



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

TESIS DOCTORAL



Doctorado en Biotecnología

**Estudio del agua como fuente de entrada y dispersión de
determinantes de resistencia a antibióticos al medio ambiente
en el área metropolitana de Valencia y alrededores**

Autor:

Diego Miguel Dasí Camaró

Directoras:

Dra. María Ángeles Castillo López

Dra. María Antonia Ferrús Pérez

Valencia, abril 2024

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de alguna manera, han contribuido en la realización de este trabajo.

A mis directoras, Dra. María Antonia Ferrús Pérez y Dra. María Ángeles Castillo López, no solo por su dirección y orientación en esta Tesis, sino también, por darme la oportunidad de realizar este trabajo en la Universidad, por su amistad, por su paciencia en determinados momentos y su constante apoyo y motivación, sin los cuales no hubiese podido llevar a cabo este trabajo.

A todo el Laboratorio de Microbiología de Salud Pública de València, por haberme permitido realizar parte de la Tesis en sus instalaciones, por su amistad, por su apoyo constante, por los conocimientos y enseñanzas de los protocolos internos de aguas y por hacerme sentir uno más del equipo desde el primer momento. En especial, quiero destacar a Doña María Luisa Camaró Sala y Doña María Piedad Olmos, por sus consejos, dedicación y motivación.

A la Unidad Docente de Microbiología del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la UPV, por haberme abierto su laboratorio y permitido realizar parte de la Tesis en sus instalaciones, por su amistad y apoyo.

Al Dr. Miguel Angel Dasí Rodríguez, por su apoyo constante, sus consejos y motivación.

A Begoña y a mi familia, por confiar en mí y darme su apoyo en todo momento, sin ellos no hubiese sido posible y es por ello, que este trabajo va dedicado a todos ellos.

A mis padres, a Begoña y a mis hermanas/os

Resumen

La amenaza para la prevención y tratamiento de las infecciones bacterianas provocada por la resistencia a los antibióticos es cada vez mayor. Este problema va más allá de conseguir el éxito en el tratamiento de infecciones humanas, ya que nos encontramos en un ecosistema interconectado, donde las bacterias resistentes a los antibióticos y los genes de resistencia pueden influir en la salud global. Una de las herramientas más importantes para el manejo de estas resistencias es la vigilancia, de forma que la información actualizada de los patrones de resistencia local pueda orientar la elección inicial de la terapia correspondiente.

En este trabajo hemos estudiado distintos tipos de agua, a fin de obtener información integrada de la contaminación y los patrones locales de resistencia a antibióticos de bacterias indicadoras, con el objetivo de determinar el potencial de estos sistemas acuáticos para actuar como medios de dispersión de determinantes de resistencias a antibióticos en el ambiente, dentro de la perspectiva "One Health".

Nuestro objetivo era obtener información acerca del nivel de contaminación por bacterias resistentes a antibióticos (ARB) y la presencia de genes determinantes de resistencias (ARG) en distintos tipos de aguas ambientales, evaluando el origen de esta resistencia, relacionando los patrones de resistencia presentes, valorando los posibles riesgos para la población y proponiendo medidas para combatir el problema. Acotamos geográficamente nuestro estudio al área metropolitana de Valencia y otros puntos de la Comunidad Valenciana, analizando muestras provenientes de distintas fuentes como estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), aguas de riego, aguas marinas y aguas continentales.

En las muestras de agua recogidas en diversas localizaciones realizamos recuentos bacterianos selectivos de bacterias consideradas indicadores de contaminación fecal, tales como los coliformes totales, *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. (enterococos), seleccionados dependiendo del origen de la muestra, con el fin de conocer su calidad higiénico-sanitaria, y valoramos el nivel de resistencias de estos microorganismos frente a distintos antibióticos de uso frecuente, mediante recuentos en placas con medio selectivo a las que se había adicionado concentraciones estándar de los mismos. Empleando *E. coli* como microorganismo monitor de la resistencia en todos los tipos de agua, junto con *Enterococcus* spp. en el caso de aguas continentales y marinas, seleccionamos y aislamos un número significativo de cepas, valorando su concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a antibióticos de uso frecuente para el tratamiento de infecciones en humanos. Por último, verificamos mediante PCR la presencia o

ausencia de diferentes genes de resistencia, tanto en el medio acuático como en las cepas seleccionadas.

Los resultados obtenidos reflejan que la calidad higiénico-sanitaria de las aguas procedentes de los efluentes de dos EDAR, aguas de mar y aguas continentales, están dentro de los estándares de calidad establecidos por la normativa española. No ocurre lo mismo con las aguas de riego y las aguas de una de las EDAR, las cuales estaban muy por encima de esos límites. Mediante recuento en medios selectivos adicionados con distintos antibióticos, se observó que un elevado porcentaje de las cepas provenientes de EDAR y aguas de riego eran resistentes a ampicilina, eritromicina, y sulfametoxazol, siendo la resistencia a la ampicilina la más prevalente. Estos resultados fueron confirmados por la CMI en los aislados de *E. coli*, los cuales mostraron un patrón global de resistencia independientemente del origen de la muestra, siendo la resistencia a ampicilina la más prevalente, seguida de tetraciclina y sulfametoxazol, con un porcentaje muy alto de cepas multirresistentes, especialmente en EDAR y aguas de riego. La mayoría de las cepas presentaron resistencia a los antibióticos betalactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas, siendo los perfiles predominantes de multirresistencia similares en todos los tipos de agua.

En el caso de *Enterococcus* spp., el número de cepas resistentes y multirresistentes fue escaso, siendo las resistencias a la eritromicina y tetraciclina las más prevalentes.

La determinación por PCR de la presencia de diversos genes de resistencia confirmó que su dispersión en el medio acuático es muy elevada, encontrándose casi todos ellos en todas las muestras de agua, aunque en un menor porcentaje en el agua de mar. Se pudo determinar la existencia de un patrón genómico homogéneo de resistencias en las cepas de *E. coli* en esta área geográfica. La presencia del gen *bla*TEM en prácticamente todas las cepas se correlacionaba con la resistencia a betalactámicos detectadas fenotípicamente en las cepas seleccionadas. Los genes *sull*, *tetW* y *qnrS* fueron detectados en menor proporción, y su presencia presentaba menos correlación con las resistencias a las correspondientes familias de antibióticos de las cepas, lo que podría atribuirse a la presencia en su genoma de otros genes no estudiados en este trabajo.

La elevada prevalencia de determinantes de resistencia a los antibióticos encontrados en los distintos tipos de agua supone un riesgo elevado de transferencia horizontal de genes a otras bacterias, y contribuye de forma determinante a su llegada al ser humano. Aunque en la actualidad la Unión Europea no incluye una regulación específica al respecto para el agua, consideramos que se deberían establecer puntos críticos de vigilancia en todos los hábitats influenciados, realizando un seguimiento periódico, genotípico y fenotípico, de las resistencias

bacterianas, y estableciendo programas de colaboración con los organismos e instituciones implicados, a fin de correlacionar los datos obtenidos.

Resum

L'amenaça per a la prevenció i el tractament de les infeccions bacterianes provocada per la resistència als antibiòtics és cada vegada més gran. Aquest problema va més enllà d'aconseguir l'èxit en el tractament d'infeccions humanes, ja que ens trobem en un ecosistema interconnectat on els bacteris resistents als antibiòtics i els gens de resistència poden influir en la salut global. Una de les eines més importants per al maneig d'aquestes resistències és la vigilància, de manera que la informació actualitzada dels patrons de resistència local pugui orientar l'elecció inicial de la teràpia corresponent.

En aquest treball hem estudiat diferents tipus d'aigua per obtenir informació integrada de la contaminació i els patrons locals de resistència a antibiòtics de bacteris indicadors, amb l'objectiu de determinar el potencial d'aquests sistemes aquàtics per actuar com a mitjans de dispersió de determinants de resistències a antibiòtics a l'ambient, dins de la perspectiva "One Health".

El nostre objectiu era obtenir informació sobre el nivell de contaminació per bacteris resistents a antibiòtics (ARB) i la presència de gens determinants de resistències (ARG) en diferents tipus d'aigües ambientals, avaluant l'origen d'aquesta resistència, relacionant els patrons de resistència presents, valorant els possibles riscos per a la població i proposant mesures per combatre el problema. Acotem geogràficament el nostre estudi a l'àrea metropolitana de València i altres punts de la Comunitat Valenciana, analitzant mostres provinents de diferents fonts com ara estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR), aigües de reg, aigües marines i aigües continentals.

A les mostres d'aigua recollides en diverses localitzacions realitzem recomptes bacterians selectius de bacteris considerats indicadors de contaminació fecal, com ara els coliformes totals, *Escherichia coli* i *Enterococcus* spp. (enterococs), seleccionats depenent de l'origen de la mostra, per tal de conèixer-ne la qualitat higienicosanitària, i valorem el nivell de resistències d'aquests microorganismes davant de diferents antibiòtics d'ús freqüent, mitjançant recomptes en plaques amb medi selectiu a les quals s'havia afegit concentracions estàndard dels mateixos. Emprant *E. coli* com a microorganisme monitor de la resistència en tots els tipus d'aigua, juntament amb *Enterococcus* spp. en el cas d'aigües continentals i marines, seleccionem i aïllem un nombre significatiu de ceps, valorant-ne la concentració mínima inhibidora (CMI) davant d'antibiòtics d'ús freqüent per al tractament d'infeccions en humans. Finalment, verifiquem mitjançant PCR la presència o absència de diferents gens de resistència, tant al medi aquàtic com als ceps seleccionats.

Els resultats obtinguts reflecteixen que la qualitat higienicosanitària de les aigües procedents dels efluents de dues EDAR, aigües de mar i aigües continentals, estan dins dels estàndards de qualitat establerts. No passa el mateix amb les aigües de reg i les aigües d'una de les EDAR, que estaven molt per sobre d'aquests límits. Mitjançant recompte en mitjans selectius addicionats de diferents antibiòtics, es va observar que un elevat percentatge dels ceps provinents d'EDAR i aigües de reg eren resistents a ampil·lina, eritromicina, i sulfametoxazol, sent la resistència a l'ampil·lina la més prevalent. Aquests resultats van ser confirmats per la CMI als aïllats d' *E. coli*, els quals van mostrar un patró global de resistència independentment de l'origen de la mostra, sent la resistència a l'ampil·lina la més prevalent, seguida de tetraciclina i sulfametoxazol, amb un percentatge molt alt de ceps multiresistents, especialment a EDAR i aigües de reg. La majoria de les ceps van presentar resistència als antibiòtics betalactàmics, sulfonamides i tetraciclins, sent els perfils predominants de multiresistència similars en tots els tipus d'aigua.

En el cas d' *Enterococcus spp.*, el nombre de ceps resistents i multiresistents va ser escàs, sent les resistències a l'eritromicina i tetraciclina les més prevalents.

La determinació per PCR de la presència de diversos gens de resistència va confirmar que la seva dispersió en el medi aquàtic és molt elevada, i gairebé tots es troben en totes les mostres d'aigua, encara que en un menor percentatge a l'aigua de mar. Es va poder determinar l'existència d'un patró genòmic homogeni de resistències als ceps d' *E. coli* en aquesta àrea geogràfica. La presència del gen *bla*TEM en pràcticament tots els ceps es correlacionava amb la resistència a betalactàmics detectats fenotípicament als ceps seleccionats. Els gens *sull*, *tetW* i *qnrS* van ser detectats en menor proporció, i la seva presència presentava menys correlació amb les resistències a les corresponents famílies d'antibiòtics dels ceps, cosa que podria atribuir-se a la presència al genoma d'altres gens no estudiats en aquest treball.

L'elevada prevalença de determinants de resistència als antibiòtics trobats en els diferents tipus d'aigua suposa un risc elevat de transferència horitzontal de gens a altres bacteris, i contribueix de manera determinant a l'arribada a l'ésser humà. Tot i que actualment la Unió Europea no inclou una regulació específica sobre això per a l'aigua, considerem que s'haurien d'establir punts crítics de vigilància en tots els hàbitats influenciables, fent un seguiment periòdic, genotípic i fenotípic, de les resistències bacterianes, i establint programes de col·laboració amb els organismes i institucions implicats, a fi de correlacionar les dades obtingudes.

Abstract

The threat to prevention and treatment of bacterial infections caused by antibiotic resistance is increasing. This problem goes beyond achieving success in the treatment of human infections since we find ourselves in an interconnected ecosystem where antibiotic-resistant bacteria and resistance genes can influence global health. One of the most important tools for managing these resistances is surveillance so that updated information on local resistance patterns can guide the initial choice of the corresponding therapy.

In this work we have studied different types of water, in order to obtain integrated information on pollution and local antibiotic resistance patterns of indicator bacteria, with the aim of determining the potential of these aquatic systems to act as means of dispersion of determinants of antibiotic resistance in the environment, within the “One Health” perspective.

Our objective was to obtain information about the level of contamination by antibiotic-resistant bacteria (ARB) and the presence of resistance-determining genes (ARG) in different types of environmental waters, evaluating the origin of this resistance, relating the present resistance patterns, assessing the possible risks for the population and proposing measures to combat the problem. We geographically limited our study to the metropolitan area of Valencia and other points of the Valencian Community, analyzing samples from different sources such as wastewater treatment plants (WWTP), irrigation water, marine water and continental water.

In water samples collected at various locations, we performed selective bacterial counts of bacteria considered indicators of fecal contamination, such as total coliforms, *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. (enterococci), selected depending on the origin of the sample, in order to know its hygienic-sanitary quality, and we assess the level of resistance of these microorganisms against different frequently used antibiotics, through counts on plates with selective medium to which standard concentrations of them had been added. Using *E. coli* as a monitoring microorganism of resistance in all types of water, together with *Enterococcus* spp. in the case of continental and marine waters, we selected and isolated a significant number of strains, assessing their minimum inhibitory concentration (MIC) against antibiotics frequently used for the treatment of infections in humans. Finally, we verified by PCR the presence or absence of different resistance genes, both in the aquatic environment and in the selected strains.

The results obtained reflect that the hygienic-sanitary quality of the waters from the effluents of two WWTPs, sea waters and continental waters, are within the quality standards established by the Spanish. The same does not occur with irrigation water and water from one of the WWTPs, which were well above those limits. By counting in selective media added with

different antibiotics, it was observed that a high percentage of the strains from WWTP and irrigation water were resistant to ampicillin, erythromycin, and sulfamethoxazole, with resistance to ampicillin being the most prevalent. These results were confirmed by the MIC in the *E. coli* isolates, which showed a global pattern of resistance regardless of the origin of the sample, with resistance to ampicillin being the most prevalent, followed by tetracycline and sulfamethoxazole, with a very high percentage. of multi-resistant strains, especially in WWTP and irrigation water. Most strains presented resistance to beta-lactam antibiotics, sulfonamides and tetracyclines, with the predominant multiresistance profiles being similar in all types of water.

In the case of *Enterococcus* spp., the number of resistant and multiresistant strains was low, with resistance to erythromycin and tetracycline being the most prevalent.

The determination by PCR of the presence of various resistance genes confirmed that their dispersion in the aquatic environment is very high, almost all of them were found in all water samples, although in a lower percentage in seawater. It was possible to determine the existence of a homogeneous genomic pattern of resistance in *E. coli* strains in this geographical area. The presence of the *bla*TEM gene in practically all strains correlated with the resistance to beta-lactams detected phenotypically in the selected strains. The genes *sull*, *tetW* and *qnrS* were detected in a lower proportion, and their presence had less correlation with the resistance to the corresponding families of antibiotics of the strains, which could be attributed to the presence in their genome of other genes not studied in this work.

The high prevalence of antibiotic resistance determinants found in different types of water represents a high risk of horizontal gene transfer to other bacteria, and contributes decisively to their arrival in humans. Although the European Union does not currently include a specific regulation in this regard for water, we consider that critical surveillance points should be established in all susceptible habitats, carrying out periodic, genotypic, and phenotypic monitoring, of bacterial resistance, and establishing collaboration programs with the organizations and institutions involved, in order to correlate the data obtained.

Esta tesis ha dado origen a los siguientes resultados y publicaciones:

- **Comunicaciones a Congresos:**

- ✓ Dasi-Camaro, Diego Miguel; MP Olmos; Ferrús Pérez, M^a Antonia; González Pellicer, Ana; Castillo López, María-Ángeles (2017). *Antibiotic resistance bacteria in surface water samples collected from Valencia (Spain)*. EN VII International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2017). Madrid, Spain. (18-20 October 2017).
- ✓ Bertomeu, Arnau; Dasi-Camaro, Diego Miguel; K. Nowacki; González Pellicer, Ana; Ferrús Pérez, M^a Antonia; Castillo López, María-Ángeles (2017). *Antibiotic resistance in effluents of wastewater treatment plants of Valencia (Spain)*. EN VII International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2017). Madrid, Spain. (18-20 October 2017).

- **Capítulo de Libro publicado:**

- ✓ Dasí, D., Olmos, M.P., Ferrús, M.A., González, A. and Castillo, M.A. 2018. Antibiotic resistance bacteria in natural water samples collected from Valencia (Spain). En: *Exploring Microorganisms: Recent advances in Applied Microbiology* (Mendez-Vilas, A. ed.). Brown Walker Press/ Universal Publishers, Inc., Irvine, California and Boca Raton, Florida, USA, pp 222-225.

- **Artículos publicados:**

- ✓ Amato, M., Dasí, D., González, A., Ferrús, M. A., y Castillo, M. A. (2021). Occurrence of antibiotic resistant bacteria and resistance genes in agricultural irrigation waters from Valencia city (Spain). *Agricultural Water Management*, 256, 107097.
- ✓ Dasí, D., Camaró-Sala, M. L., González, A., García-Ferrús, M., Jiménez-Belenguer, A. I., y Castillo, M. Á. (2024). Antibiotic Resistance in Seawater Samples from East Coast of Spain. *Applied Sciences*, 14(5), 1965.

Índice

I. Introducción	1
1. LAS RESISTENCIAS A ANTIMICROBIANOS	2
1.1. La problemática de las resistencias a antimicrobianos desde la perspectiva “One Health”	3
1.2. Antecedentes históricos	4
1.3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos	10
1.4. Base genética de las resistencias a antibióticos	12
1.4.1. Mutación cromosómica	13
1.4.2. Transferencia horizontal de genes	13
1.5. Principales familias de genes implicados en la resistencia a los antibióticos	15
1.5.1. Genes de resistencia a antibióticos betalactámicos	15
1.5.2. Gen de resistencia a meticilina	19
1.5.3. Genes de resistencia a tetraciclinas	19
1.5.4. Genes de resistencia a las sulfonamidas y trimetoprim	20
1.5.5. Genes de resistencia a los antibióticos macrólidos	21
1.5.6. Genes de resistencia a quinolonas	21
1.5.7. Genes de resistencia a los antibióticos aminoglucósidos	22
1.5.8. Genes de resistencia a la polimixina	22
1.5.9. Genes de resistencia a los antibióticos glucopéptidos	23
1.5.10. Genes de resistencia a los anfenicoles	23
1.6. El problema de las multirresistencias	24
1.7. El medio ambiente como reservorio y agente de dispersión de determinantes de resistencia a antibióticos	25
2. PAPEL DEL AGUA EN LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS	28
2.1. La calidad microbiológica del agua como factor crítico en la Salud Pública mundial	28
2.2. Las aguas como reservorio y vehículo de diseminación de resistencias	31

2.3. Fuentes antropogénicas de determinantes de resistencia en el agua	33
2.3.1. Centros sanitarios	35
2.3.2. Industrias de producción de antibióticos	36
2.3.3. Aguas residuales urbanas	37
2.3.4. Agricultura, ganadería y acuicultura	38
2.4. Factores impulsores de la aparición y dispersión de resistencias en el agua	40
2.4.1. Residuos de antibióticos	40
2.4.2. Biopelículas	40
2.4.3. Presencia de biocidas y metales pesados	41
2.4.4. Cambio climático	41
2.4.5. Microplásticos	42
2.5. Rutas de diseminación de los determinantes de resistencias en el medio acuático	43
2.5.1. Aguas residuales sin tratar	43
2.5.2. Aguas residuales tratadas	43
2.5.3. Biosólidos	45
2.5.4. Purines y deshechos de granja	45
2.5.5. Escorrentía y filtraciones	46
2.5.6. Otras rutas de dispersión	46
2.6. Riesgo para la Salud Pública derivado de la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos en el medio acuático	47
2.7. La prevención de las resistencias a antibióticos en las aguas	47
2.7.1. Vigilancia epidemiológica de las resistencias a antibióticos bajo la perspectiva “One Health”	48
2.7.2. Evaluación de los riesgos para la salud por la presencia de determinantes de resistencia en el ambiente	49
2.7.3. Microorganismos indicadores de resistencias a antibióticos en el ambiente ...50	
2.7.4. El control y vigilancia de las resistencias a antibióticos en el agua	52
II. Objetivos	53

III. Material y Métodos	56
1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS Y METODOLOGÍA DE LOS MUESTREOS	57
1.1. Muestras de agua destinada al riego agrícola	57
1.1.1. Muestras procedentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales	57
1.1.2. Muestras de aguas superficiales utilizadas para el riego	58
1.2. Muestras de aguas de costa	59
1.3. Muestras de agua continental.....	60
2. ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA	61
2.1. Medios de cultivo y reactivos.....	61
2.2. Procesamiento de las aguas destinadas al riego	62
2.3. Procesamiento de las muestras de agua de costa.....	64
2.4. Procesamiento de las muestras de aguas continentales.....	67
3. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE AGUA	67
4. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	70
4.1. Procesamiento de las muestras y aislados	70
4.2. Extracción del DNA	70
4.3. Amplificación del DNA por PCR para la detección de genes de resistencia	71
4.4. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de resultados.....	72
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73
IV. Resultados	74
1. ESTUDIO DE AGUAS DESTINADAS AL RIEGO	75
1.1. Calidad microbiológica	75
1.1.1. Aguas de EDAR.....	75
1.1.2. Aguas superficiales para riego	77
1.2. Detección de coliformes y <i>E. coli</i> en medios adicionados con antibióticos.....	77
1.2.1. Aguas de EDAR.....	78
1.2.1.1. EDAR 1	78

1.2.1.2. EDAR 2	80
1.2.1.3. EDAR 3	83
1.2.1.4. Reducción de la carga microbiana tras el tratamiento terciario	85
1.2.2. Aguas de riego superficiales.....	86
1.3. Estudio de la sensibilidad a diferentes antibióticos de los aislados de <i>Escherichia coli</i>	88
1.3.1. Resistencias a antibióticos detectadas en los aislados de <i>E. coli</i> obtenidos a partir de aguas de EDAR.....	88
1.3.1.1. EDAR1	88
1.3.1.2. EDAR 2	91
1.3.1.3. EDAR 3	93
1.3.1.4. Comparación entre los niveles de resistencias y multirresistencias detectados en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de las tres EDAR	96
1.3.2. Resistencias a antibióticos detectadas en los aislados de <i>E. coli</i> obtenidos a partir de aguas de riego superficiales.....	98
1.4. Detección de la presencia de ARG en muestras de agua destinada al riego	100
1.4.1. Estudio de la presencia de ARG en muestras de EDAR	101
1.4.1.1. Detección directa de ARG en las muestras de agua procedentes de EDAR	101
1.4.1.2. Detección de ARG en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de aguas de EDAR	103
1.4.1.3. Estudio comparativo de la presencia de ARG en las muestras de agua y los aislados de EDAR.....	104
1.4.1.4. Estudio comparativo entre las resistencias fenotípicas y la presencia de ARG en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de EDAR	105
1.4.2. Estudio de la presencia de ARG en muestras de aguas de riego superficiales	106
1.4.2.1. Detección directa de ARG en las muestras de agua de riego superficiales	106

1.4.2.2. Detección de ARG en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de aguas de riego superficiales.....	107
1.4.2.3. Estudio comparativo de la presencia de ARG en las muestras de agua y los aislados de aguas de riego superficiales	109
1.4.2.4. Estudio comparativo entre las resistencias fenotípicas y la presencia de ARG en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de aguas de riego superficiales.....	110
2. ESTUDIO DE AGUAS DE COSTA Y CONTINENTALES	111
2.1. Calidad microbiológica	111
2.1.1. Aguas de costa	111
2.1.2. Aguas continentales	112
2.2. Estudio de la sensibilidad a diferentes antibióticos de los aislados de <i>Escherichia coli</i> y de <i>Enterococcus</i> spp.....	113
2.2.1. Resistencias a antibióticos detectadas en los aislados de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. obtenidos a partir de aguas de costa.....	114
2.2.2. Resistencias a antibióticos detectadas en los aislados de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. obtenidos a partir de aguas continentales.....	116
2.3. Detección de la presencia de ARG en las muestras de agua de costa	120
2.3.1. Detección directa de ARG en las muestras de agua.....	120
2.3.2. Detección de ARG en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de aguas de costa	120
2.3.3. Estudio comparativo de la presencia de ARG en las muestras de agua y los aislados de aguas de costa	121
2.3.4. Detección de ARG en los aislados de <i>Enterococcus</i> spp.	122
2.3.5. Estudio comparativo entre las resistencias fenotípicas y la presencia de ARG en los aislados de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. procedentes de aguas de costa	122
V. Discusión	124
1. Aguas destinadas al riego agrícola	126
2. Aguas de costa y aguas continentales	144
VI. Conclusiones	155

VII. Bibliografía	159
VIII. Anexos	216

Índice de Figuras

Figura 1. Cronología del descubrimiento de antibióticos y años de la primera resistencia detectada	7
Figura 2. Lista de la OMS de patógenos prioritarios según su resistencia a los antibióticos	8
Figura 3. Principales mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida en bacterias.....	12
Figura 4. Transmisión de antibióticos y diseminación de resistencias en el medio ambiente....	27
Figura 5. Consumo comunitario de antibióticos en España en DHD	34
Figura 6. Consumo comunitario de antibióticos en la Comunidad Valenciana en DHD.....	35
Figura 7. Consumo veterinario de antibióticos en España	39
Figura 8. Puntos de toma de muestra de agua de riego en la ciudad de Valencia y alrededores	59
Figura 9. Zonas de toma de muestra de agua de costa.....	60
Figura 10. A) Aislamiento e identificación en medio TBX de <i>E. coli</i> procedente de aguas de EDAR. B) Aislamiento en medio SB de <i>Enterococcus</i> spp. procedente de aguas continentales.....	62
Figura 11. Confirmación en medio BEA de <i>Enterococcus</i> spp. procedente de aguas continentales	62
Figura 12. Rampa de filtración (Millipore)	63
Figura 13. Esquema del método Colilert-18 y Enterolert-E	65
Figura 14. Placas de Colilert-18 de aguas de mar positivas para A) coliformes y B) <i>E. coli</i>	65
Figura 15. Placa de Enterolert-E de aguas de mar.....	66
Figura 16. Sistema automatizado Thermo Scientific Sensititre®	68
Figura 17. Distribución de antibióticos (mg/L) en las placas EUVSEC	69
Figura 18. Distribución de antibióticos (mg/L) en las placas EUVNEC	69
Figura 19. Amplificación de un fragmento del gen <i>bla</i> TEM de muestras de aguas de EDAR ...	102
Figura 20. Amplificación de un fragmento del gen <i>erm</i> B de muestras de aguas de EDAR	102
Figura 21. Amplificación de un fragmento del gen <i>qnr</i> S de muestras de aguas de EDAR.....	102
Figura 22. Amplificación de un fragmento del gen <i>sul</i> I de muestras de aguas de EDAR.....	103

Figura 23. Amplificación de un fragmento del gen <i>tetW</i> de muestras de aguas de EDAR.....	103
Figura 24. Presencia de ARG en aguas de EDAR y en los aislados de <i>E. coli</i>	105
Figura 25. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen <i>blaTEM</i> en muestras de aguas de riego y aislados de <i>E. coli</i>	108
Figura 26. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen <i>tetW</i> en muestras de aguas de riego y aislados de <i>E. coli</i>	108
Figura 27. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen <i>ermB</i> en muestras de aguas de riego y aislados de <i>E. coli</i>	108
Figura 28. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen <i>sulI</i> en muestras de aguas de riego y aislados de <i>E. coli</i>	109
Figura 29. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen <i>qnrS</i> en muestras de aguas de riego y aislados de <i>E. coli</i>	109
Figura 30. Comparación de la detección de los ARG entre los aislamientos de <i>E. coli</i> y las muestras de agua de riego en los diferentes puntos de muestreo.....	110
Figura 31. Comparación de la detección de los ARG entre los aislamientos de <i>E. coli</i> y las muestras de agua de costa en las diferentes zonas de muestreo.....	121

Índice de Tablas

Tabla 1. Niveles máximos de <i>E. coli</i> admisibles para el riego de vegetales que han de consumirse crudos.....	29
Tabla 2. Niveles máximos de <i>E. coli</i> admisibles para el riego de productos para consumo humano que no es en fresco	30
Tabla 3. Calidad microbiológica de las aguas costeras y de transición, de acuerdo con la legislación vigente	31
Tabla 4. Calidad microbiológica de las aguas continentales, de acuerdo con la legislación vigente	31
Tabla 5. Principales familias de antibióticos y sus genes de resistencia relacionados presentes en el medio acuático	33
Tabla 6. Concentraciones estimadas de coliformes fecales (CF) y sus fracciones resistentes a antibióticos (R) vertidas en España y en la Comunidad Valenciana de acuerdo con los caudales de efluentes de depuración vertidos al ambiente en 2016.....	45
Tabla 7. Características de las EDAR estudiadas.....	57
Tabla 8. Concentración de antibióticos añadidos al medio de cultivo.....	64
Tabla 9. Cepas de referencia utilizadas para control interno	70
Tabla 10. Cebadores específicos para cada gen estudiado y tamaño esperado del amplicón ...	71
Tabla 11. Ciclos y temperaturas de la amplificación para cada gen estudiado.....	72
Tabla 12. Recuentos de coliformes (\log_{10} UFC/100 mL) en las muestras procedentes de EDAR	76
Tabla 13. Recuentos de <i>E. coli</i> (\log_{10} UFC/100 mL) en las muestras procedentes de EDAR.....	76
Tabla 14. Recuentos de <i>E. coli</i> (\log_{10} UFC/100 mL) en aguas superficiales para riego.....	77
Tabla 15. Recuentos de coliformes de la EDAR 1 (\log_{10} UFC/100 mL)	78
Tabla 16. Recuentos de <i>E. coli</i> de la EDAR 1 (\log_{10} UFC/100 mL)	79
Tabla 17. Recuentos de coliformes de la EDAR 2 (\log_{10} UFC/100 mL)	81
Tabla 18. Recuentos de <i>E. coli</i> de la EDAR 2 (\log_{10} UFC/100 mL)	82
Tabla 19. Recuentos de coliformes de la EDAR 3 (\log_{10} UFC/100 mL)	83

Tabla 20. Recuentos de <i>E. coli</i> de la EDAR 3 (\log_{10} UFC/100 mL)	84
Tabla 21. Porcentajes de reducción en los recuentos de <i>E. coli</i> tras el tratamiento terciario en las aguas de EDAR.....	85
Tabla 22. Recuentos de <i>E. coli</i> en aguas de riego superficiales (\log_{10} UFC/100 mL) en presencia de antibiótico	87
Tabla 23. Recuentos medios de <i>E. coli</i> en aguas de riego superficiales en los diferentes puntos de muestreo (\log_{10} UFC/100 mL).....	88
Tabla 24. Distribución de las cepas según el origen y efluente	88
Tabla 25. Frecuencia de detección de resistencias en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de la EDAR 1	90
Tabla 26. Frecuencia de <i>E. coli</i> multirresistentes aislados procedentes de la EDAR 1	90
Tabla 27. Perfiles de multirresistencia en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de la EDAR 1	91
Tabla 28. Frecuencia de detección de resistencias en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de la EDAR 2	92
Tabla 29. Frecuencia de <i>E. coli</i> multirresistentes aislados de la EDAR 2	92
Tabla 30. Perfiles de multirresistencia en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de la EDAR 2	93
Tabla 31. Frecuencia de detección de resistencias en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de la EDAR 3	94
Tabla 32. Frecuencia de <i>E. coli</i> multirresistentes aislados de la EDAR 3	94
Tabla 33. Perfiles de multirresistencia en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de la EDAR 3	95
Tabla 34. Comparación de las frecuencias de resistencias a antibióticos detectadas en los aislados de <i>E. coli</i> según la fase del tratamiento.....	97
Tabla 35. Comparación del número de aislados multirresistentes procedentes de las 3 EDAR, obtenidos antes y después del tratamiento terciario.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 36. Frecuencia de detección de resistencias en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de agua de riego superficial	99
Tabla 37. Perfiles y porcentaje de aislados de <i>E. coli</i> multirresistentes procedentes de agua de riego superficial	100

Tabla 38. Frecuencia de cepas multirresistentes entre los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de aguas de riego superficial	100
Tabla 39. Detección de ARG en muestras de agua de EDAR	101
Tabla 40. Detección de ARG en aislados de <i>E. coli</i> procedentes de agua de EDAR	104
Tabla 41. Comparación entre la presencia de ARG y las resistencias fenotípicas detectadas en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de EDAR	106
Tabla 42. Detección de ARG en muestras de agua de riego superficiales	106
Tabla 43. Detección de ARG en aislados de <i>E. coli</i> procedentes de aguas de riego superficiales	107
Tabla 44. Comparación entre la presencia de ARG y las resistencias fenotípicas detectadas en aislados de <i>E. coli</i> procedentes de aguas de riego superficiales.....	111
Tabla 45. Recuentos de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. en agua de costa	112
Tabla 46. Calidad de las aguas de costa analizadas según R.D. 1341/2007.....	112
Tabla 47. Recuentos de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. en las aguas continentales	113
Tabla 48. Calidad de las aguas continentales según R.D. 1341/2007	113
Tabla 49. Distribución de los aislados según su origen	114
Tabla 50. Frecuencia de detección de resistencias y multirresistencias en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de agua de costa.....	115
Tabla 51. Perfiles de multirresistencia detectados en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de agua de costa	115
Tabla 52. Frecuencia de detección de resistencias y multirresistencias en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de aguas continentales	117
Tabla 53. Perfiles y número de aislados de <i>E. coli</i> multirresistentes procedentes de aguas continentales	117
Tabla 54. Frecuencia de detección de resistencias y multirresistencias en los aislados de <i>Enterococcus</i> spp. procedentes de aguas continentales	119
Tabla 55. Perfiles de multirresistencia en los aislados de <i>Enterococcus</i> spp. procedentes de aguas continentales	119
Tabla 56. Detección de ARG en muestras de agua de costa.....	120

Tabla 57. Detección de ARG en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de agua de costa.....	120
Tabla 58. Detección de ARG en aislados de <i>Enterococcus</i> spp. procedentes de agua de costa	122
Tabla 59. Comparación entre la presencia de ARG y las resistencias fenotípicas detectadas en aislados de <i>E. coli</i> procedentes de aguas de costa.....	123

Abreviaturas

AMR: Antimicrobial Resistances; Resistencias a Antimicrobianos

ARB: Antibiotic Resistant Bacteria; Bacterias Resistentes a Antibióticos

ARG: Antibiotic Resistance Gene/Genes; Gen/Genes de Resistencia a Antibióticos

BEA: Agar Bilis Esculina Azida

CC: Agar Base Cromogénico Coliformes

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CRE: Carbapenem-resistant Enterobacterales; Enterobacterias resistentes a las carbapenemasas

DHD: Dosis diarias definidas por mil habitantes y día

eARG: ARG extracelulares

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control; Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales

eDNA: DNA extracelular

EFSA: European Food Safety Authority; Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EMA: European Medicines Agency; Agencia Europea de Medicamentos

ESBL: Extended Spectrum Betalactamase; Betalactamasas de espectro extendido

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GLASS: Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System; Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia y el uso de los Antimicrobianos

Ha: Hectáreas

iARG: ARG intracelulares

iDNA: DNA intracelular

MDR: Multi Drug Resistance; Multirresistencia

mJ: miliJulios

NMP: Número Más Probable

OMS: Organización Mundial de la Salud

OMSA: Organización Mundial de Sanidad Animal

PCR: Polymerase Chain Reaction; Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDR: Pan-resistencia

PRAN: Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos, España

qPCR: quantitative real time PCR; PCR cuantitativa en tiempo real

SB: Agar Slanetz y Bartley

SS: Salida/Efluente del tratamiento secundario

ST: Salida/Efluente del tratamiento terciario

TBX: Agar Glucurónico Triptona y Bilis

UE: Unión Europea

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UFP: Unidades Formadoras de Placa

XDR: Resistencia extrema

I. Introducción

1. LAS RESISTENCIAS A ANTIMICROBIANOS

Uno de los más graves problemas con que nos enfrentamos a nivel mundial es la creciente aparición de resistencias bacterianas a los antimicrobianos (Antimicrobial Resistance, AMR), entendida como la capacidad de los microorganismos para evitar la acción de un compuesto con capacidad antimicrobiana, lo que les permite sobrevivir y desarrollarse en su presencia. La existencia de microorganismos resistentes provoca un incremento de las complicaciones post-quirúrgicas y de las infecciones hospitalarias, el aumento de los períodos de hospitalización y de la duración del tratamiento de las enfermedades infecciosas, y en algunos casos, el fracaso de dichos tratamientos (Agyeman *et al.*, 2022).

En estos momentos la resistencia a antimicrobianos constituye una de las principales causas de muerte en el mundo, por encima del VIH o la malaria. El último estudio de Investigación Global sobre la Resistencia a los Antimicrobianos (GRAM) habla de 1,2 millones de personas muertas en el año 2019 como resultado directo de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos (Murray *et al.*, 2022).

En Europa, las bacterias resistentes provocan cada año más de 600.000 infecciones y aproximadamente 33.000 muertes (WHO, 2022a), de las cuales más de 4.000 se producen en España (PRAN, 2021b). A la mortalidad directa habría que añadir otros 4,95 millones de muertes en el año 2019 por los efectos asociados indirectos (cuando una infección resistente a los medicamentos está implicada en la muerte, pero la resistencia en sí mismo puede, o no, haber sido la causa) como, por ejemplo, en pacientes inmunocomprometidos, sometidos a quimioterapia o receptores de trasplantes, donde las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos incrementan de forma significativa el riesgo de mortalidad.

El Banco Mundial estima que para el año 2050 puede perderse más del 3,8 % del Producto Interior Bruto mundial debido a la resistencia a los antibióticos (The World Bank, 2016). El problema actual es de tal magnitud que autoridades reguladoras de primer nivel, tales como el Fondo Monetario Internacional (FMI) o el Banco Mundial, han declarado las resistencias a los antimicrobianos como una amenaza prioritaria para la salud mundial del siglo XXI (Hernando-Amado *et al.*, 2019).

Desde que en el año 1928 Alexander Fleming descubriese la penicilina de manera fortuita, una multitud de descubrimientos de antibióticos naturales y sintéticos cambiarían la historia de la medicina, hasta el punto de que la práctica médica actual no se entendería sin ellos. Posteriormente, su consumo se extendió, tanto para el tratamiento de infecciones en humanos, como en los sectores de la agricultura, ganadería y acuicultura, y con este uso masivo, global y

descontrolado, comenzó el problema del aumento de las resistencias, generado por la plasticidad genética de los microorganismos, que les confiere la capacidad de eludir la acción de estos compuestos mediante selección natural (Hutchings *et al.*, 2019).

1.1. La problemática de las resistencias a antimicrobianos desde la perspectiva “One Health”

La actividad humana es la principal fuente de emisión de determinantes de resistencias, tanto bacterias (Antibiotic Resistant Bacteria, ARB) como genes (Antibiotic Resistant Genes, ARG) y de residuos de antibióticos al medio ambiente, a través de diversas vías de dispersión (aguas residuales tratadas y sin tratar, biosólidos, purines y deshechos de granja, escurrimientos y filtraciones, etc.). Es a través del medio ambiente como los seres humanos y animales resultan expuestos a ARB y ARG, lo que dará lugar a la transmisión de estos determinantes a la propia microbiota humana o a la infección por microorganismos ambientales portadores de resistencias, cerrando así un círculo de retroalimentación positiva que no deja de crecer a niveles cada vez más alarmantes. Por ello, la complejidad de la aparición y propagación de las resistencias a los antibióticos no puede entenderse sin considerar las numerosas interrelaciones entre humanos, seres vivos y medio ambiente. Este es el contexto donde interviene la estrategia “One Health”, representando los esfuerzos de colaboración de múltiples disciplinas (personal médico, veterinario, investigador, etc.) que van a trabajar local, nacional y globalmente para lograr una salud óptima para las personas, los animales y el medio ambiente (Aslam *et al.*, 2021).

Históricamente, Hipócrates fue el primero en comprender la importancia de las variables ambientales en la Salud Pública. Virchow y Osler establecieron la relación entre la medicación humana y animal, y Steele estableció por primera vez una División de Salud Pública Veterinaria en el Centro de Enfermedades Transmisibles (CDC) de Estados Unidos en 1947, con grandes avances en la epidemiología de las enfermedades zoonóticas. Pero fue Calvin Schawabe, en 1967, quien formuló la idea de “One Medicine” para describir la necesidad de un enfoque único y coordinado para abordar la medicina humana y animal (Gyles, 2016; Ahmad *et al.*, 2023). Es en ese momento cuando comienza a surgir la noción de **“One Health”**, como un **concepto interdisciplinario y holístico que considera la salud humana y animal como hechos interdependientes, en asociación con el ecosistema en el que viven, y que requiere abordar las amenazas a la salud humana desde un enfoque ecológico, multidisciplinar, multisectorial y coordinado** (World Health Organization, WHO, 2021).

La AMR es uno de los puntos centrales del enfoque “One Health”. La distribución global de resistencias en bacterias patógenas humanas es consecuencia de diversos factores, tales como el uso excesivo de antibióticos en animales y humanos; la producción ganadera intensiva; la globalización en la distribución de alimentos; el aumento de viajes y comercio internacional; el cambio climático; el aumento de la densidad de población y la urbanización masiva (Hernando-Amado *et al.*, 2019). Por otro lado, la carga global de determinantes de resistencias en el ambiente está íntimamente asociada a la liberación de antibióticos no metabolizados o sus residuos al medio ambiente (Iskandar *et al.*, 2020). De esta forma, cualquier estrategia orientada a la disminución del riesgo para la salud humana por AMR debe considerar, no solo el contexto sanitario, sino todas las complejas interrelaciones que se dan entre todos los nichos ecológicos que actúan como reservorios y fuentes de dispersión de estos determinantes de resistencias (Cycon *et al.*, 2019; Ahmad *et al.*, 2023).

En 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en colaboración con la organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), publicó un informe (WHO, 2015) destacando la necesidad de abordar el problema de las resistencias a los antimicrobianos mediante una estrategia integrada, desde la visión “One Health” (Badau, 2021; Aslam *et al.*, 2021). En ella, múltiples sectores, disciplinas y comunidades, a distintos niveles de la sociedad, deben trabajar juntos con la finalidad de promover el bienestar para la salud y los ecosistemas, al tiempo que abordan la necesidad colectiva de agua, aire y energía limpios, alimentos seguros y nutritivos, de combatir el cambio climático y de contribuir al progreso sostenible (WHO, 2021).

