hinton con discos de antibióticos post-incubación..... | 17 |
| Figura 6. Sensibilidad a antibióticos de las cepas aisladas..... | 25 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Puntos y fechas de muestreo de aguas | 11 |
| Tabla 2. Antibióticos elegidos para el estudio de la resistencia de las cepas a antimicrobianos. Clasificación en grupos. Concentración del antibiótico en el disco de carga en µg. | 16 |
| Tabla 3. Genes de resistencia a β-lactámicos, carbapenemes y quinolonas | 18 |
| Tabla 4. Recuentos de <i>E. coli</i> y coliformes totales en las muestras de agua analizadas..... | 20 |
| Tabla 5. Identificación de los aislados mediante tiras API 20E | 21 |
| Tabla 6. Identificación molecular de todos los aislados..... | 22 |
| Tabla 7. Patrones de resistencia a antibióticos de las cepas | 24 |
| Tabla 8. Genes de resistencia a β-lactámicos y quinolonas en muestras de agua sin cultivar ... | 26 |
| Tabla 9. Genes de resistencia a β-lactámicos y quinolonas en las cepas aisladas | 28 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH Arginina deshidrolasa

AG Aminoglucósidos

AMC Amoxicilina

AMP Ampicilina

AMR Resistencia a los antimicrobianos

AR Resistencia a los antibióticos

ARB Bacterias resistentes a antibióticos

ARG Genes de resistencia antibiótica

ARJ Acequia Real del Júcar

C Cloranfenicol

CAZ Ceftazidima

CC Cromógeno de coliformes

CDC Centros para el Control y Prevención de Enfermedades

CIP Ciprofloxacino

CIT Citrato

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

CN Gentamicina

CPE *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas

CPO Bacterias productoras de carbapenemasas

CRE Enterobacterias resistentes a carbapenemes

CRO Ceftriaxona

CTX Cefotaxima

C3G Cefalosporinas de tercera generación

EC European Commission

EDAR Estación Depuradora de Aguas Residuales

ESBL Betalactamasas de espectro extendido

EU European Union

FQ Fluoroquinolonas

GEL Gelatinasa

HGT Transferencia horizontal de genes

IPM Imipenem

IND Producción de indol

KESC *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp.

LDC Lisina descarboxilasa

LEV Levofloxacino

MDR Multirresistentes a los antibióticos

MEM Meropenem

MH Mueller-Hinton agar

mPCR Multiplex Polymerase Chain Reaction

NA Ácido nalidíxico

ODC Ornitina descarboxilasa

ODS Objetivos de Desarrollo Sostenible

OMS Organización Mundial de la Salud

PBP Proteínas de unión a penicilina

PCA Plate Count Agar

PDR Panresistentes

SC Agar mSuperCARBA

TDA Triptófano desaminasa

TE Tetraciclina

UCI Unidad de Cuidados Intensivos

URE Ureasa

VP Producción de acetoína (Voges-Proskauer)

WHO World Health Organization

XDR Resistencia extendida a los antibióticos

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de La Albufera de Valencia

La Albufera de Valencia es uno de los principales humedales a nivel nacional y una de las zonas húmedas más relevantes de Europa. Así, el Parque Natural de la Albufera es el espacio natural protegido más antiguo de la Comunidad Valencina, declarado en julio de 1986 (Decreto 89/1986), por su elevado valor ambiental, cultural y paisajístico. El Parque Natural tiene una extensión aproximada de 21.200 hectáreas, perteneciendo unas 2.500 al lago. Sin embargo, el origen del actual Parque Natural data de miles años atrás. La laguna es el resultado del cierre de un golfo marino extendido entre las desembocaduras de los ríos Túria y Xúquer debido a la deposición de sedimentos fluviales, y fue aislado del mar Mediterráneo (GVA, <https://parquesnaturales.gva.es/va/web/pn-l-albufera/historia>; Soria et al., 2020).

Desde la década de los 70-80 del siglo XX, el aumento de la contaminación del medio hídrico por los vertidos industriales continuados, residuos agrícolas y agua residuales urbanas sin tratar, ha provocado un gran deterioro de los diferentes hábitats de la marjal, por el cual se aprobó el Plan Rector de Uso y Gestión del Parque Natural de La Albufera (Decreto 259/2004).

La Albufera recibe aguas de una gran cuenca vertiente, siendo regada por las acequias del Oro y Favara en el sistema Turia y por retornos de riego de la Acequia Real del Júcar (ARJ), y las acequias del azud de Sueca, en el sistema Júcar. La limitada comunicación con el mar Mediterráneo y las aportaciones de agua dulce han provocado un cambio en la salinidad de la Albufera, evolucionando de un ambiente salino en sus orígenes a uno dulceacuícola, que ha llevado a los expertos a hablar del cambio de la “Albufera de los pescadores” a la “Albufera de los agricultores” (Soria et al., 2020).

Actualmente, la pesca, la caza y la agricultura, vinculada al cultivo del arroz, son las actividades tradicionales más desarrolladas en torno a La Albufera. Así, el cultivo del arroz tiene una gran importancia tanto a nivel económico como medioambiental, siendo muy importante definir distintos periodos dentro del año hidrológico. Desde la segunda quincena de septiembre hasta primeros de noviembre tiene lugar la recolección del arroz y el tratamiento de la paja, caracterizado por ser un período sin riego. A continuación, durante noviembre hasta mitad de febrero, tiene lugar lo que es conocido como ‘La Perellonà’, la inundación de los campos de arroz o ‘tancats’ desde La Albufera y los aportes de las acequias. Desde mitad de febrero a final de abril se preparan las tierras para la siembra de arroz, que tiene lugar en mayo. A partir de ese momento, el riego depende en gran parte de la pluviometría de la cuenca, siendo actualmente un problema debido a la escasez de agua, que está provocando una disminución del nivel de La Albufera (GVA, <https://parquesnaturales.gva.es/va/web/pn-l-albufera/historia>; CEDEX, 2017).

1.2. Contaminación de aguas dulces

La contaminación del agua, sumado al aumento de la población y a la sequía, ha contribuido a una crisis en la disponibilidad del agua dulce y supone una amenaza debido a la dependencia de la población del agua para diversos usos y necesidades. Según la Agencia Espacial Europea, más del 70% del agua extraída de la superficie o subterránea se destina a la irrigación de campos (ESA, 2023).

Así, la contaminación del agua tiene diversas procedencias. Entre los contaminantes más presentes en las aguas superficiales encontramos los microcontaminantes orgánicos (MCO)

liberados por la actividad humana, destacando los vertidos de la industria, estaciones depuradoras de agua residuales (EDARs), escorrentías urbanas y actividad agrícola (Amato et al., 2021; Dulsat-Masvidal et al., 2023). Además, el vertido de residuos antibióticos en el medio ambiente, ha provocado un aumento de su presencia y distribución en las aguas, siendo un desencadenante en la generación de resistencias (Bergeron et al., 2015).

Las escorrentías pueden contener fertilizantes, plaguicidas, productos químicos tóxicos y bacterias, entre otros. Cuando esta escorrentía llega a las vías fluviales puede provocar un aumento del grado de eutrofización de las aguas, destacando el exceso de nitrógeno y fósforo, lo cual provoca la proliferación de algas y, consecuentemente, la aparición de zonas de bajo contenido en oxígeno (Nunez, 2011). En un estudio del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) sobre los ecosistemas acuáticos de las IBA (Áreas Importantes para la Conservación de las Aves y la Biodiversidad) en España, detectaron la presencia de fármacos, cafeína, nicotina, plaguicidas, ésteres organofosforados, compuestos perfluorados y benzofenona en las muestras de aguas analizadas. Los más preocupantes son el insecticida clorpirifós y el fármaco venlafaxina, debido a sus efectos neurotóxicos, persistentes y bioacumulativos (CSIC, 2023).

A parte de ser un problema medioambiental, la contaminación de agua es un problema que afecta a la salud humana. Así, el saneamiento deficiente del agua y su contaminación están relacionados con la transmisión de diferentes enfermedades como el cólera, la disentería, la hepatitis A, o la fiebre tifoidea (WHO, 2022). Según la OMS (WHO, 2022), al menos 2000 millones de personas de todo el mundo usan agua contaminada con heces para consumo humano, lo que supone el mayor riesgo para la seguridad.

1.3. Antibióticos y Resistencias antimicrobianas

La crisis de los microorganismos resistentes a los antimicrobianos ha irrumpido en los últimos 50 años, provocando la incapacidad para la prevención y el tratamiento eficaz de gran parte de enfermedades (Strachan & Davies, 2017). La resistencia a los antimicrobianos (AMR) se produce cuando los microorganismos desarrollan la capacidad de superponerse a los antibióticos generados para combatirlos. Según los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), la resistencia a los antibióticos (AR) mata al menos a 1,27 millones de personas en todo el mundo; en 2019 acabó con la vida de casi 5 millones de personas y, se estima que un aumento continuo de la resistencia provocaría 10 millones de muertes al año en todo el mundo. A nivel de la Unión Europea (EU), la AMR es responsable de más de 35000 muertes al año (CDC, 2022; EC, 2023). Por lo tanto, en este contexto, en 2019 la OMS (WHO, 2021) declaró la AMR como una de las 10 principales amenazas para la salud pública mundial y, la Comisión Europea (EC), la identificó como una de las tres principales amenazas prioritarias para la salud (EC, 2023).

La era moderna de los antibióticos empezó en 1928 con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming y, desde ese momento, los antibióticos han supuesto un gran cambio en la medicina en el tratamiento de las infecciones bacterianas. Poco después del inicio de su uso, aparecieron las primeras resistencias. Ante esta situación, en la década de 1950, se desarrollaron nuevos antibióticos betalactámicos, pero con el tiempo se volvieron a desarrollar resistencias frente a ellos (Ventola, 2015). De este modo, la falta de desarrollo de nuevos antibióticos capaces de combatir las bacterias patógenas, junto al uso excesivo y abusivo de estos, ha provocado que las enfermedades bacterianas vuelvan a suponer una amenaza.

Entre 2020 y 2021, el número de casos declarados de bacterias resistentes a los antibióticos (ARB) aumentó para todo los patógenos, con una mayor presencia en *Escherichia coli*, seguida de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y *Streptococcus pneumoniae* (Jiménez-Belenguer et al., 2023).

La resistencia que presentan las bacterias a los diferentes agentes antimicrobianos puede ser natural o adquirida. Dentro de la **resistencia natural**, se encuentra la resistencia intrínseca la cual está siempre expresada en una especie bacteriana sin depender de la exposición previa a antibióticos ni estar relacionada con la transferencia horizontal de genes (HGT), además de no presentar sitios específicos para los antibióticos, lo que hace que no les afecten. El otro tipo de resistencia natural es la inducida, en la cual las bacterias presentan los genes de resistencia de forma natural, pero solo se expresan ante la exposición a antibióticos. En cambio, la **resistencia adquirida** hace referencia a la manifestación de distintos mecanismos para evadir la acción de los antibióticos a los cuales eran, originalmente, susceptibles. Así, dicha resistencia se obtiene mayoritariamente mediante la adquisición de material genético externo que le confiere dicha propiedad. La transferencia del material genético puede ser mediante HGT (transferencia horizontal de genes) mediada por plásmidos, aunque en algunos casos también puede ser por bacteriófagos. Asimismo, las bacterias pueden sufrir mutaciones en su ADN cromosómico que les confiere resistencia a antimicrobianos (Dowling et al., 2017; Reygaert, 2018).

El problema se agranda con el creciente número de bacterias con resistencias a diferentes agentes antimicrobianos. Estas, se han clasificado según el número de categorías de antimicrobianos a los que son resistentes. Así, las bacterias multirresistentes (MDR, de sus siglas en inglés), son aquellas que muestran resistencia a tres o más clases de antimicrobianos. Las bacterias clasificadas como XDR (extremadamente resistentes a los medicamentos) son aquellas susceptibles sólo a una o dos categorías de antimicrobianos. Por último, se encuentran las bacterias PDR o panresistentes, las cuales destacan por no ser sensibles a ningún agente antimicrobiano (Magiorakos et al., 2012).

Los patógenos gramnegativos son los que más preocupan actualmente, debido a que se están volviendo resistentes a casi todos los antibióticos disponibles, produciendo infecciones severas en el entorno sanitario (Ventola, 2015).

En 1983 se identificaron las primeras cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), y desde ese momento, se han observado en todo el mundo. Las ESBL son enzimas capaces de hidrolizar la mayor parte de las penicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactámicos, pero no cefanicinas ni carbapenémicos, y actualmente, se conocen unas 300 (Kapoor et al., 2017). La producción de ESBL se ha observado sobre todo en especies de la familia de *Enterobacteriaceae*, destacando *E. coli* y *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* (EUCAST, 2017). La mayoría de las ESBL son enzimas adquiridas mediante transferencia horizontal cuyos genes están codificados en plásmidos, que, además, presentan genes de resistencia a otros agentes antimicrobianos como cloranfenicol (C), aminoglucósidos (AG) y tetraciclinas (TE) (Rawat & Nair, 2010). Asimismo, el aumento de la distribución de ESBL es debido también, a la expansión clonal de los organismos productores de las mismas, y a su aparición de novo, en menor medida (EUCAST, 2017). Aunque la mayoría de los brotes nosocomiales debido a *Enterobacteriaceae* productoras de ESBL tienen lugar en la UCI o en pacientes inmunodeprimidos, se han visto casos donde los neonatos se ven afectados. Además, las infecciones nosocomiales más severas han sido causadas por cepas muy virulentas

productoras de ESBL y carbapenemasas, como las cepas *K. pneumoniae* ST258 y *E. coli* ST131 (Bush & Bradford, 2020).