1.2. Antecedentes históricos

La utilización de microorganismos productores de antibióticos para prevenir enfermedades comenzó hace más de 2000 años. De hecho, en el papiro de Ebers, que data del 1550 a. C., ya se pueden observar algunas evidencias de este hecho, como la que se recoge en la receta 533, donde para curar una herida se recomienda aplicar una solución de carne o grasa animal añadiendo pan de cebada mohoso, aunque no conocían la función del moho (Haas, 1999). Sin embargo, el primer antibiótico moderno, el ácido micofenólico, no fue descubierto hasta 1893 por el microbiólogo italiano Bartolomeo Gosio (Mohr, 2016).

En 1909, Paul Ehrlich desarrolló el primer antibiótico sintético eficaz contra la sífilis, el salvarsán, un derivado del arsénico. La eficacia de este tratamiento estaba basada en la toxicidad selectiva, principio fundamental de la quimioterapia que sirvió de base para el desarrollo de

futuros antibióticos (Uddin *et al.*, 2021). En aquella época, Ehrlich ya observó que, tras la administración de las dosis iniciales, la respuesta a las siguientes dosis perdía eficacia. Ehrlich sugirió que podría perderse la afinidad entre la sustancia sintetizada y el microorganismo y, además, señaló que este fenómeno se transmitía y mantenía durante sucesivas generaciones (García-Sánchez *et al.*, 2010).

En 1930, el bacteriólogo alemán Gerhard Domagk descubrió las sulfonamidas, precursoras de las sulfamidas, antibióticos sintéticos de amplio espectro que fueron los primeros que demostraron ser eficaces en la práctica clínica y que, de hecho, se siguen utilizando en la actualidad. Los descubrimientos de Ehrlich y Domagk darían comienzo a la quimioterapia moderna (Golkar *et al.*, 2014).

La penicilina fue el primer compuesto natural con actividad antimicrobiana descubierto. Alexander Fleming, médico escocés, descubrió en 1929 la penicilina de manera casual en uno de sus experimentos, cuando observó cómo un hongo del género *Penicillium* inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en un cultivo que estaba contaminado. Pero fueron Howard Florey y Ernst Chain quienes consiguieron purificar el compuesto, lo que permitió aumentar su producción para su uso médico y abrió la puerta al posterior desarrollo de derivados semisintéticos para luchar contra las resistencias que empezaban a aparecer frente a la penicilina (Gaynes, 2017).

Tras el descubrimiento de la penicilina se inició la época dorada de los antibióticos, desde la aparición de derivados semisintéticos y nuevas moléculas pertenecientes a la familia de los betalactámicos, como las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenémicos, hasta los descubrimientos de nuevas familias de antibióticos, gracias sobre todo al trabajo desarrollado por Selman Waksman, que realizó un estudio del comportamiento antimicrobiano de bacterias provenientes del suelo. Durante esta época, que transcurrió desde los años 40 hasta los 80 del siglo XX, se descubrieron más de veinte clases de antibióticos, pertenecientes a diferentes familias y con diferentes actividades biológicas, muchos de los cuales se siguen utilizando todavía (Durand *et al.*, 2019). Basándose en la información sobre los mecanismos de acción de los antibióticos conocidos, varias empresas farmacéuticas desarrollaron nuevas moléculas, como los macrólidos en 1952, las tetraciclinas en 1948, los nitrofuranos en 1953, las quinolonas en 1960 y las oxazolidinonas en 1987 (Nicolaou y Rigol, 2018; Durand *et al.*, 2019).

Cuando se introdujeron los antibióticos en la práctica clínica, estos fueron extremadamente eficientes para eliminar las bacterias patógenas, lo que llevó a muchos a pensar que se ganaría la lucha contra las enfermedades infecciosas y, finalmente,

desaparecerían de la población. Sin embargo, el rápido y relativamente sencillo desarrollo de antibióticos que se produjo en la época provocó su uso desmesurado. Por otra parte, la creencia en que el problema estaba solucionado llevó a no seguir investigando en este campo, de forma que apenas se han detectado nuevas clases de antibióticos en los últimos 50 años (Nicolaou y Rigol, 2018; Durand *et al.*, 2019). Esto condujo a la aparición de una rápida diseminación de microorganismos resistentes, frente a los que cada vez se disponía de menos compuestos con eficacia terapéutica, reflejando la falta de conocimiento científico sobre los procesos evolutivos y ecológicos de los ecosistemas microbianos.

Efectivamente, los antibióticos naturales son metabolitos secundarios producidos por algunos microorganismos para inhibir el crecimiento de microbiota competitiva presente en el mismo nicho ecológico. Estos compuestos, como cualquier otro factor tóxico, ejercen presión selectiva sobre los microorganismos diana, quienes, mediante diferentes eventos genéticos y bioquímicos, adquieren resistencia a este tipo de sustancias, adaptándose de esta manera rápidamente al medio. El origen temporal de las resistencias a antibióticos es, por tanto, coetáneo a la presencia de los antibióticos en el ambiente (Ogawara, 2016). De hecho, se han encontrado bacterias resistentes en cuevas y lagos aislados, preservados de la contaminación bacteriana antropogénica (Bhullar *et al.*, 2012), e incluso en núcleos de permafrost de hace 30.000 años (D'Costa *et al.*, 2011).

El problema de las resistencias a antibióticos surge cuando éstos comienzan a emplearse de forma generalizada, tanto en clínica como en veterinaria y agricultura (Gajdács y Albericio, 2019). Las resistencias aparecieron y se extendieron muy rápidamente: La penicilina se comercializó en 1942 y la resistencia de *S. aureus* frente a la misma se observó un año después. Alexander Fleming ya alertó sobre este peligro en su discurso del Premio Nobel: *“Puede llegar el momento en que cualquiera pueda comprar penicilina en las tiendas. Luego existe el peligro de que el hombre ignorante se administre fácilmente una dosis insuficiente y, al exponer a sus microbios a cantidades no letales de la droga, los haga resistentes”* (Yap, 2013).

Este fenómeno se ha ido repitiendo reiteradamente con los antibióticos que se han ido descubriendo. Es un hecho comprobado que a la introducción de un antibiótico en la práctica clínica siempre le sigue la aparición de cepas resistentes al mismo (Keita *et al.*, 2022). Sin embargo, durante la época dorada de los antibióticos no se le dio mucha importancia a este fenómeno, ya que rápidamente se descubrían nuevos compuestos, debido, por una parte, al deseo de investigadores e industria por desarrollar nuevos tratamientos y, por otra, precisamente a la constante aparición de resistencias antimicrobianas tras su uso. Estos nuevos

compuestos, además, eran relativamente seguros, de fácil acceso, y su coste no era excesivamente elevado (Merrikh y Kohli, 2020).

En los años 80, sin embargo, esta situación se vio estancada, debido al alto coste y la dificultad de descubrir y desarrollar nuevos compuestos eficaces frente a las bacterias existentes, lo que conllevó la falta de inversión por parte de la industria farmacéutica (Figura 1) (Durand *et al.*, 2019; Havenga *et al.*, 2019; Uddin *et al.*, 2021).

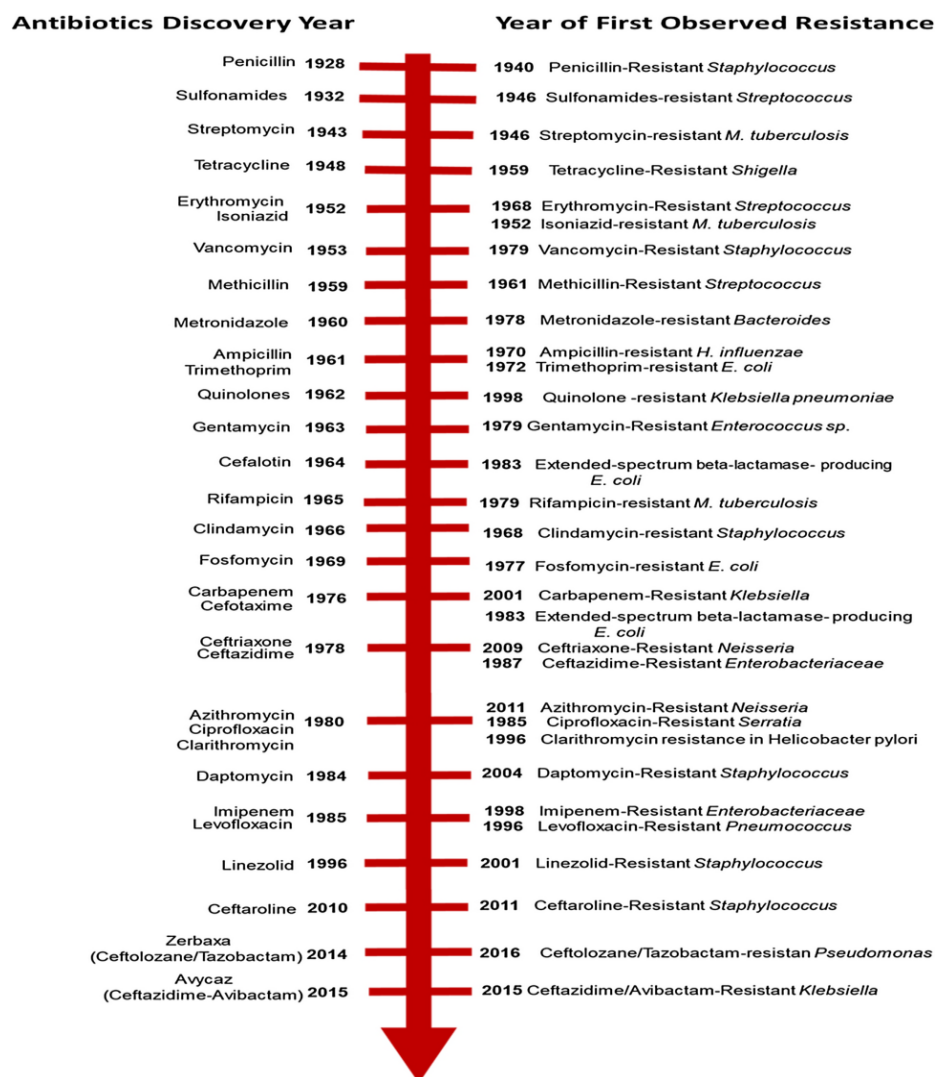


Figura 1. Cronología del descubrimiento de antibióticos y años de la primera resistencia detectada (Keita *et al.*, 2022).

Actualmente, más del 70% de las bacterias patógenas han desarrollado resistencia a al menos a un antibiótico y cada vez hay más bacterias resistentes a múltiples antibióticos. Según un informe publicado por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) junto con la OMS, realizado en los países de la Unión Europea y el Espacio Económico

Europeo, en 2022 la especie bacteriana más notificada con relación a las resistencias fue *E. coli*. Más de la mitad (54%) de las cepas de esta especie aisladas a nivel europeo fueron resistentes a, al menos, uno de los grupos de los antibióticos bajo vigilancia (aminopenicilinas, fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y carbapenémicos). Le seguían *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. faecium*, *Streptococcus pneumoniae* y *Acinetobacter* spp. (Uddin *et al.*, 2021; WHO, 2022a). Los antibióticos más afectados por estas resistencias fueron las fluoroquinolonas y los betalactámicos (Murray *et al.*, 2022).

La resistencia a antibióticos constituye, por tanto, un grave problema de Salud Pública a nivel mundial y un reto para el futuro de los sistemas sanitarios. En 2017, la OMS publicó una lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos que representan una potencial amenaza para los seres humanos y para los que se necesitan con urgencia el desarrollo de nuevos antibióticos (Figura 2). La lista se clasifica, según esta urgencia, en tres grupos de prioridad (crítica, elevada y media), con el fin de orientar y promover la investigación y desarrollo de nuevos compuestos (WHO, 2017; Breijyeh *et al.*, 2020):

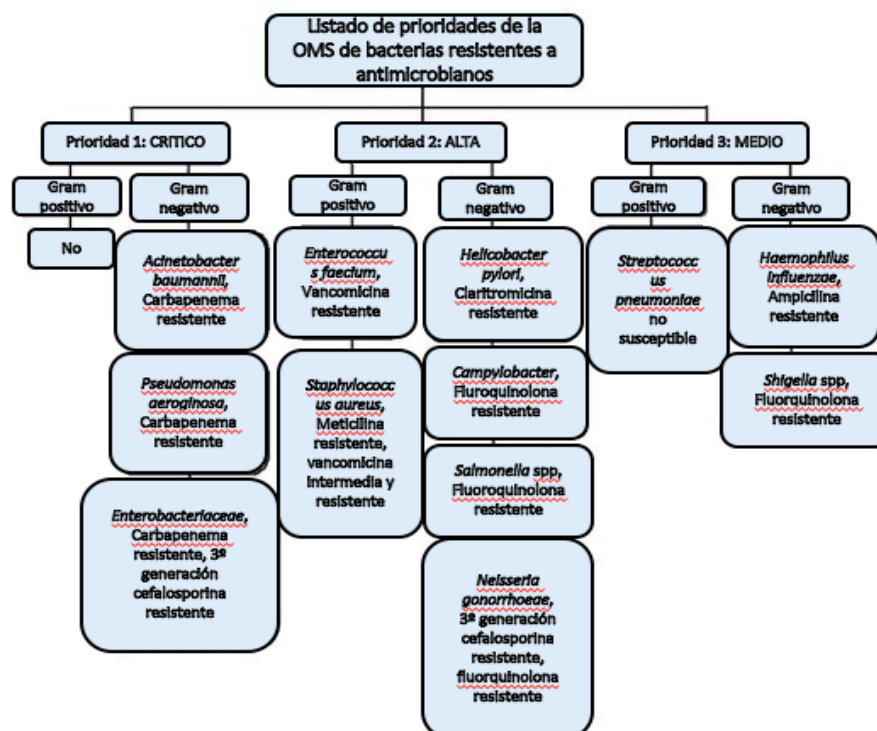


Figura 2. Lista de la OMS de patógenos prioritarios según su resistencia a los antibióticos (Adaptada de Breijyeh *et al.*, 2020).

En los últimos años se está volviendo a invertir y se están explorando nuevos enfoques para el desarrollo de antibióticos, basados en nuevos conceptos de la dinámica de la resistencia, la enfermedad y la prevención (Qin *et al.*, 2017; Plackett, 2020). A partir de la secuenciación completa del genoma bacteriano se han descubierto vías de resistencia y sistemas de regulación de esta, conocimiento crucial para el descubrimiento de nuevos fármacos. El diseño *in silico* de fármacos y el uso de la Inteligencia Artificial asociados a los estudios metagenómicos están resultando herramientas muy potentes, y recientemente se ha descrito una nueva clase de antibióticos macrocíclicos capaces de inhibir el sistema de transporte del LPS de membrana específico de *Acinetobacter*. Estos compuestos son activos frente a todas las especies del género, incluyendo las cepas multirresistentes, y una molécula de este tipo, el zosurabalpin está ya en fase de ensayo clínico (Khan *et al.*, 2023; Pahil *et al.*, 2024)

Se está estudiando el empleo de bacteriófagos, inofensivos para el organismo humano, incluida la microbiota intestinal, pero muy efectivos frente a la bacteria diana, lo que reduce el riesgo de infecciones oportunistas. También se ha propuesto el uso de anticuerpos monoclonales recombinantes frente a determinadas bacterias, aunque su producción tiene un coste muy elevado. Otro método, aplicado con éxito frente a *P. aeruginosa*, son los compuestos inhibidores del *quorum sensing*, fenómeno de señalización intercelular imprescindible para la formación de biopelículas por este tipo de bacterias (Hemmati *et al.*, 2020; Uddin *et al.*, 2021).

Dentro de estos nuevos enfoques prometedores, se ha comenzado a probar también el uso de la nanotecnología (Rosini *et al.*, 2020; Ye y Chen, 2022; Chakraborty *et al.*, 2022). La eficacia de los antibióticos puede mejorarse mediante el uso de los “nanoportadores de antibióticos”, nanopartículas con estructuras orgánicas o inorgánicas cuya función es entregar el antibiótico a su destino final (Rosini *et al.*, 2020). Como ejemplo, podemos citar el Arikayce (suspensión para inhalación de liposomas de amikacina) aprobado por la FDA, basado en la utilización de liposomas para proteger con lípidos la degradación del antibiótico y utilizado para el tratamiento de *Mycobacterium avium* (FDA, 2018).

Otro método potencial para combatir las resistencias bacterianas es el sistema CRISPR-CAS, empleado naturalmente por las bacterias como protección frente a la invasión de material genético extraño (bacteriófagos o elementos genéticos móviles) (Aslam *et al.*, 2021), pero que se puede emplear para la eliminación directa de las bacterias patógenas, editando específicamente genes necesarios para su supervivencia en cromosomas bacterianos y plásmidos, o neutralizando específicamente genes de resistencia para sensibilizar de nuevo a las bacterias frente los antibióticos (Wu *et al.*, 2021; Lee, 2023).

En este momento existen otras estrategias antibacterianas en diversas fases de desarrollo (Zhou *et al.*, 2021; Shih *et al.*, 2022; Baran *et al.*, 2023) y es posible que en los próximos años pueda detenerse el incremento exponencial de las resistencias que se observa en la actualidad. Sin embargo, la mayoría de los autores coinciden en que pasarán años hasta disponer de las armas terapéuticas que necesitamos para considerar controlado este grave problema (Wang *et al.*, 2020a; Cook y Wright, 2022; Plotniece *et al.*, 2023).

1.3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Hasta la fecha se han identificado diversos mecanismos independientes de resistencia a los antibióticos, entre los que podemos destacar los siguientes:

I. Inactivación de antibióticos

La inactivación del antibiótico es una de las estrategias bacterianas más eficaces para contrarrestar su acción. Es un proceso que se basa en la producción de enzimas que inactivan la molécula antibiótica, transfiriéndole un grupo químico específico, como pueden ser el acetilo, fosforilo o adenilo, o degradándola en su totalidad. Ejemplos de estos tipos de mecanismos de inactivación son (i) la producción de beta-lactamasas, enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar el enlace amida del anillo betalactámico, volviendo disfuncionales a antibióticos betalactámicos como penicilina, amoxicilina, ampicilina, piperacilina, ceftazidima, imipenem y otros; (ii) la unión de tetraciclina-hidroxilasas para inactivar las tetraciclinas o (iii) la acetilación de los anfenicoles, por la que la enzima cloranfenicol-acetiltransferasa transfiere un grupo acetilo a la coenzima A, evitando que el cloranfenicol se una a su objetivo en el ribosoma (Reygaert, 2018; Lima *et al.*, 2020; Darby *et al.*, 2023; Ahmad *et al.*, 2023).

II. Disminución de la permeabilidad celular

Debido a que muchos antibióticos utilizados en la práctica clínica tienen dianas intracelulares, las bacterias pueden generar cambios que disminuyan la permeabilidad de la membrana y por tanto limiten su penetración. La adquisición de resistencias por este mecanismo se suele producir por cambios en las porinas de la membrana, tales como la disminución en su expresión, y por tanto en el número de porinas, el deterioro de su función, o la aparición de cambios en la estructura de las porinas expresadas. Todo ello disminuirá la cantidad de antibiótico que entra en la célula de forma efectiva. Por ejemplo, se han descrito cepas de *E. coli* multirresistentes aisladas de pacientes con mutaciones en los genes codificantes para la porina OmpC, que alteran la carga eléctrica del poro y afectan a la permeabilidad de

antibióticos como gentamicina o cefotaxima. Sin embargo, este mecanismo no suele aportar un alto grado de resistencia y normalmente se deben asociar a otros mecanismos para tener efectos observables a nivel clínico (Nikaido, 2003; Pulingam *et al.*, 2022; Darby *et al.*, 2023).

III. Activación de bombas de eflujo

Se trata de proteínas de membrana no específicas que reconocen y expulsan diversos compuestos perjudiciales para la célula, como antibióticos, desinfectantes, metales pesados u otros, sin degradarlos. Esta expulsión da como resultado una baja concentración intracelular del antibiótico, que no afectará al funcionamiento de la bacteria. La mayoría de las bacterias tienen muchos tipos de bombas de eflujo, codificadas por genes determinados cromosómicamente. Algunos de estos genes se expresan constitutivamente, mientras que otros se sobreexpresan o inducen en respuesta a determinadas señales. Cada vez más, se consideran el principal factor de resistencia frente a muchas familias de antibióticos. Se sabe que las bombas de eflujo contribuyen al fenotipo multirresistente de la gran mayoría de patógenos gramnegativos clínicamente relevantes, como son *E. coli*, *P. aeruginosa* o *Neisseria gonorrhoeae*, debido en gran medida a su amplio rango de sustratos. Las principales clases de antibióticos expulsados por este mecanismo son los betalactámicos, macrólidos y fluoroquinolonas (Li *et al.*, 2015; Reygaert, 2018; Darby *et al.*, 2023; Ahmad *et al.*, 2023).

IV. Modificación de la diana de acción

Las modificaciones en la diana del antibiótico constituyen uno de los mecanismos de resistencia más comunes, y afectan a la gran mayoría de familias. Gracias a la acción de determinadas enzimas, constitutivas o inducibles, las bacterias pueden producir proteínas modificadas que suplantando a las dianas originales, lo que provoca la incapacidad de unión del antibiótico y, consecuentemente, la resistencia al mismo. Un ejemplo bien conocido de este mecanismo se produce con las quinolonas, las cuales inhiben las enzimas topoisomerasas al unirse cerca de su sitio activo. La sustitución de varios aminoácidos en las proteínas diana provocan una menor eficiencia de unión, al mismo tiempo que permiten que la enzima siga funcionando (Francine, 2022; Darby *et al.*, 2023; Ahmad *et al.*, 2023).

V. Modificación de la ruta metabólica

Este mecanismo de resistencia consiste en desarrollar una vía alternativa a la que se ve afectada por el antibiótico. Por ejemplo, la vancomicina inhibe la síntesis de la pared celular uniéndose a la D-alanina-D-alanina, terminal de los precursores pentapeptídicos, lo que imposibilita el entrecruzamiento del peptidoglicano de la pared bacteriana. La resistencia a la vancomicina en los enterococos y otras bacterias grampositivas está mediada por la adquisición

de los genes *van*, siendo el grupo del gen *vanA* el más prevalente en las cepas clínicas resistentes. La expresión del gen *vanA* conduce a la síntesis anormal de precursores de peptidoglicano y, como consecuencia de ello, en lugar de unirse a D-alanina-D-alanina, la vancomicina ahora se une, con afinidad reducida, a D-alanina-D-lactato terminal o D-alanina-D-serina, permitiendo que la síntesis de la pared continúe y confiriendo de esta manera resistencia a las cepas de enterococos (Miller *et al.*, 2014; Darby *et al.*, 2023).

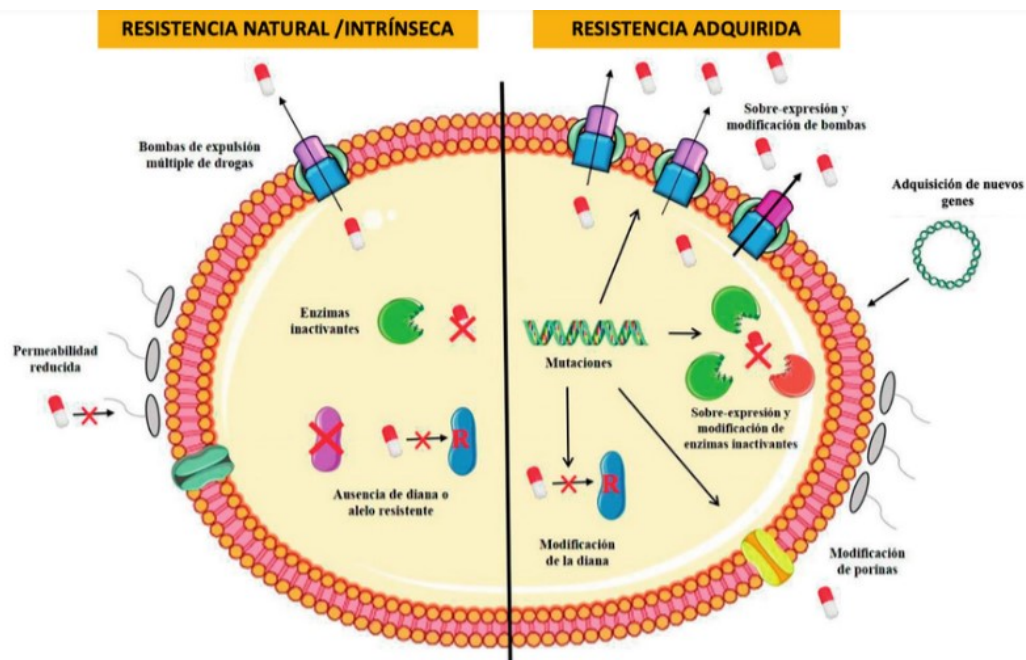


Figura 3. Principales mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida en bacterias (Pérez Gracia, 2021).

1.4. Base genética de las resistencias a antibióticos

Las bacterias pueden presentar dos tipos de mecanismos de resistencia a los compuestos con acción antimicrobiana: intrínsecos y adquiridos (Larsson y Flach, 2022). La resistencia intrínseca es aquella que permite a las bacterias permanecer activas en presencia de algunos antibióticos de forma natural, debido a sus características funcionales o componentes estructurales. Este tipo de resistencia es común a la mayoría de las cepas de un género o especie, es conocida y previsible, independiente de la exposición previa a dichos antibióticos y no está relacionada con la transmisión de material genético entre organismos. Por ejemplo, las enterobacterias son resistentes frente a la daptomicina (lipopéptido), debido a que los fosfolípidos aniónicos están presentes en menor proporción en la membrana citoplasmática de las bacterias gramnegativas, por lo que la introducción de daptomicina mediada por Ca^{2+} en la

membrana se ve muy dificultada. También las bacterias gramnegativas, al ser menos permeables que las grampositivas, muestran resistencia intrínseca a otros compuestos antibacterianos, como los glucopéptidos, que actúan sobre la pared celular (Aslam *et al.*, 2021; Baran *et al.*, 2023).

La resistencia adquirida, por el contrario, resulta de cambios en el genoma bacteriano, y se origina por la alta capacidad de adaptación genética que tienen los procariontes, capacidad que les permite responder a una amplia variedad de factores ambientales, incluidos los antibióticos, que amenacen su supervivencia (Durand *et al.*, 2019; Merrikh y Kohli, 2020). Desde una perspectiva evolutiva, las bacterias utilizan dos estrategias genéticas para adquirir nuevas resistencias: Por un lado, la mutación de genes cromosómicos y, por otro lado, la adquisición de material genético (DNA) foráneo que contiene genes de resistencia a antimicrobianos, con o sin posterior recombinación homóloga (Laws *et al.*, 2019; Huemer *et al.*, 2020; Aslam *et al.*, 2021; Francine, 2022; Darby *et al.*, 2023; Baran *et al.*, 2023).

1.4.1. Mutación cromosómica

A través de mutaciones espontáneas en su genoma, la bacteria, y posteriormente su descendencia, adquiere mayor resistencia frente a un determinado antibiótico. El proceso suele ser gradual: el estrés selectivo ejercido por la presencia de un antibiótico selecciona una mutación inicial que permite que la bacteria sobreviva, y mutaciones posteriores confieren mayor resistencia frente al antibiótico en siguientes contactos. Una vez que emerge un mutante resistente, en presencia del antibiótico se elimina la población susceptible y predominan las bacterias resistentes (Munita y Arias, 2016). En muchos casos, los cambios producidos por las mutaciones que dan lugar a estas resistencias son costosos para la homeostasis celular y solo se mantienen en presencia del antimicrobiano (Laws *et al.*, 2019; Huemer *et al.*, 2020; Aslam *et al.*, 2021; Francine, 2022).

1.4.2. Transferencia horizontal de genes

Este proceso es uno de los promotores más importantes de la evolución bacteriana y es el gran responsable del desarrollo y propagación de las resistencias a antimicrobianos. Los elementos genéticos que participan en el reclutamiento y transferencia de genes son los plásmidos, bacteriófagos, elementos conjugativos autotransferibles (ICE), islas genómicas, transposones e integrones. Estos procesos pueden tener lugar en cualquier nicho ecológico, como el suelo, los alimentos, el sistema digestivo de humanos y animales o las aguas (Laws *et al.*, 2019; Huemer *et al.*, 2020; Aslam *et al.*, 2021; Francine, 2022).

Los genes de resistencia a antibióticos (ARG) se encuentran en el ambiente en forma intracelular (iARG) pero también extracelular (eARG), persistiendo incluso después de que se eliminen los antibióticos o la bacteria hospedadora haya muerto, lo que se conoce como su rasgo "fácil de obtener, difícil de perder" (Mao *et al.*, 2014). Los iARG pueden promover la diseminación de resistencias a través de la conjugación y la transducción, mientras que los eARG, derivados de la lisis de células muertas y la secreción de células vivas (Dong *et al.*, 2019), pueden ser transferidos entre bacterias a través de mecanismos de transformación (Liu *et al.*, 2018).

I. Conjugación

La conjugación es el proceso en el cual dos bacterias, mediante un contacto estrecho entre sus membranas, comparten material genético (DNA). Los elementos genéticos móviles conjugativos impulsan la propagación de genes en poblaciones utilizando gran variedad de mecanismos, a menudo codificados por los propios elementos. Estos elementos móviles pueden ser extracromosómicos, como los plásmidos, o integrativos, tales como transposones conjugativos.

La conjugación se puede producir entre especies de distintos géneros (Evans *et al.*, 2020), se le considera el mecanismo de transferencia horizontal más importante y eficiente en la propagación de ARG y juega un papel clave en la selección y desarrollo de bacterias multirresistentes, tanto en el ambiente (Price *et al.*, 2019) como en el entorno hospitalario (Abe *et al.*, 2020).

II. Transformación

La transformación es un proceso que implica la incorporación y posterior recombinación homóloga con fragmentos de DNA libre (eDNA) en una bacteria competente. Estos fragmentos de DNA proceden de virus y bacterias lisadas, o de la secreción de células vivas. Normalmente, este mecanismo se da entre cepas bacterianas similares o cepas de la misma especie. Hasta hace poco se consideraba un fenómeno poco importante, debido a que solo unas pocas bacterias patógenas son capaces de captar eDNA portador de genes de resistencia. En los últimos años se ha observado, sin embargo, que el papel del DNA libre en la propagación de resistencias antimicrobianas es mayor de lo que se pensaba y, de hecho, en la actualidad son cada vez más las bacterias para las que se describe la implicación de procesos de transformación para captar ARG (Lam *et al.*, 2021; Francine, 2022).

III. Transducción

La transducción es un mecanismo de transferencia de material genético mediado por bacteriófagos, proceso que permite añadir nueva información genética al genoma bacteriano

de una manera eficaz y bastante simple. Se piensa que este mecanismo también puede estar subestimado y aún falta por conocer la influencia real que tiene en la adquisición de resistencias en diferentes poblaciones bacterianas (Modi *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 2019).

1.5. Principales familias de genes implicados en la resistencia a los antibióticos

1.5.1. Genes de resistencia a antibióticos betalactámicos

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos se pueden clasificar en tres grupos:

1) Modificación de la diana en las proteínas de la membrana específicas de unión a los betalactámicos (Penicillin Binding Proteins, PBP). Diferentes alteraciones en las PBP (mutaciones, hiper-expresión y modificación de la afinidad) pueden dificultar la unión del betalactámico a la proteína, lo que disminuye su actividad. Estas alteraciones de la diana ocurren como resultado de mutaciones genéticas, aunque también se pueden adquirir mediante intercambio genético. Éste es el mecanismo principal de resistencia a antibióticos betalactámicos de los microorganismos grampositivos (Jubeh *et al.*, 2020). Por ejemplo, el gen *mecA* (Peacock y Paterson, 2015), residente en un casete cromosómico y que se cree que fue adquirido mediante transferencia horizontal de genes, codifica la PBP2a que se encuentra en algunas cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM), haciendo que la PBP2a presente una disminución de la unión no covalente de estos fármacos al sitio activo, así como una reducción de la acilación posterior, lo que hace que no se inhiba por la gran mayoría de los betalactámicos disponibles, ocurriendo lo mismo con el gen *mecC* (Paterson *et al.*, 2014). Otro ejemplo es el de *S. pneumoniae*, cuya resistencia a los betalactámicos se debe a la existencia de genes en mosaico, adquiridos por transformación natural, que codifican PBPs con baja afinidad por sus inhibidores (Brückner *et al.*, 2004). También podemos encontrar PBPs modificadas generadas a partir de recombinaciones o mutaciones, como PBP1 de *Helicobacter pylori*, PBP1 y PBP2 de *N. gonorrhoeae* y PBP3 de *Haemophilus influenzae* (King *et al.*, 2014, 2017).

2) Alteraciones en la permeabilidad y bombas de eflujo. Ante la barrera que supone la membrana celular, especialmente en las bacterias gramnegativas, las sustancias poco lipofílicas (como los betalactámicos) precisan proteínas transmembrana (porinas) que le faciliten la entrada al espacio periplásmico para poder unirse a las PBP. Éste es uno de los motivos por los que, con algunas excepciones, los microorganismos gramnegativos, son generalmente más resistentes a algunos antibióticos, como betalactámicos o vancomicina, que los grampositivos (Breijyeh *et al.*, 2020). Algunas alteraciones en la permeabilidad (mutaciones, hiper-expresiones

de porinas) pueden modificar la resistencia basal a los betalactámicos. Como ejemplos podemos citar la pérdida del gen *OmpF* o las mutaciones en *OmpC*, implicadas en la resistencia de *E. coli* a los betalactámicos. La resistencia de *P. aeruginosa* a los carbapenemes se ha relacionado con combinaciones de mutaciones que pueden causar problemas en la modulación en la expresión o la pérdida total de la porina general OprD (King *et al.*, 2014, 2017).

Las bombas de eflujo pertenecientes a las superfamilias MFS, ABC, SMR, RND y MATE, son capaces de reconocer múltiples sustratos, entre ellos muchas familias de antibióticos. En las bacterias grampositivas, los sistemas de eflujo de MFS (como, por ejemplo, el codificado por *NorA* en *S. aureus*) son los principales responsables de la aparición de multirresistencias, mientras que en las bacterias gramnegativas los sistemas RND (como, por ejemplo, los codificados por *MexAB-OprM* en *P. aeruginosa* o *AcrAB-TolC* en *E. coli*) contribuyen a la resistencia de estas bacterias (King *et al.*, 2014, 2017).

3) Producción de enzimas (betalactamasas). Representa el principal mecanismo de resistencia frente a los antibióticos betalactámicos, fundamentalmente en microorganismos gramnegativos, aunque también pueden producirlas grampositivos y anaerobios. Las betalactamasas son enzimas situadas en el espacio periplásmico, que hidrolizan el anillo betalactámico y que, por tanto, inactivan el antibiótico antes de su unión con las PBP. Su producción puede estar mediada por plásmidos o puede estar codificada cromosómicamente. En el caso de los microorganismos productores de betalactamasas de origen cromosómico, estos son mayoritariamente inducibles (aumenta su producción tras la exposición a betalactámicos, especialmente cefalosporinas) y algunos no son inactivados por los inhibidores de betalactamasas. En el caso de tratarse de genes plasmídicos, estos son transferibles y los inhibidores de las betalactamasas suelen inactivar las enzimas producidas.

Muchos tipos diferentes de betalactamasas confieren resistencia a los antibióticos betalactámicos clínicamente más importantes, ya que un solo cambio de aminoácido puede afectar la especificidad del sustrato de la enzima. Existen dos clasificaciones: Una, basada en su estructura (Ambler, 1980; Naas *et al.*, 2017), distingue cuatro clases (A, B, C y D) según la interacción enzima-sustrato y sus secuencias de aminoácidos. Las clases A, C y D se caracterizan por la presencia de una serina en el sitio activo que media la hidrólisis (Knott-Hunziker *et al.*, 1979), mediante la acilación del antibiótico, formando un complejo enzima-sustrato que luego es hidrolizado por el agua. Las de clase B poseen una o dos moléculas de zinc asociadas al sitio activo (metalo-betalactamasas), atacando directamente a los grupos carbonilo y amida de todos los antibióticos betalactámicos en general, salvo los monobactámicos (Zhang y Hao, 2011).

La otra clasificación de betalactamasas, basada en su funcionalidad, considera aspectos como los pesos moleculares, puntos isoeléctricos, perfiles de sustrato y capacidad de ser inhibidas por sustancias como el ácido clavulánico y tazobactam o el EDTA. Hay al menos 17 grupos funcionales asociados con cuatro clases moleculares (Bush y Jacoby, 2010).

Las betalactamasas están codificadas por los genes *bla*, ya sean plasmídicos o cromosómicos. Estos genes a menudo coexisten con otros determinantes de resistencia a los antibióticos, asociándose a elementos genéticos móviles, lo que aumenta la posibilidad de resistencia a múltiples fármacos y su diseminación ambiental. El medio ambiente es un reservorio idóneo de resistencia a los antibióticos betalactámicos y se han identificado numerosos genes *bla* en bacterias encontradas en EDAR, aguas, acuicultura, aguas superficiales, etc., tanto saprofitas como patógenas (Zhang *et al.*, 2009b).

De la clasificación de las betalactamasas basada en su funcionalidad (Bush *et al.*, 1995) las serina-betalactamasas del grupo 2, incluidas las clases moleculares A y D, representan el grupo más grande de betalactamasas. Destaca el subgrupo 2b (enzimas que hidrolizan fácilmente las penicilinas y cefalosporinas y son inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam), en el que se incluyen las enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 codificadas por los genes *bla*_{TEM-1}; *bla*_{TEM-2} y *bla*_{SHV1}. Una actualización sobre estas enzimas se puede consultar en la base de datos de betalactamasas (Naas *et al.*, 2017).

La betalactamasa de tipo TEM fue la primera betalactamasa transmitida por plásmidos identificada en bacterias gramnegativas y es activa contra aminopenicilinas y las primeras cefalosporinas. Existen más de 250 variantes alélicas de esta betalactamasa (Naas *et al.*, 2017; National Library of Medicine, 2023). SHV comparte similitud estructural y de secuencia con TEM; en concreto, SHV-1 tiene una similitud del 68% con TEM-1. El gen *bla*_{SHV} se ha detectado en lodos activados y efluentes de EDAR (Szczepanowski *et al.*, 2009; Marti *et al.*, 2013).

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) pertenecen al subgrupo 2be según la clasificación de Bush y Jacoby y al grupo A de la clasificación de Ambler. Forman un grupo de enzimas que confieren resistencia significativa a las penicilinas, aminopenicilinas, oximiinocefalosporinas y monobactam. Su actividad es inhibida por los inhibidores de las betalactamasas, como el ácido clavulánico (Coque *et al.*, 2008). Los tipos de BLEE son diversos, pero los más comunes son derivados enzimáticos de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, mediante sustituciones de aminoácidos, lo que amplía su espectro de sustrato a costa de una menor actividad hidrolizante. Las betalactamasas TEM tipo BLEE se encuentran principalmente en bacterias gramnegativas, especialmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*. Se han recuperado variantes

del gen TEM en afluentes, lodos activados y efluentes de EDAR (Korzeniewska y Harnisz, 2013; Biswal *et al.*, 2014; Neudorf *et al.*, 2017).

Las BLEE TEM y SHV estuvieron entre las primeras BLEE descritas en la década de 1980 y fueron predominantes hasta el año 2000, cuando emergieron las BLEE CTX-M (cefotaximasa de Munich), detectándose en animales y humanos en todo el mundo (Castanheira *et al.*, 2021). Los genes que codifican las enzimas betalactamasas CTX-M suelen ser transportados por plásmidos y muestran una similitud de secuencia del 40% con los genes que codifican las betalactamasas TEM o SHV. El grupo CTX-M incluye más de 80 variantes, que se encuentran principalmente en cepas de enterobacterias, y confiere una resistencia significativamente mayor contra la cefotaxima en comparación con otras cefalosporinas, como la ceftazidima, la ceftriaxona o la cefepima (Partridge, 2015). Se han identificado variantes del gen *bla*_{CTX-M} en afluentes, lodos activados y efluentes de EDAR (Szczepanowski *et al.*, 2009; Korzeniewska y Harnisz, 2013; Biswal *et al.*, 2014), siendo los genes ESBL *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-52} y *bla*_{SHV-12} los más comunes en el ambiente (EFSA, 2011). En humanos, el más común es *bla*_{CTX-M-15}, que se asocia con el clon pandémico de *E. coli* O25:H4-ST131 (Jaen-Luchoro *et al.*, 2023).

Las enzimas de tipo OXA, que pertenecen a la clase molecular D, se diferencian completamente de las enzimas TEM y SHV. Los genes *bla*_{OXA} muestran un 20% de similitud de secuencia con los otros genes que codifican BLEE. Estos genes se han recuperado de lodos activados y efluentes de las EDAR (Szczepanowski *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2013).

Las betalactamasas de clase C, denominadas enzimas tipo AmpC, confieren resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro (Jacoby, 2009). Los genes que las codifican son a menudo cromosómicos, aunque también pueden ser plasmídicos. Las enzimas AmpC codificadas por plásmidos más comunes son las betalactamasas de tipo CMY, DHA y ACC, teniendo las enzimas de tipo CMY una mayor prevalencia en todo el mundo, y siendo el CMY-2 el más prevalente en Europa y el norte de África (Zorgani *et al.*, 2017). Los genes *bla*_{CMY}, se han detectado en efluentes y el lodo activado de diversas EDAR (Pires *et al.*, 2023).

Las carbapenemasas son betalactamasas de amplio espectro que producen resistencia a los antibióticos carbapenémicos como imipenem, meropenem, etc. La mayoría son betalactamasas de clase A (carbapenemasa de *K. pneumoniae*, KPC) y metalo-betalactamasas (MBL) de clase B, que contienen iones de zinc en lugar de serina en su sitio activo. Las enzimas VIM, IMP y NDM (metalo-betalactamasa de Nueva Delhi) y la betalactamasa de clase D oxaciclina 48 (OXA-48) son las más prevalentes en general (Potter *et al.*, 2016; Wilson y Török, 2018; Mills y Lee, 2019). La mayoría de los genes de carbapenemasas se transmiten por plásmidos (Wilson

y Török, 2018; Mills y Lee, 2019). Los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC} y *bla*_{NDM}, se encuentran comúnmente en enterobacterias y se han detectado en efluentes hospitalarios, lodos activados y efluentes de EDAR (Alexander *et al.*, 2015; Cahill *et al.*, 2019).

1.5.2. Gen de resistencia a meticilina

La resistencia a la meticilina se debe a la adquisición del gen *mecA*, que codifica la proteína fijadora de penicilina (PBP) PBP2a, supernumeraria, que posee baja afinidad por todos los antibióticos betalactámicos y, por tanto, confiere resistencia a todos estos compuestos, con la excepción de alguna cefalosporina. Esta resistencia se presenta generalmente en *S. aureus*. La expresión de la resistencia mediada por este gen es compleja y se afecta por diferentes factores como la temperatura, el pH o la osmolaridad, así como por la presencia de secuencias cromosómicas reguladoras y de otros genes cromosómicos (Morosini *et al.*, 2012).