Los antibióticos carbapenémicos representan actualmente el agente más activo y potente contra patógenos gramnegativos con resistencia a múltiples fármacos, siendo el tratamiento de último recurso, pero la actual aparición de gramnegativos productores de carbapenemasas ha despertado una nueva preocupación debido a la falta de antibióticos que combatan a las cepas multirresistentes (Martínez-Martínez, 2019). Desde la segunda mitad de los años 90 del s. XX, ha habido un aumento en la preocupación por la diseminación de carbapenemasas en Europa, debido a que pueden conferir resistencia a casi todos los antibióticos β -lactámicos y se transfieren fácilmente. Las carbapenemasas son β -lactamasas con la capacidad de hidrolizar penicilinas, la mayoría de las cefalosporinas, carbapenems y monobactámicos. Por tanto, las bacterias productoras de carbapenemasas (CPO) presentan mecanismos de resistencia a un amplio espectro de agentes antimicrobianos. Dentro de las CPO, destacan las *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas (CPE), cuyas infecciones están asociadas a altas tasas de mortalidad (EUCAST, 2017). La mayoría de las enzimas carbapenemasas son adquiridas y están codificadas en plásmidos, junto con otros genes que les confieren resistencia a otros betalactámicos, AGs y fluoroquinolonas (FQ) (Jiménez-Belenguer et al., 2023). Sin embargo, las ESBL o las cefalosporinasas AmpC también están relacionadas con el aumento de la resistencia a los carbapenems. Además, preocupan principalmente las enterobacterias resistentes a carbapenems (CRE), debido a que se han vuelto resistentes a casi todos los antibióticos disponibles, como *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, siendo *K. pneumoniae* y *E. coli* las especies más extendidas de CRE, causando aproximadamente 600 muertes al año en Estados Unidos (Pandey & Cascella, 2023; Ventola, 2015).

Frente a esta situación crítica, las bacterias productoras de ESBL, como *E. coli* y *Enterococcus* spp., y las CRE, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*, han sido englobadas entre las 12 principales amenazas graves de AMR por los CDC y además, han sido incluidas en la lista de patógenos prioritarios de la OMS de ARB para orientar la investigación y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (CDC, 2019; Gekenidis et al., 2018; Martínez-Martínez, 2019; WHO, 2017).

En el ámbito medioambiental, la resistencia a antibióticos está aumentando también, situando a los ecosistemas acuáticos como el reservorio principal de ARB y dentro de estos, el agua de riego es una de las principales fuentes de contaminación bacterianas, donde convergen comunidades bacterias autóctonas y procedentes de la contaminación antropogénica, jugando un papel distinguido en la diseminación de ARB (Freitas et al., 2019; Montero et al., 2021). La elevada presencia de bacterias resistentes en las aguas de riego puede provocar a su vez, la entrada de ARB en la cadena alimentaria, al contaminar los vegetales (Amato et al., 2021). Debido a esto, es necesario el control de la calidad del agua de riego mediante indicadores de contaminación fecal, como son *E. coli*, coliformes y *Enterococcus* spp. (Gekenidis et al., 2018, 2020). Los coliformes son, además, indicadores de resistencia, con una alta tasa de recepción de genes de resistencia con elevada propagación en el medio. Así, diferentes estudios han resaltado la preocupación existente por la presencia de coliformes MDR en aguas. Entre los coliformes, destaca *E. coli* como indicador para la contaminación fecal antropogénica y para el control de la AMR a nivel mundial. Incluso se ha detectado la presencia de cepas de *E. coli* productoras de ESBL y carbapenemasas en muestras procedentes de aguas superficiales (Anjum et al., 2021; Mishra et al., 2018).

1.3.1. Mecanismos de acción de los antibióticos β -lactámicos

El modo de acción de los antibióticos permite diferenciarlos según si inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana o de los ácidos nucleicos, inhiben la función de los ribosomas y por tanto, la síntesis de proteínas, la función de la membrana celular mediante su despolarización o inhiben rutas de su metabolismo (Dowling et al., 2017; Reygaert, 2018).

Los β -lactámicos son antibióticos que se caracterizan por la presencia de un anillo β -lactámico, su acción se dirige hacia la pared celular bacteriana, inhibiendo la última etapa de su síntesis. El mecanismo de acción está basado en la acilación de las transpeptidasas implicadas en la formación del tetrapéptido (paso final en la síntesis del peptidoglicano). El anillo beta lactámico imita al sitio de unión de los aminoácidos, de manera que se une a la transpeptidasa, impidiendo la reticulación del peptidoglicano. Estas enzimas se conocen también como PBP (penicillin binding protein). Por tanto, las PBP no están disponibles para la síntesis de nuevo peptidoglicano, componente esencial de la pared celular, lo que provocará, finalmente, la lisis bacteriana (Bush & Bradford, 2019, 2020; Dowling et al., 2017; Kapoor et al., 2017).

Hay cuatro clases principales de β -lactámicos: penicilinas (penams), cefalosporinas (cefem), carbapenemes y monobactámicos.

El grupo de las *penicilinas* se divide en penicilinas naturales, que incluye a la penicilina G (PNG o bencilpenicilina), aislada de *Penicillium chrysogenum* y la penicilina V (fenoximetilpenicilina), usadas ambas para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias grampositivas y gramnegativas, en menor medida; las aminopenicilinas, destacan la amoxicilina y la ampicilinas, que presentan actividad contra bacterias tanto gramnegativas como grampositivas, y su uso suele ser junto a inhibidores de betalactamasas; las carboxipenicilinas, carbenicilina y ticarcilina, efectivas frente a patógenos gramnegativos; y las ureidopenicilinas, que incluye la piperacilina con actividad contra los bacilos gramnegativos resistentes a la aminopenicilinas (Pandey & Cascella, 2023; Turner et al., 2022).

La primera *cefalosporina* fue aislada del hongo *Acremonium chrysogenum* en 1948. Las cefalosporinas semisintéticas comúnmente se dividen en cinco generaciones según su actividad antimicrobiana. Dentro de la de primera generación se encuentran cefazolina, cefalexina y cefadroxil, que presentan una fuerte actividad frente a microorganismos gram-positivos, mientras que es baja frente a las bacterias gramnegativas, aunque afectan principalmente a *E. coli* y *K. pneumoniae*. Las cefalosporinas de segunda generación comprenden la cefuroxima, cefoxitina, cefotetan, cefaclor y cefprozil, con una menor actividad hacia los organismos grampositivos respecto a las de primera generación, pero con una mayor acción bactericida frente a gram-negativos; las de tercera generación son cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima, cefixima, cefdinir, cefditoren y ceftibuten, que presentan una menor eficiencia frente a los grampositivos, pero mejoran la acción frente a los patógenos gram negativos, en especial contra los que contienen beta-lactamasas. Los cefems de cuarta generación se diseñaron para mejorar el transporte pasivo a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas y disminuir su afinidad por las betalactamasas y, por tanto, presentan una mayor estabilidad delante de la hidrólisis de β -lactamasas. Por último, la quinta generación de cefalosporinas se centra en mantener el amplio espectro de actuación, minimizando las resistencias surgidas hacia las generaciones anteriores (Dowling et al., 2017; Pandey & Cascella, 2023; Turner et al., 2022).

Los *carbapenemes* confieren protección frente a la mayoría de las betalactamasas y presentan un amplio espectro de actuación y, por tanto, son usados principalmente frente a infecciones por bacterias MDR, así como para tratar las infecciones nosocomiales. Los antibióticos

carbapenémicos son el imipenem, el meropenem, doripenem y ertapenem (Pandey & Cascella, 2023; Turner et al., 2022).

Los *monobactámicos* son el grupo más simple de los beta-lactámicos, y fue aislado por primera vez de *Chromobacterium violaceum*. Hay 5 β -lactámicos monocíclicos o monobactámicos, el aztreonam, tigemonam, nocardicina A, el carumonam y tabtoxina, aunque actualmente, el único monobactámico aprobado por la FDA es el aztreonam, eficaz únicamente frente a bacterias gramnegativas aerobias (Bush & Bradford, 2019; Pandey & Cascella, 2023; Turner et al., 2022).

1.3.2. Mecanismos bacterianos de resistencia

Los principales mecanismos bacterianos de resistencia son la presencia de enzimas que hidrolizan los agentes antimicrobianos, la modificación de las dianas de los antibióticos, la disminución de la absorción del antibiótico y el eflujo activo del agente antimicrobiano (Dowling et al., 2017; Reygaert, 2018).

En cuanto a los antibióticos β -lactámicos, los mecanismos más frecuentes de resistencia de las bacterias es la producción de enzimas β -lactamasas, la disminución de la entrada del antibiótico a través de la membrana externa y, la modificación de dianas (Bush & Bradford, 2020; Dowling et al., 2017; Pandey & Cascella, 2023; Reygaert, 2018).

β -lactamasas. Se encuentran codificadas en cromosomas, plásmidos u otros elementos transponibles y según su estructura se clasifican en cuatro categorías (A, B, C o D) siguiendo la clasificación de Amber. Así, gran parte de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* presenta genes cromosómicos y plásmidos portadores de genes de β -lactamasas (Reygaert, 2018). Las β -lactamasas de clase A o penicilinasas son progenitoras de las ESBL, resistentes tanto a penicilinas como a cefalosporinas de tercera generación. Las más comunes en *Enterobacteriaceae* son TEM, SHV y CTX-M. Dentro de esta clase también se encuentran algunas carbapenemasas como la KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) y la IMI (Imipenem-hydrolysing β -lactamase). La clase B se trata de las carbapenemasas metalobeta-lactamasas (MBL), como la IMP (*Pseudomonas* resistente al imipenem), NDM (metalolactamasa de Nueva Delhi) y VIM (metalolactamasa codificada por integrón de Verona). Por otro lado, las cefalosporinasas o β -lactamasas de clase C son producidas por todos los gramnegativos excepto *Salmonella* y *Klebsiella*. Las AmpC pertenecen a este grupo, siendo resistentes a todos los beta-lactámicos a excepción de los carbapenems. Por último, la clase D la conforman las OXA (Oxacillin-hydrolysing carbapenemase), muy frecuentes en países mediterráneos. La más común es la encontrada en *K. pneumoniae*, OXA-48. (Bush & Bradford, 2019; Kapoor et al., 2017; Martínez-Martínez, 2019; Nordmann et al., 2012; Reygaert, 2018; Smith & Kendall, 2023).

Limitación a la entrada de antibiótico. Las bacterias gramnegativas presentan resistencia innata a diversas moléculas, entre ellas agentes antimicrobianos grandes, debido a la estructura protectora de su membrana externa. Así, los organismos gramnegativos presentan canales de porina en su membrana para la entrada de pequeñas moléculas hidrofílicas, como los β -lactámicos y quinolonas. Una disminución del número de canales o mutaciones en éstos limita la absorción de antibiótico. Diversos estudios han demostrado que uno de los mecanismos de resistencia a carbapenems por parte Enterobacterias consiste en la disminución del número de porinas. Asimismo, se ha observado que la formación de biopelículas de organismos patógenos les protege de los agentes antimicrobianos, y además, les facilita la HGT, siendo más sencilla la transferencia de genes de resistencia (Kapoor et al., 2017; Reygaert, 2018).

Modificación de dianas. Las dianas de los agentes antimicrobianos son múltiples en la célula bacteriana, y, por tanto, susceptibles a ser modificadas por las bacterias para ser resistentes a los antibióticos. Generalmente, la modificación de las dianas farmacológicas se produce por mutaciones espontáneas en los genes. Por ejemplo, en el caso de las fluoroquinolonas (FQ), dirigidas a inhibir la síntesis de ácidos nucleicos, las mutaciones se producen en la ADN girasa, de modo que se reduce o elimina la capacidad del antibiótico para unirse (Kapoor et al., 2017; Reygaert, 2018).

Eflujo de antibióticos. Las bacterias presentan genes en su cromosoma que codifican para bombas de eflujo, encargadas de expulsar al exterior de la célula bacteriana los agentes antimicrobianos antes de que ejerzan su función. Estas se sitúan en la membrana citoplasmática de las bacterias y la mayoría transportan múltiples fármacos, lo cual puede llevar a la aparición de bacterias MDR (Kapoor et al., 2017; Reygaert, 2018).

1.3.3. Genes de resistencia a antibióticos

En este contexto, aparece un nuevo término, resistoma, como la suma de todos los genes que llevan de forma directa o indirecta a la resistencia a antibióticos tanto en el entorno clínico como en el medio ambiente (Gekenidis et al., 2018; Strachan & Davies, 2017).

Así, los ARG son preocupantes para la salud humana, sobre todo cuando son codificados por plásmidos, debido a que se propagan más rápido, y además, suelen llevar distintos ARG, lo que puede derivar en MDR (Gekenidis et al., 2020).

Los genes de carbapenemasas, identificados mayoritariamente en *Enterobacteriaceae*, son *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* y *bla_{OXA-48}* y los genes ESBL más comunes son *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX}* (Montero et al., 2021; Poirel et al., 2011).

Actualmente, el gen *bla_{KPC}* es endémico en los países mediterráneo, especialmente en Italia, Grecia e Israel. En los últimos 10 años aproximadamente, se han detectado genes *bla_{OXA-48}* en *K. pneumoniae* que se están diseminando por Europa, siendo su reservorio principal Turquía y genes similares han sido detectados en Argentina e India (Poirel et al., 2011). Además, se han encontrado genes *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}* y *bla_{KPC}* en efluentes hospitalarios de Túnez, con una mayor concentración de *bla_{NDM}*, que podría deberse a que las bacterias que presentan este gen también portan diferentes genes que confieren resistencia a otros antibióticos (Nasri et al., 2017). Asimismo, en especies de *Kluyvera* se han detectado también genes *bla_{KPC-2}*, *bla_{NDM-4}*, *bla_{OXA-48}* (Li et al., 2019). Un estudio en agua residuales hospitalarias en China también detectó el gen *bla_{KPC-2}* en *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae* (Zhang et al., 2012). También se ha reportado en varios países la presencia de genes ESBL en diferentes sistemas acuáticos. Así, en Suiza se identificaron cepas de *E. coli* productoras de ESBL procedentes de aguas de riego portadoras de genes de la familia *bla_{CTX-M}*, así como cepas de *E. cloacae* con genes de resistencia a antibióticos beta-lactámicos AmpC; los genes *bla_{CMY}* y *bla_{TEM}* también han sido detectados en *C. freundii*. Para *C. freundii* identificaron la presencia de genes de resistencia a quinolonas, como *qnrE1* y *qnrB* (Freitas et al., 2019; Gekenidis et al., 2020). Además, se identificaron cepas de *E. coli* portadoras de *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA}* y *bla_{SHV}* en aguas de riego de diferentes partes de Ecuador (Montero et al., 2021).