1.5.3. Genes de resistencia a tetraciclinas

Se conocen al menos 60 genes de resistencia a la tetraciclina (*tet*) y tres a la oxitetraciclina (*otr*) (Agga *et al.*, 2022). De estos, unos producen proteínas de eflujo, otros codifican proteínas de protección ribosomal y otros están implicados en procesos enzimáticos de inactivación o modificación del antibiótico (Mao *et al.*, 2015; Grossman, 2016; Kim *et al.*, 2016). La mayoría de ellos han sido encontrados en bacterias medioambientales (Bryan *et al.*, 2004).

Hay descritas más de treinta y seis bombas de eflujo específicas de tetraciclina, asignadas a siete grupos diferentes, según las similitudes de las secuencias de aminoácidos y el número de veces que atraviesan la membrana interna. Las Tet(A) y Tet(B) codificadas por los genes *tet*(A), *tet*(B) son las más frecuentes en los microorganismos gramnegativos y las bombas Tet(K) y Tet(L) codificadas por los genes *tet*(K), *tet*(L) son las más frecuentes en las bacterias grampositivas (Grossman, 2016; Markley y Wencewicz, 2018)

También hay descritos más de 13 genes de protección ribosómica (RPP), destacando *tet*(O), *tet*(M) y *tet*(W) como los más frecuentes, tanto en microorganismos grampositivos como en gramnegativos. Su mecanismo de resistencia consiste en codificar proteínas GTPasas con una secuencia y similitud estructural con los factores de elongación EF-G y EF-Tu, que tienen la capacidad de bloquear la unión de la tetraciclina a la subunidad 30S del ribosoma (Grossman, 2016). Estos genes se diseminan a través de poblaciones bacterianas en elementos genéticos móviles (Roberts, 2011). Otros genes de resistencia, como *tet*(X), *tet*(34) y *tet*(37) y el gen *tet*(U) y *otr*(C), están implicados en la inactivación enzimática, por mecanismos de acción poco conocidos (Agga *et al.*, 2022).

Los genes codificadores de bombas de eflujo *tetA*, *tetA(C)*, *tetA(P)*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetH*, *tetJ*, *tetK*, *tetL*, *tetV*, *tetY*, *tetZ* se han encontrado en lodos activos de plantas de tratamiento de aguas, piscifactorías y aguas superficiales (Guillaume *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2001; Poppe *et al.*, 2006; Dang *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2015; Jiao *et al.*, 2018; Pazda *et al.*, 2019). Diversos genes codificadores de protección ribosómica como *ortA*, *tetB(P)*, *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetS*, *tetT*, *tetW* o *tetX* han sido encontrados en EDAR, hospitales, plantas de producción animal, aguas residuales y ambientes acuáticos naturales (Pazda *et al.*, 2019).

1.5.4. Genes de resistencia a las sulfonamidas y trimetoprim

Muchas bacterias utilizan la vía de la síntesis de folatos para la síntesis de purinas, y por ende de ácidos nucleicos, ya que son incapaces de obtener el ácido fólico del medio externo. Las sulfamidas actúan compitiendo con el ácido paraaminobenzoico por la enzima dihidropteroato sintetasa y el trimetoprim inhibe de forma reversible la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). Se han encontrado diferentes mecanismos que confieren resistencias a las sulfonamidas, codificados mayoritariamente por los genes *sul*, mediados por elementos móviles (Huovinen *et al.*, 1995; Antunes *et al.*, 2006), mientras que en el caso del trimetoprim el mecanismo más extendido es la sustitución de una DHFR sensible a trimetoprim por una DHFR resistente, codificada por genes transmitidos por plásmidos, transposones o cassetes (Sköld, 2001; Blahna *et al.*, 2006).

El gen *sul1* forma parte de integrones de clase 1 y a menudo se transmite junto con otros ARG que se encuentran en cassetes de genes en su región variable (Recchia y Hall, 1995). El gen *sul2* aparece con frecuencia en plásmidos que albergan otros ARG. El gen *sul3* se asocia a menudo con integrones inusuales de clase 1 y se ha relacionado con el gen de resistencia a macrólidos *mef(B)* (Siqueira *et al.*, 2016). Los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* están ampliamente distribuidos en el medio ambiente y se han encontrado en efluentes y lodos activados (Szczepanowski *et al.*, 2009), en los efluentes de EDAR (Xu *et al.*, 2015), granjas ganaderas (Perreten y Boerlin, 2003), suelos agrícolas (Ji *et al.*, 2012), ríos (Jia *et al.*, 2018) y zonas costeras.

La mayoría de los genes de resistencia al trimetoprim, *dfrA* y *dfrB*, se encuentran en cassetes de genes integrados en integrones de clase 1 o clase 2. La aparición de genes *dfr* en las matrices ambientales es común. Los genes *dfrA1*, *dfrA7*, *dfrA12* y *dfrA17* se encontraron como parte de integrones en una laguna contaminada en Portugal (Henriques *et al.*, 2006) y, *dfrA1* y *dfrA12* se encontraron en una EDAR con conexión a un matadero (Moura *et al.*, 2007). El gen *drfA1* también se ha detectado en aguas superficiales de Alemania y Australia (Stoll *et al.*, 2012). Y *dfrAse* se ha detectado tanto en el afluente como en el efluente de una EDAR (Bengtsson-

Palme *et al.*, 2016), mientras que se han detectado *dfrA* y *dfrB* en lodos activados (Szczepanowski *et al.*, 2009).

1.5.5. Genes de resistencia a los antibióticos macrólidos

La resistencia a macrólidos está determinada fundamentalmente por dos mecanismos: expresión de bombas de eflujo y modificación de la diana del antibiótico. Los genes implicados en las bombas de eflujo para cocos grampositivos son: *mefA*, *mefE*, *msrA*, *msrB* y *erpB* (Iannelli *et al.*, 2014). El otro mecanismo es la modificación de la diana del antibiótico, siendo el gen *erm* (erythromycin ribosome metylation), con sus diferentes variantes, el responsable más común de esta resistencia. El gen *erm* codifica una metilasa que altera la diana de unión del antibiótico al ribosoma bacteriano, impidiendo su unión. Ello genera resistencias a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina tipo b, que comparten mecanismo de acción (Seppala *et al.*, 1998). Del gen *erm* existen variantes entre distintas especies: *ermA*, *ermC*, *ermB*, *ermAM*, *ermF*, *ermD*, *ermG*, *ermE*, *ermA* y *ermTR* (Seppälä *et al.*, 1998). Los genes *erm* se pueden encontrar en plásmidos pequeños o en el cromosoma bacteriano. Estos genes de resistencia son inducibles por el antibiótico (Vázquez-Laslop y Mankin, 2018).

1.5.6. Genes de resistencia a quinolonas

Los mecanismos de resistencia a las quinolonas impiden que el antibiótico alcance sus dianas, la ADN girasa y la topoisomerasa IV, mediante tres mecanismos:

1) Resistencia de tipo cromosómico, debida a mutaciones en segmentos definidos, las QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) de los genes que codifican para la ADN girasa (*GyrA* y *GyrB*) y la topoisomerasa IV (*ParC* y *ParE*) (Ambrožič *et al.*, 2007). Aparecen por errores de transcripción durante la replicación cromosómica (Sanders, 2001). La mutación en *gyrA* es el mecanismo que se encuentra con mayor frecuencia involucrado en la resistencia a estos antibióticos entre las bacterias gramnegativas (Gruger *et al.*, 2004).

2) Reducción de la concentración intracitoplasmática del antibiótico, bien mediante reducción pasiva de la permeabilidad de las porinas o mediante sobreexpresión de bombas de eflujo (Li y Nikaido, 2009).

3) Resistencia mediada por plásmidos (PMQR). Se han descrito tres tipos de genes de resistencia: gen *qnr*, gen variante de la aminoglucósido-acetil-transferasa (*aac(6')-Ib-cr*) y genes codificadores de bombas de eflujo (*qepA* y *oqxAB*) (Cattoir *et al.*, 2008; Strahilevitz *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2011). Los *qnr* son genes que confieren baja resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas. Se han identificado seis familias: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* y *qnrCV* (Cavaco *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Pons *et al.*, 2013). Todos ellos codifican la formación de una

proteína de 218 aminoácidos que protege a la ADN girasa y la topoisomerasa IV mediante la reducción de las dianas en la holoenzima (Pham *et al.*, 2019). Estos genes no solo incrementan el número de mutaciones que causan resistencia a quinolonas, sino que suelen combinarse con otros genes dentro del mismo plásmido para generar resistencia cruzada con otros antimicrobianos (Hernández *et al.*, 2011).

1.5.7. Genes de resistencia a los antibióticos aminoglucósidos

El mecanismo más importante de resistencia frente a los aminoglucósidos consiste en su desactivación mediante modificación enzimática, acetilando el grupo amino del antibiótico (aminoglucósido acetiltransferasa), adenilando el grupo hidroxilo del antibiótico (adeniltransferasa) o fosforilando el grupo hidroxilo (fosfotransferasa). Otros mecanismos son la producción de cambios en los sitios de unión ribosomales mediante metilación de la subunidad 16S (16S rRNA metilasas) o la modificación de la diana por mutación del ARNr 16S o de proteínas ribosomales (Poirel *et al.*, 2018). Se han encontrado muchísimas enzimas modificadoras de aminoglucósidos (Vakulenko y Mobashery, 2003; Ramón-García *et al.*, 2006; Lund *et al.*, 2023). Las codificadas por los genes *aac*, *aph* y *ant*, están vinculados en su mayoría a elementos móviles, principalmente integrones (Ramírez y Tolmasky, 2010), que han sido aislados de zonas contaminadas o ambientes acuáticos naturales (Lund *et al.*, 2023). Se han detectado variantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos en bacterias aisladas de aguas residuales hospitalarias, tanto en el afluente como en el efluente de las EDAR (Khan *et al.*, 2019).

Respecto al otro mecanismo de resistencia, mediado por las metiltransferasas de ARNr 16S (RMTasas), estas son transmitidas por genes plasmídicos que codifican para enzimas metiladoras del ARNr 16S de la subunidad ribosomal 30S, lo que interfiere con la unión de los aminoglucósidos y produce un alto nivel de resistencia a estos antibióticos (Wachino y Arakawa, 2012). Algunos de estos genes que codifican 16S rRNA metilasas, particularmente los genes *armA* y *rmtB*, se han encontrado en aguas residuales municipales, aguas residuales hospitalarias y tanto en afluentes como en efluentes de EDAR (Zurfluh *et al.*, 2017).

1.5.8. Genes de resistencia a la polimixina

Las polimixinas son polipéptidos catiónicos cíclicos cuya diana es el lípido A del lipopolisacárido de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, provocando la ruptura de la pared celular (Sun *et al.*, 2018). Uno de los antibióticos de esta familia, la colistina (polimixina E) se ha utilizado como profiláctico y promotor del crecimiento en los animales de granja y su resistencia en *E. coli* parece estar relacionada con este uso en medicina veterinaria a

escala global. En 2016 se informó por vez primera sobre la detección en *E. coli* del gen *mcr-1*, (Liu *et al.*, 2016), que provoca resistencia a este antibiótico. A partir de entonces se han descubierto otros genes (*mcr-2* a *mcr-8*) transmitidos en su mayoría por plásmidos. La presencia de *mcr-1* se ha confirmado en todos los continentes (Zhuang *et al.*, 2021).

1.5.9. Genes de resistencia a los antibióticos glucopéptidos

De los glucopéptidos, la vancomicina es el antibiótico más relevante, ya que se utiliza como última línea terapéutica, especialmente en infecciones por enterococos (Li *et al.*, 2023). En la actualidad, su resistencia se asocia fundamentalmente a tres genotipos, determinados por los genes *VanA*, *VanB* y *VanC*, aunque se han descrito más.

Las cepas con fenotipo *VanA* se caracterizan por presentar resistencia inducible de alto nivel, tanto a la vancomicina como a la teicoplanina. Su mecanismo de resistencia consiste en sintetizar el péptido D-Alanil-D-lactato, en lugar del dipéptido terminal de la pared celular D-Alanil-D-Alanina, diana de la vancomicina. La expresión de la resistencia a este antibiótico dependerá del desequilibrio que exista entre uno y otro, actuando otras proteínas *Van* en el proceso. Este tipo de resistencia es transferible. El fenotipo de resistencia *VanB* determinado por la presencia del gen *vanB*, se caracteriza por niveles variables de resistencia a la vancomicina y sensibilidad a la teicoplanina, y se asocia a la movilización de material genético de elevado peso molecular entre cromosomas por conjugación (Selim, 2022).

1.5.10. Genes de resistencia a los anfenicoles

Los anfenicoles son agentes antimicrobianos de amplio espectro. Debido a su toxicidad y a los importantes efectos adversos en humanos del cloranfenicol y sus derivados (tiamfenicol y el azidamfenicol), su uso en ganadería fue prohibido en 1994 en la Unión Europea.

La resistencia a los anfenicoles en *E. coli* está mediada por tres mecanismos principales: la inactivación enzimática por cloranfenicol-acetiltransferasas codificadas por genes *cat*, la expulsión mediante bombas de eflujo (genes *cmIA* y *floR*) y la metilación del sitio objetivo por una ARNr-metilasa codificada por el gen de multiresistencia *cfp*, que confiere resistencia a cinco clases de agentes antimicrobianos, incluidos los anfenicoles. Los genes *catA1*, *cmIA* y *floR* se encuentran a menudo en plásmidos (Poirel *et al.*, 2018).

1.6. El problema de las multirresistencias

La creciente aparición y propagación de especies microbianas resistentes, y la asociación de determinantes de resistencia en la interfaz humano-animal-ambiente, pueden alterar los genomas microbianos, provocando la aparición de “superbacterias” resistentes.

Cuando buscamos la definición de “multirresistencia” vemos que en la literatura médica se utilizan muchas expresiones diferentes para caracterizar los diferentes patrones de resistencia. Un grupo de expertos internacionales se unió en 2012, a través de una iniciativa conjunta del ECDC y el CDC, para crear una terminología internacional estandarizada con la que describir los perfiles de resistencia adquirida en *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae* (excepto *Salmonella* y *Shigella*), *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. **Multirresistencia (MDR)** se definió como la no susceptibilidad adquirida a al menos un agente en tres o más categorías antimicrobianas. **Resistencia extrema (XDR)** se definió como la no susceptibilidad a al menos un agente en todas menos dos o menos categorías antimicrobianas (es decir, los aislados bacterianos siguen siendo susceptibles sólo a una o dos categorías) y la **Pan-resistencia (PDR)** se definió como la no susceptibilidad a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2012).

En la actualidad, la incidencia de patógenos MDR que albergan determinantes de resistencia adquirida está aumentando en todo el mundo. La producción de diferentes enzimas como BLEE, metalo-betalactamasas (MBL) y carbapenemasas, asociadas con la resistencia a las cefalosporinas y los carbapenémicos, se ha generalizado. ARG bien conocidos, como *bla*_{TEM}, *bla*_{CTXM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} y *mcr-1* son responsables de la aparición de cepas MDR de *E. coli*, *P. aeruginosa*, etc. (Aslam *et al.*, 2018). La relación humano-animal-ambiente da a cada una de estas poblaciones la capacidad de actuar como un reservorio con potencialidad para la diseminación en cualquier dirección (Hassell *et al.*, 2017), mediante la multiplicación clonal de bacterias resistentes o mediante la transferencia horizontal de genes (Chang *et al.*, 2015).

En este aumento del número de microorganismos resistentes en todo el mundo, los patrones específicos varían considerablemente entre países. Ha habido un aumento significativo en toda Europa en los porcentajes de *K. pneumoniae* resistente a fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos, así como resistencia combinada a los tres grupos de antibióticos, mientras que, en *Acinetobacter* spp., existe una variabilidad considerable en las tasas de resistencia, pero se han reportado altos porcentajes (>50 %) de aislamientos con resistencia combinada a fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenémicos

en el sur de Europa (Karam *et al.*, 2016). Estos datos han sido confirmados con los resultados publicados por el ECDC para muestras humanas y de alimentos de origen animal (WHO, 2022a).

Centrándonos en *E. coli*, microorganismo indicador empleado para valorar la diseminación de patrones de resistencia en el ambiente (EFSA, 2019; Diario Oficial de la Unión Europea, 2020a), la resistencia a múltiples fármacos se observa cada vez más en la medicina humana y veterinaria en todo el mundo. Durante la última década, varios clones pandémicos de *E. coli* uropatógena MDR (como ST131 y ST95) se han diseminado globalmente (De Oliveira *et al.*, 2020). En toda Europa se observan altas tasas de resistencia a aminopenicilinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y cefalosporinas de tercera generación en estas cepas (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, 2019). Aunque la resistencia a los carbapenémicos es poco común en las cepas invasivas de *E. coli*, la situación general en Europa para las enterobacterias resistentes a las carbapenemasas (CRE), incluida *E. coli*, empeoró entre 2010 y 2018 (Brolund *et al.*, 2019). Además, en 2016 se identificó resistencia a una polimixina de último recurso, la colistina, en cepas de *E. coli* multirresistentes aisladas de granjas porcinas en China (Liu *et al.*, 2016).

Los plásmidos, especialmente los plásmidos de resistencia múltiple (plásmidos MDR), pero también otros elementos genéticos móviles, como los transposones y los casetes de genes en los integrones de clase 1 y 2, desempeñan un papel fundamental en la diseminación conjunta de genes de resistencia. La adquisición de genes que codifican betalactamasas de espectro extendido, carbapenemasas, 16S rRNA metilasas, plásmidos PMQR que confieren resistencia a las fluoroquinolonas, y genes *mcr*, son los casos más frecuentes y problemáticos (Poirel *et al.*, 2018, Kompes *et al.*, 2023; Connor *et al.*, 2023).

Cabe reseñar que las cepas de *E. coli* de origen animal a menudo también muestran resistencia a otros antibióticos, en su mayoría más antiguos, como tetraciclinas, anfénicoles, sulfonamidas, trimetoprim y fosfomicina, que a veces se encuentran ubicados en los mismos elementos genéticos junto a determinantes de resistencia crítica en humanos, provocando su co-selección y persistencia tras el tratamiento masivo con antibióticos de uso en veterinaria (Poirel *et al.*, 2018).

1.7. El medio ambiente como reservorio y agente de dispersión de determinantes de resistencia a antibióticos

Debido a la importancia de los antibióticos para la protección de la Salud Pública y la producción de alimentos, cada vez existe un mayor interés en conocer las fuentes ambientales,

los reservorios y las vías de transmisión de la resistencia a los antibióticos, para poder comprender y gestionar la crisis de las resistencias en su conjunto, tal como exige la estrategia “One Health” (Larsson y Flach, 2022).

Como ya se ha comentado, los dos orígenes de la adquisición de resistencias a antibióticos son las mutaciones en el genoma de la bacteria y la transferencia de DNA foráneo. Las mutaciones ocurren al azar y son independientes del reservorio genético de otras especies, por lo que el medio ambiente no tiene un papel importante en la aparición de estas resistencias, aunque sí en su posterior selección y dispersión. Sin embargo, la presión selectiva debido a la presencia de residuos de antibióticos sí que influye en la probabilidad de aparición más rápida de bacterias resistentes a los antibióticos por transferencia horizontal de genes: en este ambiente hostil, las bacterias pueden entrar en fase de “respuesta estricta” o generar biopelículas, lo que multiplica la velocidad de intercambio genético (Prinzi y Rohde, 2023).

Una vez aparecida una población resistente, esta presión selectiva debida a la presencia de antibióticos en el medio, mantendrá y aumentará las poblaciones de microorganismos resistentes, ya hayan sido originados por mutación o por transferencia horizontal, debido a su mejor competencia ecológica, provocando su dispersión en el entorno.

El medio ambiente actúa como conector de todos los nichos (suelos, agua, humanos, animales, red de distribución de aguas, vegetales, etc.) en los que pueden encontrarse determinantes de resistencias a antimicrobianos (Figura 4). Es un receptor de ARB y de ARG, actuando como reservorio y fuente de genes de resistencia (Martinez, 2009; Wright, 2010; Quintela-Baluja *et al.*, 2015; Williams-Nguyen *et al.*, 2016; Pepper *et al.*, 2018).

El agua, el suelo y otros nichos ecológicos con gran biodiversidad bacteriana proporcionan una enorme fuente genética, con numerosos genes de resistencia (“resistoma”) que pueden ser transferidos entre bacterias (Dantas *et al.*, 2008; Forsberg *et al.*, 2012; Pawlowski *et al.*, 2016; Berglund *et al.*, 2017; Berglund *et al.*, 2020). Existen infinidad de trabajos científicos en los que se observan diferentes patrones de prevalencia de genes de resistencia en el ambiente, dependiendo de factores tales como la localización geográfica o el tipo de muestra. Zhuang *et al.* (2021) realizaron un meta-estudio en el que se recogieron publicaciones de treinta años (1990-2020), que mostraban la existencia de 91 subtipos de ARG (entre 3000 existentes) en el 80% de todas las publicaciones recuperadas (9374 artículos). Los 50 principales subtipos abarcaban genes de resistencia a ocho familias de antibióticos: betalactámicos (*bla*), sulfonamida (*sul*), tetraciclina (*tet*), aminoglucósido (*aad*), resistencia a meticilina (*mec*),

anfenicol (*flo*), trimetoprima (*dfr*) y glicopéptido (*van*). Los perfiles de ARG reportados en las granjas fueron similares a los de las EDAR, agua y suelo, con *sul* y *tet* como los más comunes.

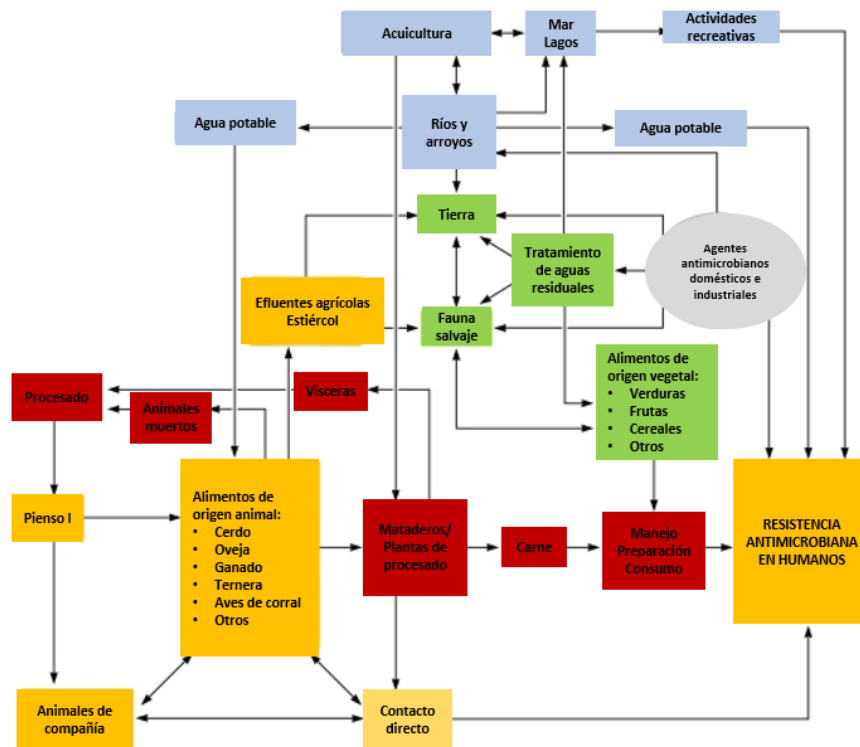


Figura 4. Transmisión de antibióticos y diseminación de resistencias en el medio ambiente (Adaptada de Davies y Davies, 2010).

En el ambiente, debido a la presión ejercida por los distintos componentes, se intercambian los compuestos genéticos móviles que contienen ARG y se desarrollan bacterias resistentes que posteriormente se diseminan a otros medios, a animales y a humanos (Berendonk *et al.*, 2015; Góchez *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020a). Los sedimentos marinos, el suelo, los ríos, el agua dulce y las biopelículas son los nichos donde con más frecuencia aparecen estos fenómenos de transferencia genética horizontal. En estos ambientes las frecuencias de transformación pueden ser incluso mayores que las frecuencias de conjugación o transducción. Esto es debido a que el eDNA puede persistir en el medio ambiente (suelos, sedimentos etc.) hasta años debido a la protección frente al ataque de nucleasas, gracias a su absorción en coloides del suelo, en partículas de arena, minerales arcillosos o sustancias húmidicas, y a la facilidad que tiene para propagarse (Dong *et al.*, 2019).

Se han documentado procesos de transferencia horizontal que implicaban ARG en prácticamente todos los ambientes del planeta: sedimentos marinos (Stewart y Sinigalliano, 1990), suelo (Paget y Simonet, 1994; Nielsen *et al.*, 1997), ríos (Williams *et al.*, 1996), agua dulce (Baur *et al.*, 1996) y biopelículas (Hendrickx *et al.*, 2003). Stewart y Sinigalliano (1990) detectaron

frecuencias de transformación espontánea para la resistencia a rifampicina del orden de 10^{-6} a 10^{-7} células resistentes por recuento total de células en sedimentos marinos, y estudios previos demostraron que las frecuencias de conjugación y transducción en agua de mar estaban alrededor de 10^{-7} /Unidades Formadoras de Placa (UFP) (Dong *et al.*, 2019).

2. PAPEL DEL AGUA EN LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Hasta en los sistemas acuáticos más prístinos se ha demostrado la existencia de ARG que se heredan verticalmente, permitiendo su supervivencia en presencia de antibióticos producidos por bacterias y hongos (Hooban *et al.*, 2020). Pero es debido a la actividad antropogénica donde los medios acuáticos han desempeñado un papel muy importante en el proceso de la diseminación de resistencias a los antibióticos, actuando como reservorio y vía de propagación de ARG y ARB. En los sistemas acuáticos los residuos de antibióticos y otras sustancias llegan a partir de distintas fuentes y se diseminan por la propia naturaleza del medio, provocando una alta presión selectiva en las comunidades microbianas y fomentando por ende el desarrollo de resistencias. En este proceso cíclico, el medio acuático, directa o indirectamente, hará que los ARG y ARB lleguen a los seres humanos y animales.

2.1. La calidad microbiológica del agua como factor crítico en la Salud Pública mundial

La calidad microbiológica del agua es uno de los principales factores que determinan la salud y el desarrollo económico de una población. Incluso en este siglo XXI se siguen produciendo más de 1,5 millones de muertes al año por enfermedades infecciosas relacionadas con agua contaminada o no potable (WHO, 2019). El contacto con agua contaminada puede ser debido al consumo de agua de bebida, a las actividades recreativas o al riego, entre otros (Weber *et al.*, 2013). El correcto control microbiológico de las aguas es, por tanto, imprescindible dentro de la estrategia “One Health”.

Este control se basa en la detección de organismos vivos indicadores de contaminación fecal mediante métodos de cultivo (BOE, 2003a; WHO, 2022b). La OMS (WHO, 2022b) y la EPA (United States Environment Protection Agency, 2002) recomiendan la monitorización de *E. coli* o coliformes termotolerantes para el control microbiológico del agua. *E. coli* es una bacteria gramnegativa que forma parte de la microbiota del intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente, y es la bacteria que en mayor número se excreta con las heces, siendo uno

de los indicadores de contaminación fecal más utilizados. Por su parte, los enterococos son bacterias grampositivas que también forman parte de la microbiota intestinal y se utilizan como indicadores de contaminación fecal en el medio acuático, debido a su abundancia en las heces y su larga supervivencia en el medio ambiente (Larrea-Murrell *et al.*, 2013).

En España, la legislación exige que las aguas medioambientales cumplan unos estándares de calidad. Sin embargo, para el vertido de aguas residuales al ambiente o cauces acuáticos, la normativa existente (Directiva 91/271/CEE; R.D. 509/1996) no determina niveles de calidad microbiológica, por lo que tienen que seguirse las directrices de las aguas en las que se viertan.

La reutilización del agua depurada regenerada para el riego (R.D. 1620/2007) exige unos niveles máximos de *E. coli* de 100 UFC/100mL para el riego de vegetales que han de consumirse crudos y de 1000 UFC/100mL para el riego de productos para consumo humano que no es en fresco (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Niveles máximos de *E. coli* admisibles para el riego de vegetales que han de consumirse crudos (R.D. 1620/2007).

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
USOS AGRÍCOLAS¹					
CALIDAD 2.1 ² a) Riego de cultivos con sistema de aplicación del agua que permita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles para alimentación humana en fresco.	1 huevo/10 L	100 UFC/100 mL Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases ³ con los siguientes valores: n = 10 m = 100 UFC/100 mL M = 1.000 UFC/100 ML c = 3	20 mg/L	10 UNT	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido de aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella</i> spp. 1000 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización) Es obligatorio llevar a cabo la detección de patógenos Presencia/Ausencia (Salmonella, etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=1.000

¹Características del agua regenerada que requieren información adicional: Conductividad 3,0 dS/m; Relación de Adsorción de Sodio (RAS): 6 meq/L; Boro: 0,5 mg/L; Arsénico: 0,1 mg/L; Berilio: 0,1 mg/L; Cadmio: 0,01 mg/L; Cobalto: 0,05 mg/L; Cromo: 0,1 mg/L; Cobre: 0,2 mg/L; Manganeso: 0,2 mg/L; Molibdeno: 0,01 mg/L; Níquel: 0,2 mg/L; Selenio: 0,02 mg/L; Vanadio: 0,1 mg/L. ²Cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán autorizados. ³Siendo n: nº de unidades de la muestra; m: valor límite admisible para el recuento de bacterias; M: valor máximo permitido para el recuento de bacterias; c: número máximo de unidades de muestra cuyo número de bacterias se sitúa entre m y M.

Tabla 2. Niveles máximos de *E. coli* admisibles para el riego de productos para consumo humano que no es en fresco (R.D. 1620/2007).

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
USOS AGRÍCOLAS¹					
CALIDAD 2.2 a) Riego de productos para consumo humano con sistema de aplicación de agua que no evita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles, pero el consumo no es en fresco sino con un tratamiento industrial posterior.	1 huevo/10 L	1000 UFC/100 mL Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases ¹ con los siguientes valores: n = 10 m = 1000 UFC/100 mL M = 10000 UFC/100 ML c = 3	35 mg/L	No se fija límite	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Taenia saginata</i> y <i>Taenia solium</i> : 1 huevo/L (si se riegan pastos para consumo de animales productores de carne) Es obligatorio llevar a cabo detección de patógenos Presencia/Ausencia (<i>Salmonella</i> , etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=10000

¹Siendo n: nº de unidades de la muestra; m: valor límite admisible para el recuento de bacterias; M: valor máximo permitido para el recuento de bacterias; c: número máximo de unidades de muestra cuyo número de bacterias se sitúa entre m y M.

El Reglamento (UE) 2020/741 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de mayo de 2020, relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua, aplicable a partir de junio de 2020, establece niveles más restrictivos para su uso como aguas de riego. Así, para los cultivos de alimentos que se consumen crudos en los que la parte comestible está en contacto directo con las aguas regeneradas y los tubérculos que se consumen crudos debe existir unos niveles \leq 10 UFC de *E. coli* /100 mL, mientras que para los cultivos de alimentos que se consumen crudos cuando la parte comestible se produce por encima del nivel del suelo y no está en contacto directo con las aguas regeneradas, los cultivos de alimentos transformados y los cultivos no alimenticios, se exigen unos niveles máximos de 100 *E. coli*/100 mL.

Paradójicamente, cuando el agua depurada es vertida a un azarbe o acequia de riego que transporta aguas de otro origen, se recomienda la instalación de un tratamiento que regenere las aguas depuradas y así cumpla los requisitos de calidad exigidos en la legislación sobre reutilización. No obstante, la calidad de dicho vertido no está sujeta a esta legislación (R.D. 1620/2007).

Respecto a las aguas costeras, el R.D. 1341/2007 establece la necesidad de monitorizar, no solo los niveles de *E. coli* sino también los de enterococos, y diferencia varios grados de calidad del agua en función de los recuentos obtenidos (Tabla 3).

Tabla 3. Calidad microbiológica de las aguas costeras y de transición, de acuerdo con la legislación vigente (R.D. 1341/2007).

	Calidad			Unidad
	Suficiente**	Buena*	Excelente*	
Enterococos intestinales	185	200	100	UFC o NMP/100 mL
<i>Escherichia coli</i>	500	500	250	UFC o NMP/100 mL

*Con arreglo a la evaluación del percentil 95; **Con arreglo a la evaluación del percentil 90 (Anexo II R.D. 1341/2007).

Por último, en el caso de las aguas continentales, el R.D. 1341/2007 establece los siguientes niveles de calidad (Tabla 4):

Tabla 4. Calidad microbiológica de las aguas continentales, de acuerdo con la legislación vigente (R.D. 1341/2007).

	Calidad			Unidad
	Suficiente**	Buena*	Excelente*	
Enterococos intestinales	330	400	200	UFC o NMP/100 mL
<i>Escherichia coli</i>	900	1000	500	UFC o NMP/100 mL

*Con arreglo a la evaluación del percentil 95; **Con arreglo a la evaluación del percentil 90 (Anexo II R.D. 1341/2007).

2.2. Las aguas como reservorio y vehículo de diseminación de resistencias

Baquero *et al.* (2008) definen los “reactores genéticos” para la resistencia a antibióticos como aquellos lugares en los cuales puede aparecer evolución genética debido a la alta conectividad biológica, la generación de variación genética como consecuencia de intercambios genéticos por recombinación, y la presencia de selección específica. Define cuatro reactores: El primero está formado por la microbiota humana y animal, en que los antibióticos terapéuticos y preventivos ejercen su acción. El segundo reactor implica a hospitales, centros de cuidados de larga estancia, granjas o cualquier otro lugar donde exista una gran cantidad de individuos susceptibles en estrecho contacto y por tanto se encuentren expuestos al intercambio bacteriano. El tercer reactor corresponde a las aguas residuales y cualquier tipo de residuo

biológico originado en el segundo reactor, donde organismos bacterianos de procedencias muy diferentes tienen la oportunidad de mezclarse y reaccionar. El cuarto reactor es el suelo y las aguas superficiales o subterráneas, donde los organismos bacterianos originados en los reactores anteriores se mezclan y relacionan con organismos ambientales.

El agua es el agente crucial en los cuatro reactores, particularmente en los dos últimos. A través del agua, las bacterias resistentes evolucionan, son sometidas a presión selectiva, se recombinan, son dispersadas, y finalmente pueden transferirse al ser humano a través de ríos, aguas marinas, fauna acuática o agua potable, bien directamente o bien a través de los alimentos (Schijven *et al.*, 2015; Manaia, 2017; Leonard *et al.*, 2018) (Figura 4). La ingestión de bacterias resistentes no solo puede provocar infecciones que tienen un alto riesgo de fracaso al tratamiento, sino que también aumenta la posibilidad de transferencia horizontal de genes procedentes de bacterias ambientales desde la microbiota intestinal o cutánea a patógenos humanos (He *et al.*, 2020). Por otra parte, y como consecuencia de los fenómenos anteriormente descritos, el agua se convierte en un punto focal para la aparición y diseminación global de cepas multi- y pan-resistentes (Andrade *et al.*, 2020).

La presencia de ARB y ARG en aguas superficiales ha sido ampliamente estudiada: Se han encontrado ARB en los océanos (Hatosy y Martiny, 2015), glaciares (Scott *et al.*, 2020); ríos (Marti *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2022), lagos (Pang *et al.*, 2015; Rosas *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2018), y otros ecosistemas acuáticos (Serwecińska, 2020). ARB tales como *Enterococcus* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia pestis* y *S. aureus* resistente a meticilina son frecuentemente aisladas en agua (Nappier *et al.*, 2020), y muchos de los patógenos calificados por la OMS como prioritarios, tales como enterobacterias resistentes a carbapenémicos y *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina, se están detectando cada vez con mayor frecuencia en el medio acuático (Lata *et al.*, 2009; Taučer-Kapteijn *et al.*, 2016; Hsu *et al.*, 2017; Nishiyama *et al.*, 2017; Ho *et al.*, 2021).

Hay que destacar que el 39% de las sustancias farmacéuticas presentes en los sistemas fluviales son antibióticos (Lu *et al.*, 2020). Pero no solo la presencia de los antibióticos promueve la presencia de bacterias resistentes en las aguas, sino también otros múltiples tipos de compuestos presentes en ellas, como metales, plaguicidas y desinfectantes, que se pueden encontrar en los terrenos por donde pasan las acequias, barrancos o ríos, y generan co-selección de bacterias resistentes a los antibióticos (Kim y Cha, 2021). En la Tabla 5 se listan los principales genes de resistencia encontrados en ambientes acuáticos.

Tabla 5. Principales familias de antibióticos y sus genes de resistencia relacionados presentes en el medio acuático (Adaptada de Mutuku *et al.*, 2022).

Familias de antibióticos	Tipo de ARG	Lugar de detección
Tetraciclinas	<i>tetA, tetA(C), tetB, tetC, tetE, tetF, tetH, tetK, tetL, tetM, tetN, tetO, tetQ, tetS, tet W</i>	Aguas naturales y residuales, lodos, aguas superficiales, estanques de peces, lodos activados
Macrólidos	<i>mphA, mphB, ereA2, ermA, ermB, ermF, ermO, mefA</i>	Aguas naturales y residuales, lodo activado, afluentes y efluentes
Sulfonamidas	<i>sull, sulll, sullll, dfrA, dfrB</i>	Aguas naturales y residuales, lodo activado, afluentes y efluentes
Betalactámicos	<i>tem, shv, ctx, ampR, cit, ges, nps, sme, veb</i>	Aguas naturales y residuales, lodo activado, afluentes y efluentes
Quinolonas	<i>gyr(A, B), qnrA, par(C, E), qnrB, qnrC, qnrS</i>	Aguas naturales y residuales, lodo activado, afluentes y efluentes

2.3. Fuentes antropogénicas de determinantes de resistencia en el agua

Como ya se ha expuesto previamente, el principal factor determinante de la velocidad de aparición de resistencias es el aumento en el uso de antibióticos. En España, el consumo comunitario de antibióticos (mediante receta del Sistema Nacional de Salud, receta privada y mutuas) en 2019 fue del 23,1 Dosis Diarias por cada mil Habitantes y Día (DHD), frente a los 1,6 DHD del consumo hospitalario (ECDC, 2021a) siendo la amoxicilina/ácido clavulánico, amoxicilina y azitromicina los antibióticos más consumidos (Informe Anual PRAN 2019-2020, 2021a). En estos últimos años, sin embargo, se observa una tendencia de descenso del consumo global, muy acusada en el año 2020 y 2021, posiblemente como consecuencia de la pandemia provocada por la Covid-19 (Figura 5).

Respecto a otros países europeos, en el ámbito del consumo comunitario, en el año 2021 España se mantiene en la misma posición del año anterior (posición 23 de 27 países, media de 18,2 DHD frente a la media europea de 15,0 DHD).

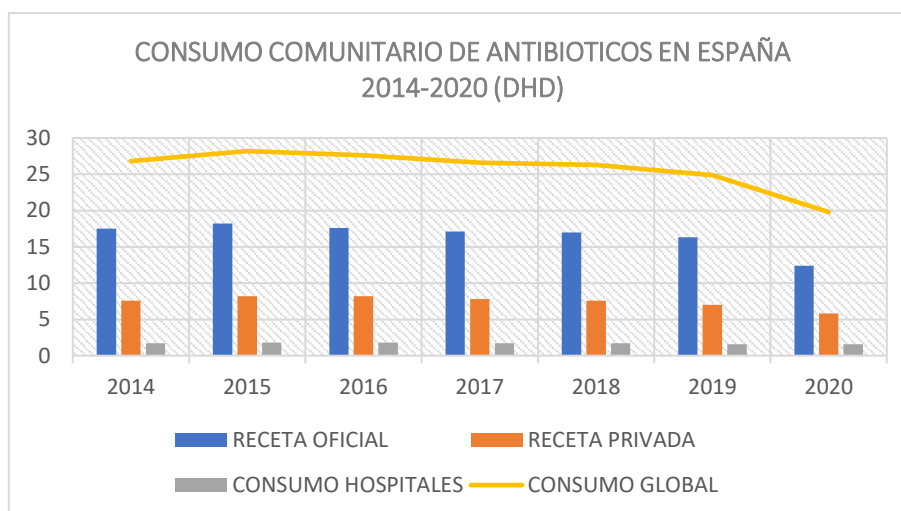


Figura 5. Consumo comunitario de antibióticos en España en DHD (Dosis diaria por cada mil Habitantes y Día) (Mapas de consumo de antibióticos, PRAN, 2023).

Los antibióticos más frecuentemente administrados en España en el año 2022 a nivel comunitario fueron los betalactámicos del grupo J01CR (clasificación ATC, Anatomical, Therapeutic, Chemical Classification System de la OMS), que comprende combinaciones de penicilinas, incluyendo los inhibidores de betalactamasa, siendo la combinación más frecuente la de amoxicilina más ácido clavulánico. En segundo lugar, aparece el grupo J1CA (clasificación ATC) formado por penicilinas de espectro extendido, seguido de macrólidos, fluoroquinolonas, cefalosporinas de segunda generación y tetraciclinas.

En la Comunidad Valenciana los datos de consumo de antibióticos en distintos ámbitos, desde 2014 a 2021 se muestran en la Figura 6 (PRAN, 2023). Los betalactámicos son los antibióticos más consumidos con mucha diferencia.

Cabe señalar que en España existe un programa de eliminación de medicamentos no utilizados (SIGRE, Sistema Integrado de Gestión y Recogida de Envases), con una media de reciclado de 10^4 g de envases y restos de medicamentos por habitante y año. Sin embargo, aún existe un alto porcentaje de usuarios que eliminan estos productos por el retrete (Moermond *et al.*, 2020) o a través de residuos sólidos urbanos, finalizando en vertederos o en las estaciones de depuración de aguas residuales (Velpandian *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2020).

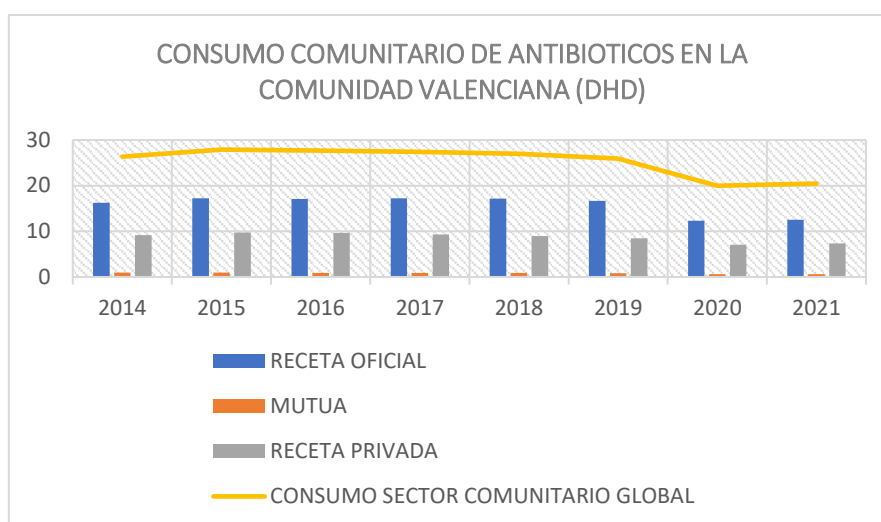


Figura 6. Consumo comunitario de antibióticos en la Comunidad Valenciana en DHD (Mapas de consumo de antibióticos, PRAN, 2023).