Por tanto, debido a la gran problemática que supone el aumento de las resistencias antibióticas, es necesario frenar el aumento de genes de resistencia a antibióticos (ARGs).

1.4. Fuentes de propagación de las resistencias antimicrobianas

Aunque la problemática de la diseminación de resistencia antibiótica y genes de resistencia es mayor en el ámbito clínico, el papel del medio ambiente también es destacable. El uso de agentes antimicrobianos en humanos y animales genera ARB y ARG, eliminados a través de las heces, que llegan a las aguas y suelos, convertidos en reservorios principales de éstos y a partir de los cuales se dispersarán (PRAN-MA, 2022). A continuación, se describen las principales fuentes de propagación de resistencias antimicrobianas.

Fuentes urbanas. De los antibióticos usados para consumo doméstico, entre un 30 y 90% son excretados por orina y heces, siendo depositado en las EDAR, lo cual supone un problema para el medioambiente, así como para la salud humana. Por otro lado, un 32% de los pacientes que se atienden en un hospital o centro sanitario reciben tratamiento antibiótico, siendo la mayoría cefalosporinas de tercera y cuarta generación y carbapenems, posicionando a los efluentes de estos como 'puntos calientes' de AMR (PRAN-MA, 2022).

Fuentes agropecuarias. Debido al uso extendido de agentes antimicrobianos para el tratamiento de los animales, la producción ganadera es una fuente de emisión de resistencias a antibióticos, que afecta tanto al medio ambiente como a los humanos al alimentarse de productos cárnicos. Asimismo, hasta el 90% de los antibióticos que se suministran al ganado son expulsados en orina y heces, siendo los purines procedentes de la actividad ganadera una fuente importante de resistencias, ya que son usados como abono para tierras destinadas al cultivo, contaminando el suelo y los cursos de agua cercana. Además, actualmente, la acuicultura es también considerada una fuente de AMR debido a la rapidez con la que los antibióticos, para el tratamiento de los peces, son transportados a través del medio acuático (CDC, 2021; PRAN-MA, 2022; Ventola, 2015).

Efluentes de depuración. Una de las principales fuentes de dispersión de ARG y ARB al medioambiente son los efluentes derivados de las EDAR, que, aunque disminuyen el número de contaminantes, al no ser un tratamiento específico, muchas ARB pueden sobrevivir. Además, un subproducto del tratamiento de aguas residuales es el lodo, biosólido usado como estiércol y que también supone un riesgo para la diseminación de resistencias antibióticas (CDC, 2021; Montero et al., 2021; PRAN-MA, 2022).

Aguas, suelos y aire. Las aguas destinadas al riego son también un foco de ARB, afectando, por tanto, a los suelos, lo que supone un problema, ya que los agentes antimicrobianos pueden incorporarse a la cadena alimentaria vía vegetales. De hecho, diferentes estudios han confirmado la correlación existente entre la presencia de ARG en aguas de riego, suelo, y frutas y verduras. Asimismo, la proximidad a algunas EDAR también está relacionado con la presencia de resistencias en aguas. Aunque en menor medida, el aire también es una amenaza debido a que es un medio de dispersión de las bacterias, y por tanto de ARB (Amato et al., 2021; CDC, 2021; Freitas et al., 2019; Gekenidis et al., 2018; PRAN-MA, 2022).

1.5. Iniciativa *One Health*

El concepto 'One Health' hace referencia a una propuesta que abarca diferentes sectores, disciplinas, tanto a nivel local, nacional como mundial, para conseguir unos mejores resultados en salud pública. Así, en la iniciativa 'One Health' son miembros la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), que colaboran con la finalidad de promover soluciones a las

diferentes amenazas a la salud pública debido a la conexión directa entre humanos, animales y medioambiente (CDC, 2023; WHO, s. f.). Esta iniciativa abarca principalmente, los ámbitos de la seguridad alimentaria, la prevención de enfermedades zoonóticas emergentes, reemergentes y endémicas en animales y humanos, las enfermedades transmitidas mediante vectores, las enfermedades tropicales desatendidas, conservar la salud medioambiental y reducir la resistencia a los agentes antimicrobianos (CDC, 2023; WHO, s. f.).

Así, la ARM es un ejemplo claro de la conexión estrecha existente entre humanos, animales y medioambiente, debido a la dispersión de las ARB y ARG desde los animales (productos cárnicos, purines) y fuentes ambientales (aguas, suelos) a la cadena alimentaria, afectando a la salud humana (CDC, 2023; Jiménez-Belenguer et al., 2023; Léger et al., 2021).

Por tanto, es necesaria la colaboración de profesionales en salud humana, animal y medio ambiente de los diferentes países para asegurar la mejor sanidad pública en la interfaz entre los tres pilares, medio ambiente, salud animal y humana (CDC, 2023; WHO, s. f.).

1.6. Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) aceptó en 2015 la Agenda 2030 sobre el Desarrollo Sostenible, que incluye 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), siendo los pilares fundamentales las personas, el planeta, la prosperidad, la paz y las alianzas internacionales (Gamez, s. f.; Moran, s. f.).

Uno de los objetivos relevantes en este trabajo es el ODS 3, centrado en garantizar una vida sana y promover el bienestar de la población. La meta 3.9 tiene como fin disminuir significativamente el número de muertes, así como de enfermedades producidas por productos químicos y por la contaminación del agua, aire y suelo. Así, como tanto el agua como el suelo son dos de las principales fuentes de emisión de ARG y ARB, reducir su contaminación en elementos con resistencias antibióticas podría reducir el número de muertes debidas a la amenaza de la AR (Gamez, s. f.).

La garantía de disponibilidad de agua, así como su gestión y saneamiento para toda la población mundial es la temática de la ODS 6, siendo la meta 6.3 la focalizada en conseguir una mejora en la calidad de las aguas, mediante la reducción de la contaminación por vertidos químicos y peligrosos, como los antibióticos, que están relacionados con la AMR (Gamez, s. f.).

En la línea de asegurar modelos de producción y consumos sostenibles se centra el objetivo número 12, y más concreto su meta 12.2, cuyo objetivo es alcanzar para 2023 un uso y gestión sostenible y eficiente de los recursos naturales. Así, es importante el control de las emisiones de residuos que se vierten de la ganadería, industria y zonas urbanas, debido a que llegan al medioambiente (Gamez, s. f.).

Otro de los objetivos relacionados con la ARM es el 14, cuyo fin es garantizar la conservación de los océanos, mares y recursos marinos y su uso sostenible. La meta 14.1 tiene el objetivo de reducir y prevenir considerablemente la contaminación marina para 2025, mayoritariamente de actividades efectuadas en tierra (Gamez, s. f.).

Así, para lograr las ODS es imprescindible afrontar la resistencia a los agentes antimicrobianos, mediante diferentes acciones como la mejora de las condiciones de saneamiento del agua, el consumo responsable de antibióticos tanto en humanos, animales como en el medioambiente (Organización Mundial de la Salud et al., 2021).

El grado de relación del presente trabajo con los ODS se muestra en el Anexo A.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es analizar la calidad microbiológica de las aguas de riego que se vierten a La Albufera de Valencia, así como evaluar su papel como vehículos de microorganismos resistentes a antibióticos y genes de resistencia a antibióticos. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el estado higiénico-sanitario de las muestras de agua mediante la detección y cuantificación de microorganismos indicadores de contaminación fecal (*E. coli* y coliformes).
2. Aislar bacterias gramnegativas productoras de beta-lactamasas de espectro extendido de las muestras de agua.
3. Aislar Enterobacterias resistentes a antibióticos carbapenémicos de las muestras de agua.
4. Estudiar la sensibilidad de los aislados a antimicrobianos de 5 familias (β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos y anfencoles) y detectar la presencia de multirresistencias.
5. Detectar genes de resistencia a antibióticos (ARGs) β -lactámicos (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CMY-2}), a carbapenémicos (*bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} y *bla*_{KPC}) y a quinolonas (*QnrA*, *QnrB* y *QnrS*) en los aislados.
6. Detectar genes de resistencia a antibióticos (ARGs) β -lactámicos (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CMY-2}), a carbapenémicos (*bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} y *bla*_{KPC}) y a quinolonas (*QnrA*, *QnrB* y *QnrS*) en las muestras de agua sin cultivar.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo, se han analizado distintas muestras de agua.

3.1. Origen de las muestras

Las muestras de agua estudiadas proceden de 6 puntos diferentes de la red de acequias que vierten sus aguas a La Albufera. Para cada punto se han llevado a cabo 2 muestreos, recogiendo el agua en botellas estériles de 2L y transportadas en refrigeración hasta su análisis en el laboratorio. En la Tabla 1 se presentan los puntos de recogida, las coordenadas exactas y las fechas de las tomas de muestra, así como su ubicación en la Figura 1 y del anexo.

Tabla 1. Puntos y fechas de muestreo de aguas

| Punto de muestreo | Coordenadas | Fechas de toma de muestra | |
|--|-----------------------------|---------------------------|------------|
| | | 1 | 2 |
| Punto 1 (P1). Catarroja | 39°23'41.7"N 0°23'57.0"W | 03-04-2023 | 08-05-2023 |
| Punto 2 (P2). Massanassa | 39°24'12.4"N 0°23'00.2"W | 25-04-2023 | 23-05-2023 |
| Punto 3 (P3). Acequia del Puerto (Catarroja) | 39°23'34.6"N 0°22'36.2"W | 25-04-2023 | 23-05-2023 |
| Punto 4 (P4). Acequia de Albal | 39°23'08.6"N 0°23'35.0"W | 08-05-2023 | 30-05-2023 |
| Punto 5 (P5). Alfalfar | 39°24'57.9"N 0°22'12.2"W | 15-05-2023 | 05-06-2023 |
| Punto 6 (P6). Acequia del Mig (Pinedo) | 39°25'27.0"N 0°20'34.2"W | 15-05-2023 | 05-06-2023 |

3.2. Filtración

En el laboratorio las muestras son filtradas a través de membranas de nitrato de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemania). Tras la filtración, las membranas son transferidas a placas Petri con medio de cultivo selectivo de manera aséptica.

La filtración se lleva a cabo mediante una rampa de filtración de 3 puestos de 47mm de diámetro (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) y una bomba de vacío del modelo D-95 (Dinko Instruments, Barcelona, España). Los volúmenes de agua filtrada varían según la procedencia de la muestra y el análisis microbiológico a realizar, de tal modo que sea posible el recuento de colonias.

Además, se realiza otra filtración de las muestras de 100 a 300 mL según la procedencia de la muestra. La membrana es cortada con un bisturí en fragmentos lo suficientemente pequeños para ser introducidos en un tubo Eppendorf de 200 mL con 500 µl de PBS (tampón fosfato salino) y 'glass beads, acid-washed' (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y llevados a agitación durante 10 minutos. Esta filtración se realiza para hacer una extracción de ADN directa de la muestra.

3.3. Estudio de la calidad higiénico-sanitaria

La evaluación de la calidad de agua es un indicador importante de la presencia de contaminación fecal, de posibles fallos en el tratamiento, almacenamiento o distribución del agua, que supone un riesgo de infección para la salud humana u otros animales de sangre caliente. Para ello se lleva a cabo el recuento de *E. coli* y coliformes, según lo descrito en la norma UNE-EN ISO 9308-1:201. Los filtros de membrana fueron depositados sobre placas con medio de cultivo cromogénico para bacterias coliformes e incubadas a 37 ± 1 °C durante 24 ± 1 h.

El medio de cultivo Cromógeno de Coliformes (CC, Chromogenic Coliforms Agar Base, Scharlau, Microinstant®, Barcelona, España) nos permitió detectar las bacterias coliformes y *E. coli*, debido a la presencia de Salmon-GAL (6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) y X-glucurónido (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucurónido), dos sustratos cromogénicos. Las bacterias coliformes procesan Salmo-GAL debido a la presencia del enzima β -D-galactosidasa, produciendo colonias de color rosa-rojo. En cambio, *E. coli* además presenta también el enzima β -D-glucuronidasa que metaboliza X-glucurónico, produciendo colonias azules-violeta (Fig 1).

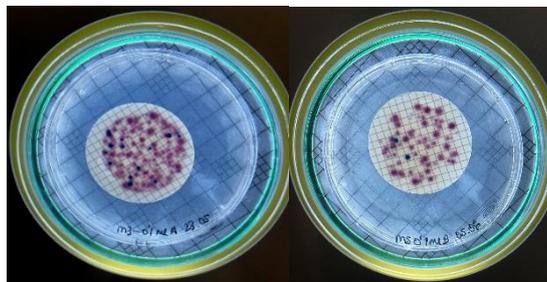


Figura 1. Apariencia de coliformes (rosa) y *E. coli* (azul) en medio CC

Tras la incubación, se procedió a la lectura de las placas siguiendo la guía para el examen microbiológico descrito por la norma UNE-EN ISO 7218:2008. Para el recuento se utilizó el Colony Counter (Digital S, P Selecta) que permite un mejor conteo de las colonias presentes con la incorporación de una lupa.

3.3.1. Aislamiento de microorganismos gramnegativos resistentes a antibióticos β -lactámicos

El aislamiento de microorganismos con resistencia a antibióticos se ha centrado en las bacterias gramnegativas, ya que poseen una membrana externa que actúa como barrera protectora frente a la entrada de sustancias como los antibióticos, siendo más resistentes a éstos que las bacterias gramnegativas (Kapoor et al., 2017). Su detección es importante debido a que son responsables de causar enfermedades graves en humanos, como *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Salmonella* spp. De hecho, la mayor parte de los patógenos incluidos en la lista de patógenos prioritarios resistentes a antibióticos de la OMS en 2017 son bacterias gramnegativas (Breijyeh et al., 2020; WHO, 2017).

3.3.2. Aislamiento de microorganismos productoras de beta-lactamasas de espectro extendido

Los filtros de membrana fueron depositados sobre placas Petri con medio cromogénico ESBL e incubadas a 37 ± 1 °C durante 24 ± 1 h.

El medio de cultivo Cromogénico ESBL (CHROMagar™ Orientation, CHROMagar™, Paris, Francia) nos permitió detectar bacterias gramnegativas productoras de beta-lactamasas de amplio espectro. Las indicaciones del fabricante determinan que el aspecto típico de las colonias crecidas en este medio permite diferenciar, *E. coli* con un color rosa oscuro a rojizo, bacterias KESC (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp) por su color azul metálico (+/- halo rojizo), *Proteus* con un halo de color marrón, *Acinetobacter* como colonias de color crema y *Pseudomonas* con colonias translúcidas (+/- pigmentación natural de crema a verde), según muestra la Figura 2.



Figura 2. Apariencia colonias en medio ESBL

Para cada muestra, se seleccionaron colonias de diferente aspecto, sembrándose por triple estría en medio Plate Count Agar (PCA, Scharlau, Barcelona, España) y resemebrando las veces que fueran necesarias hasta obtener cultivos puros. Todos los cultivos fueron incubados a 37 ± 1 °C durante 24 ± 1 h.

3.3.3. Aislamiento de microorganismos resistentes a carbapenemes

De forma paralela, con el objetivo de aislar bacterias resistentes a carbapenemes, los filtros de membrana se depositaron sobre placas con medio de cultivo mSUPERCARBA. Todas las placas fueron incubadas a 37 ± 1 °C durante 24 ± 1 h.

El medio de cultivo mSuperCarba (SC, CHROMagar™ mSuperCARBA™, Paris, Francia) es altamente selectivo y específico, inhibe el crecimiento de bacterias susceptibles a beta-lactámicos y a la mayoría de las bacterias productoras de ESBL y AmpC, permitiendo detectar y aislar bacterias productoras de carbapenemasas. Las colonias crecidas se diferencian por el color que muestran sobre el medio de cultivo, identificándose *E. coli* por una coloración rosa oscuro a rojo, el grupo KESC por coloración azul metálico, *Pseudomonas* por un color crema translúcido a azul y *Acinetobacter* por color crema opaco, según se observa en la Figura 3.

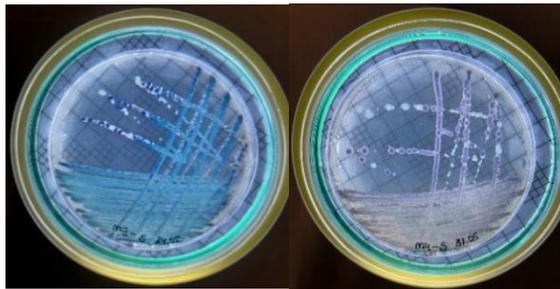


Figura 3. Apariencia colonias en medio mSuperCarba

Se seleccionaron colonias de diferente aspecto de cada muestra, sembrándose por triple estría en medio PCA y resemebrando tanta veces como sea necesario hasta obtener cultivos puros. Todos los placas cultivos fueron incubados a 37 ± 1 °C durante 24 ± 1 h.

3.4. Identificación de los microorganismos aislados mediante pruebas bioquímicas

Tras la obtención de cultivos puros en PCA, se procedió con diferentes pruebas bioquímicas para su identificación.

3.4.1. Pruebas previas

En primer lugar, se realizó la **prueba de la oxidasa** para determinar si los aislados presentan el sistema de citocromo-oxidasa. Para ello se aplicó cada una de las colonias aisladas sobre unas tiras reactivas de oxidasa (Oxidase Strips, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). El fundamento de las tiras es que en presencia del enzima citocromo oxidasa (producido por bacterias gramnegativas) la N,N-dimetil-fenilendiamina, y el alfa-naftol impregnados en las tiras reaccionan al entrar en contacto con los aislados, cambiando a una coloración azul-violeta en el caso de las bacterias grampositivas. Tras esta primera prueba, se seleccionaron solo las cepas que en las que no se producía un cambio de coloración en la tira, siendo oxidasa negativo.

En segundo lugar, se realizó la **prueba de la catalasa**. Se depositaron las colonias aisladas sobre una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y se observó si se producía burbujeo en menos de 1 minuto, indicando un resultado positivo. La aparición de burbujas es debido a la presencia del enzima catalasa, presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, que descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Tras esta prueba, se seleccionaron solamente las cepas resultantes de ser catalasa positivos.

Finalmente, se realizó una tinción Gram, con el fin de identificar bacterias gramnegativas, puesto que han desarrollado el espectro más amplio de resistencia.

Todos los aislados con resultado negativo de oxidasa, positivo de catalasa y gramnegativas, se resuspendieron en 1 mL de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) en un Eppendorf de 1,5 mL para su posterior extracción de ADN y se conservó a -20 °C. De forma paralela, otra fracción de los aislados se resuspendió en crioviales Microbank™-Red (Pro-Lab Diagnostics, Microbank™, Wirral, Reino Unido) para su conservación y almacenamiento a -20 °C.

3.4.2. Identificación mediante Tira API 20E

Así, aquellas cepas aisladas resultantes de ser oxidasa negativa, catalasa positiva y gramnegativa se identificaron mediante las pruebas bioquímicas miniaturizadas API 20E (Tiras API, bioMérieux, Madrid, España). Para la identificación por este sistema se partió de un cultivo puro de 24 horas, y se resuspendió una colonia en 5 mL de agua estéril. Se llenaron los 20 microtubos de la galería, llenándose por completo las pruebas indicadas con CIT, VP y GEL y con vaselina las cúpulas ADH, LDC, ODC, H₂S y URE que requieren un ambiente anaerobio. Las tiras se incubaron a 37 ± 1 °C, 24 h – 48h. Tras la incubación y antes de su lectura, se añadieron los reactivos en las pruebas TDA, IND y VP (reactivo TDA, INDO₂, KOH y NAFTAOL, respectivamente). Seguidamente, se procedió a su lectura, determinando como positivo y negativo las pruebas según las instrucciones del fabricante que se muestra en la Figura 4, y los resultados se introdujeron en la herramienta informática APIWEB (<https://apiweb.biomerieux.com>), obteniéndose así, la identificación de la cepa aislada.



Figura 4. Código de colores correspondiente a las pruebas negativas (-) y positivas (+) del sistema API 20E

3.4.3. Identificación mediante métodos moleculares

La identificación mediante las pruebas miniaturizadas API 20E, es óptimo para la identificación de enterobacterias. En el caso de que los aislados fueran identificados preliminarmente como *Acinetobacter baumannii*, así como para aquellos casos en los que el porcentaje de identificación fuera bajo, los resultados deben ser confirmados. Para ello, se procedió a una identificación mediante amplificación y secuenciación del gen 16S rARN (1500 pb).

Para ello, se extrajo el ADN tal y como se explicará en el apartado 3.7.1 del trabajo y se hicieron dos PCR con un volumen final de 25 μ L para así obtener una cantidad suficiente de amplicón para la secuenciación, conteniendo 2,5 μ L de ADN y el resto mix de reacción. El mix de reacción consistía en buffer PCR 1X, 2 mmol de MgCl₂, 200 μ mol de cada dNTP, 0,4 μ mol de cada cebador usado, 1,25 U de BIOTAQTM DNA Polymerase (Bioline), y agua miliQ estéril hasta alcanzar los 25 μ L de mix. Los cebadores empleados para la amplificación fueron universales 27F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGA CTT-3') para las cepas de *E. coli* (Cherif-Antar et al., 2016) y 27F y 1525R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3') para las cepas de *A. baumannii* (Khosravi et al., 2015).

Las condiciones de la amplificación para las cepas de *E. coli* fueron las siguientes: un ciclo a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos compuestos por 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C, y finalmente, un ciclo de extensión final de 10 min a 72 °C. Para el caso de las cepas de *A. baumannii*, las condiciones de la PCR fueron: un ciclo de 2 min a 95 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C y 2 min a 72 °C, y un ciclo de extensión final de 10 min a 72 °C.

A continuación, se llevó a cabo la purificación de los fragmentos amplificados usando el kit de purificación de productos de PCR (GenElute™ PCR Clean-Up Kit, Sigma-Aldrich, Madrid, España), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, para así eliminar todos los componentes del mix de reacción. El ADN amplificado y purificado se almacenó a -20°C hasta su secuenciación.

Los fragmentos del gen 16S ARNr amplificados se secuenciaron en un secuenciador de ADN ABI 373 (Applied Biosystems) y las secuencias de aproximadamente 800 pb se compararon con las almacenadas en la base de datos GenBank mediante el uso del programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Orhan-Yanikan et al., 2019). Así, se consideraron que pertenecían a la misma especie aquellas secuencias que compartían un porcentaje de identidad igual a superior al 96% con las secuencias de las bases de datos.

3.5. Estudio de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas

Tras la identificación de las cepas, se realizó un estudio sobre su sensibilidad a diferentes agentes antimicrobianos por el método del antibiograma disco-placa del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014) o método Kirby-Bauer, basado en la difusión radial del antibiótico a través del agar a partir del disco con la formación de un gradiente de concentración. Se seleccionaron 13 antibióticos de las familias β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y anfenicoles, tal y como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Antibióticos elegidos para el estudio de la resistencia de las cepas a antimicrobianos. Clasificación en grupos. Concentración del antibiótico en el disco de carga en μg .

| Grupo | Antimicrobiano | Abreviatura | Carga del disco (μg) | Diámetro del halo de inhibición (mm)* | | |
|---------------------|-------------------------|-------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------|-----------|
| | | | | R | I | S |
| β -lactámicos | Ampicilina | AMP | 10 | ≤ 13 | 14-16 | ≥ 17 |
| | Amoxicilina/Clavulánico | AMC | 20/10 | ≤ 13 | 14-17 | ≥ 18 |
| | Cefotaxima | CTX | 30 | ≤ 14 | 15-22 | ≥ 23 |
| | Ceftriaxona | CRO | 30 | ≤ 13 | 14-20 | ≥ 21 |
| | Ceftazidima | CAZ | 30 | ≤ 14 | 15-17 | ≥ 18 |
| | Imipenem | IPM | 10 | ≤ 13 | 14-15 | ≥ 16 |
| | Meropenem | MEM | 10 | ≤ 13 | 14-15 | ≥ 16 |
| Aminoglucósidos | Gentamicina | CN | 10 | ≤ 12 | 13-14 | ≥ 15 |
| Quinolonas | Ácido nalidíxico | NA | 30 | ≤ 13 | 14-18 | ≥ 19 |
| | Levofloxacino | LEV | 5 | ≤ 13 | 14-16 | ≥ 17 |
| | Ciprofloxacino | CIP | 5 | ≤ 15 | 16-20 | ≥ 21 |
| Tetraciclinas | Tetraciclina | TE | 30 | ≤ 14 | 15-18 | ≥ 19 |
| Anfenicoles | Cloranfenicol | C | 30 | ≤ 12 | 13-17 | ≥ 18 |

* Valores según el diámetro del halo de inhibición en mm para clasificar en resistentes (R), intermedios (I) o sensibles (S)

Se tomaron colonias de un cultivo puro de 24h y se inocularon en suero fisiológico al 0,9%, ajustando la turbidez por comparación con el 0,5 de la escala de Mc Farland. Un hisopo se

impregnó con esta disolución y se inoculó en placas de agar Mueller-Hinton (MH, MUELLER-HINTON AGAR, Scharlau, Barcelona, España) pasando el escobillón en todas las direcciones. Tras 3-5 minutos, se depositaron los discos con antibióticos (OXOID Antimicrobial Susceptibility Test Disc) mediante un dispensador de discos Antimicrobial Susceptibility Testing Disc Dispenser).

Se empleó la cepa *E. coli* ATCC 25922, como control de calidad de la metodología, siendo los límites aceptable de los diámetros de las zonas de inhibición los establecidos por el CLSI,2014.

Las placas se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24h. Tras el período de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición en milímetros (Fig. 5), clasificándose la resistencia en resistente (R), intermedia (I) y sensible (S), según las normas establecidas por el CLSI,2014 para las diferentes cepas tal y como se muestra en la Tabla 2.



Figura 5. Placas de las cepas M1-2 E R (izquierda) y M1-3 E R (derecha) sembradas en medio Mueller-Hinton con discos de antibióticos post-incubación

3.6. Estudio de la presencia de genes de resistencia a antibióticos

El estudio y la detección de los genes de resistencia a antibióticos se realizó directamente desde las muestras de aguas, así como a partir de los aislados.

3.6.1. Extracción de ADN

Para extraer el ADN directo de las muestras de agua, se partió de un Eppendorf de 2 mL con fragmentos de la membrana de filtración y PBS procediendo tal y como se menciona en el apartado 3.2. En cambio, para la extracción de ADN de las cepas aisladas, se partió de un cultivo puro de 24h en PCA y se resuspendieron en 1 mL de tampón TE 1X.

La extracción de ADN de las muestras y de los aislados se hizo utilizando el kit de extracción comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante para las bacterias gramnegativas.

3.6.2. PCR multiplex para la detección de genes de resistencia a β -lactámicos, carbapenémicos y quinolonas

La detección de genes de resistencia se hizo sobre el ADN extraído tanto de las muestras como de los aislados mediante reacciones de PCR multiplex (mPCR).