2.3.1. Centros sanitarios

Los efluentes de los hospitales son considerados una fuente de primer impacto en la emisión de ARB, ARG y residuos de antibióticos (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2015; Hocquet *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018; Buelow *et al.*, 2020; Petrovich *et al.*, 2020).

En conjunto en Europa, un tercio de los pacientes que acuden a un hospital son tratados con antibióticos (Versporten *et al.*, 2018). Durante el 2020, en el ámbito del consumo hospitalario, España se encontraba ligeramente por debajo de la media europea (1,56 DHD frente a la media europea de 1,57 DHD) (ECDC, 2021a). El grupo de las penicilinas es el más prescrito, seguido de cefalosporinas de tercera y cuarta generación y carbapenémicos, quinolonas y macrólidos (PRAN, 2023).

Aunque el uso de antibióticos en hospitales representa solo el 6.5 % del total del consumo de antibióticos global, muy por debajo de los centros de atención primaria y recetas privadas (PRAN, 2023), los hospitales y centros de salud contribuyen al aporte de cepas multirresistentes y genes de resistencia a antibióticos críticos (Hutinel *et al.*, 2019). La práctica de emplear antibióticos de última generación en los hospitales conlleva la frecuente aparición de resistencias a los mismos. Como ejemplo, las cepas de *S. aureus* meticilina-resistentes representan en estos momentos el 23,2% del total de los aislados de este microorganismo (ECDC, 2021b). En infecciones nosocomiales intraabdominales y del tracto urinario, el 32,6% de *K. pneumoniae* y el 8,1% de *E. coli* producen betalactamasas de espectro extendido (Cantón *et al.*, 2019). Es de destacar el caso de *P. aeruginosa*, que sigue siendo una de las principales causas de infecciones asociadas a la atención sanitaria en Europa. En 2019, el 12,5% de las cepas

invasivas de *P. aeruginosa* en España presentaron resistencia combinada a más de 3 grupos de antimicrobianos (Valero *et al.*, 2021). Por este motivo, las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria constituyen un grave problema, siendo una de las principales causas de la morbilidad nosocomial y del incremento del coste de la estancia hospitalaria (Lupi3n *et al.*, 2014).

Por otra parte, los residuos farmac3uticos, bacterias y genes de resistencia a antibi3ticos de las aguas residuales hospitalarias (Divyashree *et al.*, 2020) ingresan posteriormente en las aguas residuales municipales sin tratar, creando un punto de acceso para la transferencia de ARG (Rizzo *et al.*, 2013). Se ha demostrado que las aguas residuales cl3nicas forman un grupo distinto a otros tipos de agua en relaci3n con las resistencias a antibi3ticos (Voigt *et al.*, 2020), existiendo una mayor variabilidad en las tasas de resistencia en las aguas residuales de los hospitales que en las aguas residuales municipales (Lamba *et al.*, 2017; Hutinel *et al.*, 2019). Estas aguas tambi3n contienen una concentraci3n superior de bacterias pat3genas, que pueden compartir o adquirir genes de resistencia durante los procesos de pretratamiento (McArdell *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 2003).

Cuantitativamente, los compuestos del grupo de las quinolonas son los que se encuentran a una mayor concentraci3n, debido a su uso frecuente y su larga vida media en el medio ambiente (Wang *et al.*, 2018). Por el contrario, los betalact3micos se encuentran en mucha menor cantidad, ya que tienen una baja vida media (Brody *et al.*, 2005). En Espa3a, los antibi3ticos m3s frecuentemente detectados en efluentes hospitalarios son las fluoroquinolonas, trimetoprim y azitromicina (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2015; Mendoza *et al.*, 2015; Moles *et al.*, 2022).

A nivel molecular, en estos efluentes hospitalarios se encuentran determinantes de resistencia para la pr3ctica totalidad de los antibi3ticos, destacando los genes que codifican resistencia a diferentes familias de betalactamasas (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2015; Kizny Gordon *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Buelow *et al.*, 2020; Petrovich *et al.*, 2020; Zagui *et al.*, 2020).

2.3.2. Industrias de producci3n de antibi3ticos

La industria farmac3utica puede ser considerada como una fuente de emisi3n de antibi3ticos y otros residuos al medio ambiente en caso de que sus efluentes no sean adecuadamente tratados. En un estudio realizado en veinte EDAR de Estados Unidos, se observ3 que, en aquellos cuyos afluentes eran empresas farmac3uticas, se detectaban concentraciones significativamente m3s elevadas en un tercio de los compuestos analizados, en comparaci3n con

una EDAR control no afectada por la producción farmacéutica (Zagui *et al.*, 2020), encontrándose para algunos antibióticos concentraciones hasta 1000 veces superiores.

La industria farmacéutica ha establecido un límite aceptable de emisión (PNEC) de antibióticos al medio ambiente para cada antibiótico y ha establecido unos plazos en los que, en el 2027, el 88% de las plantas de producción deben cumplir con este objetivo de vertido (AMR Industry Alliance, 2020).

2.3.3. Aguas residuales urbanas

La mayoría de los antibióticos consumidos por pacientes en régimen ambulatorio se excretan por la orina (61% del total) o heces (37% del total), finalizando en las depuradoras de aguas residuales (PRAN, 2022). La mayoría de las fuentes antropogénicas ya comentadas finalizan asimismo en las aguas residuales, que contienen niveles extremadamente elevados de microorganismos patógenos y no patógenos (Eftim *et al.*, 2017; Soller *et al.*, 2018) junto con altas concentraciones de residuos de antibióticos (Jurado *et al.*, 2019b). Existe consenso mundial en que las aguas residuales municipales sin tratar, las aguas residuales de efluentes tratadas y los lodos de aguas residuales son “puntos calientes” donde las bacterias ambientales interactúan entre sí, y actúan como reservorios de ARG (Auerbach *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009a), constituyendo puntos críticos para la evolución y propagación de resistencias a antimicrobianos (Rizzo *et al.*, 2013; Caucci *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017).

La mayoría de los ARG detectados en los afluentes corresponden a genes de amplia distribución ambiental que codifican resistencias frente a antibióticos de primera generación. Un estudio realizado en siete países europeos (Pärnänen *et al.*, 2019) analizó 229 genes de resistencia y 25 elementos genéticos móviles, encontrando que todas las muestras contenían genes de resistencia a los aminoglucósidos (*aadA* y *strB*), betalactámicos (*bla* GES, *bla* OXA y *bla* VEB), macrólidos, lincosamina y estreptogramina B (MLS B) (*ereA*, *ermF* y *matA/mel*), sulfonamidas (*sulI*), tetraciclinas (*tetM* y *tetQ*) y multiresistencia (*qacEdelta1* y *qacH*), además de varios elementos genéticos involucrados en la transferencia y recombinación de genes (*intI1*, *tnpA*, *Tp614*, *ISAb3*, *ISPps* e *ISSm2*). Con respecto a los ARG de alta preocupación en entornos clínicos, *bla* IMP y *vanA* fueron detectados esporádicamente en los afluentes de diferentes países. El gen *bla* VIM se detectó en afluentes de Portugal, España, Chipre y Alemania, y *bla* KPC en afluentes de Portugal y España y esporádicamente en muestras de efluentes. La abundancia relativa de familias de genes que confieren resistencia y determinantes de transferencia fue mayor en los países con mayor consumo de antibióticos. El estudio concluyó que el uso de antibióticos en las áreas analizadas, la temperatura ambiental y el tamaño de las plantas de

tratamiento de aguas residuales urbanas son factores importantes relacionados con los perfiles de ARG detectados en ellas.

2.3.4. Agricultura, ganadería y acuicultura

La utilización de antibióticos es frecuente en agricultura, ganadería y acuicultura. El 73% de todos los antibióticos vendidos en el mundo se utilizan en la producción de alimentos para animales (Van Boeckel *et al.*, 2019).

Los antibióticos no se utilizan solo para tratar las infecciones veterinarias, sino que, debido a un incremento constante de la demanda, también se utilizan como profilácticos y estimulantes del crecimiento (Gelband *et al.*, 2015). Se estima que el 80% de todos los antibióticos vendidos en Estados Unidos son para estos usos (Gilbert *et al.*, 2021) y se espera que la utilización de antibióticos para la producción animal crezca alrededor de un 11% para 2030 (Tiseo *et al.*, 2020). Sin embargo, un informe reciente de la European Food Safety Authority (EFSA) y el ECDC reporta que el consumo de antibióticos en animales (alrededor de 100 mg/kg) es por primera vez inferior al humano (130 mg/kg) en Europa (EFSA y ECDC, 2022).

La media de uso de antibióticos veterinarios en Europa está situada en 10^7 mg/PCU (Unidad de Corrección de Población). En España se observa un elevado consumo, pero con un descenso significativo a lo largo del tiempo (Figura 7), habiéndose reducido un 58,84% el consumo en laboratorios de 2014 a 2019 y un 4,63% en minoristas y farmacias de 2017 a 2019 (PRAN 2019-2020, 2021a). El progresivo descenso del consumo en España cada vez nos sitúa más cerca de los principales competidores europeos en producción animal.

Gran parte de la dosis de antibióticos que los animales ingieren es excretada (Tian *et al.*, 2021), liberando estos residuos al medio ambiente a través del estiércol, el suelo y las escorrentías, o como efluentes de aguas residuales en aguas superficiales y sedimentos (Thanner *et al.*, 2016; Suttner *et al.*, 2020). Se han detectado concentraciones de enterococos 17 veces superiores en aguas superficiales cercanas a centros de alimentación de animales respecto a la concentración encontrada aguas arriba (Sapkota *et al.*, 2007). También se han establecido correlaciones entre la cantidad de antibiótico empleado con los animales, en este caso tetraciclina, y la concentración detectada aguas abajo (Peak *et al.*, 2007). Por otra parte, con frecuencia se detectan numerosos genes de resistencia en el estiércol del ganado, fundamentalmente a la tetraciclina y a sulfamidas, causando una grave contaminación genética en el agua y suelo circundante (Tian *et al.*, 2021). Las bacterias procedentes de los pasos de sacrificio, procesamiento y eliminación de cadáveres también ingresan en las aguas ambientales

(Lavilla Lerma *et al.*, 2014; Svanström, 2014; Onuoha *et al.*, 2016; Afsharnia *et al.*, 2018; Onuoha, 2018).

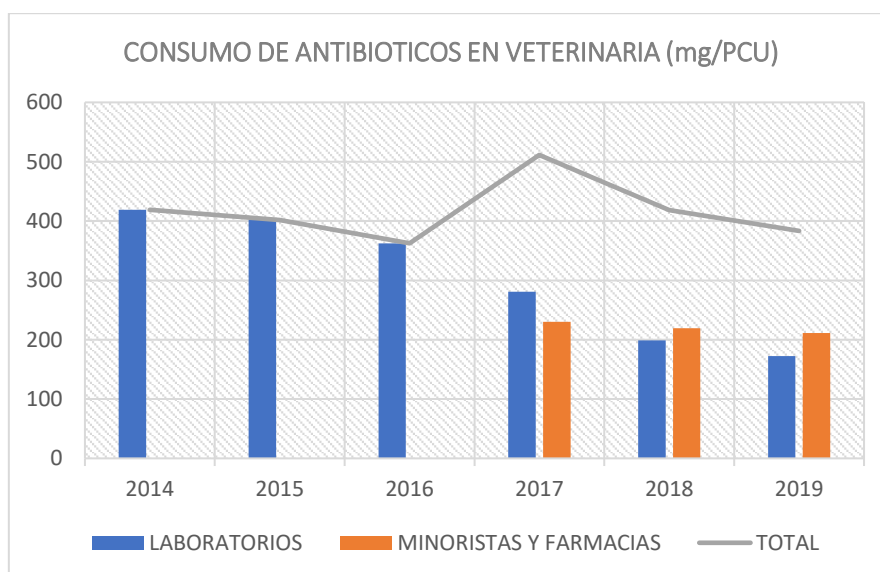


Figura 7. Consumo veterinario de antibióticos en España en mg/PCU (Informe Anual PRAN 2019-2020, 2021a).

En acuicultura también se emplean diversos antibióticos, lo que conduce a la selección de bacterias resistentes en el medio acuático (Watts *et al.*, 2017), ya que el 80% de estos se excretan en las heces y orina de los peces en forma activa (FAO y WHO, 2019). Las bacterias resistentes pueden pasar a las aguas superficiales cuando el agua de acuicultura se escurre, se derrama o se mezcla con ellas. La acuicultura también se ha convertido en foco para la transferencia de genes en las bacterias del agua de mar, debido a la mezcla de combinaciones de alimentos que incluyen antibióticos (Baquero *et al.*, 2008; Muziasari *et al.*, 2016; Watts *et al.*, 2017), como estiércol de cerdos o aves que han sido tratados con antibióticos. Una revisión basada en un metaanálisis realizado a partir de 460 artículos (Reverter *et al.*, 2020) encontró que el índice de resistencia a múltiples antibióticos de la acuicultura se correlaciona con el de las bacterias clínicas humanas. En un metaanálisis similar en el que se analizaron más de 9000 artículos, Zhuang *et al.* (2021) concluyeron que el uso de antibióticos en granjas y acuicultura tiene una influencia directa en la diversidad de tipos de ARG en las EDAR, el suelo y el agua.

Los cultivos también son fuentes de resistencias, ya que las escorrentías agrícolas pueden introducir ARB en el medio ambiente. Con frecuencia se detectan microorganismos resistentes en productos vegetales y frutas, cuyo origen principal puede ser el estiércol animal o el agua de riego contaminada. Estos productos frescos, que han ganado importancia debido al incremento

del interés por las dietas saludables, se han detectado cepas productoras de betalactamasas, cefalosporinas y carbapenemasas de espectro extendido, así como cepas que albergan el gen de resistencia a la colistina *mcr* (Chelaghma *et al.*, 2021; Jiménez-Belenguer *et al.*, 2023).

2.4. Factores impulsores de la aparición y dispersión de resistencias en el agua

Existen diversos factores que impulsan la aparición y dispersión de resistencias en las aguas, influyendo, tanto en la cantidad de bacterias presentes en el medio como en la velocidad de transferencia horizontal de ARG. El factor más relevante es, como ya se ha comentado, la presencia de residuos de antibióticos en el medio. Pero a esto hay que sumarle la presencia de metales pesados y biocidas (Water JPI, 2018), así como el efecto del cambio climático o la contaminación por microplásticos.

2.4.1. Residuos de antibióticos

Numerosos estudios han demostrado que la introducción de antibióticos en los sistemas acuáticos se asocia con un número creciente de ARB y genes de resistencia emergentes. Estos antibióticos proceden, entre otras, de las fuentes anteriormente reseñadas y no se eliminan por completo en los procesos de tratamiento (Fletcher, 2015; Hiller *et al.*, 2019; Petrovich *et al.*, 2020; Savin *et al.*, 2020). En este sentido, los antibióticos sintéticos y semisintéticos, como las fluoroquinolonas y las sulfamidas, son químicamente más estables, por lo que sus residuos se suelen detectar con mayor frecuencia que los de los betalactámicos (Rusch *et al.*, 2019).

Los residuos de antibióticos en el medio ambiente tienen impacto sobre la microbiota en diferentes niveles tróficos. Su presencia en concentraciones subinhibitorias les hace funcionar como moléculas de señalización y causar cambios en la expresión y transferencia de genes, la expresión de factores de virulencia, formación de biopelículas y la modulación de la actividad génica (Serwecińska, 2020). Estos fenómenos se ven favorecidos por las altas densidades celulares, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de contaminantes orgánicos (Joseph *et al.*, 2019), siendo por tanto más intensos en los ambientes acuáticos más contaminados.

2.4.2. Biopelículas

Las biopelículas bacterianas constituyen consorcios de microorganismos embebidos en una matriz polimérica extracelular de producción propia formada por un conjunto complejo de proteínas, polisacáridos y DNA. Se encuentran distribuidas ampliamente en muy diversos ambientes, incluyendo sistemas naturales acuáticos o de agua potable (Singh *et al.*, 2017). Las biopelículas son ambientes propicios para el desarrollo y mantenimiento de poblaciones

resistentes a antibióticos y desinfectantes. En ellas aumenta la resistencia a los antibióticos de 10 a 1000 veces, debido a varios mecanismos, tales como la proximidad de las células, fenómenos de *quorum-sensing*, presencia de DNA extracromosómico y aumento de los mecanismos de transferencia genética horizontal, entre otros (Prinzi y Rohde, 2023).

2.4.3. Presencia de biocidas y metales pesados

Los metales pesados derivados de fuentes naturales y antropogénicas son capaces de permanecer mucho tiempo en los entornos acuáticos, ejerciendo una presión selectiva que favorece el mantenimiento y diseminación de las resistencias a antibióticos (Gao *et al.*, 2015; EEA, 2018).

Los biocidas son agentes antimicrobianos de uso común en centros sanitarios y granjas, y también se utilizan como aditivos y conservantes para la industria y alimentos. Su uso ha aumentado en los últimos años debido a la pandemia de la Covid-19 y, como consecuencia, se ha incrementado su presencia en el medio ambiente, impulsando, al igual que los metales pesados, la aparición de resistencias a antibióticos mediante procesos de co-selección (Kahrilas *et al.*, 2015; Wales y Davies, 2015; Maillard, 2018). De hecho, los mecanismos de resistencia frente a metales pesados y biocidas (modificación de la diana, activación de bombas de eflujo, disminución de la permeabilidad celular e inactivación) son estructural y funcionalmente parecidos a los desarrollados frente a antibióticos (Pal *et al.*, 2017; Maillard, 2018).

Las aguas residuales se han identificado como puntos críticos donde la confluencia de antibióticos, metales pesados, biocidas y ARG provoca la selección de bacterias multirresistentes y la propagación de ARG (Di Cesare *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2022). En un estudio realizado en las aguas residuales de Shanghái se observó que metales pesados como el plomo, zinc y el cadmio provocaban la diseminación de genes de resistencia frente a la eritromicina (Gao *et al.*, 2015). En otros estudios también se ha encontrado que concentraciones subinhibitorias de metales pesados y biocidas en medios acuáticos impulsan las mutaciones y la transferencia de ARG (Lu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

2.4.4. Cambio climático

El cambio climático está provocando en todo el mundo un aumento de las temperaturas, las precipitaciones, las escorrentías y las sequías, influyendo en la diseminación de los patógenos resistentes a antibióticos en el medio ambiente (Boxall *et al.*, 2009; Skaland *et al.*, 2022).

Las temperaturas cada vez mayores se asocian con un aumento de las tasas de crecimiento bacteriano y la transferencia horizontal de genes, ya que aumenta la replicación y supervivencia de las bacterias en el medio ambiente y puede provocar alteraciones en la

expresión de sus genes (Van Elsas *et al.*, 2011; Philipsborn *et al.*, 2016). Además, en climas con temperaturas elevadas, la absorción en los suelos y el agua de antibióticos, metales pesados o biocidas, es mayor (Chen *et al.*, 2019a).

También se relaciona el cambio climático con una mayor frecuencia de inundaciones y los consecuentes desplazamientos y aglomeración de la población, lo que conlleva a un aumento de las enfermedades transmitidas por el agua (Cardoso *et al.*, 2004; Burnham, 2021). Las tormentas y las precipitaciones cada vez más intensas pueden dañar las redes de abastecimiento y las instalaciones de las EDAR, provocando un aumento del riesgo de contaminación por las inundaciones, a la vez que también puede aumentar la escorrentía agrícola, provocando un aumento de la contaminación de las aguas y, en consecuencia, aumentando las oportunidades de transferencia de ARG (Forsberg *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2019a).

Por último, la sequía extrema en algunos lugares obliga a muchas personas, fundamentalmente en países poco desarrollados, a utilizar fuentes de agua de mala calidad para beber, para riego y para uso doméstico, aumentando el riesgo de exposición humana a patógenos (Van Huynh *et al.*, 2019; Skaland *et al.*, 2022).

2.4.5. Microplásticos

Los microplásticos (fragmentos < 5 mm) se encuentran en todos los ecosistemas acuáticos, incluido el agua de mar, el agua dulce y los sedimentos. Estos compuestos son adsorbentes activos de contaminantes orgánicos, como los antibióticos. Las bacterias colonizan la superficie de los plásticos y se ha descrito que la contaminación por microplásticos influye en la diversidad microbiana y aumenta el intercambio de genes en los ecosistemas acuáticos, de forma que en los microplásticos se encuentran niveles de antibióticos, ARG y microorganismos mayores que en el agua circundante (Yang *et al.*, 2019b). La salinidad elevada parece reducir la adsorción de antibióticos a los microplásticos y se ha demostrado que la abundancia de ARG, y la concentración, tanto de ARB como de ARG encontrada en estos contaminantes es mayor en el agua dulce que en estuarios y aguas de mar (Wang *et al.*, 2020c).

Recientemente se ha descrito que también los macroplásticos asociados a los ecosistemas acuícolas poseen capacidad para actuar como soporte para biopelículas que incluyen bacterias potencialmente patógenas y ARB, aumentando su carga de ARG respecto al agua circundante y suponiendo una fuente de reentrada al ser humano a través del consumo de peces de acuicultura (Naudet *et al.*, 2023).

2.5. Rutas de diseminación de los determinantes de resistencias en el medio acuático

A partir de las fuentes de emisión hay diversas rutas posibles de dispersión de los residuos de antibióticos, las ARB y los ARG al ambiente. A continuación, se detallan las principales rutas:

2.5.1. Aguas residuales sin tratar

Las aguas residuales sin tratar pueden acabar en otros ambientes (suelo, aguas superficiales o agua costera) por vertido directo en lugares con bajos niveles de saneamiento ambiental (Collignon *et al.*, 2018), pero también pueden verterse accidentalmente a causa de desbordamientos del alcantarillado causado por problemas pluviales con grandes caudales, (USEPA 2004; 2011) o por el envejecimiento de infraestructuras, que provoca fugas en tuberías de aguas residuales al suelo, aguas subterráneas, pozos y fuentes de agua (Hua *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2004; Rosi-Marshall y Kelly, 2015).

2.5.2. Aguas residuales tratadas

En general, los procesos de tratamiento de aguas residuales en EDAR no están preparados para eliminar las ARB o los ARG. Incluso tras someter el agua a procesos secundarios y terciarios de tratamiento y desinfección incluida la desinfección con UV, ozono y cloro, no se consiguen eliminarlos (Gupta *et al.*, 2018; Cacace *et al.*, 2019; Hiller *et al.*, 2019; Marano *et al.*, 2019; Divyashree *et al.*, 2020), encontrándose que las descargas de las EDAR contribuyen significativamente a la presencia de AMR en el medio ambiente (Hiller *et al.*, 2019). Por otra parte, las aguas residuales que provienen de centros sanitarios, una vez tratadas tienen tasas muy altas de determinantes de resistencias (Lamba *et al.*, 2017) y, aunque disminuye significativamente la carga bacteriana tras pasar por la EDAR, se ha observado que pueden seleccionarse cepas multirresistentes y en ocasiones se encuentra una acumulación de ARG (Czekalski *et al.*, 2012).

También los residuos de antibióticos resisten a los tratamientos de depuración (McArdell *et al.*, 2003; Gogoi *et al.*, 2018) que, aunque son más efectivos frente a los betalactámicos, trimetoprim (Dodd y Huang, 2007), fluoroquinolonas y tetraciclinas (Managaki *et al.*, 2007; Sukul y Spitteller, 2007), son poco efectivos frente a otras sustancias, como los macrólidos (Gulkowska *et al.*, 2008).

Algunos estudios han sugerido que las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) podrían actuar como biorreactores para la transferencia y selección de ARB y ARG (Guo *et al.*, 2017; Fatta-Kassinos *et al.*, 2020) y de diseminación de AMR a las aguas superficiales (LaPara *et*

al., 2011; Czekalski *et al.*, 2012; Czekalski *et al.*, 2014; Cacace *et al.*, 2019). Se ha demostrado que la descarga de aguas residuales tratadas aumenta la cantidad de ARG en los cuerpos de aguas receptoras (LaPara *et al.*, 2011; Pruden *et al.*, 2012; Amos *et al.*, 2018; Jäger *et al.*, 2018), habiéndose detectado en distintos trabajos más de cien casetes de genes de resistencia conocidos (Khan *et al.*, 2013; Gillings *et al.*, 2015).

Actualmente no se conocen bien los mecanismos que controlan el transporte, la transferencia y la acumulación de ARG en las aguas residuales. Tampoco está claro si el factor que contribuye más al aumento del resistoma acuático es la presión selectiva de los antibióticos que se vierten con los efluentes, o las ARB que escapan de las EDAR con los efluentes y llegan al medio. Es posible que se trate de un efecto sinérgico debido a estos dos factores, junto con el de una mayor concentración de nutrientes que estimule el crecimiento microbiano (Subirats *et al.*, 2019; Suzuki *et al.*, 2019).

En España, la normativa vigente establece que las aguas residuales deben someterse a una serie de tratamientos (pretratamiento, primario, secundario y terciario) para la posterior reutilización o vertido al cauce receptor. En el pretratamiento se eliminan los fragmentos gruesos del agua; en el tratamiento primario se eliminan diversos sólidos, arenas, grasas y aceites por decantación primaria normalmente; en el tratamiento secundario se elimina mediante tratamientos biológicos la materia orgánica; y en el tratamiento terciario se eliminan gran parte de los agentes patógenos mediante procesos como microfiltración, ultrafiltración, ozonización y tratamiento UV (BOE, 1995). En este sentido, se ha encontrado que ciertos protocolos de tratamiento, como los reactores biológicos de membrana (Munir *et al.*, 2011) y la coagulación (Li *et al.*, 2017), son importantes para eliminar ARB y ARG.

Un estudio realizado en nuestro país ha estimado las concentraciones de bacterias coliformes fecales, enterococos fecales y sus fracciones resistentes a diferentes antibióticos (amoxicilina, tetraciclina, ciprofloxacina y cefotaxima) que se vierten al medio ambiente a partir de un sistema de tratamiento de agua residual (PRAN Medio Ambiente, 2022), encontrándose recuentos enormes, de entre 10^{12} y 10^{16} UFC/día (Tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones estimadas de coliformes fecales (CF) y sus fracciones resistentes a antibióticos (R) vertidas en España y en la Comunidad Valenciana de acuerdo con los caudales de efluentes de depuración vertidos al ambiente en 2016. (Adaptada del PRAN Medio Ambiente, 2022).

	Caudal (m ³ /d)	CF (UFC/d)	CF-AMX ^R (UFC/d)	CF-TET ^R (UFC/d)	CF-CIP ^R (UFC/d)	CF-CFX ^R (UFC/d)
España	1,16 x 10 ⁷	2,62 x 10 ¹⁶	2,23 x 10 ¹⁶	4,79 x 10 ¹⁵	6,72 x 10 ¹⁵	4,76 x 10 ¹³
Comunidad Valenciana	6,05 x 10 ⁵	1,37 x 10 ¹⁵	1,16 x 10 ¹⁵	2,50 x 10 ¹⁴	3,51 x 10 ¹⁴	2,48 x 10 ¹²

AMX: Amoxicilina; TET: Tetraciclina; CIP: Ciprofloxacino; CFX: Cefotaxima; UFC: unidades formadoras de colonia; d: día.

2.5.3. Biosólidos

Debido a que los lodos generados por el tratamiento de las aguas residuales en las EDAR se utilizan para la agricultura, el paisajismo y los jardines domésticos, estos podrían ser una fuente de residuos de antibióticos y de ARB. Se ha demostrado que los valores de ARG en los biosólidos aplicados en tierra agrícola llegan a ser tres órdenes de magnitud superiores que en los efluentes de la EDAR (Munir y Xagorarakí, 2011). Un estudio del Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA), utilizando determinados ARG como marcadores de resistencia, arrojó valores promedio de 10⁷ copias por gramo de peso seco del gen *bla*TEM y para el gen *qnr*S (Gillings *et al.*, 2015). También se ha demostrado que, tras el tratamiento de estos biosólidos mediante estabilización con cal y digestión anaeróbica, se consigue una reducción significativa de las ARB y los ARG, mucho mejor que la conseguida por los métodos tradicionales de deshidratación y concentración por gravedad (Diehl y LaPara, 2010; Ma *et al.*, 2011).

Cuando los biosólidos se aplican a la tierra, la supervivencia o adaptación de las ARB en el suelo es muy variable, y aunque en un principio el nivel de AMR y ARG es elevado, la muerte bacteriana ocurre con relativa rapidez, debido fundamentalmente a la presencia de la microbiota autóctona. Sin embargo, el arrastre de las lluvias puede transportarlos a las aguas superficiales, donde la transferencia horizontal de genes es mayor (Pepper *et al.*, 2018).

2.5.4. Purines y deshechos de granja

Se estima que entre el 60%-85% de los antibióticos que los animales ingieren son excretados (Tian *et al.*, 2021), dando como resultado la liberación al medio ambiente de ARG, ARB y residuos de antibióticos. Son numerosos los estudios realizados al respecto, con datos muy alarmantes. La presencia de cepas productoras de BLEE es frecuente en granjas porcinas (entre el 10%-45%), siendo *E. coli* el principal productor; en las aves de corral este porcentaje oscila entre el 29,6% y 69,2% dependiendo del ciclo de producción de los pollos de engorde,

mientras que en el ganado vacuno los porcentajes son muy variables, oscilando entre el 8,4% y 42,2% (Lee *et al.*, 2020). En un estudio portugués (Amador *et al.*, 2019) se aislaron cepas de *Enterobacteriaceae* multirresistentes en todas las muestras, fundamentalmente a ciprofloxacina, además de cloranfenicol, quinolonas, tetraciclinas y sulfonamidas, y se ha informado de la presencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (Bonardi y Pitino, 2019) y cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes, alguna de ellas resistente hasta a 13 antibióticos (Yang *et al.*, 2019a) en este tipo de muestras.

Todas estas excreciones finalizan en su diseminación al medio acuático y suelo (Zou *et al.*, 2019) y pueden volver directamente al ser humano en el caso de que se apliquen en los campos de cultivo como fertilizantes, por el consumo posterior de estos vegetales crudos (Zou *et al.*, 2019). Se ha confirmado una mayor abundancia de ARG, como *sul1*, *ermB*, *strB*, *int1* y *repA* en suelos fertilizados con estiércol de vaca y cerdo que en suelos no abonados (Marti *et al.*, 2014), incluso durante más de 4 meses después de la aplicación del estiércol (Zalewska *et al.*, 2021).

2.5.5. Escorrentía y filtraciones

El suelo es un nicho ecológico propicio para el desarrollo de microorganismos propios e importados a través de las prácticas agrícolas, muchos de los cuales son patógenos potenciales, en el que se facilita la transferencia horizontal de genes (Zalewska *et al.*, 2021). Esta presencia de ARB en el suelo tiene un impacto directo en las aguas subterráneas, donde se ha encontrado hasta un 80% de bacterias resistentes a más de un antibiótico (Andrade *et al.*, 2020). También se han aislado un 77% de ARB en pozos y fuentes (Andrade *et al.*, 2020). De los acuíferos en nuestro país existen pocos datos, pero algunos estudios demuestran la contaminación por antibióticos y la abundancia de ARG (*sull*, *ermB*, *tetW*, *qnrS*) (Boy-Roura *et al.*, 2018). Las recargas de los acuíferos por aguas superficiales contaminadas por antibióticos y ARG, la utilización de purines y biosólidos como abono y las filtraciones de aguas residuales por el mal estado de los colectores o la deficiente impermeabilización, pueden ser una fuente de contaminación de estas aguas.

2.5.6. Otras rutas de dispersión

La atmósfera a través de aerosoles y polvo en suspensión también es una posible ruta de dispersión de resistencias. Así mismo, la fauna silvestre puede actuar como vector, transportando las bacterias y resistencia en sus migraciones a largas distancias (Laborda *et al.*, 2022).

2.6. Riesgo para la Salud Pública derivado de la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos en el medio acuático

Los determinantes de resistencia presentes en las aguas pueden alcanzar al hombre a través de varias vías:

Las aguas recreativas tienen un gran impacto. Se ha valorado que más de 120 millones de personas sufren gastroenteritis al año en el mundo por ingesta accidental de enteropatógenos (Shuval, 2003) y más de 50 millones por aerosoles (Mannocci *et al.*, 2016). La ingestión se produce generalmente durante el baño en ríos, playas, lagos, etc., donde se pueden encontrar microorganismos resistentes. Algunos estudios han demostrado que individuos más propensos a ingerir aguas marinas (surfistas) tenían un mayor nivel de *E. coli* resistente a las cefalosporinas que la población en general (Leonard *et al.*, 2018). Otro estudio encontró que la natación recreativa podría representar un factor de riesgo para las infecciones del tracto urinario con *E. coli* o *K. pneumoniae* resistentes a las betalactamasas (Soraas *et al.*, 2013).

Respecto al agua potable, al estar tratada mediante filtración y desinfección, es muy difícil encontrar ARB en la red de distribución y en el agua del grifo. Aun así, se han encontrado bacterias resistentes en plantas potabilizadoras (Khan *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020).

El agua de riego es otra posible fuente de contaminación, especialmente si se emplea agua residual regenerada. Por ello, es muy importante la eficacia del tratamiento que se aplique en la regeneración del efluente secundario para la eliminación de los patógenos que contenga dicho efluente (Fahrenfeld *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Said *et al.*, 2015; Pan y Chu, 2018).

2.7. La prevención de las resistencias a antibióticos en las aguas

Para prevenir y disminuir la carga de AMR, la estrategia “One Health” establece un enfoque multifacético (Van Puyvelde *et al.*, 2018). Sus principales pilares de apoyo son el establecimiento de sistemas globales de vigilancia epidemiológica, la promoción de medidas de coordinación a través de organismos nacionales e internacionales, la implementación de metodologías de investigación y educación transdisciplinar y la toma de decisiones políticas globales (Allen-Scott *et al.*, 2015; Villanueva-Cabezas *et al.*, 2022). En esta estrategia, la vigilancia epidemiológica y el seguimiento de las resistencias a antibióticos son clave.

2.7.1. Vigilancia epidemiológica de las resistencias a antibióticos bajo la perspectiva “One Health”

La OMS señala que la vigilancia sistemática del uso de antibióticos y de la prevalencia de la resistencia a los antibióticos en humanos y animales es imperativa para el manejo de las enfermedades infecciosas bacterianas (WHO, 2015). Esta vigilancia requiere un enfoque integrado, en el que se marcan una serie de objetivos (Larsson *et al.*, 2018): 1) Abordar el riesgo de transmisión de bacterias que ya son resistentes a los antibióticos a los humanos a través de rutas ambientales. (2) Abordar el riesgo de acelerar la evolución de la resistencia a los antibióticos en patógenos a través de la contaminación con agentes selectivos y bacterias de origen humano o animal. (3) Abordar los riesgos que plantean los antibióticos para la salud de los ecosistemas acuáticos y terrestres, incluidos los efectos sobre las funciones y servicios de los ecosistemas. (4) Monitorizar la prevalencia de resistencia a nivel poblacional y (5) Disminuir el uso de antibióticos a nivel poblacional.

Para ello, la OMS ha desarrollado el “Plan de Acción Mundial Sobre la Resistencia a los Antimicrobianos” (WHO, 2015; WHO, 2020), con el objetivo de combatir de una manera coordinada los riesgos asociados a las AMR en los humanos, los animales y el medio ambiente, centrándose en aspectos específicos del uso de antibióticos, así como en vigilancia de las variedades y prevalencia de AMR en cada sistema, teniendo en cuenta las posibles interacciones entre y dentro de los sistemas a nivel comunitario, hospitalario, individual, animal, agrícola y ambiental (Ahmad *et al.*, 2023). También en junio de 2017 la Unión Europea (UE) publicó su Plan de Acción para Luchar contra la Resistencia a los Antimicrobianos y a nivel nacional se ha publicado recientemente el Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) 2022-2024, ambos en coordinación con el enfoque global “One Health”.

Para poder evaluar y comparar los datos de resistencia a nivel mundial, la OMS ha creado un nuevo sistema de facilitación y recopilación de datos donde participan muchas naciones entre ellas España: el sistema denominado GLASS (Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia y el uso de Antimicrobianos). El último informe publicado en 2022, en el que participaron 87 países, destacó la elevada presencia de niveles de resistencia (superiores al 50%) en bacterias que ocasionan septicemia. También concluyó que las infecciones bacterianas comunes, como por ejemplo las causadas por *E. coli* en las vías urinarias, presentan cada vez más resistencia a los tratamientos de primera línea (ampicilina y cotrimoxazol) así como a tratamientos de segunda línea (fluoroquinolonas). Por todo ello, considera inaplazable impulsar la investigación para permitir descubrir las razones subyacentes de la progresión de las resistencias (WHO, 2022c).

2.7.2. Evaluación de los riesgos para la salud por la presencia de determinantes de resistencia en el ambiente

Analizar la abundancia y el patrón de resistencias en la microbiota ambiental, junto con la recopilación de datos sobre el uso de antibióticos, puede brindarnos la oportunidad de predecir el riesgo existente por la presencia de microorganismos resistentes en el ambiente (Linton *et al.*, 1974; Kwak *et al.*, 2015; Hendriksen *et al.*, 2019; Hutinel *et al.*, 2019; Pärnänen *et al.*, 2019; Aarestrup y Woolhouse, 2020; Huijbers *et al.*, 2020). Los riesgos de transmisión de bacterias ambientales podrían ser cuantificables a partir de datos sobre emisión, destino y exposición. Sin embargo, existen importantes lagunas en nuestro conocimiento sobre la complejidad de su evolución y propagación, que disminuyen la precisión de la evaluación de riesgos para la salud humana. Por ello, aún en estos momentos los modelos que describen la ruta ambiental son escasos (Woegerbauer *et al.*, 2020).

La detección de determinados ARG como marcadores del riesgo de transmisión y de la prevalencia de la resistencia a nivel poblacional sería el mejor enfoque para desarrollar estos modelos (Huijbers *et al.*, 2019). Sin embargo, faltan estudios dosis-respuesta que incluyan la cuantificación de los riesgos de infección en relación con la exposición ambiental (Larsson y Flach, 2022), junto con estudios integrales a largo plazo que evalúen la acumulación y disipación de los ARG en los ecosistemas. Además, aún disponemos de pocos datos cuantitativos sobre la frecuencia de la transferencia de ARG a través de los ecosistemas y las tasas de absorción de DNA extracelular libre (eDNA) por bacterias potencialmente patógenas (Niegowska y Wögerbauer, 2022). La complejidad aumenta por el hecho de que factores bióticos y abióticos, como la temperatura, la presión de oxígeno, los nutrientes, la competencia entre especies, etc., que no están relacionados con los perfiles de resistencia a los antibióticos de la bacteria, son importantes para la transmisión ambiental.

En estos momentos existe consenso en que los estudios sobre el peligro de las resistencias a antimicrobianos deben abarcar, tanto la búsqueda de bacterias resistentes a antibióticos como la detección de los genes que codifican dichas resistencias. De ahí la importancia de seguir profundizando en el estudio de bacterias zoonóticas y genes de resistencia circulantes en el ambiente y la necesidad de establecer indicadores de resistencia antimicrobiana y ARG para su control (Larsson y Flach, 2022). Para ello, se pueden emplear técnicas diversas como el análisis fenotípico de los aislados (Kwak *et al.*, 2015; Hutinel *et al.*, 2019; Huijbers *et al.*, 2020), el análisis de ARG mediante PCR cualitativa o cuantitativa (Pärnänen *et al.*, 2019; Aarestrup y Woolhouse, 2020; Karkman *et al.*, 2020) o la metagenómica (Hendriksen *et al.*, 2019), pero es complejo interpretar los resultados generados en los estudios de vigilancia ambiental.

El cultivo del microorganismo proporciona más información sobre el genotipo y el contexto, sobre todo si se combina con la secuenciación de las cepas detectadas. Sin embargo, es el medio más costoso, y de cobertura más limitada, por las propias características de su metodología (Ashton *et al.*, 2015). La metagenómica se puede utilizar para detectar y cuantificar ARG. Caracterizar el resistoma ambiental es importante para comprender el papel del medio ambiente como fuente de nuevos factores de resistencia. Identificar aquellos ARG que están en riesgo de emerger o acaban de emerger en patógenos permite su detección temprana clínicamente, previniendo su propagación y guiando el desarrollo de futuros fármacos. Su principal problema es la sensibilidad (Bengtsson-Palme *et al.*, 2017). Por último, la PCR constituye un buen nexo entre cobertura y sensibilidad (Karkman *et al.*, 2016) para la detección de la presencia general de contaminación antropogénica (Gaze *et al.*, 2005; Gillings *et al.*, 2015).

Respecto a los residuos de antibióticos, su detección en el medio ambiente es complicada, ya que muchas veces se encuentran en concentraciones de nanogramos por litro (Kim *et al.*, 2018; Szymanska *et al.*, 2019). Sin embargo, su monitorización es imprescindible. Al tener los antibióticos y las bacterias las mismas fuentes, la correlación entre ambos en muestras ambientales nos puede brindar evidencia de la presión selectiva que están experimentando los microorganismos en dicho ambiente.

2.7.3. Microorganismos indicadores de resistencias a antibióticos en el ambiente

A pesar de que, hasta la fecha, no existe ninguna normativa específica respecto a cómo monitorizar los riesgos potenciales para la salud humana asociados a las AMR y los ARG en las aguas (Holcomb y Stewart, 2020) mediante la detección y el cultivo de microorganismos indicadores, el estudio de resistencias en *E. coli* y enterococos procedentes de aguas puede ser de gran interés para observar la evolución de las resistencias a antimicrobianos. Ambos microorganismos poseen un genoma muy flexible que les permite captar DNA exógeno rápidamente.

La presencia de cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos se ha propuesto como un indicador de la presencia de ARB y de los genes relevantes clínicamente asociados a las mismas (EFSA, 2008; Gekenidis *et al.*, 2018), ya que se trata de un microorganismo utilizado habitualmente para monitorizar la calidad del agua, está muy bien caracterizado en términos de resistencia adquirida a los antibióticos (Ferreira da Silva *et al.*, 2007; Galvin *et al.*, 2010; Łuczkiwicz *et al.*, 2010a; Rizzo *et al.*, 2013) y, gracias a su plasticidad genómica, es un potente vector para la diseminación de los ARG (Aristizábal-Hoyos *et al.*, 2019). Se ha demostrado que las cepas comensales de *E. coli* reflejan la exposición de la población a la presión de selección

antimicrobiana y, por lo tanto, pueden proporcionar evidencia continua sobre las tendencias. En presencia de antibióticos, el microorganismo desarrolla rápidamente resistencias frente a las familias más comunes (betalactámicos, sulfonamidas, quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos, etc.), incluyendo los carbapenémicos y polimixinas, antibióticos de último recurso terapéutico (Poirel *et al.*, 2018; Puvača y de Llanos Frutos, 2021). Es interesante señalar que se ha encontrado muy buena correlación entre los perfiles de multirresistencias de los aislados de *E. coli* de muestras de aguas residuales y los datos de MDR en cepas de *E. coli* de las poblaciones humanas asociadas (Anjum *et al.*, 2021). Por ello, *E. coli* está presente en muchos programas nacionales de vigilancia (WHO, 2022b). En la Decisión de Ejecución (UE) 2020/1729 de la Comisión (EU, 2020), relativa a la vigilancia y la notificación de AMR de las bacterias zoonóticas y comensales se expresa que la monitorización de las AMR mediante el indicador comensal *E. coli* constituye la columna vertebral de los datos de seguimiento en toda la UE.