Se realizaron cuatro mPCR para la detección de genes que codifican betalactamasas de espectro extendido, el plásmido de AmpC- β -lactamasa CMY-2, carbapenemasas (Jiménez-Belenguer et al., 2023) y quinolonas: (1) para la detección de *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CMY-2}*; (2) para la detección de *bla_{IMP}* y *bla_{OXA-48}*; (3) para la detección de *bla_{VIM}* y *bla_{KPC}*; y (4) para la detección de *QnrA*, *QnrB* y *QnrS*. Estos genes fueron elegidos por su alta prevalencia en bacterias gramnegativas ambientales y patógenas productoras de ESBL y carbapenemasas en España. Los cebadores, sus secuencias y tamaños de amplicones esperados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Genes de resistencia a β -lactámicos, carbapenemes y quinolonas

| Gen | Tamaño amplicón (pb) | Secuencia | Referencia |
|-----------------------------|----------------------|---|----------------------|
| <i>bla_{TEM}</i> | 247 | F 5' TTAAGTGGCGAACTACTTAC-3' R 5'-GTCTATTTTCGTTTCATCCATA-3' | Kozak et al. (2009) |
| <i>bla_{SHV}</i> | 393 | F 5'-AGGATTGACTGCCTTTTTG-3' R 5'-ATTTGCTGATTTTCGCTCG-3' | |
| <i>bla_{CMY-2}</i> | 1000 | F 5'-GACAGCCTCTTCTCCACA-3' R 5'-TGGACACGAAGGCTACGTA-3' | |
| <i>bla_{IMP}</i> | 232 | F 5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3' R 5'-GGTTTAAAYAAAACAACCACC-3' | Poirel et al. (2011) |
| <i>bla_{OXA-48}</i> | 438 | F 5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' R 5'-CATCAAGTCAACCCAACCG-3' | |
| <i>bla_{VIM}</i> | 390 | F 5'-GATGGTGTGGTTCGCATA-3' R 5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3' | |
| <i>bla_{KPC}</i> | 798 | F 5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3' R 5'-CTTGCATCCTTGTAGGCG-3' | |
| <i>QnrA</i> | 580 | F 5'-AGAGGATTTCTCAGCCAGG-3' R 5'-TGCCAGGCACAGATCTTGAC-3' | Cattoir 2007 |
| <i>QnrB</i> | 264 | F 5'-GGMATHGAAATTCGCCACTG-3' R 5'-TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA-3' | |
| <i>QnrS</i> | 428 | F 5'-GCAAGTTCATTGAACAGGGT-3' R 5'-TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG-3' | |

Para la realización de la mPCR (1) se usó el mix de reactivos que incluía 2 μ L de ADN; 2,5 mM de MgCl₂; tampón de PCR 1X; 0,2 mM de cada dNTP; 0,4 μ M de cada cebador para *bla_{SHV}*, y 0,2 μ M para *bla_{TEM}* y *bla_{CMY-2}*; 5 U de Taq polimerasa, y agua MiliQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 25 μ L. Las condiciones del termociclador fueron: 15 min a 94 °C, 30 ciclos de amplificación de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C, con 10 min para la extensión final a 72 °C, según lo descrito por (Kozak et al., 2009). Además, se utilizaron controles positivos propios empleados en trabajos anteriores y como control negativo agua MiliQ estéril.

Para la mPCR (2) y (3), el mix consistió en 2,5 μ L de ADN extraído; 1,5 mM de MgCl₂; tampón de PCR 1X; 0,125 mM de dNTPs; 0,4 μ M de cada cebador; 2 U de Taq polimerasa, alcanzando un volumen de reacción final de 25 μ L. La amplificación se llevó a cabo siguiendo las condiciones de Poirel et al. (2011) con ligeras modificaciones: 10 min a 94 °C y 36 ciclos de amplificación compuestos por 30 s a 94 °C, 40 s a 55 °C y 50 s a 72 °C, finalizando con la extensión final de 5 min a 72 °C. Se utilizaron controles positivos propios empleados en trabajos anteriores y agua MiliQ estéril como control negativo.

Para la realización de la mPCR (4), el mix usado constó de 2 μ L de ADN; 1,25 mM de MgCl₂; tampón de PCR 1X; 0,2 mM de cada dNTP; 0,25 μ M de cada cebador; 2,5 U de Taq polimerasa, y agua MiliQ estéril hasta obtener un volumen final de la reacción del mix de 25 μ L. Las condiciones de amplificación fueron: 10 min a 95 °C, 35 ciclos de amplificación de 1 min a 95 °C, 1 min a 54

°C y 1 min a 72 °C, con 10 min para la extensión final a 72 °C, según lo descrito por (Cattoir et al., 2009). Se usaron controles positivos propios utilizados en trabajos anteriores y como control negativo, agua MiliQ estéril.

3.6.3. Electroforesis en gel de agarosa

Se utilizó el gel de agarosa E (Condalab) al 1,5% en tampón TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, acetato 20 mM, EDTA 1 mM) para el análisis de los amplicones. El gel se llevó a ebullición, y tras su atemperamiento se añadieron 5 µL de RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Washington, USA) por 100 ml de gel preparado, para el relevado de las bandas a posteriori.

En cada carril del gel se cargaron 5-6 µL del resultado de PCR mezclado con el colorante de carga de ADN TriTrack (6X) (Thermo Scientific), además de un marcador de pesos moleculares (GeneRuler 100 bp, Thermo Scientific). Las condiciones de la electroforesis fueron 90 V durante 75 minutos. Los resultados fueron observados con un transiluminador (TransilluminatorVilber, Lourmat, France) con luz UV.

3.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se ha usado el software Statgraphics Centurion 19 (<https://www.statgraphics.com/>). Para la comparación de los resultados de los recuentos de *E. coli* y coliformes totales entre los puntos, se ha utilizado el Método de la diferencia mínima significativa (LSD). Para estudiar la relación de dependencia entre la presencia de genes y el punto de toma de muestra, así como el medio de cultivo utilizado para el aislamiento de bacterias, se ha llevado a cabo la prueba χ^2 .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Condiciones higiénico-sanitarias

Los recuentos de *E. coli* y coliformes totales, expresados como las medias \pm desviación estándar, para los 6 puntos y los dos muestreos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Recuentos de *E. coli* y coliformes totales en las muestras de agua analizadas

| Punto | Muestreo | Recuentos (UFC/100 mL) (media \pm DS) | |
|-------|----------|---|--------------------------------|
| | | <i>E. coli</i> | Coliformes totales |
| P1 | 1 | $(3,82 \pm 0,65) \times 10^4$ ^a | $(6,22 \pm 1,33) \times 10^4$ |
| | 2 | $(3,99 \pm 1,14) \times 10^4$ ^a | $(35,90 \pm 3,75) \times 10^4$ |
| P2 | 1 | $(1,81 \pm 0,40) \times 10^4$ ^b | $(18,30 \pm 1,2) \times 10^4$ |
| | 2 | $(6,55 \pm 0,85) \times 10^3$ ^b | $(25,50 \pm 3,54) \times 10^4$ |
| P3 | 1 | $(4,28 \pm 2,59) \times 10^3$ ^{bc} | $(6,23 \pm 3,21) \times 10^4$ |
| | 2 | $(1,05 \pm 0,35) \times 10^4$ ^{bc} | $(17,80 \pm 0,49) \times 10^4$ |
| P4 | 1 | $(2,50 \pm 5,00) \times 10^1$ ^c | $(2,28 \pm 0,98) \times 10^4$ |
| | 2 | $(1,23 \pm 0,85) \times 10^3$ ^c | $(3,55 \pm 1,22) \times 10^4$ |
| P5 | 1 | $(4,16 \pm 0,36) \times 10^4$ ^b | $(12,40 \pm 6,67) \times 10^5$ |
| | 2 | $(1,95 \pm 0,79) \times 10^3$ ^b | $(4,86 \pm 1,99) \times 10^4$ |
| P6 | 1 | $(1,05 \pm 0,77) \times 10^3$ ^c | $(24,00 \pm 1,13) \times 10^4$ |
| | 2 | $(1,10 \pm 0,27) \times 10^3$ ^c | $(6,35 \pm 0,49) \times 10^4$ |

Las letras de los superíndices diferentes muestran las diferencias significativas ($p < 0,05$)

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para los niveles de *E. coli* y coliformes total con el fin de comparar la carga microbiana entre los diferentes puntos de muestreo. Dado que se obtuvo un valor de p -valor inferior a 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de *E. coli* entre los diferentes puntos de toma de muestra. Se hizo el Test de Rangos Múltiples para determinar qué valores son diferentes significativamente unos de otros, indicado en la Tabla 4 mediante los superíndices. Así, el punto 1 (P1) presentan valores de media de *E. coli* significativamente diferentes al resto de puntos. El punto 2 (P2) además, presenta medias significativamente diferentes de *E. coli* respecto al punto 4 (P4) y al punto 6 (P6) y el P4 muestra también medias de *E. coli* significativamente diferentes al punto 5 (P5) y al P6. Los valores de *E. coli* variaron entre 25 y $4,2 \times 10^4$ UFC/100 mL, con mayores niveles en P1, seguido de P5, P2, P3, P6 y finalmente, el P4.

En cuanto a los recuentos de coliformes totales, el análisis ANOVA indica alguna no normalidad significativa en los datos, por tanto, se realizó el Test de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de los puntos de muestreo, que indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medianas de coliformes totales de los puntos de muestreo P2 y P4. Los valores de coliformes totales variaron entre $2,28 \times 10^4$ y $12,40 \times 10^6$ UFC/100 mL, siendo el P5 el que presenta mayor nivel de contaminación, seguido de P2, P1, P6, P3, y por último P4.

En Europa no hay indicaciones para la regulación de la calidad de las aguas de riego en cuanto a ARB. Sin embargo, para todos los puntos y en todos los muestreos, excepto para el segundo muestreo del P4, existe contaminación de origen fecal debido a la presencia de niveles de *E. coli* superiores a los límites máximos aconsejados para aguas destinadas al regadío que entren en contacto con productos comestibles (100 UFC/100 mL) (R.D. 1620/2007). En un estudio realizado en acequias de otros puntos de Valencia (Amato et al., 2021), los valores de *E. coli* también excedían los límites recomendados, tal y como en los puntos de muestreo del presente estudio. Por tanto, el agua no debería utilizarse para riego de productos comestibles crudos, siendo

necesario un control de la calidad de las aguas para evadir riesgos microbiológicos y reducir el número de resistencias a antimicrobianos en aguas de riego.

4.2. Identificación bioquímica y molecular de los aislados

De los 135 aislados obtenidos de los diferentes puntos de muestreo, 44 fueron negativos para la prueba oxidasa, positivos para la prueba de catalasa y gramnegativos, siendo 29 aislados en medio ESBL (65,9%) y los 15 restantes aislados en medio SC (34,1%) y, por tanto, supuestamente resistentes a beta- lactámicos y los segundos, además, a carbapenemes. Teniendo en cuenta el punto de muestreo, 16 de las cepas fueron aisladas del P1, 2 de los aislados proceden del P2, 10 cepas del P3, 5 del P4, 2 del P5 y 9 cepas del P6.

El resultado de la identificación bioquímica de todos los aislados tras llevar a cabo la tira API 20E se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Identificación de los aislados mediante tiras API 20E

| Punto | Código de cepas | Identificación API 20E | % ID | Nº de cepas |
|-------|---|---|------|-------------|
| P1 | M1-S1A M1-S1B M1-2 S M1-4 S R M1-S2 | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1</i> | >93% | 5 |
| | M1-1 S M1-3 S M1-S1 | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 2</i> | >81% | 3 |
| | M1-E1 M1-E2 R | <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> | 98% | 2 |
| | M1-3 E | <i>Escherichia coli 1</i> | >99% | 1 |
| | M1-4 S | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | >94% | 1 |
| | M1-2 E | <i>Serratia fonticola</i> | >91% | 1 |
| P2 | M2-E3 | <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> | 99% | 1 |
| | M2-E1 | <i>Klebsiella pneumoniae spp ozaenae</i> | >89% | 1 |
| P3 | M3-3 S M3-2 E | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1</i> | >89% | 2 |
| | M3-E1 M3-E1 R | <i>Enterobacter cloacae</i> | >93% | 2 |
| | M3-1B E | <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> | 99% | 1 |
| | M3-4A E | <i>Kluyvera spp</i> | >86% | 1 |
| | M3-E2 R | <i>Serratia fonticola</i> | >91% | 1 |
| P4 | M4-1A E M4-E2 | <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> | 98% | 2 |
| | M4-1 E | <i>Serratia fonticola</i> | >97% | 1 |
| | M4-E4 | <i>Serratia marcescens</i> | 99% | 1 |
| P5 | M5-E1 | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1</i> | >94% | 1 |
| | M5-1A E | <i>Klebsiella oxytoca</i> | >97% | 1 |
| P6 | M6-S2 M6-S1 M6-S2 R M6-4 E | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1</i> | >94% | 4 |
| | M6-1 S | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 2</i> | >81% | 1 |
| | M6-4 E | <i>Enterobacter cloacae</i> | >95% | 1 |
| | M6-E2 R | <i>Serratia fonticola</i> | >91% | 1 |

E: aislados en medio ESBL, S: aislados en mSuperCARBA

De las 44 cepas, 21 fueron identificadas dentro del grupo KESC (12 *K. pneumoniae ssp pneumoniae* 1, 4 *K. pneumoniae ssp pneumoniae* 2, 1 *K. pneumoniae spp ozaenae*, 1 *K. oxytoca* y 2 *E. cloacae*); 6 como *A. baumannii/calcoaceticus*; 5 *Serratia ssp.* (4 *S. fonticola* y 1 *S. marcescens*); 1 *Stenotrophomonas maltophilia*; 1 *Kluyvera spp*; 1 *E. coli* 1; y, 9 de los aislados fueron identificados como dudosos.

Se llevó a cabo la amplificación y secuenciación del gen 16S rARN de las cepas identificadas como *A. baumannii/calcoaceticus* y de aquellos aislados con porcentajes de identificación bajos, y los resultados se recogieron en el Anexo C.

De los 6 aislados identificados mediante tira API 20E, tras la secuenciación del gen 16S rARN, 3 resultaron ser *A. baumannii*; 1 *A. calcoaceticus*; y, los 2 restantes, *Acinetobacter pittii*. Por tanto, la identificación molecular presenta una mayor precisión que la bioquímica.