Los enterococos presentan resistencia intrínseca a varios antibióticos, como penicilinas, cefalosporinas y aminoglucósidos, y pueden adquirir resistencias mediadas por plásmidos o transposones a muchos otros antibióticos, como las tetraciclinas, el trimetoprim o la vancomicina. De hecho, la aparición reciente de enterococos resistentes a vancomicina que muestran multirresistencia a varios antibióticos novedosos y de último recurso está también causando una gran preocupación en el entorno sanitario (Torres *et al.*, 2018; Davis *et al.*, 2022). La monitorización de las AMR en los enterococos como bacterias indicadoras que representan a los microorganismos grampositivos complementa los datos de *E. coli* para las enterobacterias gramnegativas (EFSA, 2019; Diario Oficial de la Unión Europea, 2020a).

En cuanto a la metodología más adecuada para esta monitorización mediante microorganismos indicadores, la EFSA publicó en 2019 el informe "Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food", en el que se ofrecen propuestas para actualizar la monitorización armonizada y la notificación de la resistencia a los antibióticos (AMR) desde una perspectiva de Salud Pública. Entre ellas, se refuerza la monitorización fenotípica de resistencias en aislamientos bacterianos, utilizando métodos de microdilución para probar la susceptibilidad e interpretar la resistencia utilizando valores de corte epidemiológicos, en aislamientos de *E. coli* y enterococos (EFSA, 2019).

2.7.4. El control y vigilancia de las resistencias a antibióticos en el agua

Como ya se ha visto previamente, el agua desempeña un papel fundamental en la aparición y dispersión de las resistencias antimicrobianas, actuando como reservorio, lugar de interacción humanos-animales-medio ambiente y medio de propagación de estas. Por ello, para prevenir y disminuir la carga AMR, en un sistema “One Health” es fundamental la monitorización de las resistencias a los antibióticos en el agua.

En el Plan de la OMS propuesto en 2015 se le dio un enfoque bastante pobre al papel del agua en relación con los riesgos asociados a las AMR y, en consecuencia, se generaron muy pocos datos dentro del mismo (Wellcome Trust, 2020). De la misma manera, tanto el Plan de Acción para luchar contra la Resistencia a los Antimicrobianos de la UE como nuestro Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) 2022-2024, pese a darle algo más de protagonismo al papel del medio ambiente, están fundamentalmente enfocados en la salud humana y animal, al estar en coordinación con el Plan de 2015 (EU, 2017; PRAN, 2022). Sin embargo, en estos últimos años cada vez hay más voces que señalan la necesidad de profundizar en el estudio de los sistemas acuáticos, sobre todo las aguas superficiales, en la lucha contra las AMR (Naddeo, 2021; Jimenez *et al.*, 2023; Zinsstag *et al.*, 2023).

Por todo ello, en esta tesis, siguiendo la visión global que plantea “One Health” en la dirección de prevenir, anticipar, detectar y responder mejor a los problemas de salud de nuestro entorno, se han estudiado, tanto a nivel genotípico como fenotípico, los patrones de resistencias a antibióticos que prevalecen en distintos tipos de agua en el área metropolitana de Valencia y alrededores, donde confluyen interacciones entre humanos, animales y medio ambiente, con el fin de conocer la situación de las resistencias en los sistemas acuáticos de nuestro entorno, comprender mejor las posibles interacciones desde una perspectiva integral y proponer soluciones o estrategias para abordar el problema.

II. Objetivos

Actualmente no podemos abordar el problema de las resistencias a los antibióticos sin entender cómo las sociedades humanas interactúan con los animales y los ecosistemas. El agua desempeña un papel prioritario en esta interacción, y constituye un entorno extremadamente propicio para la selección y expansión de estas resistencias.

La sobreexposición a los antibióticos está provocando un aumento de los niveles de resistencia en la microbiota comensal humana y de otros animales. Las bacterias fecales, una vez en entornos ambientales, transfieren genes de resistencia a los microorganismos autóctonos no resistentes. En los sistemas acuáticos, el ciclo puede incluir la posterior transmisión de estos genes a bacterias asociadas a humanos. Al mismo tiempo, el enriquecimiento en bacterias resistentes es promovido por la presencia de residuos de antimicrobianos en el agua.

En este sentido, las plantas de Depuración de Aguas residuales (EDAR) son el punto de enlace entre la sociedad humana y el medio ambiente. En ellas se acumulan bacterias y antibióticos, incrementando la presión evolutiva y favoreciendo el desarrollo de AMR y, por lo tanto, sus vertidos pueden contribuir a que estos finalicen en el medio ambiente.

Por otra parte, las aguas superficiales son las principales receptoras de microorganismos de origen humano o animal, y pueden cerrar el círculo de transmisión de estos determinantes de resistencia al ser humano a través del baño, la ingestión o el riego de alimentos.

La evaluación general de la calidad de las distintas aguas puede ayudar, por tanto, a conocer la magnitud del riesgo al que nos enfrentamos, desarrollar mejoras para la detección de bacterias resistentes a antibióticos y ARG y mejorar los procesos de eliminación de estas.

Teniendo en consideración el consenso sobre la estrategia “One Health para el control de las resistencias a antimicrobianos, los diversos informes de organismos nacionales e internacionales sobre el incremento de las resistencias a antibióticos y sus recomendaciones para su control, así como la regulación española sobre la calidad del agua, el **OBJETIVO PRINCIPAL** de este trabajo ha sido **DETERMINAR EL POTENCIAL DE DISTINTOS SISTEMAS ACUÁTICOS PARA ACTUAR COMO MEDIOS DE DISPERSIÓN DE DETERMINANTES DE RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS AL AMBIENTE**, eligiendo para ello diversos sistemas acuáticos situados en el área metropolitana de la ciudad de Valencia, así como otros puntos de la Comunidad Valenciana.

Para alcanzar este objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

– Determinar la calidad microbiológica de los diversos sistemas acuáticos predefinidos (aguas residuales, aguas de riego, aguas de mar y aguas continentales) de nuestra área geográfica, mediante recuentos microbiológicos de los principales indicadores de contaminación fecal presentes en las mismas, de acuerdo con la legislación vigente.

– Aislar e identificar colonias pertenecientes a la especie *Escherichia coli* y el género *Enterococcus*, como indicadores de los niveles de resistencias a antibióticos en los sistemas acuáticos estudiados.

– Detectar la presencia de resistencias a diferentes antibióticos de uso en la práctica médica, su frecuencia, distribución, y perfiles de multirresistencia en los microorganismos aislados en este tipo de aguas.

– Investigar la presencia de diversos genes indicadores de resistencia a las principales familias de antibióticos de uso clínico, tanto en los diferentes tipos de aguas estudiadas como en las cepas aisladas de dichas aguas.

– Determinar si existe relación entre los niveles de contaminación por bacterias indicadoras de contaminación fecal, las resistencias de las cepas aisladas y la presencia de genes de resistencia a antibióticos detectados en cada tipo de agua.

– Establecer relaciones, si las hubiera, entre los perfiles de resistencias a antibióticos encontrados en los microorganismos aislados de los distintos tipos de agua y su procedencia.

III. Material y Métodos

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral se realizó en la Sección de Microbiología del Laboratorio de Salud Pública de Valencia y en los laboratorios de Microbiología del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia.

1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS Y METODOLOGÍA DE LOS MUESTREOS

1.1. Muestras de agua destinada al riego agrícola

Se analizaron dos tipos de muestras: Agua procedente de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) y aguas superficiales procedentes del río Turia y de cuatro de sus acequias.

1.1.1. Muestras procedentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales

Se analizaron muestras procedentes de 3 EDAR pertenecientes al área metropolitana de Valencia. Las características de cada una de ellas se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Características de las EDAR estudiadas (Adaptado de Entitat de Sanejament d'Aigües, 2017).

	EDAR 1	EDAR 2	EDAR 3
Caudal (m ³ /día)	10323	94979	35360
Población servida (he)	63009	321622	153330
Rendimiento Sólidos Sedimentables (%)	99	94	96
Rendimiento DBO ₅ (%)	98	93	94
Rendimiento DQO (%)	96	90	90
Generación eléctrica	Cogeneración	Cogeneración	Cogeneración
LÍNEA DE AGUA			
Pretratamiento	Reja de gruesos; Reja de finos; Tamizado; Tanque de homogeneización; Desarenador; Desengrasador	Reja de gruesos; Reja de finos; Tamizado; Desarenador; Desengrasador	Reja de gruesos; Reja de finos; Desarenador; Desengrasador
Tratamiento primario	Físico-Químico; Decantación	Físico-Químico; Decantación	Decantación
Tratamiento secundario	Fango activado; Eliminación de nitrógeno	Fango activado	Fango activado; Eliminación de nitrógeno
Tratamiento terciario	Coagulación Floculación; Filtración	Coagulación Floculación; Filtración	Coagulación Floculación;
Desinfección	Ultravioleta	Ultravioleta	Ultravioleta

Todas ellas reciben aguas de tipo urbano e industrial. En los tres casos, parte del agua depurada se vierte al mar a través de un emisario submarino, mientras que otra parte es

reutilizada tras el tratamiento para el riego agrícola de las áreas limítrofes, tales como las huertas de Paterna, Valencia, Alboraya o Albufera Sur.

La EDAR 1 solo recoge agua del municipio de Paterna, la EDAR 3 recoge vertidos urbanos de los pueblos colindantes y una parte minoritaria de la ciudad de Valencia, mientras que la EDAR 2 trata el agua de la ciudad de Valencia, incluyendo parte de los hospitales localizados en el municipio (BOE, 2003b; acuaMed, 2006; Aigües de Paterna, 2023).

Se realizaron 6 muestreos en fechas diferentes, con una periodicidad mensual, los tres primeros en primavera (marzo-abril-mayo) y los otros tres en otoño (septiembre-octubre-noviembre) del año 2017.

De cada EDAR se tomaron 2 muestras en cada muestreo, una de ellas correspondiente a la salida del tratamiento secundario (SS) y otra a la salida del tratamiento terciario (ST). Las muestras se recogieron en botellas de plástico estériles de 2 L de capacidad y se transportaron al laboratorio en condiciones de refrigeración (5 ± 2 °C). A su llegada, se conservaron en frío y se procesaron en un plazo inferior a dos horas.

1.1.2. Muestras de aguas superficiales utilizadas para el riego

Las muestras procedían de 5 puntos diferentes de la vega del río Turia: 4 acequias que transportan agua del río y son utilizadas para el riego de las huertas colindantes, y 1 del propio río (Figura 8):

- **Muestras del Río Turia:** Recogidas directamente del cauce del río Turia a su paso por el término municipal de Quart de Poblet.
- **Muestras de la Acequia Real de Moncada:** Se trata de la acequia más grande de todas las muestreadas, con una longitud de 32,8 kilómetros y una capacidad de 5 m³/s, que permite regar unas 5.000 Ha de superficie de huerta. Las muestras fueron tomadas en un punto situado en el Molino Real de Paterna.
- **Muestras de la Acequia de Rascanya:** Esta acequia toma el agua por el Azud de Repartiment (Quart de Poblet) y recorre 13 kilómetros hasta desembocar en el mar. Su caudal es de 1,42 m³/s y riega una superficie total de 840 Ha. La toma de muestra se llevó a cabo a su paso por el término municipal de Alboraya.
- **Muestras de la Acequia de Vera:** Esta acequia lleva aguas provenientes de la Acequia de Mestalla, que empieza en el azud de Mestalla, entre los municipios de Manises y Paterna; lleva un caudal de 2,2 m³/s, presenta una longitud de 2 kilómetros y abastece a unas 116 Ha de superficie. La acequia de Vera circula en uno de sus tramos a la altura de la Universidad Politécnica de Valencia, punto que fue seleccionado para la toma de muestras.

- **Muestras del Barranco de Carraixet:** Este nace en la sierra Calderona y pasa por doce municipios antes de desembocar en el mar. Las muestras fueron tomadas en la zona final del Barranco, que separa el término municipal de la ciudad de Valencia de la urbanización Port Saplaya (Alboraya). La EDAR 3 vierte parte de su efluente en el barranco de Carraixet. A partir de ese momento, el agua se utiliza para regar los campos de alrededor y el sobrante se desecha al mar. Su último tramo se aprovecha como coto de pesca.

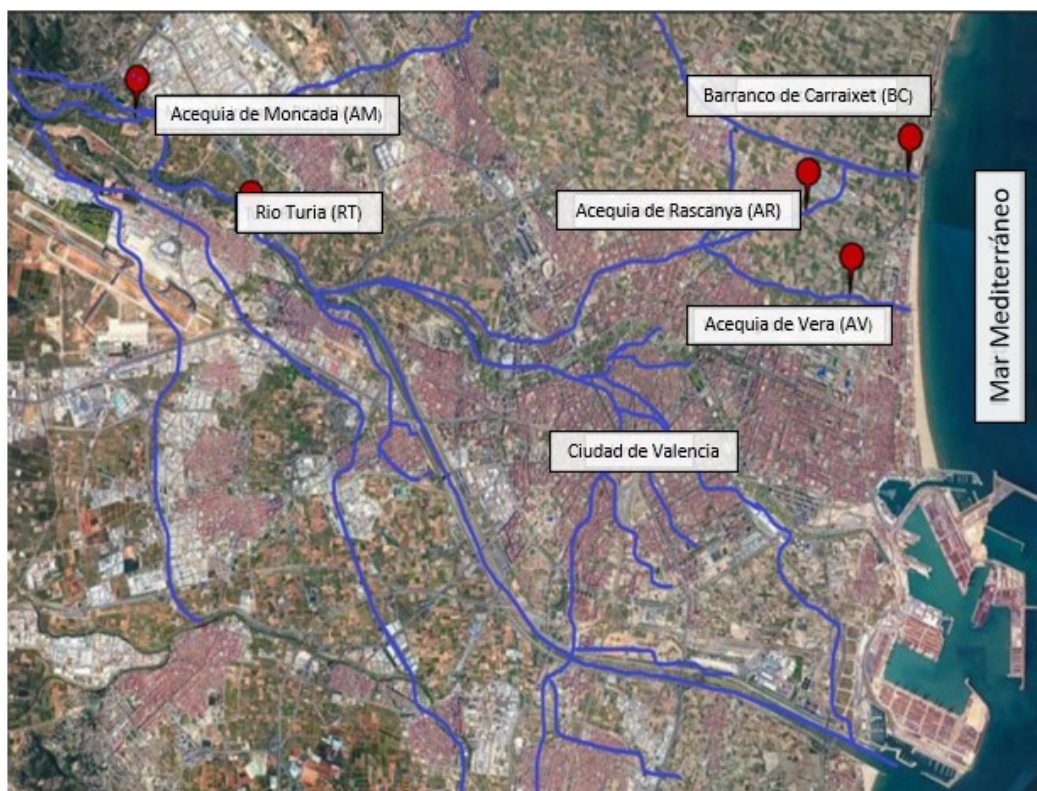


Figura 8. Puntos de toma de muestra de agua de riego en la ciudad de Valencia y alrededores.

Se llevaron a cabo 5 muestreos para cada punto, durante los meses de enero a mayo de 2018, con periodicidad mensual.

Todas las muestras se recogieron en botellas estériles de 2 L, transportándolas en refrigeración (5 ± 2 °C) para su inmediato análisis en el laboratorio.

1.2. Muestras de aguas de costa

Se analizaron un total de 77 muestras de agua de mar obtenidas de diferentes playas de la Comunidad Valenciana (España) durante los meses de junio, julio y agosto del año 2017. En

todos los puntos se tomó una muestra antes del comienzo de la temporada y durante la temporada de baño se analizaron, al menos, 2 muestras más de cada punto (Figura 9).

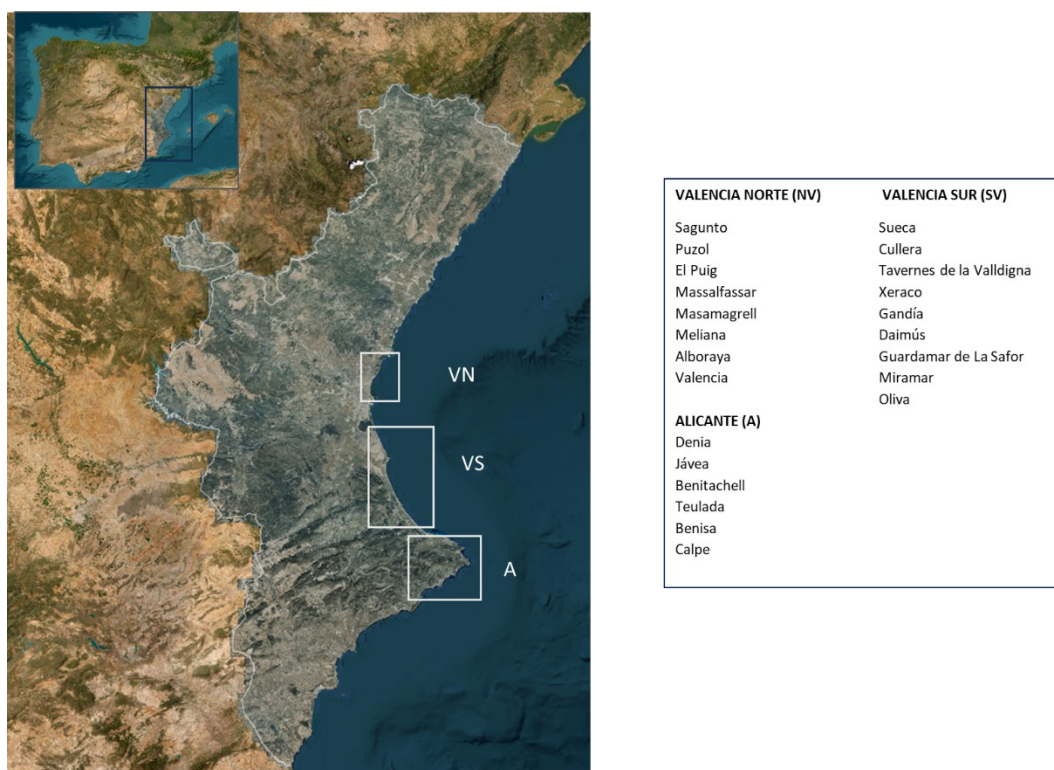


Figura 9. Zonas de toma de muestra de agua de costa.

Las muestras se recogieron en botellas estériles de 2 L, que se transportaron en refrigeración (5 ± 2 °C) al laboratorio para su análisis inmediato.

1.3. Muestras de agua continental

Se analizaron un total de 102 muestras de agua, obtenidas en un periodo de seis meses durante el año 2017 a partir de fuentes naturales (n=8), pozos (n=59) y aguas superficiales (n=35) de distintos puntos de la provincia de Valencia: La Safor, La Ribera, la Huerta Oeste, la Huerta Sur, Valencia, Utiel-Requena y La Costera. Todas estas aguas pueden ser utilizadas para la producción de agua de consumo humano, siempre pasando previamente por una Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP) antes de llegar al consumidor.

Las muestras se tomaron utilizando recipientes estériles y fueron transportadas al laboratorio en refrigeración (5 ± 2 °C) para su análisis inmediato.

2. ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA

2.1. Medios de cultivo y reactivos

Agar nutritivo (Scharlau, Barcelona, España). Se trata de un medio de uso general, no selectivo, adecuado para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos poco exigentes nutricionalmente. Para la preparación se suspendieron 23 g del medio en 1 L de agua destilada, se disolvió a 100 °C en un agitador termostático, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, y se distribuyó en placas Petri.

Microinstant® Agar Base Cromogénico Coliformes (CC) (Scharlau, Barcelona, España). Medio de cultivo cromogénico, selectivo y diferencial para la detección de enterobacterias fermentadoras de lactosa (coliformes) y de *E. coli*. Se basa en la detección simultánea de dos actividades enzimáticas: β -galactosidasa, para todos los coliformes, y β -glucuronidasa, exclusivamente para *E. coli*, lo que hace que las colonias tengan coloración diferente: color rosa para coliformes y color azul-púrpura para las colonias de *E. coli*. Para su preparación se pesaron 29,45 g del medio deshidratado por litro (L) de agua destilada y se esterilizó por ebullición. Una vez estéril, se le añadió el Suplemento Selectivo CV para Coliformes (Scharlau, Barcelona, España) que inhibe el crecimiento de *Pseudomonas* spp. y *Enterococcus* spp., siguiendo las instrucciones del fabricante.

Microinstant® Agar Glucurónico Triptona y Bilis (TBX) (Oxoid, Ltd. Hampshire, Reino Unido). Este medio se utilizó para el aislamiento e identificación de *E. coli*. En él, las presuntas colonias de *E. coli* muestran una coloración azul-celeste (Figura 10 A) debido a que la β -D-glucuronidasa rompe el BCIG (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucurónico), sustrato cromógeno que contiene el agar TBX, dando lugar a colonias características de color azul-celeste. Para su preparación se añadieron 36,5 g en 1 L de agua destilada y se esterilizó en autoclave (121 °C, 15 min). Cuando finalizó su esterilización se repartió en placas Petri.

Agar Slanetz y Bartley (SB) (VWR, Barcelona, España). Este medio se utilizó para aislar *Enterococcus* spp. (enterococos). Las colonias características muestran un color rojo, marrón o rosado, en el centro o en toda la colonia (Figura 10 B), debido a que los enterococos reducen el TTC (cloruro de 2, 3, 5 – trifeniltetrazolio), compuesto incoloro, a formazán, de color rojo oscuro. Para su preparación se añadieron 41,5 g del medio deshidratado a 1 L de agua destilada, se disolvió a 100 °C en un agitador termostático, se esterilizó en autoclave 20 min (121 °C durante 15 minutos) y una vez atemperado se distribuyó en placas Petri.

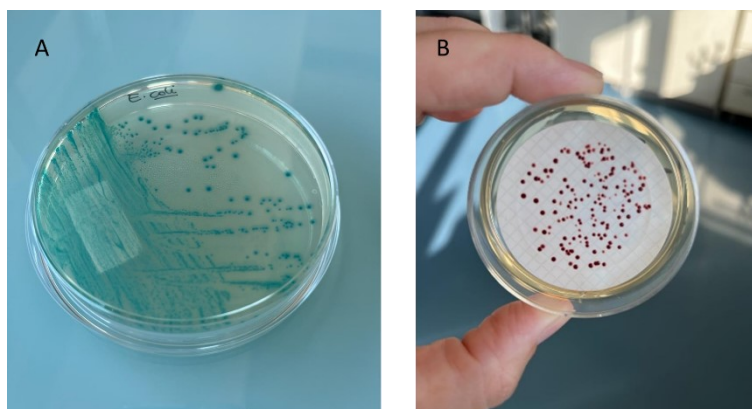


Figura 10. A) Aislamiento e identificación en medio TBX de *E. coli* procedente de aguas de EDAR. **B)** Aislamiento en medio SB de *Enterococcus* spp. procedente de aguas continentales.

Agar Bilis Esculina Azida (BEA) (VWR, Barcelona, España). Empleado para confirmar la identificación de las presuntas colonias de enterococos (ISO 7899-2: 2001). Las colonias características muestran un color marrón-negro, por la capacidad que tienen de hidrolizar la esculina, de forma que el producto final, la 6,7-dihidroxicumarina se combina con los iones de hierro, dando lugar al color de identificación característico (Figura 11). Para su preparación se pesaron 13 g de agar, 3 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de bilis, 1 g de esculina, 0,5 g de citrato de hierro, 17 g de peptona de caseína (triptona) y 0,15 g de azida de sodio. Luego se añadió todo en 1 L de agua destilada y se calentó hasta que se disolvieron todos los componentes. Se esterilizó en autoclave 15 min (121 °C durante 15 minutos) y una vez aatemperado se distribuyó en placas Petri.

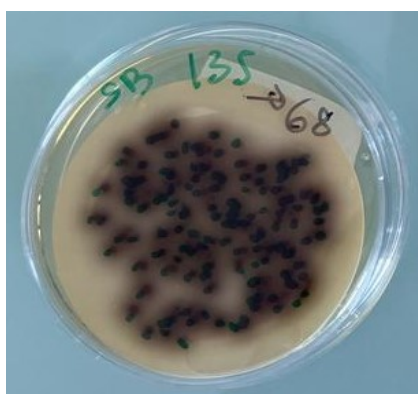


Figura 11. Confirmación en medio BEA de *Enterococcus* spp. procedente de aguas continentales.

2.2. Procesamiento de las aguas destinadas al riego

Los análisis fueron llevados a cabo mediante filtración por membrana (ISO 9308-1: 2014). Las muestras de agua se filtraron al vacío a través de membranas de nitrocelulosa con un

diámetro de poro de 0,45 μm (Millipore, Reino Unido). Los volúmenes de filtración variaron en relación con la carga microbiana esperada y procedencia de la muestra: Las muestras de agua residual (EDAR) procedentes de la salida del tratamiento secundario (SS) fueron filtradas en volúmenes de 1 mL y 5 mL, mientras que para las muestras procedentes del tratamiento terciario (ST) se aumentaron los volúmenes a 50 mL y 100 mL. Para las aguas de riego superficiales se filtraron 100 mL de muestra. En todos los casos, la filtración se realizó por cuadruplicado.



Figura 12. Rampa de filtración (Millipore).

Las membranas fueron depositadas asépticamente sobre Agar CC. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h, tras las cuales se llevó a cabo el recuento de colonias características de coliformes, que presentaron un color rosado, y *E. coli*, de color azul-púrpura.

Los resultados se expresaron como la media de los cuatro ensayos, en UFC (Unidades Formadoras de Colonias)/100 mL de agua. Debido a los diferentes volúmenes de muestra que fueron filtrados, la cantidad de microorganismos presentes en las muestras procedentes del efluente secundario de las EDAR se consideraron “incontables” cuando su número superaba 4 \log_{10} UFC/100 mL, mientras que, para el resto de las muestras, esta cantidad fue de 3 \log_{10} UFC/100 mL.

Posteriormente se seleccionaron al menos 25 colonias típicas de *E. coli* por cada punto de muestreo (entre 5 y 6 colonias por cada una de las placas), que se aislaron mediante sucesivas resiembras en medio TBX. Una vez aisladas, las cepas se conservaron a -20 °C en crioviales MicrobankTM-Blue (Pro-Lab Diagnostics, Quimigen S.L. Madrid, España). Adicionalmente, se preparó una suspensión de cada colonia en tampón TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8) para la posterior extracción del DNA bacteriano.

Además del análisis descrito previamente, se realizó un recuento dirigido, para detectar coliformes y *E. coli* capaces de crecer en presencia de diversos antibióticos. Para ello, se prepararon placas de Agar CC adicionadas por separado con 5 antibióticos diferentes: ampicilina

(AMP), ciprofloxacino (CIP), eritromicina (ERI), oxitetraciclina (OXI), y sulfametoxazol (SXT), todos ellos suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). Las concentraciones de antibiótico utilizadas (Tabla 8) se determinaron en base a los puntos de corte de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) propuestas en el informe Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Weinstein *et al.*, 2018) para enterobacterias. Cuando no existían límites para estos tipos de microorganismos, se utilizaron las concentraciones utilizadas previamente en la bibliografía (Pei *et al.*, 2006; Proia *et al.*, 2018).

Tabla 8. Concentración de antibióticos añadidos al medio de cultivo.

Antibiótico	Concentración (mg/L)
Ampicilina	32
Ciprofloxacino	4
Oxitetraciclina	45,5
Eritromicina	8
Sulfametoxazol	16

Las muestras fueron filtradas también por cuadruplicado, y procesadas de la misma forma descrita previamente para los recuentos convencionales.

2.3. Procesamiento de las muestras de agua de costa

Para el estudio de la calidad higiénico-sanitaria de las muestras de agua de mar se siguió un método comercial de recuento de coliformes y *E. coli* por número más probable (NMP) en aguas, basado en la Norma ISO 9308-2: 2012 (Colilert-18®, IDEXX Labs., Hooddorp, The Netherlands). Este método se basa en la tecnología de Sustrato Definido (DST), en la que el medio de cultivo contiene un sustrato cromogénico, ONPG (o-nitrofenil-D-galactopiranosido), y otro fluorogénico, MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido). El reactivo DST se mezcla con 100 ml de muestra y se incuba para determinar el número más probable (NMP) de microorganismos presentes en la muestra. Cuando la enzima β -D- galactosidasa de las bacterias coliformes metaboliza el sustrato indicador ONPG, el color de la muestra se vuelve amarillo. Cuando la actividad β -D-glucuronidasa de *E. coli* produce la hidrólisis del segundo nutriente indicador (MUG), la muestra emite fluorescencia con luz UV. El método permite la detección simultánea de estas bacterias en 24 horas.

Dado que se esperaba una elevada carga microbiana en este tipo de aguas (> 200 UFC/100 mL), todas las muestras fueron diluidas (1/10) con agua destilada estéril antes de su análisis, realizado siguiendo las instrucciones y pasos indicados por el fabricante (Figura 13).

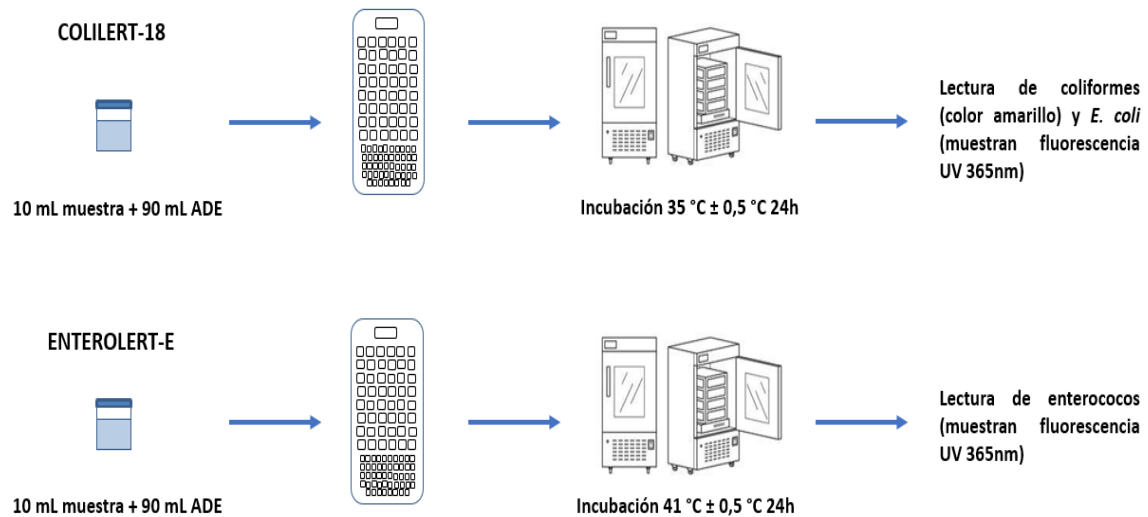


Figura 13. Esquema del método Colilert-18 y Enterolert-E.

Tras la incubación, el color de los pocillos se evaluó de acuerdo con el Colilert Quanti Tray, Comparator® suministrado por el fabricante, considerando como positivo para coliformes aquellos pocillos que poseían color amarillo de igual o mayor intensidad que el del comparador. Si además del color amarillo, se observaba fluorescencia al ser irradiado con luz ultravioleta de 365 nm, el pocillo se consideró positivo para la presencia de *E. coli* (Figura 14). En ambos casos, el valor del resultado en UFC/100 mL, correspondiente al número de pocillos positivos, se encuentra en la tabla B2 de NMP que aparece en el anexo B de la Norma ISO 9308-2.

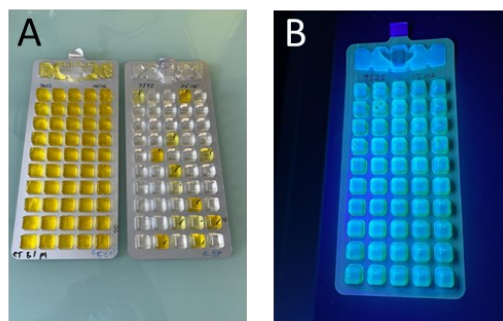


Figura 14. Placas de Colilert-18 de aguas de mar positivas para **A)** coliformes y **B)** *E. coli*.

A partir de los pocillos positivos para *E. coli*, con un asa estéril se realizó una siembra en triple estría en agar TBX para su aislamiento. Tras la incubación (44 °C, 24 h) las colonias de *E. coli*, de coloración azul-celeste, fueron crecidas en medio agar nutritivo, a partir del cual se

procedió a su congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en crioviales MicrobankTM-Blue (Pro-Lab Diagnostics, Quimigen S.L. Madrid, España) y su inoculación en tampón TE, para la posterior extracción del DNA.

Para el recuento de enterococos se siguió el método de recuento alternativo con certificado AFNOR (Nº IDX 33/04-02/15), conocido comercialmente como Enterolert-E (IDEXX, Labs., Hooddorp, The Netherlands) (Figura 13), también basado en la tecnología de sustrato definido (DST). El reactivo contiene un indicador, 4-metil-umbeliferil- β -D-glucósido. Cuando la enzima β -glucosidasa de los enterococos lo hidroliza, se produce fluorescencia, que puede ser observada con luz ultravioleta de 365 nm (Figura 15). Se consideró como positivo el pocillo que presentó fluorescencia azul al ser irradiado con luz ultravioleta de 365 nm en cámara oscura. Los resultados positivos para enterococos observados antes de las 24 h de incubación, así como los negativos observados después de 28 h se consideraron como válidos. El valor del resultado (UFC/100 mL), correspondiente al número de pocillos positivos, se encuentra en el Anexo B de la Norma ISO 9308-2.



Figura 15. Placa de Enterolert-E de aguas de mar.

A partir de los pocillos positivos para enterococos, con un asa estéril se realizó una siembra en triple estría en agar SB para su aislamiento. Tras la incubación ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 48 horas) las colonias típicas de enterococos (coloración roja, marrón o rosada) se confirmaron sembrándolas en medio de cultivo BEA. Posteriormente, cada una de las colonias fue crecida en agar nutritivo, a partir del cual se procedió a su congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en crioviales MicrobankTM-Blue (Pro-Lab Diagnostics, Quimigen S.L. Madrid, España) y su suspensión en tampón TE, para la extracción del DNA.

2.4. Procesamiento de las muestras de aguas continentales

Los análisis se llevaron a cabo mediante filtración por membrana (ISO 9308-1: 2014, ISO 7899-2: 2001). Cien mililitros de las muestras se filtraron al vacío a través de filtros de membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0,45 μm (Millipore, Reino Unido) y se colocaron asépticamente sobre placas con TBX, para la detección de *E. coli*, y sobre medio SB para enterococos, por duplicado. Las placas fueron incubadas a 37 °C, durante 24 y 48 h, respectivamente y los resultados se expresaron como UFC /100 mL de agua.

A continuación, entre 3 y 5 colonias se cultivaron en agar TBX para confirmar la identificación de las presuntas colonias de *E. coli*. Para la confirmación de los enterococos, las colonias sospechosas en agar SB (coloración rojo oscuro) se sembraron en agar BEA.

Una vez aisladas, todas las cepas fueron cultivadas para su congelación a -20 °C en crioviales MicrobankTM-Blue (Pro-Lab Diagnostics, Quimigen S.L. Madrid, España), así como conservadas en tampón TE, para la posterior extracción de DNA.

3. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE AGUA

La detección de resistencias a antibióticos de los diferentes aislados obtenidos de todas las muestras de agua analizadas se llevó a cabo siguiendo la técnica de microdilución, en concordancia con los métodos descritos por el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), métodos de referencia internacional (Norma ISO 20776-1:2006). En el análisis de las posibles resistencias se utilizaron los puntos de corte epidemiológicos descritos por dicha Norma.

Para este estudio se utilizó el sistema automatizado Thermo Scientific Sensititre[®] (Thermo Fischer Scientific, Madrid, España), usando placas EUVSEC para *E. coli* y EUVNEC para enterococos. Estas placas se componen de noventa y seis pocillos, los cuales llevan integrados y deshidratados los antibióticos establecidos en el Diario Oficial de la Unión Europea 2013/652/UE, en un intervalo de dilución determinado, adecuado a los puntos de corte establecidos por EUCAST.

El procedimiento seguido fue el descrito por el fabricante (Figura 16): Se resuspendieron 3-4 colonias de cada aislado, procedentes de un cultivo de 24 horas, en 5 mL de agua destilada, con el fin de alcanzar el valor de opacidad 0,5 de la escala McFarland (equivalente a un inóculo de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL), midiendo la concentración con el nefelómetro Sensititre[®] (Thermo

Fischer Scientific, Madrid, España). Una vez ajustada la densidad de la suspensión, se transfirió a un tubo con 5 mL de caldo Mueller-Hinton el volumen correspondiente para alcanzar una concentración final de 10^6 UFC/mL. Para confirmar que se estaba trabajando con un cultivo puro, se realizó una siembra en agar TBX para *E. coli*, y en medio BEA para enterococos.

Posteriormente se procedió a la inoculación de las placas correspondientes, utilizando los cabezales desechables suministrados por el fabricante, con el equipo Sensititre Automated Inoculation Delivery System®, seleccionando los parámetros correspondientes al microorganismo estudiado. Este inoculador permite diferentes opciones: por un lado, el volumen que se quiere dispensar en cada pocillo y, por otro lado, la distribución de muestras en la placa (una o más cepas por placa).

Al finalizar la dispensación, la placa se cubrió con una lámina adhesiva para evitar la evaporación y la posible contaminación de la muestra y se incubó durante 24h a 37 °C. Trascurrido el tiempo de incubación se procedió a la visualización de los resultados mediante el sistema digital de visualización CIM Thermo Scientific Sensititre Vizion®.



Figura 16. Sistema automatizado Thermo Scientific Sensititre®.

Los antibióticos ensayados para *E. coli* fueron ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacino, cloranfenicol, colistina, gentamicina, meropenem, ácido nalidíxico, tetraciclina, trimetoprim, y tigeciclina (Figura 17).

Para los aislados de enterococos se utilizaron placas EUVNEC con los siguientes antibióticos: ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacino, daptomicina, eritromicina, gentamicina, linezolid, quinupristin/dalfopristin, tetraciclina, tigeciclina, teicoplanin y vancomicina (Figura 18).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SMX 1024	TMP 32	CIP 8	TET 64	MERO 16	AZI 64	NAL 128	CHL 128	TGC 8	COL 16	AMP 64	GEN 32
B	SMX 512	TMP 16	CIP 4	TET 32	MERO 8	AZI 32	NAL 64	CHL 64	TGC 4	COL 8	AMP 32	GEN 16
C	SMX 256	TMP 8	CIP 2	TET 16	MERO 4	AZI 16	NAL 32	CHL 32	TGC 2	COL 4	AMP 16	GEN 8
D	SMX 128	TMP 4	CIP 1	TET 8	MERO 2	AZI 8	NAL 16	CHL 16	TGC 1	COL 2	AMP 8	GEN 4
E	SMX 64	TMP 2	CIP 0,5	TET 4	MERO 1	AZI 4	NAL 8	CHL 8	TGC 0,5	COL 1	AMP 4	GEN 2
F	SMX 32	TMP 1	CIP 0,25	TET 2	MERO 0,5	AZI 2	NAL 4	FOT 1	TGC 0,25	TAZ 2	AMP 2	GEN 1
G	SMX 16	TMP 0,5	CIP 0,12	CIP 0,03	MERO 0,25	MERO 0,06	FOT 4	FOT 0,5	TAZ 8	TAZ 1	AMP 1	GEN 0,5
H	SMX 8	TMP 0,25	CIP 0,06	CIP 0,015	MERO 0,12	MERO 0,03	FOT 2	FOT 0,25	TAZ 4	TAZ 0,5	POS	POS

Figura 17. Distribución de antibióticos (mg/L) en las placas EUVSEC. (SMX: sulfametoxazol; TMP: trimetoprim; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; MERO: meropenem; AZI: azitromicina; NAL: ácido nalidíxico; FOT: cefotaxima; CHL: cloranfenicol; TGC: tigeciclina; TAZ: ceftazidima; COL: colistina; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; POS: control positivo. Las líneas gruesas indican la posición de los pocillos control).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VAN 128	TEI 64	SYN 64	TET 128	DAP 32	CIP 16	ERY 128	TGC 4	LZD 64	GEN 1024	AMP 64	CHL 128
B	VAN 64	TEI 32	SYN 32	TET 64	DAP 16	CIP 8	ERY 64	TGC 2	LZD 32	GEN 512	AMP 32	CHL 64
C	VAN 32	TEI 16	SYN 16	TET 32	DAP 8	CIP 4	ERY 32	TGC 1	LZD 16	GEN 256	AMP 16	CHL 32
D	VAN 16	TEI 8	SYN 8	TET 16	DAP 4	CIP 2	ERY 16	TGC 0,5	LZD 8	GEN 128	AMP 8	CHL 16
E	VAN 8	TEI 4	SYN 4	TET 8	DAP 2	CIP 1	ERY 8	TGC 0,25	LZD 4	GEN 64	AMP 4	CHL 8
F	VAN 4	TEI 2	SYN 2	TET 4	DAP 1	CIP 0,5	ERY 4	TGC 0,12	LZD 2	GEN 32	AMP 2	CHL 4
G	VAN 2	TEI 1	SYN 1	TET 2	DAP 0,5	CIP 0,25	ERY 2	TGC 0,06	LZD 1	GEN 16	AMP 1	POS
H	VAN 1	TEI 0,5	SYN 0,5	TET 1	DAP 0,25	CIP 0,12	ERY 1	TGC 0,03	LZD 0,5	GEN 8	AMP 0,5	POS

Figura 18. Distribución de antibióticos (mg/L) en las placas EUVNEC. (VAN: vancomicina; TEI: teicoplanin; SYN: quinupristin/dalfopristin; TET: tetraciclina; DAP: daptomicina; CIP: ciprofloxacino; ERY: eritromicina; TGC: tigeciclina; LZD: linezolid; GEN: gentamicina; AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; POS: control positivo).

Con la finalidad de asegurar el correcto funcionamiento del sistema se utilizaron controles internos siguiendo las recomendaciones y cepas de referencia especificadas en la Norma ISO

11133:2014 (Tabla 9). Las cepas fueron suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Valencia, España).

Tabla 9. Cepas de referencia utilizadas para control interno.

Microorganismos	CECT
<i>Enterococcus faecalis</i>	795
<i>Enterococcus faecalis</i>	481
<i>Enterococcus faecium</i>	410
<i>Enterococcus faecium</i>	8224
<i>Escherichia coli</i>	516
<i>Escherichia coli</i>	434
<i>Escherichia coli</i>	943

4. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

4.1. Procesamiento de las muestras y aislados

Se estudió la presencia de genes de resistencia (ARG), tanto directamente en las muestras de agua como en los aislados procedentes de todas ellas.