Así pues, a partir de los resultados de la identificación molecular, la clasificación de las 44 cepas se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Identificación molecular de todos los aislados

| Punto | Código de cepas | Identificación | Nº de cepas |
|-------|--|-------------------------------------|-------------|
| P1 | M1-S1A; M1-S1B; M1-2 S; M1-4 S R; M1-S2; M1-1 S; M1-3 S; M1-S1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 8 |
| | M1-E1; M1-E2; M1-E2 R; M1-E3 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 4 |
| | M1-3 E | <i>Escherichia coli</i> 1 | 1 |
| | M1-4 S | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 1 |
| | M1-2 E; M1-4 E | <i>Serratia fonticola</i> | 2 |
| P2 | M2-E3 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 1 |
| | M2-E1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 |
| P3 | M3-3 S; M3-S3; M3-2 E | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 3 |
| | M3-E1; M3-E1 R | <i>Enterobacter cloacae</i> | 2 |
| | M3-1B E | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 1 |
| | M3-E2 | <i>Acinetobacter pittii</i> | 1 |
| | M3-1A E | <i>Leclercia adecarboxylata</i> | 1 |
| | M3-4A E | <i>Kluyvera spp</i> | 1 |
| | M3-E2 R | <i>Serratia fonticola</i> | 1 |
| P4 | M4-1A E; M4-E2 | <i>Acinetobacter pittii</i> | 2 |
| | M4-1 E; M4-E1 | <i>Serratia fonticola</i> | 2 |
| | M4-E4 | <i>Serratia marcescens</i> | 1 |
| P5 | M5-E1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 |
| | M5-1A E | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 |
| P6 | M6-S2; M6-S1; M6-S2 R; M6-4 E; M6-1 S | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 5 |
| | M6-4 E | <i>Enterobacter cloacae</i> | 1 |
| | M6-E2 R | <i>Serratia fonticola</i> | 1 |
| | M6-1 E | <i>Raoultella ornithinolytica</i> | 1 |
| | M6-E2 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 1 |

E: aislados en medio ESBL, S: aislados en mSuperCARBA

La cepa más frecuentemente aislada fue *K. pneumoniae* (40,9%), aislada en el 77,8% de los casos en SC y el 22,2% restante en ESBL; seguida de *S. fonticola* y *A. baumannii*, con un 13,6% de los aislados; el 6,8% fueron *E. cloacae* y *A. pittii*; y finalmente, con el 2,3% *S. maltophilia*, *Kluyvera* spp., *E. coli* 1, *S. marcescens*, *K. oxytoca*, *A. calcoaceticus*, *L. adecarboxylata* y *R. ornithinolytica*.

Así, en el medio SC han sido aisladas sólo 2 especies, *K. pneumoniae* y *S. maltophilia*, de las cuales se tienen antecedentes de poseer resistencia a carbapenemes (Magiorakos et al., 2012; Martínez-Martínez, 2019; WHO, 2021).

Además, en el P1 se encontraba el 44,4% de las cepas de *K. pneumoniae*; seguido por el P6 con un 27,8%; P3 con 16,7%; P2 y P5 con el 5,6%; mientras que en P4 no se aisló ninguna. *S. maltophilia* y *E. coli* 1 en cambio, sólo fueron aisladas en el P1. *Kluyvera* spp., *A. calcoaceticus* y *L. adecarboxylata* se aislaron solamente en P3; *S. marcescens* en P4; *K. oxytoca* en P5; y, *R. ornithinolytica* en P6. *E. cloacae* se aisló en el 66,7% de los casos de P3 y del 33,3% de P6. En el caso de la especie *S. fonticola*, fue aislada en un 33,3 % en P1 y P4 y 16,7% en P3 y P6; mientras que *A. baumannii* un 66,7% de P1 y un 16,7% de P2 y P6. Por último, *A. pittii* fue aislado en un 66,7% de P4 y un 33,3% de P3. Asimismo, en el P3 se han aislado el mayor número de especies distintas (7), seguido del P1 y P6 (5), el P4 (3), y finalmente, P2 y P5 (2).

En un estudio en aguas superficiales asiáticas (Sta Ana et al., 2021), el 23,7% de las cepas aisladas se identificaron como *E. coli*; el 18,4% como *C. freundii*; 17,1% *K. pneumoniae*; y 15,8% *E. cloacae*. En el estudio presente, sin embargo, no se identificó ningún *C. freundii*, el porcentaje de para *E. coli* fue inferior (2,3%), para *K. pneumoniae* fue superior (40,9%) y para *E. cloacae* también fue ligeramente inferior (6,8%).

4.3. Perfil de resistencia antibiótica de los aislados

Tras realizar los antibiogramas sobre las 44 cepas, se obtuvieron diferentes patrones de resistencia tal y como se observan en la Tabla 7.

Los antibióticos ensayados se dividen en 7 grupos según la clasificación de antibióticos de la OMS (WHO, 2019): penicilinas, cefalosporinas de tercera generación (C3G), penems, quinolonas, aminoglucósidos (AG), tetraciclinas y fenicoles.

Veintinueve de las cepas aisladas mostraron alguna resistencia adquirida a alguno de los 13 antibióticos testados y 15 de los aislados fueron sensibles a todos. Se hallaron 18 perfiles de resistencia diferentes para las 44 cepas aisladas. De los 18 perfiles de resistencia, al menos un antibiótico de la familia de β -lactámicos estaba presente en 15 de ellos. De esos 15, 9 presentaban algún antibiótico del grupo de penicilinas, 10 alguna C3G y 1 algún antibiótico del grupo de los carbapenemes. Así, el patrón de resistencias con mayor número de aislados fue AMC-CTX-CRO-CAZ-NA-LEV-CIP-CN-TE (penicilinas, C3G, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas), con resistencia a 9 de los 13 antibióticos testados, siendo las 5 cepas aisladas en mSuperCARBA. El segundo patrón más frecuente con 3 aislados fue AMC (penicilinas) y AMC-C (penicilinas y fenicoles), siendo las 3 cepas de AMC aisladas del medio ESBL y para AMC-C, 2 de las cepas aisladas de ESBL y 1 en mSuperCARBA.

Tabla 7. Patrones de resistencia a antibióticos de las cepas

| Patrones de resistencia | Nº de cepas | Código de cepas |
|--------------------------------------|-------------|--|
| AMC | 3 | M5-1A E; M5-E1; M6-4 E |
| C | 1 | M1-E2 |
| CTX | 1 | M3-1B E |
| NA | 2 | M1-4 E; M4-1 E |
| AMC-C | 3 | M2-E1; M1-3 S; M1-E3 |
| AMC-TE-C | 2 | M1-1 S; M1-S1 |
| CN-TE-C | 1 | M4-E4 |
| CTX-CRO-CAZ | 1 | M1-2 E |
| AMP-AMC-CTX-CRO | 1 | M1-3 E |
| AMC-CTX-CRO-CAZ | 1 | M3-S3 |
| AMC-NA-LEV-CIP | 1 | M3-3 S |
| CAZ-NA-LEV-CIP | 1 | M1-4 S |
| CTX-CRO-NA-TE-C | 1 | M3- 4A E |
| CTX-CRO-NA-LEV-CIP-CN | 1 | M3-E1 |
| AMC-CTX-CRO-CAZ-NA-LEV-CIP-TE-C | 1 | M6-S2 |
| AMC-CTX-CRO-CAZ-NA-LEV-CIP-CN-TE | 5 | M1-S1B; M1-2 S; M1-4 S R; M1-S2; M6-S2 R |
| AMC-CTX-CRO-CAZ-NA-LEV-CIP-CN-TE-C | 2 | M6-1 S; M6-S1 |
| AMC-CTX-CRO-CAZ-MEM-NA-LEV-CIP-CN-TE | 1 | M1-S1A |

AMP: Ampicilina, AMC: Amoxicilina/Clavulánico, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, CAZ: Ceftazidima, MEM: Meropenem, CN: Gentamicina, NA: Ácido nalidíxico, LEV: Levofloxacino, CIP: Ciprofloxacino, TE: Tetraciclina, C: Cloranfenicol, E: aislados en medio ESBL, S: aislados en mSuperCARBA.

Aquellas cepas que presentaron resistencia a 3 o más clases de antibióticos se consideraron multirresistentes (MDR) (Gekenidis et al., 2018, 2020; Magiorakos et al., 2012). Por tanto, 8 de los 18 perfiles de resistencia presentaban estas características, de modo que, 14 de las 44 cepas ensayadas (31,8%) eran MDR. Así, un 35,7% de las cepas multirresistentes lo fueron para penicilinas, C3G, quinolonas, AG y tetraciclinas; un 14,3% a penicilinas, tetraciclinas y fenicoles; un 14,3% a penicilinas, C3G, quinolonas, AG, tetraciclinas y fenicoles; el 7,1% mostraron resistencia a AG, tetraciclinas y fenicoles; el mismo porcentaje (7,1%) a C3G, quinolonas, tetraciclinas y fenicoles; 7,1% a C3G, quinolonas y AG; 7,1% a penicilinas, C3G, quinolonas, tetraciclinas y fenicoles; 7,1% a penicilinas, C3G, carbapenemes, quinolonas, AG y tetraciclinas. Así, un 92,8% de las cepas multirresistentes lo son a la familia de tetraciclinas testadas; un 78,6% a las penicilinas, C3G y quinolonas; un 71,4% a AG; un 50,0% a fenicoles; y, por último, un 7,1% son resistentes a los carbapenemes. Se observó, que el 78,6% de las MDR fueron aisladas en mSuperCARBA, mientras que un 21,4% en ESBL.

Además, el 50,0% de las cepas multirresistentes fueron aislados del P1; el 28,6% del P6; el 14,3% del P3; el 7,1% del P4; y del P2 y P5 no fueron aisladas ninguna cepa multirresistente. Así, resultaron multirresistentes el 43,7% de los aislados del P1; el 44,4% de las cepas del P6 y, finalmente, el 20% de los aislados del P3 y del P4.

En la Figura 6 se muestra conjuntamente la susceptibilidad de las 44 cepas a los 13 antibióticos testados, e incluyendo el tipo de respuesta, según si es sensible, intermedio o resistente al efecto del antibiótico.

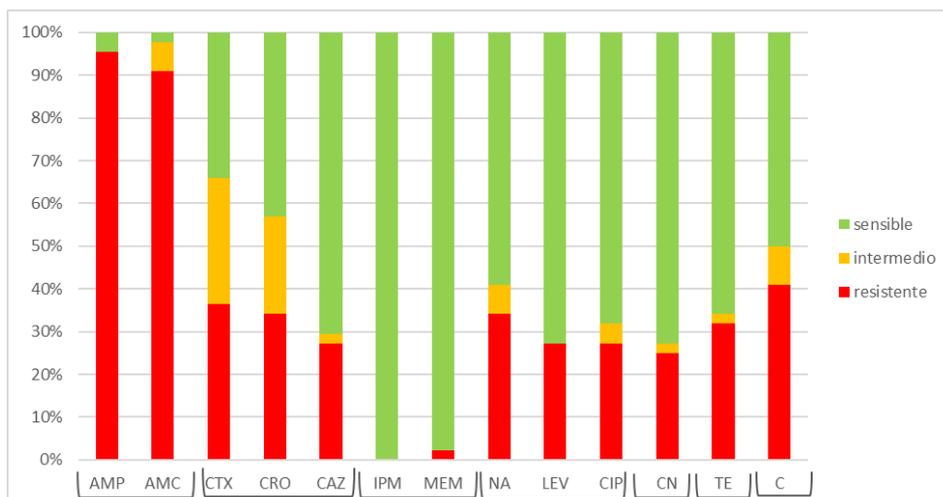


Figura 6. Sensibilidad a antibióticos de las cepas aisladas

Se observa una gran variabilidad en la resistencia a las diferentes familias de antibióticos de los aislados, siendo predominante la resistencia a los β -lactámicos, sobre todo para las penicilinas AMP (95,5%) y AMC (90,9%), seguido de las cefalosporinas de tercera generación, CTX (36,4%), CRO (34,1%) y CAZ (27,3%) y con menor frecuencia los carbapenems con un 2,3% de resistencia al MEM, y ninguna cepa resistente a IMP. Seguido de los anfenicoles con un 40,9% de los aislados resistentes al C; las quinolonas con un 34,1%, LEV (27,3%) y CIP (27,3%); tetraciclinas con un 31,88% de las cepas resistentes a TE; y un 25% de los aislados resistentes a CN de la familia de los aminoglucósidos.

En un estudio realizado en unas aguas de riego en Valencia (Amato et al., 2021), el 72% de los aislados fue resistente a ampicilina, inferior a lo detectado en los aislados ensayados en este estudio; la resistencia a tetraciclina y ciprofloxacina fue superior a lo determinado y para las cefalosporinas de nueva generación los valores obtenidos fueron similares; para meropenem, todos los aislados resultaron sensibles, por tanto, concuerda con los resultados presentados, donde sólo un aislado presentaba resistencia. Detectaron 15 patrones de multirresistencia, siendo el 70,4% de los aislados de *E. coli* multirresistentes, ligeramente superior a lo detectados en nuestras aguas. Los resultados obtenidos también son semejantes a un estudio realizado en aguas superficiales de Asia y Brasil (Freitas et al., 2019; Sta Ana et al., 2021) donde los aislados de la familia Enterobacteriaceae y del género *Acinetobacter*, fueron resistentes en un alto porcentaje a penicilinas; un menor porcentaje a CTX; muy pocas a carbapenems; y niveles intermedios de resistencia se observaron para los AG, TE y CIP. Además, en un análisis de las resistencias antibióticas en aguas de riego de Suiza (Gekenidis et al., 2018), ninguna de las cepas aisladas presentaba resistencia a los antibióticos carbapenémicos meropenem e imipenem, demostrando la baja prevalencia de éstos en aguas de riego.

Por lo que respecta a las diferencias de sensibilidad a los agentes antimicrobianos entre los diferentes puntos de muestreo, el P1 presentan al mayor número de resistencias, siendo todos los aislados resistentes a las penicilinas; la mitad de las cepas resistentes a C3G; un 6,3% resistente a carbapenems; un 43,7% resistente a quinolonas; un 37,5% resistente a AG; la mitad de los aislados resistentes a tetraciclinas y un 43,7% resistente a fenicoles. Seguidamente, se encuentra el P6, con el 88,9% de los aislados resistentes a penicilinas; el 44,4% a C3G, quinolonas y tetraciclinas; y el 33,3% resistentes a AG y fenicoles. En tercer lugar, encontramos el P3, con el 90,0% de las cepas aisladas resistentes a penicilinas; el 40,0% a C3G; el 30,0% a quinolonas y

fenicoles; y, el 10,0% a AG y tetraciclinas. A continuación, el P4, con todas los aislados resistentes a penicilinas; el 60,0% a fenicoles; y, el 20,0% a quinolonas, AG y tetraciclinas. Todas le cepas aisladas del P2 fueron resistentes a penicilinas y fenicoles, y, por último, todos los aislados del P5, sólo fueron resistentes a penicilinas.