Para la detección en las muestras de agua, se filtraron volúmenes de 300 mL de cada muestra y tipo de agua. Una vez finalizada la filtración, las membranas fueron cortadas en pequeños trozos con la ayuda de pinzas y bisturís, previamente esterilizados, y sus fragmentos depositados en tubos Eppendorfs de 1,5 mL.

Para la extracción del DNA de los aislados, se descongelaron a temperatura ambiente los inóculos que estaban conservados en tampón TE.

4.2. Extracción del DNA

Para la extracción del DNA genómico a partir, tanto de las muestras de agua como de los aislados de *E. coli* y enterococos, se utilizó GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de las muestras de agua, previamente se añadieron al tubo Eppendorf que contenía los fragmentos de membrana, 80 mg de perlas de cristal (Glass beads, Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 500 µL de tampón de lisis, provisto en el kit; se agitó durante 20 min a 3000 rpm en el Disruptor Gene® (USA Scientific, Ocala, FL, USA) y, a partir, de este punto se siguieron los pasos descritos por el fabricante. Asimismo, las bacterias grampositivas fueron previamente

tratadas con lisozima (20 mg/mL) durante 10 minutos a 55 °C para lisar de manera efectiva la pared celular.

El DNA extraído se conservó a -21 °C en caso de no ser procesado inmediatamente.

4.3. Amplificación del DNA por PCR para la detección de genes de resistencia

La detección de los ARG se llevó a cabo mediante PCR convencional. Los genes seleccionados fueron: *bla*TEM (productor de la betalactamasa *bla*TEM, responsable de la resistencia a ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, carbenicilina y cefalosporinas de primera generación), *tetW* (gen de resistencia a la tetraciclina), *ermB* (gen que confiere resistencia a los macrólidos), *sull* (gen de resistencia a sulfonamidas) y *qnrS* (gen que codifica resistencia a las quinolonas).

Las secuencias de cebadores utilizadas, así como las condiciones de las diferentes reacciones de PCR fueron seleccionadas de acuerdo con la información disponible en la bibliografía (Tabla 10). Los cebadores fueron sintetizados por TIB MOLBIOL (Madrid, España).

Tabla 10. Cebadores específicos para cada gen estudiado y tamaño esperado del amplicón.

Cebadores	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Referencia
5' -GCKGCCAACTTACTTCTGACAACG- 3' 5' -CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA- 3'	<i>bla</i> TEM	247	Xi <i>et al.</i> (2009)
5' -GAGAGCCTGCTATATGCCAGC- 3' 5' -CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA- 3'	<i>tetW</i>	168	Aminov <i>et al.</i> (2001)
5' -GATACCGTTTACGAAATTGG- 3' 5' -GAATCGAGACTTGAGTGTGC- 3'	<i>ermB</i>	364	Chen <i>et al.</i> (2007)
5' -CGCACCGGAAACATCGCTGCAC- 3' 5' -TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG- 3'	<i>sull</i>	163	Pei <i>et al.</i> (2006)
5' -GACGTGCTAACTTGCCTGAT- 3' 5' -TGCCATTGTTGGAAACTTG- 3'	<i>qnrS</i>	118	Marti y Balcazar (2013)

Para la reacción de PCR se preparó un volumen final de 25 µL, añadiendo a 22,5 µL de la mezcla de reacción (1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,25 µM de cada uno de los cebadores y 2,5 U de Taq polimerasa en tampón 1X) 2,5 µL del DNA extraído. Se incluyó en cada reacción de PCR un control positivo procedente de una muestra de nuestra colección, y un control negativo, con agua ultrapura estéril, para comprobar que no se estaba produciendo ninguna contaminación cruzada por DNA exógeno.

Las reacciones de PCR se llevaron cabo en un Termociclador modelo Mastercycler®Pro (Eppendorf, Alemania), seleccionando un programa específico para la amplificación de cada gen, en las condiciones que se recogen en la Tabla 11.

Tabla 11. Ciclos y temperaturas de la amplificación para cada gen estudiado.

Gen	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Fase
blaTEM <i>Xi et al. (2009)</i>	1	95	3 min	Desnaturalización
	40	95	15 s	Desnaturalización
		60	20 s	Unión de cebadores
		72	1 min	Extensión
1	72	1 min	Extensión	
ermB <i>Chen et al. (2007)</i>	1	94	4 min	Desnaturalización
	30	94	30 s	Desnaturalización
		58	30 s	Unión de cebadores
		72	45 s	Extensión
1	72	7 min	Extensión	
qnrS <i>Marti y Balcazar (2013)</i>	1	95	3 min	Desnaturalización
	40	95	15 s	Desnaturalización
		62	20 s	Unión de cebadores
		72	1 min	Extensión
1	72	1 min	Extensión	
tetW <i>Aminov et al. (2001)</i>	1	95	3 min	Desnaturalización
	40	95	15 s	Desnaturalización
		60	20 s	Unión de cebadores
		72	1 min	Extensión
1	72	1 min	Extensión	
sulI <i>Pei et al. (2006)</i>	1	95	3 min	Desnaturalización
	40	95	15 s	Desnaturalización
		65	20 s	Unión de cebadores
		72	1 min	Extensión
1	72	1 min	Extensión	

4.4. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de resultados

Tras la reacción, los amplicones se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Conda, España) al 1,3%, en tampón TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM). Para conseguir una correcta visualización de las bandas, se añadieron 5 µL de RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Ecogen, Madrid, España) por cada 100 mL de gel preparado. Como marcador de pesos moleculares se utilizaron 7 µL de GeneRuler 100 bp DNA Ladder, 0,5 µg/µL (Thermo Fisher, Madrid, España). Una vez finalizada la electroforesis, se visualizaron las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados en un transiluminador (Thermo Fisher, Madrid, España) con luz UV.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software Statgraphics (Centurion XVII, Statgraphics Technologies, EEUU). La comparación de los recuentos de microorganismos obtenidos para las diferentes muestras se realizó mediante el método de la Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher en la prueba *post-hoc* de Rangos Múltiples, y se llevó a cabo un Análisis de Varianza Multifactorial, con la finalidad de determinar qué factores (origen de la muestra, momento del muestreo, etc.) presentaban un efecto estadísticamente significativo sobre los resultados.

Para el caso de muestras apareadas se utilizó el test t, mientras que las diferencias en la frecuencia de detección de los diferentes genes de resistencia en los distintos tipos de muestras se compararon mediante la prueba X^2 , a partir de tablas de contingencia.

IV. Resultados

1. ESTUDIO DE AGUAS DESTINADAS AL RIEGO

1.1. Calidad microbiológica

A continuación, se muestran los resultados obtenidos a partir del estudio de los distintos efluentes de EDAR (36 muestras) así como de aguas procedentes del Río Turia y de acequias situadas en el área metropolitana de la ciudad de Valencia (25 muestras).

1.1.1. Aguas de EDAR

Los resultados de los recuentos de coliformes y de *E. coli* en las muestras de agua que fueron recogidas de las EDAR se muestran en las Tablas 12 y 13, respectivamente.

En la EDAR 1 y en la EDAR 3, el agua del efluente del tratamiento secundario (muestra SS) presentó recuentos de coliformes superiores al límite máximo de cuantificación (“incontables”, $> 4 \log_{10}$ UFC/100 mL) en todos los muestreos realizados. En las muestras SS de la EDAR 2 se observaron recuentos muy altos de coliformes, siendo imposibles de cuantificar, excepto en M1 ($3,6 \pm 0,1 \log_{10}$ UFC/100 mL). Aunque los niveles de coliformes detectados en los efluentes ST de las EDAR 1 y 2 mostraron una mayor variabilidad que la EDAR 3 a lo largo de los diferentes muestreos, el estudio estadístico no detectó diferencias significativas entre los muestreos realizados en primavera (M1, M2 y M3) y otoño (M4, M5 y M6) para ninguna de las EDAR estudiadas.

Los niveles de *E. coli* (Tabla 13) detectados en las muestras procedentes del efluente SS fueron elevados a lo largo de todos los muestreos y para las tres EDAR, siendo imposibles de cuantificar en muchos de ellos.

Por lo que respecta a las muestras ST, se observó un descenso en los recuentos de coliformes y *E. coli* en todas ellas respecto a los obtenidos para las muestras SS. Este descenso era estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en el caso de los recuentos de *E. coli*, y mayor para la EDAR 1. También para *E. coli*, se hallaron diferencias significativas entre los muestreos realizados durante la primavera (M1, M2 y M3) y otoño (M4, M5 y M6) para el efluente ST de la EDAR 1.

Cuando los niveles medios de *E. coli* obtenidos para el efluente ST se compararon con la legislación que regula la calidad de las aguas depuradas reutilizadas para el riego (R.D. 1620/2007) se observó que el efluente terciario de las EDAR 1 y 2 cumplía con la normativa española ($1,1 \log_{10}$ UFC/100 mL y $1,9 \log_{10}$ UFC/100 mL, respectivamente), mientras que la calidad microbiológica del efluente de la EDAR 3 estaba por encima de los estándares de la norma.

Tabla 12. Recuentos de coliformes (\log_{10} UFC/100 mL) en las muestras procedentes de EDAR.

EDAR	Efluente	M1	M2	M3	M4	M5	M6
EDAR 1	SS	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$
	ST	$1,5 \pm 0,1^{bA}$	$>3,0 \pm 0,0^{bD}$	$1,9 \pm 0,1^{bB}$	$2,1 \pm 0,0^{bC}$	$2,1 \pm 0,0^{bC}$	$2,1 \pm 0,1^{bC}$
EDAR 2	SS	$3,6 \pm 0,1^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aB}$	$>4,0 \pm 0,0^{aB}$	$>4,0 \pm 0,0^{aB}$	$>4,0 \pm 0,0^{aB}$	$>4,0 \pm 0,0^{aB}$
	ST	$1,9 \pm 0,1^{bA}$	$>3,0 \pm 0,0^{bE}$	$>3,0 \pm 0,0^{bE}$	$2,6 \pm 0,0^{bC}$	$2,2 \pm 0,1^{bB}$	$2,9 \pm 0,0^{bD}$
EDAR 3	SS	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$
	ST	$>3,0 \pm 0,0^{aA}$	$>3,0 \pm 0,0^{aA}$	$>3,0 \pm 0,0^{aA}$	$>3,0 \pm 0,0^{aA}$	$>3,0 \pm 0,0^{aA}$	$>3,0 \pm 0,0^{aA}$

Los valores se expresan como la media del \log_{10} (UFC/100 mL) calculados para cada muestreo \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) se expresan con superíndices diferentes (con letras en mayúscula entre muestreos, dentro de una misma fila; con letras en minúscula entre efluentes para una misma EDAR). SS: Salida Secundaria; ST Salida Terciaria; M1: Muestreo 1; M2: Muestreo 2; M3: Muestreo 3; M4: Muestreo 4; M5: Muestreo 5; M6: Muestreo 6.

Tabla 13. Recuentos de *E. coli* (\log_{10} UFC/100 mL) en las muestras procedentes de EDAR.

EDAR	Efluente	M1	M2	M3	M4	M5	M6
EDAR 1	SS	$3,9 \pm 0,1^{aA}$	$>4,0 \pm 0,1^{aA}$	$3,9 \pm 0,2^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$
	ST	$0,8 \pm 0,2^{bAB}$	$0,3 \pm 0,5^{bA}$	$0,3 \pm 0,5^{bA}$	$1,2 \pm 0,1^{bC}$	$1,3 \pm 0,0^{bC}$	$1,3 \pm 0,0^{bC}$
EDAR 2	SS	$3,1 \pm 0,1^{aA}$	$3,6 \pm 0,0^{aB}$	$>4,0 \pm 0,0^{aCA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aC}$	$>4,0 \pm 0,0^{aC}$	$>4,0 \pm 0,0^{aC}$
	ST	$1,3 \pm 0,1^{bA}$	$2,3 \pm 0,1^{bE}$	$1,6 \pm 0,0^{bE}$	$2,1 \pm 0,0^{bC}$	$1,9 \pm 0,0^{bB}$	$2,0 \pm 0,1^{bD}$
EDAR 3	SS	$>4,0 \pm 0,0^{aB}$	$>4,0 \pm 0,0^{aB}$	$>4,0 \pm 0,0^{aB}$	$>4,0 \pm 0,0^{aB}$	$>4,0 \pm 0,0^{aB}$	$3,9 \pm 0,0^{aA}$
	ST	$1,9 \pm 0,0^{bA}$	$>3,0 \pm 0,0^{bB}$	$>3,0 \pm 0,0^{bB}$	$>3,0 \pm 0,0^{bB}$	$>3,0 \pm 0,0^{bB}$	$>3,0 \pm 0,0^{bB}$

Los valores se expresan como la media del \log_{10} UFC/100 mL calculados para cada muestreo \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) se expresan con superíndices diferentes (con letras en mayúscula entre muestreos, dentro de una misma fila; con letras en minúscula entre efluentes para una misma EDAR). SS: Salida Secundaria; ST Salida Terciaria; M1: Muestreo 1; M2: Muestreo 2; M3: Muestreo 3; M4: Muestreo 4; M5: Muestreo 5; M6: Muestreo 6.

1.1.2. Aguas superficiales para riego

Los resultados de los recuentos de *E. coli* en las muestras de agua se muestran en la Tabla 14. Los recuentos de coliformes fueron incontables para todas las muestras y muestreos.

Los resultados mostraron elevados niveles de *E. coli* para todas las aguas y muestreos realizados. Los mayores niveles se detectaron en la Acequia de Vera, siendo incontables ($>4,0 \log_{10}$ UFC/100 mL) en todos los muestreos, así como en la Acequia de Rascanya y el Barranco de Carraixet, puntos para los que, en tres de los cinco muestreos, también se observaron niveles incontables. Los niveles de *E. coli* solo fueron cuantificables para todos los muestreos en las aguas del Río Turia y la Acequia de Moncada. Se observó también que el momento del muestreo no tuvo un efecto significativo en los niveles de contaminación detectados.

Tabla 14. Recuentos de *E. coli* (\log_{10} UFC/100 mL) en aguas superficiales para riego.

	M1	M2	M3	M4	M5
RT	$3,3 \pm 0,0^{abA}$	$3,5 \pm 0,0^{cB}$	$3,6 \pm 0,2^{bB}$	$3,4 \pm 0,1^{cB}$	$3,3 \pm 0,0^{bB}$
AM	$3,0 \pm 0,0^{abA}$	$3,8 \pm 0,1^{bB}$	$3,3 \pm 0,0^{cB}$	$3,0 \pm 0,0^{cB}$	$3,0 \pm 0,3^{bB}$
AR	$2,8 \pm 0,1^{bA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aC}$	$>4,0 \pm 0,0^{aC}$	$3,9 \pm 0,2^{bB}$	$>4,0 \pm 0,0^{aC}$
AV	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aA}$
BC	$3,3 \pm 0,2^{abA}$	$>4,0 \pm 0,0^{aD}$	$>4,0 \pm 0,0^{aD}$	$3,9 \pm 0,1^{bB}$	$>4,0 \pm 0,0^{aC}$

Los valores son medias \pm desviación estándar del \log_{10} (UFC/100 mL) calculados para cada muestreo. El análisis estadístico de comparación entre acequias se muestra en la Tabla con los superíndices en minúscula. El análisis estadístico de comparación entre muestreos para una misma acequia se indica con letras mayúscula: Dentro de una misma fila, superíndices (en minúscula) distintos denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) Dentro de cada columna, superíndices (en mayúscula) distintos denotan diferencias significativas ($p < 0,05$). RT: Río Turia; AM: Acequia de Moncada; AR: Acequia de Rascanya; AV: Acequia de Vera; BC: Barranco de Carraixet. M1: Muestreo 1; M2: Muestreo 2; M3: Muestreo 3; M4: Muestreo 4; M5: Muestreo 5.

Al igual que para las aguas de EDAR, se compararon los niveles medios de *E. coli* obtenidos para cada uno de los puntos muestreados con la legislación que regula la calidad de las aguas depuradas reutilizadas para el riego (R.D. 1620/2007 y Reglamento (UE) 2020/741), observándose que ninguno de ellos cumplía con los estándares de calidad requeridos en la normativa.

1.2. Detección de coliformes y *E. coli* en medios adicionados con antibióticos

De forma paralela a los anteriores análisis, y con el fin de determinar los niveles globales de enterobacterias coliformes y *E. coli* “presuntivamente resistentes”, es decir, capaces de crecer en presencia de concentraciones de antibióticos superiores a las consideradas inhibitorias para enterobacterias sensibles, se realizaron recuentos en medio CC adicionado con 5

antibióticos diferentes, siguiendo la misma metodología que en el apartado anterior. Como controles para la comparación estadística se utilizaron los resultados obtenidos en los medios sin antibiótico.

1.2.1. Aguas de EDAR

1.2.1.1. EDAR 1

La Tabla 15 muestra los recuentos de coliformes presuntivamente resistentes a antibióticos, obtenidos de los efluentes de la EDAR 1.

Tabla 15. Recuentos de coliformes de la EDAR 1 (\log_{10} UFC/100 mL).

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	
SS	CC	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^{ab}$
	AMP	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$
	CIP	$>4,0 \pm 0,0^a$	$2,8 \pm 0,2^d$	$3,0 \pm 0,1^c$	$3,7 \pm 0,0^b$	$3,8 \pm 0,0^b$	$3,7 \pm 0,0^b$
	ERI	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$
	OXI	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,1 \pm 0,1^c$	$3,3 \pm 0,2^b$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$
	SUL	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,6 \pm 0,0^b$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$
ST	CC	$1,5 \pm 0,1^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$1,9 \pm 0,1^p$	$2,1 \pm 0,0^p$	$2,1 \pm 0,0^p$	$2,1 \pm 0,1^p$
	AMP	$0,8 \pm 0,9^{qr}$	$0,5 \pm 0,3^r$	$0,8 \pm 0,2^q$	$1,4 \pm 0,0^r$	$1,5 \pm 0,0^r$	$1,5 \pm 0,1^r$
	CIP	$0,6 \pm 0,4^r$	$0,0 \pm 0,0^s$	$0,2 \pm 0,3^r$	$1,0 \pm 0,1^t$	$1,2 \pm 0,1^t$	$1,3 \pm 0,0^t$
	ERI	$1,5 \pm 0,1^p$	$0,8 \pm 0,2^q$	$1,9 \pm 0,1^p$	$1,9 \pm 0,0^q$	$1,9 \pm 0,0^q$	$1,9 \pm 0,0^q$
	OXI	$0,5 \pm 0,3^r$	$0,0 \pm 0,0^s$	$0,0 \pm 0,0^r$	$0,9 \pm 0,0^u$	$1,0 \pm 0,1^u$	$1,1 \pm 0,1^u$
	SUL	$1,0 \pm 0,2^{pqr}$	$0,0 \pm 0,0^s$	$0,3 \pm 0,4^r$	$1,2 \pm 0,1^s$	$1,4 \pm 0,0^s$	$1,4 \pm 0,0^s$

Los valores se expresan como la media del \log_{10} (UFC/100 mL) calculados para cada muestreo \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas dentro de una misma columna ($p < 0,05$) se expresan con superíndices diferentes (a,b,c... para SS; p,q,r... para ST). SS: Salida Secundario; ST Salida Terciario; CC: Control (sin antibiótico); AMP: ampicilina; OXI: oxitetraciclina; ERI: eritromicina; SUL: sulfametoxazol; CIP: ciprofloxacino. M1: Muestreo 1; M2: Muestreo 2; M3: Muestreo 3; M4: Muestreo 4; M5: Muestreo 5; M6: Muestreo 6.

Respecto a la época de la toma de las muestras, solo se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los muestreos de primavera y otoño para el antibiótico OXI, siendo mayores en esta última estación.

En cuanto a las muestras del efluente ST, los antibióticos que ejercieron mayor selectividad fueron CIP (entre $0,0 \pm 0,0$ y $1,3 \pm 0,0 \log_{10}$ UFC/100 mL), OXI (entre $0,0 \pm 0,0$ y $1,1 \pm 0,1 \log_{10}$ UFC/100 mL) y SUL (entre $0,0 \pm 0,0$ y $1,4 \pm 0,0 \log_{10}$ UFC/100 mL), con diferencias significativas respecto al control en todos los muestreos.

La presencia de coliformes resistentes fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los muestreos realizados en otoño (M4, M5, M6) para todos los antibióticos ensayados, mientras que los niveles detectados en las placas control se mantuvieron semejantes en ambas estaciones.

En la Tabla 16 se muestran los niveles de *E. coli* presuntamente resistentes a antibióticos detectados en los efluentes de la EDAR 1.

Tabla 16. Recuentos de *E. coli* de la EDAR 1 (\log_{10} UFC/100 mL).

		M1	M2	M3	M4	M5	M6
SS	CC	3,9 ± 0,1 ^a	>4,0 ± 0,1 ^a	3,9 ± 0,2 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	AMP	3,4 ± 0,1 ^b	3,5 ± 0,1 ^b	3,5 ± 0,1 ^b	3,9 ± 0,0 ^a	3,8 ± 0,0 ^b	3,8 ± 0,0 ^b
	CIP	3,4 ± 0,1 ^b	3,0 ± 0,1 ^d	2,9 ± 0,1 ^d	3,5 ± 0,0 ^b	3,6 ± 0,0 ^d	3,6 ± 0,0 ^c
	ERI	3,9 ± 0,1 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	3,9 ± 0,1 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	OXI	3,4 ± 0,0 ^b	3,3 ± 0,1 ^c	3,3 ± 0,1 ^c	3,9 ± 0,0 ^a	3,7 ± 0,0 ^c	>4,0 ± 0,0 ^a
	SUL	3,5 ± 0,0 ^b	3,4 ± 0,1 ^c	3,5 ± 0,1 ^b	3,8 ± 0,0 ^{ab}	3,8 ± 0,0 ^b	3,8 ± 0,0 ^b
ST	CC	0,8 ± 0,2 ^p	0,3 ± 0,5 ^p	0,3 ± 0,5 ^p	1,2 ± 0,1 ^p	1,3 ± 0,0 ^p	1,3 ± 0,0 ^p
	AMP	0,2 ± 0,3 ^q	0,0 ± 0,0 ^p	0,3 ± 0,4 ^p	0,9 ± 0,1 ^q	1,0 ± 0,1 ^r	1,0 ± 0,1 ^r
	CIP	0,0 ± 0,0 ^q	0,0 ± 0,0 ^p	0,3 ± 0,4 ^p	0,7 ± 0,1 ^r	0,8 ± 0,1 ^s	0,9 ± 0,1 ^s
	ERI	0,3 ± 0,4 ^{pq}	0,2 ± 0,3 ^p	0,2 ± 0,3 ^p	0,9 ± 0,1 ^q	1,1 ± 0,1 ^q	1,1 ± 0,0 ^q
	OXI	0,2 ± 0,3 ^q	0,0 ± 0,0 ^p	0,2 ± 0,3 ^p	0,5 ± 0,2 ^s	0,8 ± 0,0 ^s	0,9 ± 0,0 ^s
	SUL	0,3 ± 0,4 ^{pq}	0,0 ± 0,0 ^p	0,2 ± 0,3 ^p	0,9 ± 0,0 ^q	1,0 ± 0,0 ^r	1,0 ± 0,1 ^r

Los valores se expresan como la media del \log_{10} (UFC/100 mL) calculados para cada muestreo \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas dentro de una misma columna ($p < 0,05$) se expresan con superíndices diferentes (a,b,c... para SS; p,q,r... para ST). SS: Salida Secundaria; ST Salida Terciaria; CC: Control (sin antibiótico); AMP: ampicilina; OXI: oxitetraciclina; ERI: eritromicina; SUL: sulfametoxazol; CIP: ciprofloxacino; M1: Muestreo 1; M2: Muestreo 2; M3: Muestreo 3; M4: Muestreo 4; M5: Muestreo 5; M6: Muestreo 6.

Los valores detectados en el efluente SS fueron, en general, elevados, siendo muchos de ellos incontables. Se observó que la concentración de *E. coli* en las placas adicionadas con ERI no presentó diferencias significativas con el control en ninguno de los muestreos, mientras que para el resto de los antibióticos se observaron disminuciones estadísticamente significativas en todos los recuentos para CIP; en cinco de ellos para SUL y AMP (M1, M2, M3, M5 y M6 en ambos casos) y en cuatro para OXI (M1, M2, M3 y M5). Asimismo, los recuentos obtenidos en los muestreos realizados en otoño (M4, M5, M6) fueron significativamente más altos ($p < 0,05$) que en primavera (M1, M2, M3) para los antibióticos CIP, OXI y SUL.

En las muestras ST, de igual manera que lo observado para coliformes, los niveles de *E. coli* presuntivamente resistentes fueron significativamente menores que los obtenidos en el efluente secundario (SS) ($p < 0,05$). En estas muestras existía gran variabilidad entre muestreos: En M2 y M3, los valores de recuentos detectados no fueron significativamente diferentes a los del control para ninguno de los antibióticos ensayados. Sin embargo, para los muestreos M1, M4, M5 y M6, los recuentos de *E. coli* en presencia de antibióticos fueron menores que los de sus respectivos controles. Para estos muestreos, los antibióticos más selectivos frente a las poblaciones de *E. coli* fueron OXI (entre $0,2 \pm 0,2$ y $0,9 \pm 0,0 \log_{10}$ UFC/100 mL) y CIP (entre $0,0 \pm 0,1$ y $0,9 \pm 0,1 \log_{10}$ UFC/100 mL).

Los recuentos de otoño fueron significativamente mayores que los de primavera, tanto para el control como para todos los antibióticos ensayados ($p < 0,05$).

1.2.1.2. EDAR 2

En las Tablas 17 y 18 se muestran los niveles de coliformes y *E. coli* presuntivamente resistentes, obtenidos del análisis de las muestras procedentes de la EDAR 2, respectivamente.

Respecto a los recuentos de coliformes, en las muestras SS se observaron altos recuentos para todos los muestreos y antibióticos ensayados, siendo imposibles de cuantificar, debido a su elevada concentración, en muchos casos. M1 fue el muestreo en el que se detectaron mayores diferencias con los resultados obtenidos en las placas control: se observó un menor número de bacterias presuntivamente resistentes a CIP ($1,0 \pm 1,2 \log_{10}$ UFC/100 mL) y OXI ($2,0 \pm 0,0 \log_{10}$ UFC/100 mL), con diferencias significativas respecto al control.

El estudio estadístico mostró diferencias significativas entre los muestreos de otoño y primavera, para los antibióticos CIP, OXI y SUL siendo los niveles de resistencias más elevados en otoño ($p < 0,05$).

Tabla 17. Recuentos de coliformes de la EDAR 2 (\log_{10} UFC/100 mL).

		M1	M2	M3	M4	M5	M6
SS	CC	3,6 ± 0,1 ^{ab}	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	AMP	2,7 ± 0,1 ^{bc}	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	CIP	1,0 ± 1,2 ^d	3,0 ± 0,1 ^c	3,9 ± 0,1 ^b	3,9 ± 0,0 ^b	>4,0 ± 0,0 ^a	3,9 ± 0,0 ^b
	ERI	3,8 ± 0,2 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	OXI	2,0 ± 0,0 ^c	3,6 ± 0,2 ^b	>4,0 ± 0,0 ^a	3,9 ± 0,0 ^b	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	SUL	3,0 ± 0,2 ^b	3,7 ± 0,2 ^b	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
ST	CC	1,9 ± 0,1 ^{pq}	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	2,6 ± 0,0 ^p	2,2 ± 0,1 ^p	2,9 ± 0,0 ^p
	AMP	1,3 ± 0,2 ^r	2,7 ± 0,0 ^r	2,8 ± 0,3 ^{pq}	2,5 ± 0,0 ^q	2,0 ± 0,1 ^q	1,9 ± 0,0 ^q
	CIP	0,2 ± 0,3 ^s	2,1 ± 0,1 ^t	1,2 ± 0,1 ^r	2,0 ± 0,0 ^s	0,9 ± 0,0 ^s	1,1 ± 0,1 ^r
	ERI	2,1 ± 0,6 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	2,5 ± 0,0 ^q	2,2 ± 0,1 ^p	2,9 ± 0,0 ^p
	OXI	0,5 ± 0,3 ^s	2,9 ± 0,2 ^q	2,0 ± 1,2 ^{qr}	2,4 ± 0,0 ^r	1,6 ± 0,0 ^r	2,0 ± 0,0 ^q
	SUL	1,3 ± 0,3 ^{qr}	2,5 ± 0,1 ^s	1,8 ± 0,1 ^r	2,4 ± 0,0 ^r	1,5 ± 0,0 ^r	2,0 ± 0,0 ^q

Los valores se expresan como la media del \log_{10} (UFC/100 mL) calculados para cada muestreo \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas dentro de una misma columna ($p < 0,05$) se expresan con superíndices diferentes (a,b,c... para SS; p,q,r... para ST). SS: Salida Secundaria; ST Salida Terciaria; CC: Control (sin antibiótico); AMP: ampicilina; OXI: oxitetraciclina; ERI: eritromicina; SUL: sulfametoxazol; CIP: ciprofloxacino; M1: Muestreo 1; M2: Muestreo 2; M3: Muestreo 3; M4: Muestreo 4; M5: Muestreo 5; M6: Muestreo 6.

Con respecto a las muestras procedentes de ST, los recuentos de coliformes fueron inferiores a los obtenidos en las placas control, excepto para el antibiótico ERI. En todos los muestreos se observó un menor número de bacterias en el medio adicionado con CIP (entre 0,2 \pm 0,3 y 2,1 \pm 0,1 \log_{10} UFC/100 mL) y OXI (entre 0,5 \pm 0,3 y 2,9 \pm 0,2 \log_{10} UFC/100 mL) que en las placas con el resto de antibióticos. Además de ERI, los antibióticos para los que se observó un mayor crecimiento a lo largo de todos los muestreos fueron AMP (entre 1,3 \pm 0,2 y 2,8 \pm 0,3 \log_{10} UFC/100 mL) y SUL (entre 2,5 \pm 0,1 y > 1,3 \pm 0,3 \log_{10} UFC/100 mL).

No se encontraron diferencias significativas entre los recuentos realizados en primavera y otoño ($p > 0,05$).

Respecto a los niveles de *E. coli* capaces de crecer en presencia de los antibióticos ensayados (Tabla 18), en las muestras SS los niveles de contaminación por *E. coli* fueron elevados en todos los muestreos, detectándose niveles no cuantificables para muchos de los antibióticos testados en los muestreos M3 a M6. Las mayores concentraciones de bacterias presuntamente resistentes se observaron para los antibióticos AMP y ERI, sin que los recuentos presentaran diferencias significativas con el control para este último. Asimismo, el análisis estadístico indicó un número significativamente menor de colonias de *E. coli* en las placas adicionadas con OXI

(entre $0,5 \pm 1,0$ y $> 4,0 \pm 0,0 \log_{10}$ UFC/100 mL), CIP (entre $2,2 \pm 0,2$ y $> 4,0 \pm 0,0 \log_{10}$ UFC/100 mL), y SUL (entre $2,4 \pm 0,3$ y $3,9 \pm 0,0 \log_{10}$ UFC/100 mL).

En el análisis comparativo de las concentraciones de *E. coli* detectadas en primavera y otoño se observaron niveles significativamente mayores en otoño ($p < 0,05$).

Tabla 18. Recuentos de *E. coli* de la EDAR 2 (\log_{10} UFC/100 mL).

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	
SS	CC	$3,1 \pm 0,1^a$	$3,6 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$
	AMP	$2,7 \pm 0,1^{ab}$	$3,2 \pm 0,1^{bc}$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,9 \pm 0,0^b$	$>4,0 \pm 0,0^b$	$>4,0 \pm 0,0^b$
	CIP	$2,2 \pm 0,2^b$	$2,5 \pm 0,4^d$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,6 \pm 0,0^e$	$3,9 \pm 0,0^c$	$3,8 \pm 0,0^d$
	ERI	$3,0 \pm 0,1^a$	$3,4 \pm 0,3^{ab}$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$
	OXI	$0,5 \pm 1,0^c$	$3,0 \pm 0,1^c$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,9 \pm 0,0^c$	$3,9 \pm 0,0^c$	$3,8 \pm 0,0^c$
	SUL	$2,4 \pm 0,3^{ab}$	$3,0 \pm 0,1^c$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,7 \pm 0,0^d$	$3,9 \pm 0,0^d$	$3,8 \pm 0,0^d$
ST	CC	$1,3 \pm 0,1^p$	$2,3 \pm 0,1^p$	$1,6 \pm 0,0^p$	$2,1 \pm 0,0^p$	$1,9 \pm 0,0^p$	$2,0 \pm 0,1^p$
	AMP	$0,9 \pm 0,2^{qr}$	$2,0 \pm 0,1^q$	$1,1 \pm 0,2^q$	$2,0 \pm 0,0^q$	$1,0 \pm 0,1^s$	$0,5 \pm 0,2^{rs}$
	CIP	$0,3 \pm 0,4^r$	$1,0 \pm 0,1^t$	$0,6 \pm 0,4^r$	$1,7 \pm 0,0^t$	$0,7 \pm 0,0^u$	$0,6 \pm 0,2^{qr}$
	ERI	$1,3 \pm 0,1^p$	$2,3 \pm 0,0^p$	$1,5 \pm 0,1^p$	$2,1 \pm 0,1^p$	$1,7 \pm 0,1^q$	$2,0 \pm 0,1^p$
	OXI	$0,3 \pm 0,4^r$	$1,9 \pm 0,1^r$	$0,6 \pm 0,4^r$	$1,9 \pm 0,0^r$	$0,8 \pm 0,2^t$	$0,2 \pm 0,3^s$
	SUL	$1,0 \pm 0,2^q$	$1,8 \pm 0,1^s$	$0,6 \pm 0,4^r$	$1,8 \pm 0,0^s$	$1,4 \pm 0,0^r$	$0,7 \pm 0,1^q$

Los valores se expresan como la media del \log_{10} (UFC/100 mL) calculados para cada muestreo \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas dentro de una misma columna ($p < 0,05$) se expresan con superíndices diferentes (a,b,c... para SS; p,q,r... para ST). SS: Salida Secundaria; ST Salida Terciaria; CC: Control (sin antibiótico); AMP: ampicilina; OXI: oxitetraciclina; ERI: eritromicina; SUL: sulfametoxazol; CIP: ciprofloxacino; M1: Muestreo 1; M2: Muestreo 2; M3: Muestreo 3; M4: Muestreo 4; M5: Muestreo 5; M6: Muestreo 6.

Por lo que respecta a las muestras ST, se observaron diferencias significativas entre todos los recuentos y los respectivos controles, salvo para ERI (recuentos entre $1,3 \pm 0,1$ y $2,3 \pm 0,0 \log_{10}$ UFC/100 mL). CIP fue el antibiótico más selectivo, detectándose menores niveles de *E. coli* presuntamente resistentes en todos los muestreos (recuentos entre $0,3 \pm 0,4$ y $1,7 \pm 0,0 \log_{10}$ UFC/100 mL).

No se detectaron diferencias significativas entre los niveles de *E. coli* detectados en los muestreos de primavera y otoño para ningún antibiótico ($p > 0,05$).

1.2.1.3. EDAR 3

De igual modo a las anteriores EDAR analizadas, los niveles de coliformes detectados tanto en las muestras SS como en las ST, fueron muy elevados, no pudiendo ser cuantificados para la mayoría de los muestreos y antibióticos ensayados (Tablas 19 y 20).

En las muestras procedentes del efluente secundario (SS), los recuentos en medios suplementados con ERI y SUL no mostraron diferencias significativas con sus respectivos controles. Así mismo, en los muestreos M3 y M4 los recuentos fueron también imposibles de cuantificar para todos los antibióticos. CIP fue el único antibiótico frente al que se observó disminución en los recuentos en los muestreos M1, M2, M5 y M6.

Tabla 19. Recuentos de coliformes de la EDAR 3 (\log_{10} UFC/100 mL).

		M1	M2	M3	M4	M5	M6
SS	CC	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	AMP	3,9 ± 0,1 ^b	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	3,9 ± 0,0 ^b
	CIP	3,5 ± 0,0 ^c	3,8 ± 0,2 ^b	>4,0 ± 0,1 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	3,8 ± 0,0 ^b	3,3 ± 0,0 ^c
	ERI	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	OXI	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,1 ^a	3,9 ± 0,0 ^b	3,7 ± 0,0 ^c	3,1 ± 0,1 ^d
	SUL	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	ST	CC	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p
AMP	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	
CIP	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	2,7 ± 0,0 ^r	2,3 ± 0,0 ^r	2,8 ± 0,0 ^q	
ERI	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	
OXI	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	2,8 ± 0,1 ^q	2,5 ± 0,0 ^q	>3,0 ± 0,0 ^p	
SUL	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	>3,0 ± 0,0 ^p	

Los valores se expresan como la media del \log_{10} (UFC/100 mL) calculados para cada muestreo ± la desviación estándar. Las diferencias significativas dentro de una misma columna ($p < 0,05$) se expresan con superíndices diferentes (a,b,c... para SS; p,q,r... para ST). SS: Salida Secundaria; ST Salida Terciaria; CC: Control (sin antibiótico); AMP: ampicilina; OXI: oxitetraciclina; ERI: eritromicina; SUL: sulfametoxazol; CIP: ciprofloxacino; M1: Muestreo 1; M2: Muestreo 2; M3: Muestreo 3; M4: Muestreo 4; M5: Muestreo 5; M6: Muestreo 6.

En cuanto a las muestras ST, en la mayoría los casos se obtuvieron resultados que superaban el límite de cuantificación. Únicamente para CIP y OXI se obtuvieron concentraciones de entre 2,3 y 2,8 \log_{10} UFC/100 mL en los muestreos M4 a M6.

El estudio estadístico mostró diferencias significativas entre los muestreos de otoño y primavera, para los antibióticos CIP, OXI y SUL en las muestras SS, siendo los recuentos más

elevados en otoño ($p < 0,05$). Ocurrió lo contrario para las muestras ST, donde los niveles de coliformes presuntivamente resistentes a CIP y OXI fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en primavera.

Con respecto a los niveles de *E. coli* (Tabla 20), en las muestras SS los recuentos fueron elevados en todos los muestreos, siendo incontables en la mayoría. Solo en M6 se observó una reducción en los niveles de crecimiento de *E. coli* significativa respecto al control para todos los antibióticos testados.

No se encontraron diferencias significativas en los muestreos realizados en primavera y otoño para ninguno de los antibióticos ensayados ($p > 0,05$).

Tabla 20. Recuentos de *E. coli* de la EDAR 3 (\log_{10} UFC/100 mL).

		M1	M2	M3	M4	M5	M6
SS	CC	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,9 \pm 0,0^a$
	AMP	$3,5 \pm 0,0^d$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,5 \pm 0,1^b$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,1 \pm 0,0^d$
	CIP	$3,2 \pm 0,0^e$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,6 \pm 0,0^b$	$2,3 \pm 0,0^f$
	ERI	$3,8 \pm 0,0^b$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,3 \pm 0,1^b$
	OXI	$3,1 \pm 0,1^f$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,7 \pm 0,0^b$	$3,5 \pm 0,0^c$	$2,7 \pm 0,0^e$
	SUL	$3,7 \pm 0,0^c$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$>4,0 \pm 0,0^a$	$3,2 \pm 0,1^c$
ST	CC	$1,9 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$
	AMP	$1,2 \pm 0,1^s$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$2,9 \pm 0,0^q$	$2,6 \pm 0,2^q$	$>3,0 \pm 0,0^p$
	CIP	$0,3 \pm 0,4^t$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$2,3 \pm 0,0^s$	$2,0 \pm 0,0^s$	$2,4 \pm 0,0^r$
	ERI	$1,8 \pm 0,0^q$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$
	OXI	$0,2 \pm 0,3^t$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$2,6 \pm 0,0^r$	$2,3 \pm 0,0^r$	$2,7 \pm 0,0^q$
	SUL	$1,4 \pm 0,0^r$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$	$2,9 \pm 0,1^p$	$>3,0 \pm 0,0^p$

Los valores se expresan como la media del \log_{10} (UFC/100 mL) calculados para cada muestreo \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas dentro de una misma columna ($p < 0,05$) se expresan con superíndices diferentes (a,b,c... para SS; p,q,r... para ST). SS: Salida Secundaria; ST Salida Terciaria; CC: Control (sin antibiótico); AMP: ampicilina; OXI: oxitetraciclina; ERI: eritromicina; SUL: sulfametoxazol; CIP: ciprofloxacino; M1: Muestreo 1; M2: Muestreo 2; M3: Muestreo 3; M4: Muestreo 4; M5: Muestreo 5; M6: Muestreo 6.

En las muestras ST, aunque los datos mostraron mayor variabilidad, cabe destacar los elevados recuentos de *E. coli* capaces de crecer en presencia de todos los antibióticos ensayados. Los mayores niveles se observaron en las placas adicionadas con AMP, ERI y SUL, mientras que los antibióticos más selectivos fueron CIP (recuentos entre $0,3 \pm 0,0$ en M1 y $> 3,0$

$\pm 0,0 \log_{10}$ UFC/100 mL en M2 y M3) y OXI (entre $0,2 \pm 0,0$ en M1 y $> 3,0 \pm 0,0 \log_{10}$ UFC/100 mL en M2 y M3).

No se hallaron diferencias significativas entre los muestreos realizados en primavera y otoño para ninguno de los antibióticos ensayados ($p > 0,05$).

1.2.1.4. Reducción de la carga microbiana tras el tratamiento terciario

Para valorar la eficacia del tratamiento terciario en cada una de las EDAR, se realizó el análisis estadístico de los niveles medios de *E. coli* obtenidos antes (SS) y después (ST) de dicho tratamiento, valorando el porcentaje de reducción de las concentraciones de microorganismos obtenidas.

Se observó un descenso significativo en la contaminación por *E. coli* en todos los efluentes ST respecto a la de las muestras SS ($p < 0,05$), tanto en la población total de *E. coli*, crecida en medios sin antibióticos, como en las obtenidas en cada uno de los medios con antibióticos (Tabla 21).

Tabla 21. Porcentajes de reducción en los recuentos de *E. coli* tras el tratamiento terciario en las aguas de EDAR.

	EDAR 1	EDAR 2	EDAR 3
CC	85,5 \pm 8,6	46,8 \pm 15,8	*
AMP	84,1 \pm 12,1	51,2 \pm 15,9	88,6 \pm 19,8
CIP	87,1 \pm 10,8	73,2 \pm 14,8	44,1 \pm 44,1
ERI	93,3 \pm 2,3	44,1 \pm 16,7	51,2 \pm 50,0
OXI	90,6 \pm 8,3	59,5 \pm 25,7	38,7 \pm 38,9
SUL	85,0 \pm 11,3	58,5 \pm 15,3	63,3 \pm 0,9

CC: Control (sin antibiótico); AMP: ampicilina; OXI: oxitetraciclina; ERI: eritromicina; SUL: sulfametoxazol; CIP: ciprofloxacino. *: recuentos incontables ($> 4 \log_{10}$ UFC/100 mL).

Este análisis demostró que en la EDAR 1 se daban porcentajes de reducción significativamente mayores que los obtenidos para las EDAR2 y EDAR 3, tanto para los niveles totales como para cada uno de los medios adicionados de antibióticos. Por lo que respecta a las otras dos EDAR, solo se detectaron diferencias entre ellas para AMP (mayor porcentaje de reducción en la EDAR 3; $\chi^2 = 4,308$, $p = 0,0379$) y para CIP y OXI (reducción mayor en la EDAR 2; $\chi^2 = 17,022$, $p = 0,0000$ y $\chi^2 = 9,290$, $p = 0,0023$, respectivamente).

1.2.2. Aguas de riego superficiales

Al igual que para las muestras de EDAR, como controles para la comparación estadística se utilizaron los resultados obtenidos en los medios de cultivo sin antibiótico, presentados en la Tabla 14 del apartado 1.1.2.

La mayoría de las muestras de agua analizadas mostraron niveles de coliformes capaces de crecer en los medios con antibióticos imposibles de cuantificar, sin diferencias significativas con respecto a las concentraciones detectadas en el medio control, excepto en las muestras incubadas con CIP y OXI, que presentaron valores medios entre 1,3 y 1,9 \log_{10} UFC/100 mL, y 1,4 a 1,8 \log_{10} de UFC/100 mL, respectivamente.

Los recuentos de *E. coli* fueron posibles en la mayoría de las muestras, excepto para la Acequia de Vera y algunas muestras de la Acequia de Rascanya y el Barranco del Carraixet (Tablas 22 y 23). Estos recuentos fueron significativamente menores en las placas suplementadas con CIP, que mostró el máximo efecto inhibitorio, seguido de OXI y AMP. Por el contrario, ERI fue el agente menos selectivo, sin diferencias significativas con los recuentos en medio control. En líneas generales no se detectaron diferencias entre los recuentos obtenidos en diferentes momentos del año.

Cuando se compararon los niveles medios de *E. coli* obtenidos para los diferentes puntos de muestreo, se observó que las muestras procedentes de Acequia de Moncada y el Río Turia fueron los sitios con menor concentración de bacterias, sin que hubiera diferencias significativas entre los dos puntos ($p < 0,05$). Las muestras de la Acequia de Vera, donde los resultados fueron incontables, la Acequia de Rascanya y el Barranco de Carraixet (también sin diferencias significativas entre ellos), fueron los sitios que presentaron los recuentos significativamente más altos.

Tabla 22. Recuentos de *E. coli* en aguas de riego superficiales (\log_{10} UFC/100 mL) en presencia de antibiótico.

		M1	M2	M3	M4	M5
RT	CC	3,3 ± 0,1 ^a	3,5 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,2 ^a	3,4 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,1 ^b
	AMP	2,9 ± 0,0 ^b	3,0 ± 0,0 ^b	3,2 ± 0,0 ^c	3,0 ± 0,1 ^b	2,9 ± 0,0 ^c
	OXI	2,5 ± 0,1 ^c	2,4 ± 0,2 ^d	2,6 ± 0,1 ^d	2,3 ± 0,1 ^d	2,2 ± 0,1 ^e
	SUL	3,2 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,0 ^b	3,4 ± 0,1 ^b	3,1 ± 0,1 ^b	3,1 ± 0,1 ^c
	ERI	3,3 ± 0,1 ^a	3,5 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,1 ^a	3,4 ± 0,0 ^a	3,4 ± 0,0 ^a
	CIP	2,6 ± 0,0 ^c	2,6 ± 0,0 ^c	2,7 ± 0,1 ^d	2,5 ± 0,1 ^c	2,5 ± 0,0 ^d
AM	CC	3,0 ± 0,0 ^a	3,8 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,2 ^a
	AMP	2,7 ± 0,1 ^b	3,4 ± 0,1 ^b	2,6 ± 0,1 ^b	2,5 ± 0,2 ^b	2,6 ± 0,2 ^b
	OXI	2,1 ± 0,3 ^c	3,0 ± 0,0 ^c	2,3 ± 0,1 ^c	2,1 ± 0,3 ^c	2,0 ± 0,2 ^c
	SUL	2,9 ± 0,1 ^{ab}	3,6 ± 0,1 ^b	3,3 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,0 ^a	3,1 ± 0,3 ^a
	ERI	3,0 ± 0,0 ^a	3,8 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,0 ^a	3,0 ± 0,0 ^a	3,1 ± 0,4 ^{ab}
	CIP	2,0 ± 0,0 ^c	2,9 ± 0,1 ^c	2,1 ± 0,1 ^d	2,1 ± 0,1 ^c	2,1 ± 0,2 ^c
AR	CC	2,8 ± 0,1 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	3,9 ± 0,2 ^{ab}	>4,0 ± 0,0 ^a
	AMP	2,7 ± 0,1 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	OXI	2,2 ± 0,1 ^b	>4,0 ± 0,0 ^a	2,8 ± 0,1 ^b	3,5 ± 0,1 ^b	3,9 ± 0,1 ^b
	SUL	2,8 ± 0,1 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	ERI	2,8 ± 0,1 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	CIP	1,5 ± 0,3 ^c	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	2,5 ± 0,6 ^c	>4,0 ± 0,0 ^a
AV	CC	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	AMP	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	OXI	3,0 ± 0,8 ^b	3,6 ± 0,4 ^b	2,9 ± 0,0 ^b	3,5 ± 0,2 ^b	>4,0 ± 0,0 ^a
	SUL	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	ERI	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	CIP	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
BC	CC	3,3 ± 0,2 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	3,9 ± 0,1 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	AMP	3,0 ± 0,1 ^b	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	3,4 ± 0,1 ^c	3,6 ± 0,1 ^c
	OXI	2,5 ± 0,1 ^c	3,6 ± 0,3 ^b	3,2 ± 0,2 ^b	2,7 ± 0,0 ^e	3,2 ± 0,1 ^d
	SUL	3,3 ± 0,1 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	3,6 ± 0,0 ^b	3,8 ± 0,2 ^b
	ERI	3,4 ± 0,1 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	3,8 ± 0,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a
	CIP	2,5 ± 0,1 ^c	>4,0 ± 0,0 ^a	3,5 ± 0,0 ^b	2,9 ± 0,1 ^d	3,0 ± 0,1 ^d

Los valores son medias ± desviación estándar del \log_{10} (UFC/100 mL) en cuatro placas para cada tiempo de muestreo y antibiótico. CC (sin antibiótico); AMP: ampicilina; OXI: oxitetraciclina; SUL: sulfametoxazol; ERI: eritromicina; CIP: ciprofloxacino. RT: Río Turia; AM: Acequia de Moncada; AR: Acequia de Rascanya; AV: Acequia de Vera; BC: Barranco de Carraixet. Dentro de cada columna, los valores medios con los mismos superíndices no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). M1: Muestreo 1; M2: Muestreo 2; M3: Muestreo 3; M4: Muestreo 4; M5: Muestreo 5.

Tabla 23. Recuentos medios de *E. coli* en aguas de riego superficiales en los diferentes puntos de muestreo (\log_{10} UFC/100 mL).

	RT	AM	AR	AV	BC
CC	3,4 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,4 ^a	3,4 ± 0,8 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	3,7 ± 0,4 ^a
AMP	3,0 ± 0,1 ^c	2,7 ± 0,4 ^b	3,7 ± 1,0 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	3,4 ± 0,3 ^b
OXI	2,4 ± 0,2 ^e	2,3 ± 0,4 ^c	3,1 ± 0,7 ^a	3,4 ± 0,3 ^b	3,0 ± 0,4 ^c
SUL	3,2 ± 0,1 ^b	3,2 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,9 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	3,6 ± 0,3 ^{ab}
ERI	3,4 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,3 ^a	3,6 ± 0,9 ^a	>4,0 ± 0,0 ^a	3,7 ± 0,3 ^a
CIP	2,6 ± 0,1 ^d	2,2 ± 0,4 ^c	2,0 ± 1,0 ^b	>4,0 ± 0,0 ^a	3,0 ± 0,4 ^c

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar del \log_{10} (UFC/100 mL) en cuatro palcas durante cinco tiempos de muestreo. CC (sin antibiótico); AMP: ampicilina; OXI: oxitetraciclina; SUL: sulfametoxazol; ERI: eritromicina; CIP: ciprofloxacino. RT: Río Turia; AM: Acequia de Moncada; AR: Acequia de Rascanya; AV: Acequia de Vera; BC: Barranco de Carraixet. Dentro de cada columna, los valores medios con los mismos superíndices no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

1.3. Estudio de la sensibilidad a diferentes antibióticos de los aislados de *Escherichia coli*

1.3.1. Resistencias a antibióticos detectadas en los aislados de *E. coli* obtenidos a partir de aguas de EDAR

Un total de 161 cepas (mínimo de 25 de cada efluente) fueron aisladas de las aguas de EDAR e identificadas como *E. coli* (Tabla 24).

Tabla 24. Distribución de las cepas según el origen y efluente.

Origen	Nº cepas aisladas de <i>E. coli</i>	
EDAR 1	SS	29
	ST	25
EDAR 2	SS	29
	ST	28
EDAR 3	SS	25
	ST	25

SS: Salida Secundario; ST: Salida Terciario.

A continuación, se estudió su sensibilidad a una batería de 14 antibióticos mediante la metodología Sensititre™, tal como se describe en Material y Métodos.

1.3.1.1. EDAR 1

Los resultados del estudio de los 54 aislados de *E. coli* procedentes de la EDAR 1 se muestran en la Tabla 25. La resistencia a la ampicilina fue la más frecuente entre los aislados (70%), seguida de tetraciclina y sulfametoxazol, con un 67% y 59%, respectivamente. Meropenem (6%), tigeciclina (2%) y colistina (2%) fueron los antibióticos con menores tasas de

resistencias. Sólo 5 aislados (10%) no presentaron resistencia frente a ninguna de las familias de antibióticos ensayadas.

No se detectó relación de dependencia entre la resistencia a un determinado antibiótico y la estación (primavera-otoño) de toma de las muestras ($p > 0,05$). Sólo para el sulfametoxazol y la azitromicina se encontró una relación de dependencia con respecto al efluente, siendo el porcentaje de bacterias presuntamente resistentes significativamente mayor para los aislados procedentes del efluente SS (79% y 21% respectivamente).

Además de la resistencia a cada antibiótico por separado, se estudió la tasa de multirresistencias (MDR) entre los aislados (Tabla 26), considerando ésta como la resistencia a 3 o más familias de antibióticos distintas (EUCAST, 2009). El análisis estadístico no mostró relación de dependencia entre la aparición de multirresistencias y la estación de recogida de las muestras, por una parte, ni el tipo de efluente, por otra ($p > 0,05$).

Del total de 54 aislados de la EDAR 1, 36 de ellos (67%) presentaron multirresistencia, detectándose 15 perfiles distintos (Tabla 27). Destacó la presencia de resistencia a betalactámicos y sulfonamidas en 13 de los 15 perfiles detectados. La combinación **BLA-QNL-SUL-TET** fue la más frecuente entre el total de los aislados (13%). Le siguieron un perfil de multirresistencia a 3 familias (**BLA-SUL-TET**) y otro a 5 familias (**BLA-FEN-QNL-SUL-TET**), presentes cada uno de ellos en un 11% de los aislados.

Tabla 25. Frecuencia de detección de resistencias en los aislados de *E. coli* procedentes de la EDAR 1.

		Nº de aislados resistentes de <i>E. coli</i>													
		SMX	TMP	CIP	TET	MER	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN
SS	Primavera	10	9	11	11	0	2	8	1	5	0	2	0	9	4
	Otoño	13	10	8	11	2	4	7	5	4	1	5	0	13	2
	Total (%)	23 (79)	19 (66)	19 (66)	22 (76)	2 (7)	6 (21)	15 (52)	6 (21)	9 (31)	1 (3)	7 (24)	0	22 (76)	6 (21)
ST	Primavera	3	5	5	5	0	0	4	0	3	0	0	0	7	3
	Otoño	6	6	7	9	1	0	6	1	6	0	1	1	9	1
	Total (%)	9 (36)	11 (44)	12 (48)	14 (56)	1 (4)	0	10 (40)	1 (4)	9 (36)	0	1 (4)	1 (4)	16 (64)	4 (16)
Total (%)		32 (59)	30 (56)	31 (57)	36 (67)	3 (6)	6 (11)	25 (46)	7 (13)	18 (33)	1 (2)	8 (15)	1 (2)	38 (70)	10 (19)

SMX: sulfametoxazol; TMP: trimetoprim; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; MER: meropenem; AZI: azitromicina; NAL: ácido nalidíxico; FOT: cefotaxima; CHL: cloranfenicol; TGC: tigeciclina; TAZ: ceftazidima; COL: colistina; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; SS: Salida Secundario; ST: Salida Terciario.

Tabla 26. Frecuencia de *E. coli* multirresistentes aislados procedentes de la EDAR 1.

		Nº de aislados <i>E. coli</i> (%)
SS	Primavera	10 (71)
	Otoño	12 (80)
	Total	22 (76)
ST	Primavera	6 (55)
	Otoño	8 (57)
	Total	14 (56)
Total (%)		36 (67)

SS: Salida Secundario; ST: Salida Terciario.

Tabla 27. Perfiles de multirresistencia en los aislados de *E. coli* procedentes de la EDAR 1.

	AMG	BLA	FEN	MCL	QNL	POL	SUL	TET	Nº cepas <i>E. coli</i> (%)
		■					■	■	6 (11)
			■					■	1 (2)
					■		■		1 (2)
	■	■			■				1 (2)
		■			■		■	■	7 (13)
	■	■			■				1 (2)
		■	■				■	■	2 (4)
	■				■		■	■	1 (2)
		■	■		■		■	■	6 (11)
		■			■	■	■	■	1 (2)
	■	■		■					1 (2)
		■	■		■		■	■	3 (6)
		■		■	■		■	■	1 (2)
		■	■		■		■	■	3 (6)
		■			■		■	■	1 (2)
Total	7	13	7	4	11	1	13	12	36

AMG: Aminoglucósidos; BLA: Betalactámicos; FEN: Anfénicoles; MCL: Macrólidos; QNL: Quinolonas; POL: Polimixinas; SUL: Sulfonamidas; TET: Tetraciclinas; Casilla sombreada: Resistencia a familia de antibióticos.

1.3.1.2. EDAR 2

Los 57 aislados de esta EDAR mostraron resistencia frente a algún antibiótico (Tabla 28). El 86% de las cepas presentaron resistencia a la ampicilina, y el 75% a ciprofloxacino y tetraciclina. Colistina y meropenem presentaron el menor número de aislados resistentes (9% y 11%, respectivamente). Se detectó un porcentaje significativamente mayor de cepas resistentes a sulfametoxazol, meropenem, cloranfenicol y colistina en otoño ($\chi^2=6,330$, $\chi^2=6,035$, $\chi^2=7,917$, $\chi^2=4,933$, respectivamente, $p < 0,05$) mientras que, con respecto al tipo de efluente, los 5 únicos aislados resistentes a la colistina se encontraron en el efluente terciario ST ($\chi^2= 5,677$, $p= 0,0172$).

En cuanto a la presencia de multirresistencias (Tabla 29), el 74% del total de cepas estudiadas (42) presentaron esta característica, observándose una mayor prevalencia de multirresistencias en el efluente ST (23 cepas, 82%) que en el SS (19 cepas, 66%), pero sin diferencias significativas entre la estación de muestreo ni el tipo de efluente ($p > 0,05$).

Tabla 28. Frecuencia de detección de resistencias en los aislados de *E. coli* procedentes de la EDAR 2.

		Nº de aislados resistentes de <i>E. coli</i>													
		SMX	TMP	CIP	TET	MER	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN
SS	Primavera	5	5	11	9	0	0	8	2	1	0	2	0	10	0
	Otoño	12	12	11	12	2	3	10	3	8	2	2	0	13	3
	Total (%)	17 (59)	17 (59)	22 (76)	21 (72)	2 (7)	3 (10)	18 (62)	5 (17)	9 (31)	2 (7)	4 (14)	0	23 (79)	3 (10)
ST	Primavera	8	7	11	10	0	3	11	1	3	0	1	0	12	3
	Otoño	12	10	10	12	4	5	10	5	7	5	5	5	14	5
	Total (%)	20 (71)	17 (61)	21 (75)	22 (79)	4 (14)	8 (29)	21 (75)	6 (21)	10 (36)	5 (18)	6 (21)	5 (18)	26 (93)	8 (29)
Total (%)		37 (65)	34 (60)	43 (75)	43 (75)	6 (11)	11 (19)	39 (68)	11 (19)	19 (33)	7 (12)	10 (18)	5 (9)	49 (86)	11 (19)

SMX: sulfametoxazol; TMP: trimetoprim; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; MER: meropenem; AZI: azitromicina; NAL: ácido nalidíxico; FOT: cefotaxima; CHL: cloranfenicol; TGC: tigeciclina; TAZ: ceftazidima; COL: colistina; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; SS: Salida Secundario; ST: Salida Terciario.

Tabla 29. Frecuencia de *E. coli* multirresistentes aislados de la EDAR 2.

Nº de aislados <i>E. coli</i> (%)		
SS	Primavera	8 (57)
	Otoño	11 (73)
	Total	19 (66)
ST	Primavera	11 (84)
	Otoño	12 (80)
	Total	23 (82)
Total (%)		42 (74)

SS: Salida Secundario; ST: Salida Terciario.

Se detectaron un total de 16 perfiles MDR (Tabla 30). Las familias de antibióticos más frecuentes en los perfiles de multirresistencia fueron betalactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas y quinolonas, encontrándose en 15, 14, 14 y 13 perfiles, respectivamente. La combinación **BLA-FEN-QNL-SUL-TET** fue la más frecuente entre el total de los aislados (16%). Le siguió un perfil de resistencia a 4 familias, **BLA-QNL-SUL-TET**, presente en el 11% de los aislados. Es de destacar que 3 aislados (5%), procedentes del efluente terciario ST, presentaron resistencia a todas las familias de antibióticos ensayadas.

Tabla 30. Perfiles de multirresistencia en los aislados de *E. coli* procedentes de la EDAR 2.

	AMG	BLA	FEN	MCL	QNL	POL	SUL	TET	Nº cepas <i>E. coli</i> (%)
		■					■	■	4 (7)
		■			■		■		3 (5)
		■			■			■	3 (5)
		■			■		■	■	6 (11)
			■		■		■	■	2 (4)
	■	■			■			■	1 (2)
		■	■		■		■		1 (2)
		■	■		■		■	■	9 (16)
	■	■			■		■	■	2 (4)
		■		■		■	■	■	1 (2)
	■	■			■		■	■	2 (4)
		■	■		■		■	■	2 (4)
	■	■			■		■	■	1 (2)
			■		■		■	■	1 (2)
		■	■		■		■	■	1 (2)
		■	■		■		■	■	3 (5)
Total	7	15	7	7	13	3	14	14	42

AMG: Aminoglucósidos; BLA: Betalactámicos; FEN: Anfencílicos; MCL: Macrólidos; QNL: Quinolonas; POL: Polimixinas; SUL: Sulfonamidas; TET: Tetraciclinas; Casilla sombreada: Resistencia a familia de antibióticos.

1.3.1.3. EDAR 3

Un total de 50 aislados de *E. coli* procedentes de la EDAR 3 fueron sometidos al estudio de sensibilidad (Tabla 31). En este EDAR solo 4 aislados (8%) no presentaron resistencia frente a ninguna de las familias de antibióticos estudiadas. Ampicilina, al igual que ocurría en las anteriores EDAR, siguió siendo el antibiótico frente al cual se detectó un mayor porcentaje de resistencias (74%), seguido por trimetoprim, tetraciclina y sulfametoxazol, con un 70%, 68% y 68%, respectivamente. No se detectó resistencia a meropenem o colistina en ningún aislado.

El estudio comparativo entre estaciones indicó que los porcentajes de resistencia a trimetoprim eran significativamente más altos en los aislados de primavera ($\chi^2 = 6,349$, $p = 0,0117$), así como a ampicilina en otoño ($\chi^2 = 4,435$, $p = 0,0352$). Con respecto al tratamiento, la resistencia al cloranfenicol (40%) fue mayor entre los aislados de ST (10 cepas en ST (40%) frente a 3 en SS (12%); $\chi^2 = 5,094$, $p = 0,0240$).

Tabla 31. Frecuencia de detección de resistencias en los aislados de *E. coli* procedentes de la EDAR 3.

		Nº de aislados resistentes de <i>E. coli</i>													
		SMX	TMP	CIP	TET	MER	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN
SS	Primavera	8	10	6	9	0	2	5	2	1	0	2	0	9	2
	Otoño	8	10	9	10	0	4	6	3	2	1	2	0	10	0
	Total (%)	16 (64)	20 (80)	15 (60)	19 (76)	0	6 (24)	11 (44)	5 (20)	3 (12)	1 (4)	4 (16)	0	19 (76)	2 (8)
ST	Primavera	7	8	6	7	0	0	7	3	4	0	1	0	9	2
	Otoño	11	7	4	8	0	2	6	2	6	0	4	0	9	3
	Total (%)	18 (72)	15 (60)	10 (40)	15(60)	0	2 (8)	13 (52)	5 (20)	10 (40)	0	5 (20)	0	18 (72)	5 (20)
Total (%)		34 (68)	35 (70)	25 (50)	34 (68)	0	8 (16)	24 (48)	10 (20)	13 (26)	1 (12)	9 (18)	0	37 (74)	7 (14)

SMX: sulfametoxazol; TMP: trimetoprim; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; MER: meropenem; AZI: azitromicina; NAL: ácido nalidíxico; FOT: cefotaxima; CHL: cloranfenicol; TGC: tigeciclina; TAZ: ceftazidima; COL: colistina; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; SS: Salida Secundario; ST: Salida Terciario.

Tabla 32. Frecuencia de *E. coli* multirresistentes aislados de la EDAR 3.

		Nº de aislados <i>E. coli</i> (%)	
SS	Primavera	9 (90)	
	Otoño	10 (67)	
	Total	19 (76)	
ST	Primavera	8 (80)	
	Otoño	9 (60)	
	Total	17 (68)	
Total (%)		36 (72)	

SS: Salida Secundario; ST: Salida Terciario.

En cuanto a la aparición de multirresistencias (Tabla 32), se observó una prevalencia similar en los efluentes SS (76%) y ST (68%), sin que el análisis estadístico mostrara relación entre la frecuencia de estas multirresistencias y la estación de recogida de las muestras.

Del total de los 50 aislados provenientes de la EDAR 3, 36 de ellos (72%) presentaron multirresistencia, detectándose 11 perfiles distintos (Tabla 33). Las combinaciones **BLA-SUL-TET** y **BLA-QNL-SUL-TET** fueron las más frecuentes entre el total de los aislados (14%). Le siguieron un perfil de resistencia a 5 familias (**BLA-MCL-QNL-SUL-TET**) presente en el 10% de los aislados, un perfil de multirresistencia a 3 familias (**QNL-SUL-TET**) presente en el 8% de los aislados, uno de resistencia a 5 familias (**BLA-FEN-QNL-SUL-TET**) y uno de resistencia a 6 familias (**AMG-BLA-FEN-QNL-SUL-TET**). Destacó la presencia de resistencia a sulfonamidas en los 11 perfiles detectados, a betalactámicos en 10 perfiles y a quinolonas y tetraciclinas en 9 perfiles.

Tabla 33. Perfiles de multirresistencia en los aislados de *E. coli* procedentes de la EDAR 3.

	AMG	BLA	FEN	MCL	QNL	POL	SUL	TET	Nº cepas <i>E. coli</i> (%)
		■					■	■	7 (14)
		■			■		■		1 (3)
					■		■	■	3 (8)
		■			■		■	■	7 (14)
	■	■			■		■		1 (3)
		■	■				■	■	1 (3)
					■		■	■	4 (8)
	■	■			■		■	■	1 (3)
		■		■	■		■	■	5 (10)
	■	■	■		■		■	■	4 (8)
		■	■	■	■		■	■	2 (5)
Total	3	10	4	2	9	0	11	9	36

AMG: Aminoglucósidos; BLA: Betalactámicos; FEN: Anfencílicos; MCL: Macrólidos; QNL: Quinolonas; POL: Polimixinas; SUL: Sulfonamidas; TET: Tetraciclinas; Casilla sombreada: Resistencia a familia de antibióticos.

1.3.1.4. Comparación entre los niveles de resistencias y multirresistencias detectados en los aislados de *E. coli* procedentes de las tres EDAR

El análisis estadístico indicó que no existía relación de dependencia entre los niveles de resistencia detectados para un antibiótico y la EDAR de origen, excepto para los antibióticos CIP ($\chi^2 = 7,851$; $p = 0,0197$), NAL ($\chi^2 = 6,774$; $p = 0,0338$) y TGC ($\chi^2 = 7,486$; $p = 0,0237$), en el que los niveles más altos de resistencia se detectaron en los aislados de la EDAR 2. Tampoco se encontró relación de dependencia entre las tasas de bacterias multirresistentes detectadas y su EDAR de origen.

Para valorar la eficacia del tratamiento terciario en la eliminación de bacterias resistentes, se realizó el análisis estadístico comparativo de los niveles de *E. coli* resistentes a cada antibiótico (Tabla 34), y la frecuencia de aislados multirresistentes (Tabla 35) obtenidos antes (SS) y después (ST) de dicho tratamiento.

No se observó descenso significativo para ningún antibiótico, ni tampoco hubo reducción del número de microorganismos multirresistentes entre los efluentes SS y ST. Es llamativo que tanto los aislados de *E. coli* resistentes a COL como a AMP aumentaron en el efluente terciario. También se observó un marcado aumento del porcentaje de cepas resistentes en el efluente ST respecto de SS para AMP en la EDAR 2.

Tabla 34. Comparación de las frecuencias de resistencias a antibióticos detectadas en los aislados de *E. coli* según la fase del tratamiento.

	Nº de aislados	Nº de aislados resistentes de <i>E. coli</i> (%)													
		SMX	TMP	CIP	TET	MER	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN
SS	83	56 (67)	56 (67)	56 (67)	62 (75)	4 (5)	15 (18)	44 (53)	16 (19)	21 (25)	4 (5)	15 (18)	0 (0)	64 (77)	11 (13)
ST	78	47(60)	43 (55)	43 (55)	51 (65)	5 (6)	10 (13)	44 (56)	12 (5)	29 (37)	5 (6)	12 (15)	6 (7)	70 (90)	17 (22)

SMX: sulfametoxazol; TMP: trimetoprim; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; MER: meropenem; AZI: azitromicina; NAL: ácido nalidíxico; FOT: cefotaxima; CHL: cloranfenicol; TGC: tigeciclina; TAZ: ceftazidima; COL: colistina; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; SS: Salida Secundario; ST: Salida Terciario.

Tabla 35. Comparación del número de aislados multirresistentes procedentes de las 3 EDAR, obtenidos antes y después del tratamiento terciario.

		Nº de <i>E. coli</i> multirresistentes (%)	Total (%)
SS	EDAR 1	22 (76)	60/83 (72,3)
	EDAR 2	19 (66)	
	EDAR 3	19 (76)	
ST	EDAR 1	14 (56)	54/78 (69,2)
	EDAR 2	23 (82)	
	EDAR 3	17 (68)	

1.3.2. Resistencias a antibióticos detectadas en los aislados de *E. coli* obtenidos a partir de aguas de riego superficiales

Se aislaron un total de 125 cepas de *E. coli*, 25 de cada uno de los cinco puntos de muestreo estudiados. Todos los aislados mostraron resistencia, al menos, a un antibiótico, siendo la resistencia a sulfametoxazol la más frecuente (97% de los aislados), seguida de ampicilina (72%), tetraciclina (65%) y ciprofloxacino (60%) (Tabla 36). Los antibióticos meropenem, tigeciclina y colistina resultaron efectivos frente a todos los aislados.

El 70% (88) de los 125 aislados de *E. coli* presentaron multirresistencia (Tabla 37), con un total de 15 perfiles diferentes. La resistencia a los betalactámicos estaba presente en todos los perfiles, seguida de las resistencias a sulfonamidas, quinolonas y tetraciclinas (14, 11 y 10 perfiles de resistencia, respectivamente). La combinación más frecuente fue la formada por **BLA-FEN-QNL-SUL-TET**, que presentaban un 13% de los aislados de *E. coli*, seguida del perfil **BLA-QNL-SUL-TET** (9%). Por familias de antibióticos, el número más alto de perfiles de multirresistencia entre los aislamientos de *E. coli* fue frente a 4 y 5 familias de antibióticos, con 30 aislamientos cada una, seguida de la resistencia a 3 familias, con 16 aislamientos y 6 familias con 12 aislamientos (Tabla 37).

Las cepas procedentes del Barranco de Carraixet mostraron la mayor tasa de multirresistencia (22 cepas, 88%), con cuatro fenotipos diferentes (Tabla 38). Además, tres de estos aislados eran resistentes a 9 de los 14 antibióticos probados. El río Turia mostró una tasa de multirresistencias entre sus aislados de *E. coli* del 80% (20 cepas), la acequia de Rascanya del 72% y la acequia de Vera del 64%. En las muestras de la acequia de Moncada fue donde se observó el menor porcentaje de cepas multirresistentes (48% de los aislados). Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el sitio o el momento de muestreo y los porcentajes de bacterias multirresistentes detectadas.

Tabla 36. Frecuencia de detección de resistencias en los aislados de *E. coli* procedentes de agua de riego superficial.

Punto de muestreo	Nº de aislados de <i>E. coli</i>	Nº de aislados resistentes de <i>E. coli</i> (%)													
		SMX	TMP	CIP	TET	MER	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN
RT	25	25 (100)	16 (64)	20 (80)	16 (64)	0	14 (56)	18 (72)	4 (16)	5 (20)	0	0	0	20 (80)	0
AM	25	23 (92)	12 (48)	10 (40)	15 (60)	0	3 (12)	8 (32)	5 (20)	5 (20)	0	5 (20)	0	15 (60)	0
AR	25	25 (100)	18 (72)	11 (44)	18 (72)	0	4 (16)	11 (44)	4 (16)	7 (28)	0	4 (16)	0	18 (72)	7 (28)
AV	25	23 (92)	5 (20)	16 (64)	14 (56)	0	2 (8)	14 (56)	5 (20)	7 (28)	0	5 (20)	0	16 (64)	5 (20)
BC	25	25 (100)	14 (56)	18 (72)	18 (72)	0	7 (28)	18 (72)	7 (28)	10 (40)	0	7 (28)	0	21 (84)	4 (16)
Total (%)	125	121 (97)	65 (52)	75 (60)	81 (65)	0	30 (24)	69 (55)	25 (20)	34 (27)	0	21 (17)	0	90 (72)	16 (13)

SMX: sulfametoxazol; TMP: trimetoprim; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; MER: meropenem; AZI: azitromicina; NAL: ácido nalidixico; FOT: cefotaxima; CHL: cloranfenicol; TGC: tigeciclina; TAZ: ceftazidima; COL: colistina; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina. RT: Río Turia; AM: Acequia de Moncada; AR: Acequia de Rascanya; AV: Acequia de Vera; BC: Barranco de Carraixet.

Tabla 37. Perfiles y porcentaje de aislados de *E. coli* multirresistentes procedentes de agua de riego superficial.

	AMG	BLA	FEN	MCL	QNL	POL	SUL	TET	Nº cepas <i>E. coli</i> (%)
									8 (6)
									2 (2)
									6 (5)
									3 (2)
									3 (2)
									5 (4)
									5 (4)
									3 (2)
									11 (9)
									16 (13)
									2 (2)
									6 (5)
									6 (5)
									6 (5)
									6 (5)
Total	3	15	6	6	11	0	14	10	88

AMG: Aminoglucósidos; BLA: Betalactámicos; FEN: Anfencíoles; MCL: Macrólidos; QNL: Quinolonas; POL: Polimixinas; SUL: Sulfonamidas; TET: Tetracilinas; Casilla sombreada: Resistencia a familia de antibióticos.

Tabla 38. Frecuencia de cepas multirresistentes entre los aislados de *E. coli* procedentes de aguas de riego superficial.

Punto de muestreo	Nº (%) de <i>E. coli</i>
RT	20 (80%)
AM	12 (48%)
AR	18 (72%)
AV	16 (64%)
BC	22 (88%)
Total (%)	88 (70)

RT: Río Turia; AM: Acequia de Moncada; AR: Acequia de Rascanya; AV: Acequia de Vera; BC: Barranco de Carraixet.

1.4. Detección de la presencia de ARG en muestras de agua destinada al riego

Una vez realizado el estudio de sensibilidad, se realizó la detección de los 5 genes de resistencia a antibióticos (ARG) seleccionados, tanto directamente en las muestras de agua como en los aislados de *E. coli*, siguiendo las etapas descritas en el capítulo de Material y Métodos.

1.4.1. Estudio de la presencia de ARG en muestras de EDAR

1.4.1.1. Detección directa de ARG en las muestras de agua procedentes de EDAR

Se estudió la presencia de los 5 genes de resistencia seleccionados en las 36 muestras de agua procedentes de los efluentes SS y ST de las distintas EDAR. Los datos se presentan de acuerdo con el tipo de efluente y la estación de recogida de las muestras (Tabla 39).

Tabla 39. Detección de ARG en muestras de agua de EDAR.

		Nº de muestras	Nº de muestras positivas (%)					
			<i>bla</i> TEM	<i>qnr</i> S	<i>erm</i> B	<i>sul</i> I	<i>tet</i> W	
EDAR 1	SS	P	3	3 (100)	3 (100)	2 (67)	3 (100)	3 (100)
		O	3	3 (100)	3 (100)	3 (100)	2 (67)	3 (100)
	ST	P	3	3 (100)	3 (100)	1 (33)	3 (100)	3 (100)
		O	3	2 (67)	2 (67)	3 (100)	2 (67)	3 (100)
	Total		12	11 (92)	11 (92)	9 (75)	10 (83)	12 (100)
	EDAR 2	SS	P	3	3 (100)	3 (100)	1 (33)	3 (100)
O			3	3 (100)	2 (67)	3 (100)	3 (100)	2 (67)
ST		P	3	3 (100)	3 (100)	2 (67)	3 (100)	3 (100)
		O	3	3 (100)	3 (100)	2 (67)	3 (100)	3 (100)
Total		12	12 (100)	11 (92)	8 (67)	12 (100)	11 (92)	
EDAR 3		SS	P	3	3 (100)	3 (100)	2 (67)	3 (100)
	O		3	2 (67)	1 (33)	1 (33)	2 (67)	1 (33)
	ST	P	3	3 (100)	3 (100)	2 (67)	3 (100)	3 (100)
		O	3	3 (100)	2 (67)	1 (33)	1 (33)	2 (67)
	Total		12	11 (92)	9 (75)	6 (50)	9 (75)	9 (75)
	Total		36	34 (94)	31 (86)	23 (64)	31 (86)	32 (89)

SS: Salida Secundaria; ST: Salida Terciaria; P: Primavera; O: Otoño.

El gen *bla*TEM fue el detectado con mayor frecuencia en todas las muestras analizadas (94%), seguido del gen *tet*W (89%) y los genes *sul*I y *qnr*S (86% cada uno). El gen *erm*B se detectó con menor frecuencia en el total de las muestras estudiadas (64%). El análisis estadístico de los resultados mostró que no existía relación de dependencia entre la presencia de los diferentes genes estudiados y la EDAR de la cual fue tomada la muestra, ($p > 0,05$) o el tipo de efluente ($p > 0,05$). Sin embargo, la presencia de los genes *qnr*S, *sul*I y *tet*W fue significativamente mayor en primavera ($\chi^2 = 5,806$, $p = 0,0160$; $\chi^2 = 5,806$, $p = 0,0160$; $\chi^2 = 4,500$, $p = 0,0339$, respectivamente). En las figuras de la 19 a la 23 se muestran las fotografías de los gels revelados, en los que se detecta la presencia de las bandas correspondientes a los genes estudiados.

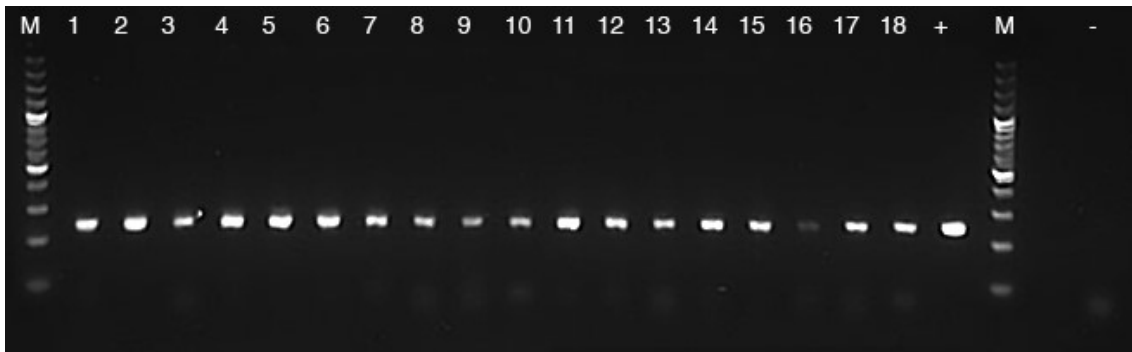


Figura 19. Amplificación de un fragmento del gen *bla*TEM de aguas de EDAR. M: marcador 100 pb; 1: EDAR 3 SS M1; 2: EDAR 3 ST M1; 3: EDAR 3 SS M2; 4: EDAR 3 ST M2; 5: EDAR 3 SS M3; 6: EDAR 3 ST M3; 7: EDAR 2 SS M1; 8: EDAR 2 ST M1; 9: EDAR 2 SS M2; 10: EDAR 2 ST M2; 11: EDAR 2 SS M3; 12: EDAR 2 ST M3; 13: EDAR 1 SS M1; 14: EDAR 1 ST M1; 15: EDAR 1 SS M2; 16: EDAR 1 ST M2; 17: EDAR 1 SS M3; 18: EDAR 1 ST M3; +: control positivo; -: control negativo.

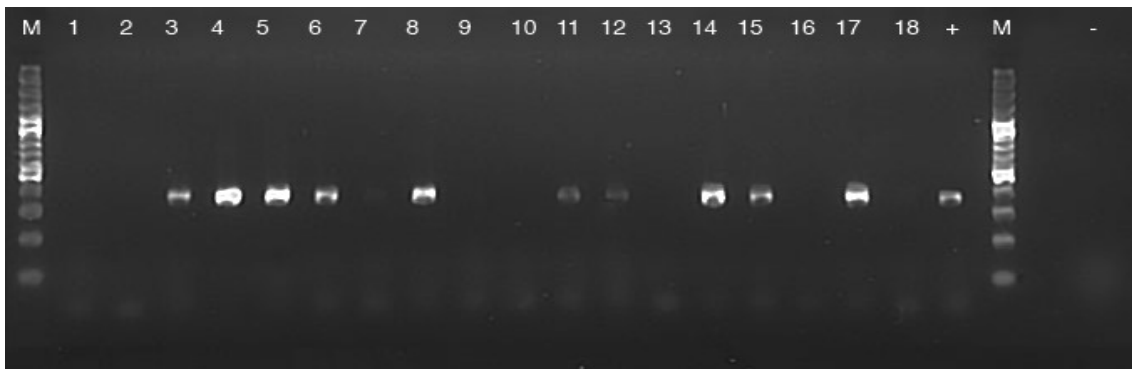


Figura 20. Amplificación de un fragmento del gen *erm*B de aguas de EDAR. M: marcador 100 pb; 1: EDAR 3 SS M1; 2: EDAR 3 ST M1; 3: EDAR 3 SS M2; 4: EDAR 3 ST M2; 5: EDAR 3 SS M3; 6: EDAR 3 ST M3; 7: EDAR 2 SS M1; 8: EDAR 2 ST M1; 9: EDAR 2 SS M2; 10: EDAR 2 ST M2; 11: EDAR 2 SS M3; 12: EDAR 2 ST M3; 13: EDAR 1 SS M1; 14: EDAR 1 ST M1; 15: EDAR 1 SS M2; 16: EDAR 1 ST M2; 17: EDAR 1 SS M3; 18: EDAR 1 ST M3; +: control positivo; -: control negativo.

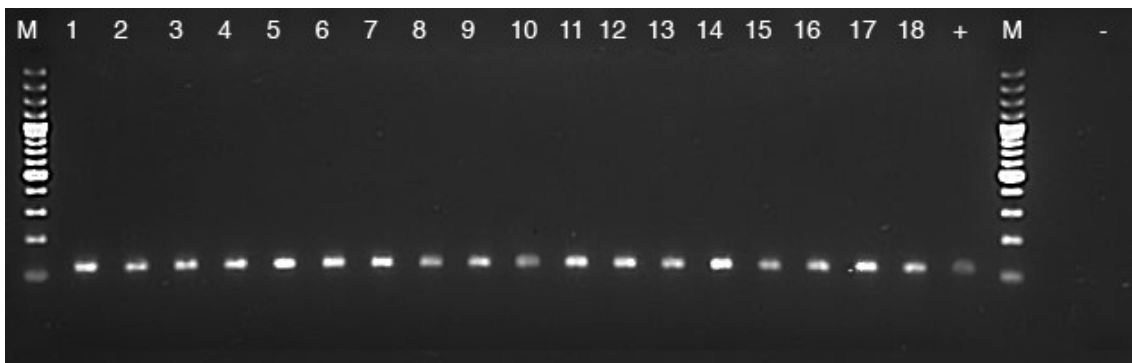


Figura 21. Amplificación de un fragmento del gen *qnr*S de aguas de EDAR. M: marcador 100 pb; 1: EDAR 3 SS M1; 2: EDAR 3 ST M1; 3: EDAR 3 SS M2; 4: EDAR 3 ST M2; 5: EDAR 3 SS M3; 6: EDAR 3 ST M3; 7: EDAR 2 SS M1; 8: EDAR 2 ST M1; 9: EDAR 2 SS M2; 10: EDAR 2 ST M2; 11: EDAR 2 SS M3; 12: EDAR 2 ST M3; 13: EDAR 1 SS M1; 14: EDAR 1 ST M1; 15: EDAR 1 SS M2; 16: EDAR 1 ST M2; 17: EDAR 1 SS M3; 18: EDAR 1 ST M3; +: control positivo; -: control negativo.