Las cepas consideradas multirresistentes pertenecían un 78,6% a la especie *K. pneumoniae*; y un 7,1% a los géneros *Enterobacter*, *Kluyvera* y *Serratia*. Demostrando, la gran preocupación existente por *K. pneumoniae*, debido a su gran desaminación en el agua y amplio espectro de resistencia (Amato et al., 2021; Ventola, 2015)

4.4. Detección de genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos y quinolonas

Presencia de genes en las muestras de agua sin cultivar

Se hizo mPCR para detectar los genes de resistencia a β -lactámicos, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} y *bla*_{KPC}, y a quinolonas, *QnrA*, *QnrB* y *QnrS* en el ADN extraído directamente de las muestras de agua sin cultivar. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Genes de resistencia a β -lactámicos y quinolonas en muestras de agua sin cultivar

| Punto | Muestreo | Genes de resistencia a β -lactámicos y quinolonas | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------|---|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | <i>bla</i> _{TEM} | <i>bla</i> _{SHV} | <i>bla</i> _{CMY-2} | <i>bla</i> _{IPM} | <i>bla</i> _{OXA-48} | <i>bla</i> _{VIM} | <i>bla</i> _{KPC} | <i>QnrA</i> | <i>QnrB</i> | <i>QnrS</i> |
| P1 | 1 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | - |
| | 2 | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - |
| P2 | 1 | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| | 2 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| P3 | 1 | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | 2 | - | - | - | - | + | - | + | - | - | + |
| P4 | 1 | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + |
| | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| P5 | 1 | + | - | - | - | + | - | + | - | - | + |
| | 2 | + | - | - | - | + | - | + | - | - | + |
| P6 | 1 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| | 2 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + |
| Porcentajes de detección (%) | | 50 | 0 | 16,7 | 25 | 75 | 0 | 50 | 0 | 0 | 41,7 |
| χ^2 | | 8,000 | nsc | 4,800 | 4,000 | 9,333 | nsc | 8,000 | nsc | nsc | 5,829 |
| <i>p</i> | | 0,1562 | | 0,4408 | 0,5494 | 0,0965 | | 0,1562 | | | 0,3233 |

nsc: no se puede calcular

La prueba de la χ^2 , mediante la cual se determina la relación de dependencia entre la presencia del gen y el punto de muestreo reveló que no existe una relación de dependencia entre ambos factores para ninguno de los genes y puntos estudiados ($p > 0.05$). Así, la presencia de los genes de resistencia testados no depende del punto de procedencia de la muestra.

El gen encontrado en más puntos de muestreo fue *bla*_{OXA}, perteneciente a la clase de carbapenemes, presente en todos los puntos menos en P4. Seguidamente, el gen *bla*_{TEM} (β -lactámicos) se ha detectado en todos los puntos excepto P4 y P6; *bla*_{KPC} (carbapenemes) en P1, P2, P3, P5; *QnrS* (quinolonas) en P3, P4, P5 y P6; *bla*_{IMP} (carbapenemes) en P1, P2 y P3; *bla*_{CMY-2} (β -lactámicos) ha sido hallado en P3 y P4. En cambio, *bla*_{SHV} (β -lactámicos), *bla*_{VIM} (carbapenemes), *QnrA* y *QnrB*, del grupo quinolonas, no han sido detectados en ninguna de las muestras de aguas sin cultivar.

El punto con mayor presencia de los genes ensayados fue P3, con *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA}, *bla*_{KPC} y *QnrS*; seguido de P1, P2 y P5 con la presencia de 4 de los 10 genes estudiados; y finalmente, P4 y P6 con presencia de 2 genes.

En el estudio realizado por Amato et al. (2021), el gen *bla*_{TEM} se detectó en la mayoría de las muestras de aguas sin cultivar, y *QnrS* en el 72%, resultados similares a los obtenidos para los puntos de muestreo del estudio. Los genes *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA} y *QnrS* fueron detectados por Amarasiri et al. (2022) en aguas superficiales del Nepal. En otro estudio, llevado a cabo en aguas superficiales de Brasil, (Sanchez et al., 2018) *bla*_{TEM} fue detectado en el 86,4% de las muestras, valor similar al obtenido en el presente estudio; *bla*_{KPC}, se encontró un porcentaje inferior (30,8%) al detectado en nuestras aguas (66,7%) y además detectan el gen *bla*_{SHV}, al contrario que en el presente estudio donde no se detectó en ninguna de las muestras. De igual modo al que en nuestro análisis, *bla*_{VIM} no se detectó en ninguna de las muestras; y, *QnrS*, *QnrB*, se detectó en el 53,8% y *QnrA* en el 15,4% de las muestras, mientras que en nuestro estudio, sólo se detectó el gen de quinolonas *QnrS* en el 66,7% de las muestras estudiadas (Sanchez et al., 2018).

Presencia de genes en los aislados

Así mismo se realizó la mPCR para detectar los genes de resistencia a β -lactámicos, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} y *bla*_{KPC}, y a quinolonas, *QnrA*, *QnrB* y *QnrS* en el ADN extraído de las 44 cepas aisladas de los diferentes puntos de muestreo (Tabla 9).

Se usó el estadístico χ^2 para determinar la dependencia entre la presencia del gen y el medio de cultivo utilizado para su aislamiento, así como la relación entre la presencia del gen y el punto de muestreo. Los valores de $p < 0,05$ indican la relación de dependencia entre la presencia de los genes *bla*_{TEM} ($p = 0,0010$), *bla*_{SHV} ($p = 0,000$) y *bla*_{OXA} ($p = 0,0005$) respecto al medio de cultivo. En el 66,7% de los casos, la presencia de *bla*_{TEM} se dio en aislados de SC; con respecto al gen *bla*_{SHV}, 91,7% fue detectado en aislados de SC; y también en SC se aislaron el 75,0% de las cepas con presencia positiva de *bla*_{OXA}. Además, destaca que el gen *bla*_{KPC} es detectado mayoritariamente (60%) en cepas aisladas del medio ESBL. Por último, *QnrB* y *QnrS* se detectaron únicamente en aislados en ESBL.

Para el factor punto de muestreo, todos los genes ensayados resultaron independientes ($p > 0,05$), es decir, la presencia o no del gen de resistencia no dependía del punto del cual había sido aislada la cepa. En el 37,5% de las cepas aisladas del P1 se detectó la presencia de *bla*_{TEM}; en el 50,0% *bla*_{SHV}; *bla*_{OXA} fue detectado en el 25,0% y el *QnrB* en el 6,3% de las cepas de dicho punto. En P2, se detectó en la mitad de las cepas el gen *bla*_{TEM}. Un 40,0% de los aislados de P3 presentaban *bla*_{TEM}; un 30,0% *bla*_{SHV}; los genes *bla*_{OXA} y *QnrS* estuvieron presentes en un 20,0%; y los genes *bla*_{CMY-2}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC} y *QnrB* en un 10,0%. En P4 se detectaron *bla*_{TEM} y *bla*_{KPC} en el 20,0% de los aislados. En los aislados de P5 no se detectó ningún de los genes de resistencia ensayados. En los aislados de P6, el 66,7% tenían *bla*_{OXA}; el 33,3% *bla*_{TEM} y *bla*_{KPC}; el 22,2% *QnrS*; y, el 11,1% *bla*_{SHV}.

De las 44 cepas analizadas, 27 presentaron alguno de los 10 genes de resistencia estudiados (61,4%). El gen encontrado en el mayor número de cepas fue *bla*_{TEM}, presente en el 34,1% de los aislados; seguido de *bla*_{SHV} y *bla*_{OXA}, en el 27,3%; *bla*_{KPC} en el 11,4%; *QnrS* en el 9,1%; *QnrB* en el 4,5%; y, *bla*_{CMY-2} y *bla*_{VIM} en el 2,3%. En cambio, *bla*_{IMP} y *QnrA*, no se detectaron en ninguna de las cepas ensayadas.

Tabla 9. Genes de resistencia a β -lactámicos y quinolonas en las cepas aisladas

| Punto | Cepa | Genes de resistencia a β -lactámicos y quinolonas | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------|---|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | <i>bla</i> _{TEM} | <i>bla</i> _{SHV} | <i>bla</i> _{CMY-2} | <i>bla</i> _{IPM} | <i>bla</i> _{OXA-48} | <i>bla</i> _{VIM} | <i>bla</i> _{KPC} | <i>QnrA</i> | <i>QnrB</i> | <i>QnrS</i> |
| P1 | M1-S1A | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M1-S1B | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M1-4 S | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M1-E2 | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| | M1-1 S | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M1-2 S | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| | M1-3 S | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M1-4 S R | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| | M1-S1 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M1-S2 | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| | M1-2 E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M1-3 E | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| | M1-4 E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M1-E1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| M1-E2 R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| M1-E3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| P2 | M2-E1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M2-E3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| P3 | M3-E1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M3-E2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M3- 4A E | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| | M3-1B E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M3-3 S | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| | M3-S3 R | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - |
| | M3-1A E | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| | M3-2 E | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| M3-E1 R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| M3-E2 R | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | |
| P4 | M4-1 E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M4-E1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M4-1A E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M4-E2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| P5 | M4-E4 | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| | M5-1A E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| M5-E1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| P6 | M6-S2 | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| | M6-1 E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | M6-4 E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | M6-E2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M6-1 S | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| | M6-S1 | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - |
| | M6-S2 R | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - |
| M6-4 E | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | |
| M6-E2 R | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | |
| Porcentajes de detección (%) | | 34,1 | 27,3 | 2,3 | 0 | 27,3 | 2,3 | 11,4 | 0 | 4,5 | 9,1 |
| Medio cultivo | χ^2 | 10,749 | 24,343 | 0,529 | nsc | 12,290 | 1,978 | 0,088 | nsc | 1,084 | 2,276 |
| | <i>p</i> | 0,001 | 0,000 | 0,4669 | | 0,0005 | 0,1596 | 0,7672 | | 0,2979 | 0,1314 |
| Punto | χ^2 | 1,942 | 8,764 | 3,479 | nsc | 10,725 | 3,479 | 7,266 | nsc | 1,650 | 5,818 |
| | <i>p</i> | 0,8571 | 0,1188 | 0,6266 | | 0,0571 | 0,6266 | 0,2016 | | 0,8951 | 0,3244 |

E: aislados en medio ESBL, S: aislados en mSuperCARBA; nsc: no se puede calcular

Veinticuatro de las 44 cepas ensayadas (54,5%) presentaban alguno de los 7 genes β -lactámicos ensayados; 14 mostraron poseer alguno de los 4 genes de resistencia a carbapenemes, lo que

representa un 31,8% de los aislados; y, el 13,6% de las cepas alguno de los genes de resistencia a quinolonas.

La especie en la cual se detectaron más genes de resistencia fue *K. pneumoniae*, con 6 genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC} y *QnrS*), además, fue en la especie en la que más se detectaron los genes *bla*_{TEM} (10 aislados), *bla*_{SHV} (10 aislados), *bla*_{OXA} (10 cepas) y *bla*_{KPC} (3 cepas). *S. fonticola* fue la segunda especie con más genes detectados, 3 (*bla*_{CMY-2}, *bla*_{OXA} y *QnrS*). Para *S. maltophilia* se detectó *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}; *bla*_{TEM} y *QnrS* en *E. cloacae*; *bla*_{TEM} y *QnrB* en *Kluyvera* spp; *bla*_{TEM} y *bla*_{KPC} en *S. marcescens*; *bla*_{TEM} y *bla*_{OXA} en *A. baumannii*; y, *bla*_{SHV} y *bla*_{KPC} en *L. adecarboxylata*. Para *E. coli 1* sólo se encontró *QnrB*; y, para *R. ornithinolytica* *QnrS*. En cambio, no se encontró ningún gen de resistencia en las especies *A. calcoaceticus*, *A. pittii* y *K. oxytoca*.

Así, en Amato et al. (2021) se detectó *bla*_{TEM} en el 96% de los aislados de *E. coli* y el 21,6% presentaba el gen *QnrS*. Sin embargo, en Sta Ana et al. (2021), detectaron *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} en un 16,3% y 8,5%, respectivamente de los aislados productores de EBSL y los genes que codifican para dos de las tres beta-lactamasas más importantes de espectro extendido *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} se encontraron en el 85,29% y 41,18% de los aislados de *E. coli*, respectivamente, mientras que *bla*_{KPC} no fue detectado. Además, Freitas et al. (2019), detectó los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} en los aislados pertenecientes a los géneros de *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*, mientras que los genes de carbapenemes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{KPC} no fueron detectados. En el estudio realizado por Vital et al. (2018), el gen *bla*_{TEM} fue detectado en los aislados productores de ESBL, mientras que no se detectaron *bla*_{SHV} ni *bla*_{OXA}. En un estudio de resistencias en aguas de riego en Enterobacteriaceae (Gekenidis et al., 2020), se detectaron genes que codifican para beta-lactamasas del tipo AmpC, *bla*_{CMY}. Así, hay una gran diversidad y diferencia en la presencia de genes de resistencia a β-lactámicos y quinolonas, según la procedencia de las aguas y el gen estudiado.

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo ha permitido estudiar la presencia de resistencias antibióticas en diferentes puntos de aguas de la región de La Albufera, destinadas principalmente al riego de productos comestibles.

La detección de elevados valores de coliformes totales, así como de *E. coli* superiores a los límites aconsejados para aguas de riego, en todos los puntos de muestreo, pone de manifiesto la presencia de contaminación fecal de las aguas, y, por tanto, el riesgo microbiológico que supone para el riego de productos comestibles. Siendo importante la aplicación de medidas de vigilancia tal y como recomienda 'One Health', para reducir las amenazas a la salud pública debido a la interfaz humanos, animales y medioambiente.

El análisis de susceptibilidad de las diferentes bacterias aisladas revela la presencia de bacterias multirresistentes, suponiendo una gran amenaza para el buen tratamiento de enfermedades, debido a la falta de antibióticos que puedan ser sensibles a estas bacterias MDR.

Además, la elevada presencia de la cepa *K. pneumoniae*, y, en menor medida, de *Acinetobacter spp.*, es preocupante, debido a que se trata de bacterias oportunistas de preocupación mundial, al estar estrechamente implicadas en infecciones nosocomiales, principalmente de pacientes en la UCI e inmunocomprometidos. Es tal su preocupación, que figuran en la lista de patógenos prioritarios de la OMS, al ser resistentes a los carbapenémicos, antibióticos de última acción, y, productor de ESBL, en el caso de *K. pneumoniae*.

Así, la presencia de ARB en las aguas de riego contribuye a que aumente el resistoma a los antibióticos debido a la transferencia de los ARG entre las diferentes bacterias, tanto a nivel clínico como ambiental. Destaca la presencia de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}, que codifican para dos de las tres β -lactamasas más importantes de espectro extendido, y, *bla*_{OXA-48}, que codifica para una carbapenemasa, con una elevada diseminación actualmente en Europa. También es importante, la detección de *bla*_{KPC}, que codifica para una carbapenemasa, aislada por primera vez en *K. pneumoniae*, y que es endémica en los países mediterráneos.

Por tanto, debido a la gran amenaza que supone la resistencia a antibióticos, especialmente en las aguas como reservorio principal y como uno de los centros de transmisión al medioambiente, es necesaria, una actuación inmediata y una puesta en marcha de medidas de control epidemiológico de las resistencias antibióticas en las aguas de riego.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALCALDE, S. L., & GAWLIK, B. (2018). Minimum quality requirements for water reuse in agricultural irrigation and aquifer recharge—Towards a water reuse regulatory instrument at EU level Réédition. JRC Publications Repository. <https://doi.org/10.2760/804116>
- AMATO, M., DASÍ, D., GONZÁLEZ, A., FERRÚS, M. A., & CASTILLO, M. Á. (2021). Occurrence of antibiotic resistant bacteria and resistance genes in agricultural irrigation waters from Valencia city (Spain). *Agricultural Water Management*, 256, 107097. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.107097>
- ANJUM, M. F., SCHMITT, H., BÖRJESSON, S., BERENDONK, T. U., DONNER, E., STEHLING, E. G., BOERLIN, P., TOPP, E., JARDINE, C., LI, X., LI, B., DOLEJSKA, M., MADEC, J.-Y., DAGOT, C., GUENTHER, S., WALSH, F., VILLA, L., VELDMAN, K., SUNDE, M., ... PEDERSEN, K. (2021). The potential of using *E. coli* as an indicator for the surveillance of antimicrobial resistance (AMR) in the environment. *Current Opinion in Microbiology*, 64, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.011>
- BERGERON, S., BOOPATHY, R., NATHANIEL, R., CORBIN, A., & LAFLEUR, G. (2015). Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 102, 370-374. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.017>
- BREIJYEH, Z., JUBEH, B., & KARAMAN, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25(6), 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- BUSH, K., & BRADFORD, P. A. (2019). Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nature Reviews. Microbiology*, 17(5), 295-306. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0159-8>
- BUSH, K., & BRADFORD, P. A. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), 10.1128/cmr.00047-19. <https://doi.org/10.1128/cmr.00047-19>
- CDC. (2019). The biggest antibiotic-resistant threats in the U.S. Centers for Disease Control and Prevention, visto el 11 de Junio de 2023, <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>
- CDC. (2021). Where Antibiotic Resistance Spreads. Centers for Disease Control and Prevention, visto el 4 de Junio de 2023, <https://www.cdc.gov/drugresistance/where-resistance-spreads.html>
- CDC. (2022). About Antimicrobial Resistance. Centers for Disease Control and Prevention, visto el 4 de Junio de 2023, <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- CDC. (2023). One Health Basics | One Health | CDC, visto el 4 de Junio de 2023, <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>

- CEDEX. (2017). Estudio de la afección del cultivo del arroz en la calidad de agua de La Albufera de Valencia. Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas, visto el 2 de julio de 2023, https://www.chj.es/es-es/medioambiente/albufera/Documents/Estudio_de_la_afeccion_del_cultivo_del_arroz_en_la_calidad_de_agua_de_la_Albufera_de_Valencia.pdf
- CHERIF-ANTAR, A., MOUSSA-BOUDJEMÂA, B., DIDOUH, N., MEDJAHDI, K., MAYO, B., & FLÓREZ, A. B. (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Science & Technology*, 96(1), 27-38. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0235-4>
- CLSI. (2014). M100Ed33 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition. Clinical & Laboratory Standards Institute, visto el 4 de Julio de 2023 <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
- CSIC. (2023, marzo 3). Los contaminantes orgánicos amenazan los ecosistemas acuáticos de las áreas de alto valor ecológico en España. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, visto el 31 de Mayo de 2023, <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/los-contaminantes-organicos-amenazan-los-ecosistemas-acuaticos-de-las-areas-de>
- DOWLING, A., O'DWYER, J., & ADLEY, C. (2017). Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance, en *Antimicrobial Research: Novel bioknowledge and educational programs*. Ed. A. Méndez-Vilas. Badajoz, 536-545.
- DULSAT-MASVIDAL, M., CIUDAD, C., INFANTE, O., MATEO, R., & LACORTE, S. (2023). Water pollution threats in important bird and biodiversity areas from Spain. *Journal of Hazardous Materials*, 448, 130938. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130938>
- EC. (2023). Acción de la UE en materia de resistencia a los antimicrobianos, visto el 4 de Junio de 2023, https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance/eu-action-antimicrobial-resistance_es
- ESA. (2023). How much water do we use for irrigation?, visto el 3 de Junio de 2023, https://www.esa.int/Applications/Observing_the_Earth/FutureEO/How_much_water_do_we_use_for_irrigation
- EUCAST. (2017). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. *eucastr: Resistance mechanisms*, visto el 4 de Junio de 2023, https://www.eucast.org/resistance_mechanisms
- FREITAS, D. Y., ARAÚJO, S., FOLADOR, A. R. C., RAMOS, R. T. J., AZEVEDO, J. S. N., TACÃO, M., SILVA, A., HENRIQUES, I., & BARAÚNA, R. A. (2019). Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria Recovered From an Amazonian Lake Near the City of Belém, Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 10, 364. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00364>
- GAMEZ, M. J. (s. f.). Objetivos y metas de desarrollo sostenible. *Desarrollo Sostenible*, visto el 5 de Junio de 2023, <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- GEKENIDIS, M.-T., KLÄUI, A., SMALLA, K., & DRISSNER, D. (2020). Transferable Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Plasmids in Enterobacteriaceae from Irrigation Water. *Microorganisms*, 8(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070978>

- GEKENIDIS, M.-T., QI, W., HUMMERJOHANN, J., ZBINDEN, R., WALSH, F., & DRISSNER, D. (2018). Antibiotic-resistant indicator bacteria in irrigation water: High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *PloS One*, 13(11), e0207857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207857>
- GVA. (s. f.). Historia y usos tradicionales – PN L'Albufera, Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica, Generalitat Valenciana. PN L'Albufera, visto el 2 de Julio de 2023, <https://parquesnaturales.gva.es/ca/web/pn-l-albufera/historia>
- JIMÉNEZ-BELENQUER, A. I., FERRÚS, M. A., HERNÁNDEZ, M., GARCÍA-HERNÁNDEZ, J., MORENO, Y., & CASTILLO, M. Á. (2023). Prevalence and Characterization of Beta-Lactam and Carbapenem-Resistant Bacteria Isolated from Organic Fresh Produce Retailed in Eastern Spain. *Antibiotics*, 12(2), 387. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020387>
- KAPOOR, G., SAIGAL, S., & ELONGAVAN, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- KHOSRAVI, A. D., SADEGHI, P., SHAHRAKI, A. H., HEIDARIEH, P., & SHEIKHI, N. (2015). Molecular Methods for Identification of *Acinetobacter* Species by Partial Sequencing of the *rpoB* and 16S rRNA Genes. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(7), DC09-DC13. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13867.6188>
- LÉGER, A., LAMBRAKI, I., GRAELLS, T., COUSINS, M., HENRIKSSON, P. J. G., HARBARTH, S., CARSON, C., MAJOWICZ, S., TROELL, M., PARMLEY, E. J., JØRGENSEN, P. S., & WERNLI, D. (2021). AMR-Intervene: A social–ecological framework to capture the diversity of actions to tackle antimicrobial resistance from a One Health perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), 1-21. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa394>
- LI, Y., LUO, L., XIAO, Z., WANG, G., LI, C., ZHANG, Z., ZHOU, Y., & ZHANG, L. (2019). Characterization of a Carbapenem-Resistant *Kluyvera Cryocrescens* Isolate Carrying Blandm-1 from Hospital Sewage. *Antibiotics*, 8(3), 149. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030149>
- MAGIORAKOS, A.-P., SRINIVASAN, A., CAREY, R. B., CARMELI, Y., FALAGAS, M. E., GISKE, C. G., HARBARTH, S., HINDLER, J. F., KAHLMETER, G., OLSSON-LILJEQUIST, B., PATERSON, D. L., RICE, L. B., STELLING, J., STRUELENS, M. J., VATOPOULOS, A., WEBER, J. T., & MONNET, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. (2019). Carbapenemases: The never-ending story. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica (English Ed.)*, 37(2), 73-75. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.12.006>
- MISHRA, M., ARUKHA, A. P., PATEL, A. K., BEHERA, N., MOHANTA, T. K., & YADAV, D. (2018). Multi-Drug Resistant Coliform: Water Sanitary Standards and Health Hazards. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 311. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00311>

- MONTERO, L., IRAZABAL, J., CARDENAS, P., GRAHAM, J. P., & TRUEBA, G. (2021). Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing-Escherichia coli Isolated From Irrigation Waters and Produce in Ecuador. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709418>
- MORAN, M. (s. f.). La Agenda para el Desarrollo Sostenible. *Desarrollo Sostenible*, visto el 21 de Junio de 2023, <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/development-agenda/>
- NASRI, E., SUBIRATS, J., SÀNCHEZ-MELSIÓ, A., MANSOUR, H. B., BORREGO, C. M., & BALCÁZAR, J. L. (2017). Abundance of carbapenemase genes (blaKPC, blaNDM and blaOXA-48) in wastewater effluents from Tunisian hospitals. *Environmental Pollution*, 229, 371-374. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.095>
- NORDMANN, P., GIRLICH, D., & POIREL, L. (2012). Detection of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae by use of a novel screening medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(8), 2761-2766. <https://doi.org/10.1128/JCM.06477-11>
- NUNEZ, C. (2011, julio 6). La contaminación del agua constituye una crisis mundial creciente. Esto es lo que hay que saber. *National Geographic.*, visto el 31 de Mayo de 2023, <https://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/contaminacion-del-agua>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, AGRICULTURA, O. DE LAS N. U. PARA LA A. Y LA, & ANIMAL, O. M. DE S. (2021). La resistencia a los antimicrobianos y el marco de cooperación de las Naciones Unidas para el desarrollo sostenible: Orientaciones para los equipos de las Naciones Unidas en los países. Ed. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 15 pp. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/346796>
- PANDEY, N., & CASCELLA, M. (2023). Beta-Lactam Antibiotics, en *StatPearls*. Ed. StatPearls Publishing, Florida, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>
- POIREL, L., WALSH, T. R., CUVILLIER, V., & NORDMANN, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119-123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- PRAN-MA. (2022). Estudio de las principales fuentes de emisión, rutas de dispersión y vías de exposición a los antimicrobianos, bacterias resistentes y genes de resistencia antimicrobiana para personas y animales. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), Madrid.
- RAWAT, D., & NAIR, D. (2010). Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3), 263-274. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.68531>
- REYGAERT, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482-501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- SANCHEZ, D. G., DE MELO, F. M., SAVAZZI, E. A., & STEHLING, E. G. (2018). Detection of different β -lactamases encoding genes, including blaNDM, and plasmid-mediated quinolone resistance genes in different water sources from Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(7), 407. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6801-5>
- SMITH, H. Z., & KENDALL, B. (2023). Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae, en *StatPearls*. Ed. StatPearls Publishing, Florida. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551704/>

- SORIA, J., ROMO, S., VERA-HERRERA, L., CALVO, S., SÒRIA-PERPINYÀ, X., & PEREZ, J. (2020). Evolución de la conductividad en la Albufera de Valencia entre 1985 y 2018. *Limnetica*, 40. <https://doi.org/10.23818/limn.40.15>
- STA ANA, K. M., MADRIAGA, J., & ESPINO, M. P. (2021). β -Lactam antibiotics and antibiotic resistance in Asian lakes and rivers: An overview of contamination, sources and detection methods. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 275, 116624. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116624>
- STRACHAN, C. R., & DAVIES, J. (2017). The Whys and Wherefores of Antibiotic Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(2), a025171. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025171>
- TURNER, J., MURAOKA, A., BEDENBAUGH, M., CHILDRESS, B., PERNOT, L., WIENCEK, M., & PETERSON, Y. K. (2022). The Chemical Relationship Among Beta-Lactam Antibiotics and Potential Impacts on Reactivity and Decomposition. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.807955>
- VENTOLA, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277-283.
- WHO. (s.f.). One Health, visto el 22 de mayo de 2023, <https://www.who.int/europe/initiatives/one-health>
- WHO. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos, visto el 11 de Junio de 2023, <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- WHO. (2019). WHO releases the 2019 AWaRe Classification Antibiotics, visto el 6 de julio de 2023, <https://www.who.int/news/item/01-10-2019-who-releases-the-2019-aware-classification-antibiotics>
- WHO. (2021). Antimicrobial resistance, visto el 3 de Junio de 2023, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- WHO. (2022). Drinking-water, visto el 31 de Mayo de 2023, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
- ZHANG, X., LÜ, X., & ZONG, Z. (2012). Enterobacteriaceae producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73(2), 204-206. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.007>