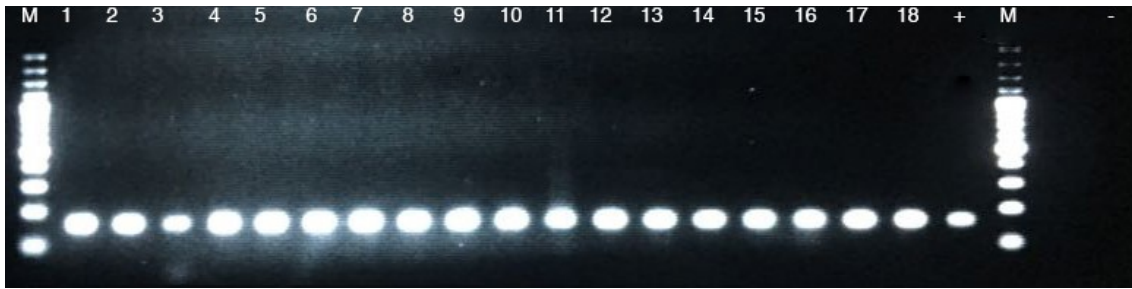


Figura 22. Amplificación de un fragmento del gen *sulI* de aguas de EDAR. M: marcador 100 pb; 1: EDAR 3 SS M1; 2: EDAR 3 ST M1; 3: EDAR 3 SS M2; 4: EDAR 3 ST M2; 5: EDAR 3 SS M3; 6: EDAR 3 ST M3; 7: EDAR 2 SS M1; 8: EDAR 2 ST M1; 9: EDAR 2 SS M2; 10: EDAR 2 ST M2; 11: EDAR 2 SS M3; 12: EDAR 2 ST M3; 13: EDAR 1 SS M1; 14: EDAR 1 ST M1; 15: EDAR 1 SS M2; 16: EDAR 1 ST M2; 17: EDAR 1 SS M3; 18: EDAR 1 ST M3; +: control positivo; -: control negativo.

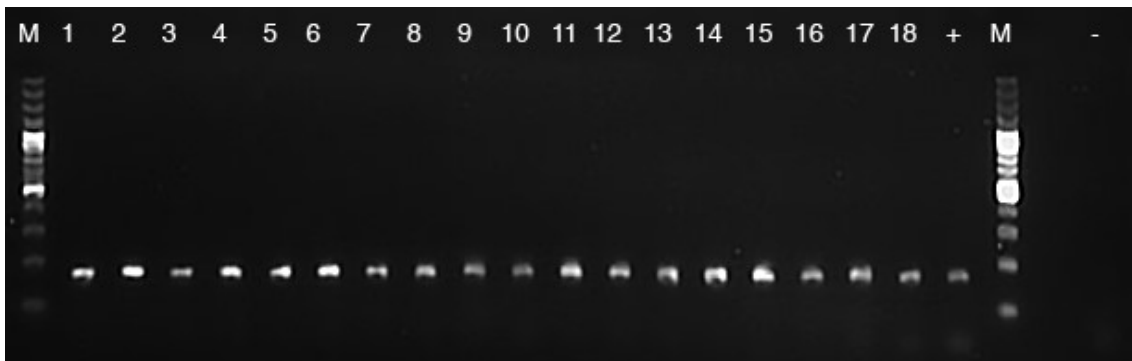


Figura 23. Amplificación de un fragmento del gen *tetW* de aguas de EDAR. M: marcador 100 pb; 1: EDAR 3 SS M1; 2: EDAR 3 ST M1; 3: EDAR 3 SS M2; 4: EDAR 3 ST M2; 5: EDAR 3 SS M3; 6: EDAR 3 ST M3; 7: EDAR 2 SS M1; 8: EDAR 2 ST M1; 9: EDAR 2 SS M2; 10: EDAR 2 ST M2; 11: EDAR 2 SS M3; 12: EDAR 2 ST M3; 13: EDAR 1 SS M1; 14: EDAR 1 ST M1; 15: EDAR 1 SS M2; 16: EDAR 1 ST M2; 17: EDAR 1 SS M3; 18: EDAR 1 ST M3; +: control positivo; -: control negativo.

1.4.1.2. Detección de ARG en los aislados de *E. coli* procedentes de aguas de EDAR

Se estudió la presencia de los 5 genes de resistencia seleccionados en los 161 aislados de *E. coli* procedentes de las aguas de los efluentes SS y ST de las distintas EDAR (Tabla 40). El gen *bla*TEM fue el más frecuentemente detectado en el total de los aislados, con porcentajes superiores al 90% en todas las muestras analizadas, seguido del gen *sulI*, presente en el 60% del total de los aislados. El gen *ermB* fue detectado en una menor proporción (6%).

El análisis estadístico indicó una relación de dependencia entre la presencia de los genes *ermB* ($\chi^2 = 4,356$, $p = 0,0369$), *sulI* ($\chi^2 = 14,856$, $p = 0,0001$) y *tetW*, ($\chi^2 = 7,456$, $p = 0,0063$) y la estación del muestreo, cuya presencia en otoño fue significativamente mayor que en primavera. Sólo para el gen *tetW* se encontró una relación de dependencia con respecto al efluente y la EDAR, siendo más frecuente en los aislados procedentes del efluente SS ($\chi^2 = 4,996$, $p = 0,0254$) y en los aislados de la EDAR 1 (23 cepas (43%) frente a 11 y 10 cepas en las otras dos EDAR; $\chi^2 = 9,538$, $p = 0,0085$).

Tabla 40. Detección de ARG en aislados de *E. coli* procedentes de agua de EDAR.

			Nº de aislados	Nº de aislados positivos (%)					
				<i>bla</i> TEM	<i>qnrS</i>	<i>ermB</i>	<i>sull</i>	<i>tetW</i>	
EDAR 1	SS	P	14	13 (93)	1 (7)	0	6 (43)	9 (64)	
		O	15	14 (93)	6 (40)	2 (13)	10 (67)	6 (40)	
	ST	P	11	11 (100)	0	0	5 (45)	0	
		O	14	14 (100)	8 (57)	1 (9)	6 (43)	8 (57)	
	Total			54	52 (96)	15 (28)	3 (6)	27 (50)	23 (43)
	EDAR 2	SS	P	14	13 (93)	8 (57)	1 (7)	6 (43)	1 (7)
O			15	14 (93)	5 (33)	2 (13)	14 (93)	6 (40)	
ST		P	13	12 (93)	1 (8)	0	6 (46)	1 (8)	
		O	15	14 (93)	3 (20)	2 (13)	7 (47)	3 (20)	
Total			57	53 (93)	17 (30)	5 (9)	33 (58)	11 (19)	
EDAR 3		SS	P	10	9 (90)	3 (30)	0	3 (30)	1 (10)
	O		15	15 (100)	6 (40)	1 (7)	13 (87)	6 (40)	
	ST	P	10	10 (100)	3 (30)	0	5 (50)	0	
		O	15	13 (87)	4 (27)	0	15 (100)	3 (20)	
	Total			50	47 (94)	16 (32)	1 (2)	36 (72)	10 (20)
	Total			161	152 (94)	48 (30)	9 (6)	96 (60)	44 (27)

SS: Salida Secundaria; ST: Salida Terciaria; P: Primavera; O: Otoño.

1.4.1.3. Estudio comparativo de la presencia de ARG en las muestras de agua y los aislados de EDAR

A continuación, se expone el resultado del estudio comparativo de la presencia de ARG en las aguas procedentes de las EDAR, analizadas directamente, y en los aislados de *E. coli* procedentes de esas mismas aguas (Figura 24).

El gen *bla*TEM se detectó en todas las EDAR con porcentajes mayores del 90%, tanto en las muestras de agua como en los aislados de *E. coli*. El gen *sull* se detectó en porcentajes superiores al 75% en las muestras de agua, mientras que su presencia en los aislados de *E. coli* varió desde el 50% al 72%, denotando diferencias significativas entre las EDAR 1 y 2 ($\chi^2 = 4,429$, $p = 0,035$ y $\chi^2 = 7,747$, $p = 0,005$, respectivamente). La presencia de los genes *tetW* y *qnrS* fue superior al 75% en todas las muestras de agua de las EDAR, sin embargo, en los aislados de *E. coli* su presencia no superó el 50%, encontrándose diferencias significativas entre los niveles detectados en agua y en las cepas para todas las EDAR (*tetW*: $\chi^2 = 12,990$, $23,905$, $13,774$, $p = 0,0353$, $0,0000$, $0,0002$; *qnrS*: $\chi^2 = 16,796$, $15,723$, $7,436$, $p = 0,000$, $0,0001$, $0,0064$, respectivamente para cada EDAR). Con respecto al gen *ermB*, los porcentajes de detección en aguas (> 50%) fueron significativamente mayor que en los aislados de *E. coli* (< 10%) para todas

las EDAR ($\chi^2 = 31,829$, $p = 0,000$; $\chi^2 = 21,730$, $p = 0,000$ y $\chi^2 = 22,262$, $p = 0,000$, para la EDAR 1, EDAR 2 y EDAR 3, respectivamente).

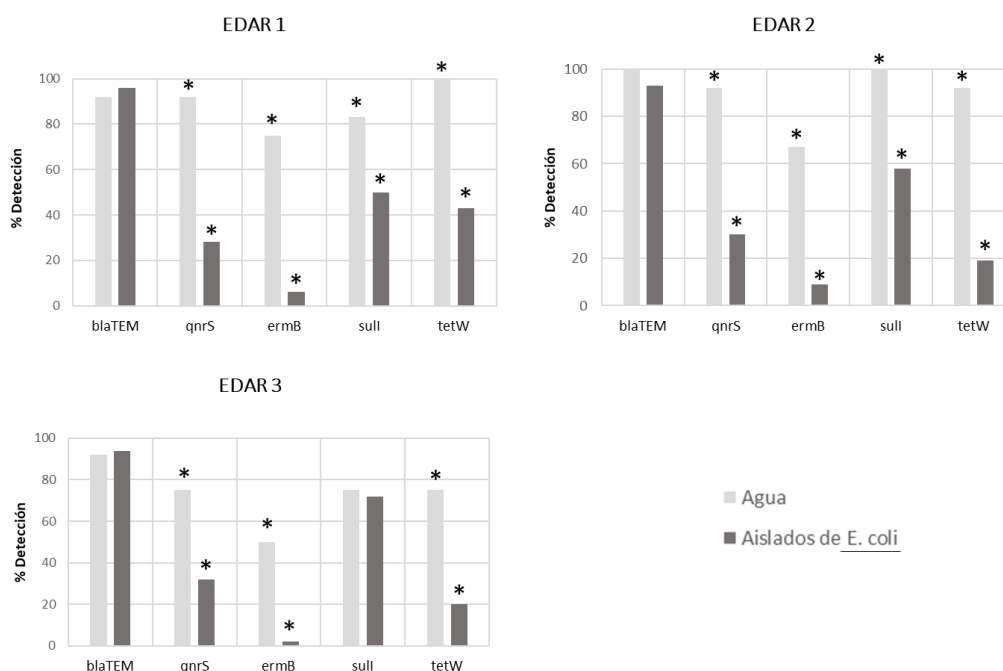


Figura 24. Presencia de ARG en aguas de EDAR y en los aislados de *E. coli*. *: denota diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la frecuencia de aparición de genes en las muestras de agua y en los aislados de *E. coli*.

1.4.1.4. Estudio comparativo entre las resistencias fenotípicas y la presencia de ARG en los aislados de *E. coli* procedentes de EDAR

El objetivo del presente apartado fue analizar la relación entre la presencia de ARG en los aislados de *E. coli*, procedentes de aguas de EDAR y las resistencias detectadas en los mismos mediante el ensayo Sensititre (Tabla 41). Para ello se seleccionaron varios antibióticos pertenecientes a cada una de las familias de los ARG analizados: Ampicilina, cefotaxima y ceftazidima (betalactámicos), sulfametoxazol (sulfonamidas), tetraciclina (tetraciclinas), ciprofloxacino y ácido nalidíxico (quinolonas) y azitromicina (macrólidos). La resistencia a los mismos observada en las cepas de *E. coli* se relacionó con la presencia de los genes *blaTEM*, *sull*, *tetW*, *qnrS* y *ermB*, respectivamente.

El gen *blaTEM* fue detectado en porcentajes por encima del 90% en los aislados que mostraron resistencia a AMP, TAZ y FOT en el ensayo Sensititre. El gen *sull*, fue detectado en el 57% de los resistentes a SMX (59 de los 103 aislados). Niveles inferiores fueron detectados para los genes *tetW* y *qnrS* en los aislados con resistencias mostradas en Sensititre a TET (30%), y CIP

(29%) y NAL (34%), respectivamente. En cuanto al gen *ermB*, sólo se detectó en 4 (16%) de los 25 aislados resistentes a AZI.

Tabla 41. Comparación entre la presencia de ARG y las resistencias fenotípicas detectadas en los aislados de *E. coli* procedentes de EDAR.

Resistencia fenotípica (nº aislados)		Presencia del gen (nº aislados, %)
Betalactámicos		<i>blaTEM</i>
AMP	134	130 (97%)
FOT	28	25 (90%)
TAZ	27	26 (96%)
Sulfonamidas		<i>sulI</i>
SMX	103	59 (57%)
Tetraciclinas		<i>tetW</i>
TET	113	34 (30%)
Quinolonas		<i>qnrS</i>
CIP	99	29 (29%)
NAL	88	30 (34%)
Macrólidos		<i>ermB</i>
AZI	25	4 (16%)

AMP: ampicilina; FOT: cefotaxima; TAZ: ceftazidima; SMX: sulfametoxazol; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacino; NAL: ácido nalidíxico; AZI: azitromicina.

1.4.2. Estudio de la presencia de ARG en muestras de aguas de riego superficiales

Se realizó la detección de los 5 ARG seleccionados, tanto directamente en las 25 muestras de agua como en los 125 aislados de *E. coli*.

1.4.2.1. Detección directa de ARG en las muestras de agua de riego superficiales

Se detectaron los cinco genes en todos los puntos de muestreo, con algunas variaciones en la frecuencia de detección que no fueron estadísticamente significativas (Tabla 42).

Tabla 42. Detección de ARG en muestras de agua de riego superficiales.

Punto de muestreo	Nº de muestras	Nº de muestras positivas (%)				
		<i>blaTEM</i>	<i>qnrS</i>	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>tetW</i>
RT	5	5 (100)	3 (60)	3 (60)	3 (60)	5 (100)
AM	5	5 (100)	3 (60)	2 (40)	4 (80)	5 (100)
AR	5	4 (80)	3 (60)	2 (40)	4 (80)	5 (100)
AV	5	5 (100)	5 (100)	4 (80)	5 (100)	5 (100)
BC	5	5 (100)	4 (80)	4 (80)	4 (80)	5 (100)
Total	25	24 (96)	18 (72)	15 (60)	20 (80)	25 (100)

RT: Río Turia; AM: Acequia de Moncada; AR: Acequia de Rascanya; AV: Acequia de Vera; BC: Barranco de Carraixet.

El gen *tetW* se detectó en la totalidad de las muestras de agua, seguido por el gen *blaTEM* (96%), el cual se detectó en todas las muestras excepto en una, procedente de la Acequia de Rascanya. El gen *sull* (80% en total) fue menos frecuente en las aguas del río Turia (60%), mientras que el 100% de las muestras de la Acequia de Vera fueron positivas para este gen. Para los genes *qnrS* y *ermB* se observó una gran variabilidad entre las muestras (del 40% al 100%), con un porcentaje promedio de 72% para *qnrS* y 60% para *ermB* (Tabla 42).

1.4.2.2. Detección de ARG en los aislados de *E. coli* procedentes de aguas de riego superficiales

Los resultados de la investigación de la presencia de ARG en los 125 aislados de *E. coli* se muestran en la Tabla 43. El 96% de los aislados (120) presentó el gen *blaTEM*, mientras que el gen *ermB* solo se detectó en un aislado. El resto de los genes presentaron una frecuencia de detección no superior al 50%.

No se encontró una relación significativa con el sitio de muestreo para los genes *blaTEM*, *sull* y *tetW*. Sin embargo, ninguna de las muestras de la Acequia de Rascanya presentaba el gen *qnrS*, mientras que el gen *ermB* fue detectado únicamente en una muestra del Río Turia.

Tabla 43. Detección de ARG en aislados de *E. coli* procedentes de aguas de riego superficiales.

Punto de muestreo	Nº de aislados de <i>E. coli</i>	Nº de aislados positivos (%)				
		<i>blaTEM</i>	<i>qnrS</i>	<i>ermB</i>	<i>sull</i>	<i>tetW</i>
RT	25	24 (96)	9 (36)	1 (4)	11 (44)	8 (32)
AM	25	25 (100)	9 (36)	0	13 (52)	2 (8)
AR	25	23 (92)	0	0	11 (44)	5 (20)
AV	25	25 (100)	6 (24)	0	14 (56)	5 (20)
BC	25	23 (92)	3 (12)	0	12 (48)	2 (8)
Total	125	120 (96)	27 (22)	1 (1)	61 (49)	22 (18)

RT: Río Turia; AM: Acequia de Moncada; AR: Acequia de Rascanya; AV: Acequia de Vera; BC: Barranco de Carraixet.

En las figuras de la 25 a la 29 se pueden observar las fotografías de los geles revelados, en los que se detecta la presencia de las bandas correspondientes a los genes estudiados.

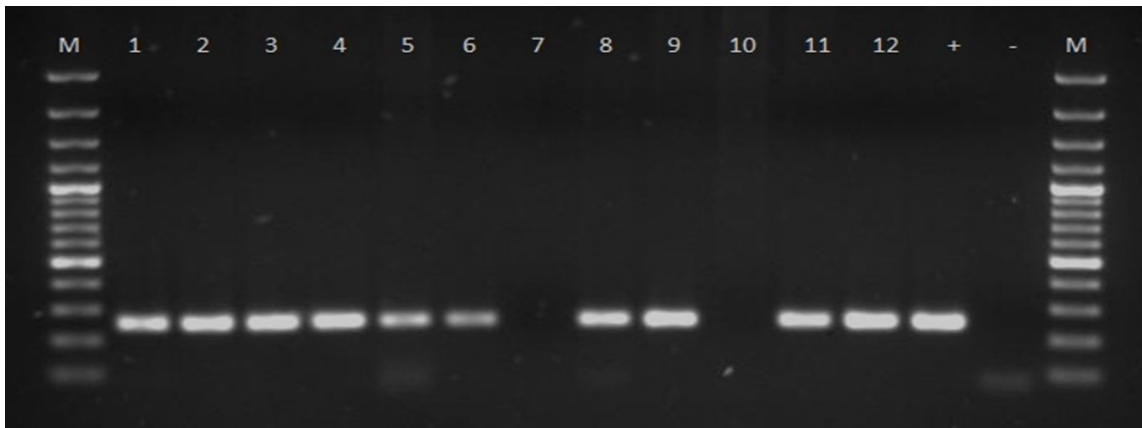


Figura 25. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen *bla*TEM en muestras de aguas de riego y aislados de *E. coli*. M: marcador 100 pb; 1: AV-agua; 2: aislado AV-1; 3: aislado AV-2; 4: aislado AV-3; 5: aislado AV-4; 6: aislado AV-5; 7: AR-agua; 8: aislado AR-1; 9: aislado AR-2; 10: aislado AR-3; 11: aislado AR-4; 12: aislado AR-5; +: control positivo; -: control negativo.

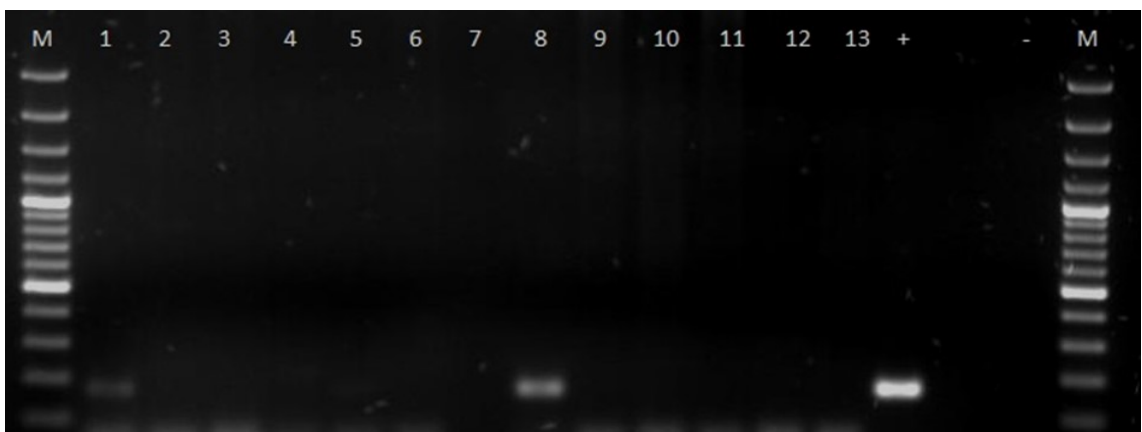


Figura 26. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen *tet*W en muestras de aguas de riego y aislados de *E. coli*. M: marcador 100 pb; 1: AR-agua; 2: aislado AR-1; 3: aislado AR-2; 4: aislado AR-3; 5: aislado AR-4; 6: aislado AR-5; 7: vacío; 8: BC-agua; 9: aislado BC-1; 10: aislado BC-2; 11: aislado BC-3; 12: aislado BC-4; 13: aislado BC-5; +: control positivo; -: control negativo.

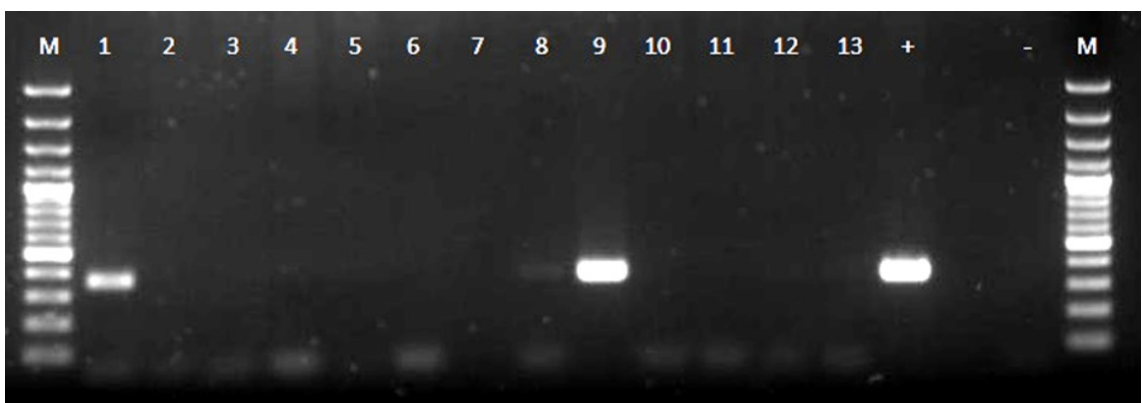


Figura 27. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen *erm*B en muestras de aguas de riego y aislados de *E. coli*. M: marcador 100 pb; 1: AV-agua; 2: aislado AV-1; 3: aislado AV-2; 4: aislado AV-3; 5: aislado AV-4; 6: aislado AV-5; 7: vacío; 8: RT-agua; 9: aislado RT-1; 10: aislado RT-2; 11: aislado RT-3; 12: aislado RT-4; 13: aislado RT-5; +: control positivo; -: control negativo.

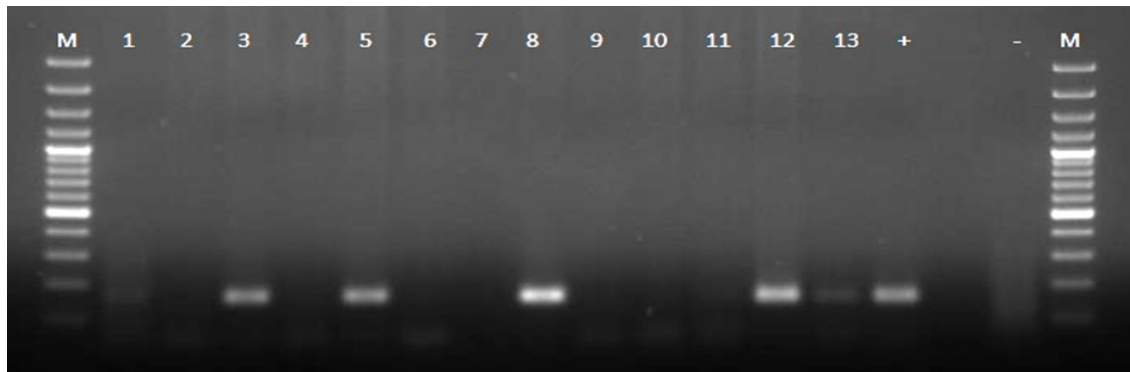


Figura 28. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen *sull* en muestras de aguas de riego y aislados de *E. coli*. M: marcador 100 pb; 1: BC-agua; 2: aislado BC-1; 3: aislado BC-2; 4: aislado BC-3; 5: aislado BC-4; 6: aislado BC-5; 7: vacío; 8: AV-agua; 9: aislado AV-1; 10: aislado AV-2; 11: aislado AV-3; 12: aislado AV-4; 13: aislado AV-5; +: control positivo; -: control negativo.

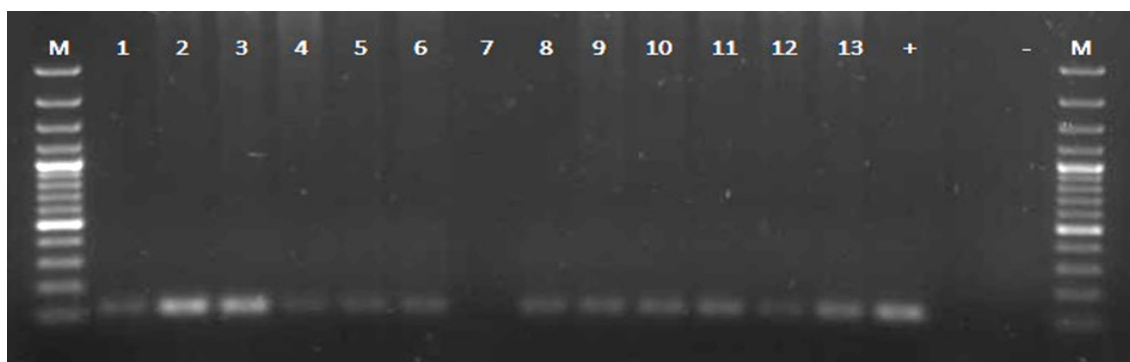


Figura 29. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen *qnrS* en muestras de aguas de riego y aislados de *E. coli*. M: marcador 100 pb; 1: AM-agua; 2: aislado AM-1; 3: aislado AM-2; 4: aislado AM-3; 5: aislado AM-4; 6: aislado AM-5; 7: vacío; 8: aislado RT-agua; 9: aislado RT-1; 10: aislado RT-2; 11: aislado RT-3; 12: aislado RT-4; 13: aislado RT-5; +: control positivo; -: control negativo.

1.4.2.3. Estudio comparativo de la presencia de ARG en las muestras de agua y los aislados de aguas de riego superficiales

A continuación, se expone el resultado del estudio comparativo de la presencia de ARG en las aguas de riego superficiales, analizadas directamente, y en los aislados de *E. coli* procedentes de las mismas (Figura 30).

El gen *tetW* se detectó en el 100% de las aguas analizadas, mientras que en los aislados de *E. coli* los porcentajes fueron significativamente menores ($p < 0,05$), para todos los sitios de muestreo. De forma semejante, el gen *ermB* fue detectado en niveles significativamente más altos en las aguas, no detectándose en ninguno de los aislados de *E. coli*, excepto en una cepa proveniente del Río Turia. La presencia del gen *qnrS* fue mayor del 70% en las muestras de agua y menor del 25% en los aislados de *E. coli*. El análisis estadístico mostró diferencias significativas para tres de los cinco puntos muestreados ($\chi^2 = 16,667$, $10,364$, y $10,770$, para la Acequia de Rascanya, Acequia de Vera y Barranco de Carraixet, respectivamente). Los genes *bla*_{TEM} y *sull*

no mostraron diferencias significativas entre los niveles de detección en las aguas y en los aislados para ninguno de los puntos de muestreo. Finalmente, *ermB*, fue detectado en el 60% de las muestras de agua y solo en un aislado de *E. coli* (1%).

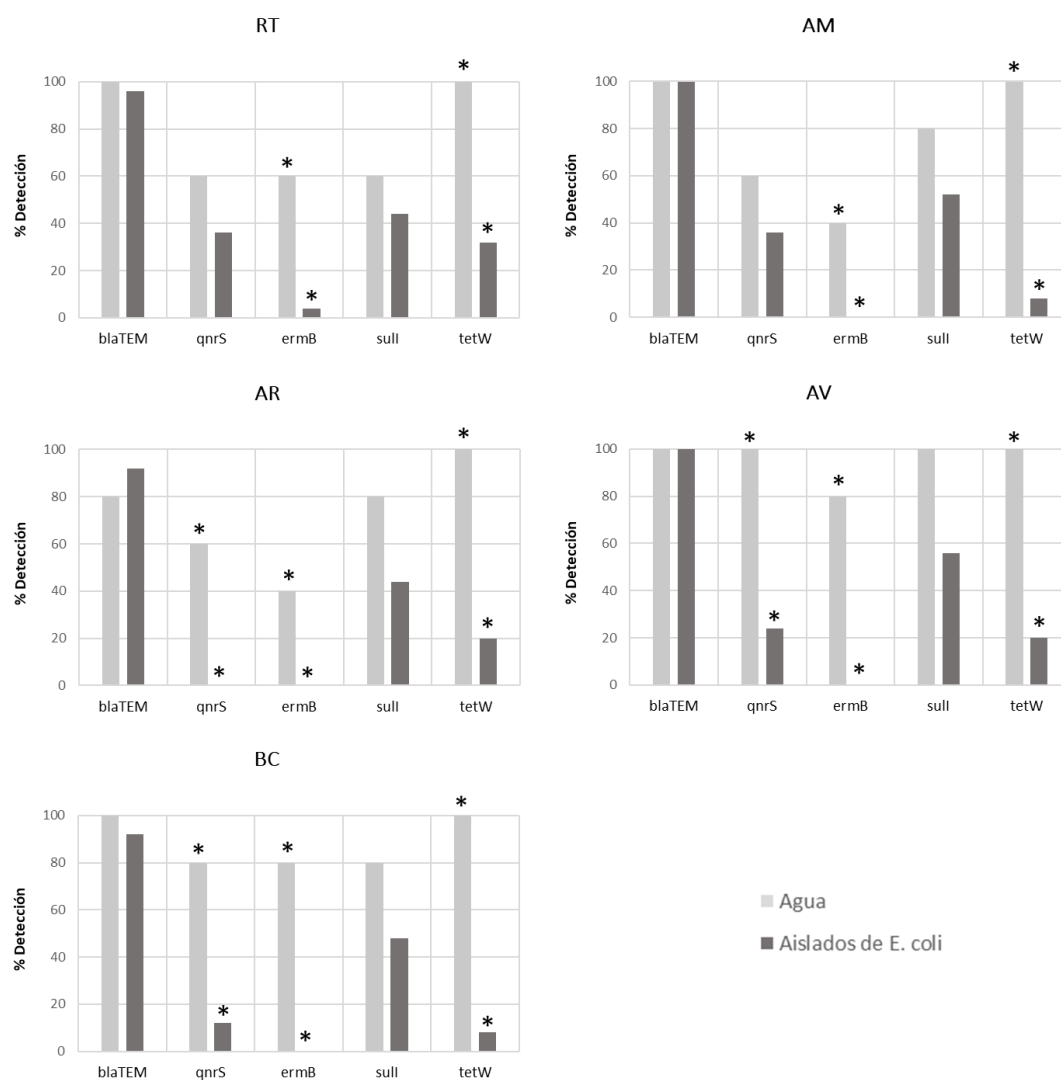


Figura 30. Comparación de la detección de los ARG entre los aislamientos de *E. coli* y las muestras de agua de riego en los diferentes puntos de muestreo. RT: Río Turia; AM: Acequia de Moncada; AR: Acequia de Rascanya; AV: Acequia de Vera; BC: Barranco de Carraixet. *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la aparición de genes en muestras de agua y en aislados de *E. coli*.

1.4.2.4. Estudio comparativo entre las resistencias fenotípicas y la presencia de ARG en los aislados de *E. coli* procedentes de aguas de riego superficiales

En el presente apartado se analiza la relación entre la presencia de ARG en los aislados de *E. coli*, procedentes de aguas de riego superficiales y las resistencias detectadas en los mismos mediante el ensayo Sensititre (Tabla 44). El gen *blaTEM* fue detectado en 87 cepas (97% de los

aislados) resistentes a AMP y en el 100% de los resistentes a FOT (25) y a TAZ (21). Respecto a la prevalencia del gen *sull*, este fue detectado aproximadamente en el 50% de las cepas resistentes a SMX (60 de 121). El gen *tetW* tan solo fue detectado en el 19% de los aislados resistentes a TET. El gen *qnrS* fue detectado en el 28% y 26% de los resistentes a CIP y NAL, respectivamente. En cuanto a *ermB*, solo en uno de los 30 aislados resistentes a AZI se detectó el gen.

Tabla 44. Comparación entre la presencia de ARG y las resistencias fenotípicas detectadas en aislados de *E. coli* procedentes de aguas de riego superficiales.

Resistencia fenotípica (nº aislados)		Presencia del gen (nº aislados, %)
Betalactámicos		<i>blaTEM</i>
AMP	90	87 (97%)
FOT	25	25 (100%)
TAZ	21	21 (100%)
Sulfonamidas		<i>sull</i>
SMX	121	60 (50%)
Tetraciclinas		<i>tetW</i>
TET	81	15 (19%)
Quinolonas		<i>qnrS</i>
CIP	75	21 (28%)
NAL	69	18 (26%)
Macrólidos		<i>ermB</i>
AZI	30	1 (3%)

AMP: ampicilina; FOT: cefotaxima; TAZ: ceftazidima; SMX: sulfametoxazol; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacino; NAL: ácido nalidíxico; AZI: azitromicina.

2. ESTUDIO DE AGUAS DE COSTA Y CONTINENTALES

2.1. Calidad microbiológica

Para este estudio se analizaron 77 muestras procedentes de diferentes playas de la Comunidad Valenciana (España) y 102 muestras de aguas continentales.

2.1.1. Aguas de costa

El 74% del total de las muestras (57 muestras) presentaron contaminación por *E. coli* y el 39% (30 muestras) por enterococos. Los valores de los recuentos variaron de 1 a 3,8 log₁₀ y de 1 a 2,9 log₁₀, para *E. coli* y enterococos, respectivamente (Tabla 45). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de contaminación por ambos microorganismos en ninguna de las tres zonas de muestreo.

De acuerdo con los límites establecidos en el Real Decreto 1341/2007, las aguas de baño de nuestro estudio cumplían con la normativa, presentando una calidad excelente (en su mayoría) o buena (Tabla 46).

Tabla 45. Recuentos de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en agua de costa.

	<i>E. coli</i>		<i>Enterococcus</i> spp.	
	Muestras positivas	log ₁₀ NMP/100 mL	Muestras positivas	log ₁₀ NMP/100 mL
VN	14	1,3 ± 0,5	9	1,4 ± 0,4
VS	23	1,5 ± 0,6	12	1,5 ± 0,4
AN	20	1,8 ± 0,9	9	1,9 ± 0,6

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar del log₁₀ (NMP/100 mL) de las muestras positivas. VN: Valencia Norte; VS: Valencia Sur; AN: Alicante Norte.

Tabla 46. Calidad de las aguas de costa analizadas según R.D. 1341/2007.

		Calidad aguas de baño	
		Buena	Excelente
<i>E. coli</i>	VN		21
	VS	3	27
	AN	5	21
Enterococos	VN	1	20
	VS	2	28
	AN	5	21

VN: Valencia Norte; VS: Valencia Sur; AN: Alicante Norte.

2.1.2. Aguas continentales

De las 102 muestras de agua analizadas, el 100% mostró contaminación por enterococos, mientras que *E. coli* fue detectado en un total de 82 muestras: 43 de aguas de pozo, 31 de aguas superficiales y todas las aguas de fuentes (Tabla 47).

La mayoría de las muestras mostraron niveles de *E. coli* por debajo de 1 log₁₀ UFC/100 mL, aunque se llegaron a detectar valores de 3,5 log₁₀ en algunas aguas de pozo y aguas superficiales; y de 2,5 log₁₀ en aguas de fuentes. Los recuentos de enterococos llegaron a niveles de 2,4 log₁₀ en aguas superficiales y de 2,1 log₁₀ en aguas de pozo y aguas de fuentes.

De acuerdo con el Real Decreto 1341/2007 sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño, los valores obtenidos en el presente estudio permiten calificar las aguas continentales

analizadas, en su mayoría, en la categoría de excelente, aunque 2 de ellas se clasificaron como de calidad insuficiente, debido a las altas concentraciones de *E. coli* detectadas (Tabla 48).

Tabla 47. Recuentos de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en las aguas continentales.

Origen	log ₁₀ UFC/100 mL	Nº de muestras	
		<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> spp.
Pozo	< 1	46	37
	1 - < 2	11	20
	> 2	2	2
Superficiales	< 1	26	18
	1 - < 2	4	13
	> 2	5	4
Fuentes	0 - < 1	7	5
	1 - < 2	0	2
	>2	1	1

Tabla 48. Calidad de las aguas continentales según R.D. 1341/2007.

		Calidad agua continental		
		Buena	Excelente	Insuficiente
<i>E. coli</i>	Pozo		58	1
	Superficial	1	33	1
	Fuente		8	
Enterococos	Pozo		59	
	Superficial	1	34	
	Fuente		8	

2.2. Estudio de la sensibilidad a diferentes antibióticos de los aislados de *Escherichia coli* y de *Enterococcus* spp.

Una vez procesadas todas las muestras se procedió al aislamiento e identificación de los aislados de *E. coli* y de enterococos procedentes de las mismas, con el fin de estudiar sus niveles de resistencias a antibióticos mediante el método de Sensititre® (Tabla 49).

Tabla 49. Distribución de los aislados según su origen.

Origen		Nº de aislados	
		<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus spp.</i>
Aguas de costa	VN	14	9
	VS	23	12
	AN	20	9
	Total	57	30
Aguas continentales	Pozo	34	36
	Superficial	20	22
	Fuente	4	5
	Total	58	63

VN: Valencia Norte; VS: Valencia Sur; AN: Alicante Norte.

2.2.1. Resistencias a antibióticos detectadas en los aislados de *E. coli* y *Enterococcus spp.* obtenidos a partir de aguas de costa

A partir del agua de mar se aislaron un total de 57 cepas de *E. coli* y 30 de enterococos, 1 de cada una de las muestras positivas.

De los 57 aislados de *E. coli*, 34 (59,6%) fueron resistentes al menos a un antibiótico, 6 de ellos procedentes de Valencia Norte, 17 de Valencia Sur y 11 de Alicante Norte (Tabla 50). La resistencia a ampicilina fue la más frecuente (35% de los aislados), seguida de ciprofloxacino (18% de los aislados), sulfametoxazol y trimetoprim (16% de los aislados cada uno), tetraciclina y ácido nalidíxico (14% de los aislados cada uno). Colistina y meropenem mostraron un menor número de aislados resistentes (1 sola cepa, 2%), mientras que tigeciclina y cloranfenicol resultaron efectivos frente a todos los aislados. No se detectó ninguna relación de dependencia ($p > 0,05$) entre el número de cepas resistentes a cualquier antibiótico y la zona de donde fueron aislados.

Así mismo, se detectaron 5 cepas multirresistentes entre los 57 aislados de *E. coli* (9%): 2 aislados de Valencia Norte, 2 de Valencia Sur y 1 de Alicante Norte (Tabla 51). Cada cepa multirresistente mostró un perfil distinto. En todos los perfiles se detectaron resistencia a betalactámicos, en 4 de ellos resistencia a sulfonamidas y tetraciclinas y, en 3 perfiles, resistencia a quinolonas.

Tabla 50. Frecuencia de detección de resistencias y multirresistencias en los aislados de *E. coli* procedentes de agua de costa.

Origen muestra	Nº de aislados de <i>E. coli</i>	Nº de aislados resistentes de <i>E. coli</i> (%)														Nº de MDR (%)
		SMX	TMP	CIP	TET	MER	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN	
VN	14	2 (14)	3 (21)	2 (14)	2 (14)	0	1 (7)	3 (21)	0	0	0	1 (7)	0	4 (29)	1 (7)	2 (14)
VS	23	4 (17)	4 (17)	4 (17)	2 (9)	1 (4)	3 (13)	4 (17)	2 (9)	0	0	4 (17)	1 (4)	12 (52)	0	2 (9)
AN	20	3 (15)	2 (10)	4 (20)	4 (20)	0	1 (5)	1 (5)	0	0	0	0	0	4 (20)	0	1 (5)
Total (%)	57	9 (16)	9 (16)	10 (18)	8 (14)	1 (2)	5 (9)	8 (14)	2 (4)	0 (0)	0 (0)	5 (9)	1 (2)	20 (35)	1 (2)	5 (9)

VN: Valencia Norte; VS: Valencia Sur; AN: Alicante Norte. SMX: sulfametoxazol; TMP: trimetoprim; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; MER: meropenem; AZI: azitromicina; NAL: ácido nalidíxico; FOT: cefotaxima; CHL: cloranfenicol; TGC: tigeciclina; TAZ: ceftazidima; COL: colistina; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina. MDR: multirresistencia (resistencia ≥ 3 familias de antibióticos).

Tabla 51. Perfiles de multirresistencia detectados en los aislados de *E. coli* procedentes de agua de costa.

	AMG	BLA	FEN	MCL	QNL	POL	SUL	TET	<i>E. coli</i> (%)
									1 (2)
									1 (2)
									1 (2)
									1 (2)
									1 (2)
Total	1	5	0	2	3	1	4	4	5

AMG: Aminoglucósidos; BLA: Betalactámicos; FEN: Anfénicoles; MCL: Macrólidos; QNL: Quinolonas; POL: Polimixinas; SUL: Sulfonamidas; TET: Tetraciclinas; Casilla sombreada: Resistencia a familia de antibióticos.

De los 30 aislados de enterococos, solo 7 cepas (23%) mostraron resistencia a un antibiótico. Se aislaron 6 cepas resistentes a la tetraciclina (20%), 4 de Valencia Sur y 2 de Alicante Norte; y una a la daptomicina (3% de los aislados), procedente de Valencia Sur, sin que hubiera relación de dependencia ($p > 0,05$) entre la resistencia de los aislados frente a ninguno de los dos antibióticos y la zona de donde se aislaron. Ninguna cepa mostró multirresistencia.

2.2.2. Resistencias a antibióticos detectadas en los aislados de *E. coli* y *Enterococcus* spp. obtenidos a partir de aguas continentales

A partir de las 102 muestras se aislaron un total de 121 cepas bacterianas, 58 de *E. coli* y 63 de enterococos.

Entre los 58 aislamientos de *E. coli*, 16 (28%) fueron resistentes al menos a un antibiótico y 13 (22%) mostraron resistencias a dos o más antibióticos. De los aislados resistentes, 9 provenían de aguas de pozo, 6 de aguas superficiales y 1 de fuentes (Tabla 52).

Las resistencias a sulfametoxazol y tetraciclina fueron las más frecuentes, en el 19% y 17% de los aislados, respectivamente, seguida de resistencia a ampicilina por 9 aislados (16%), trimetoprim por 8 aislados (14%) y ciprofloxacino (6 aislados, 10%). Tigeciclina y colistina fueron efectivos frente a todos los aislados. El análisis estadístico no detectó relación de dependencia ($p > 0,05$) entre la resistencia de los aislados frente a cualquier antibiótico y el origen de la muestra.

Entre los 16 aislados de *E. coli* resistentes a algún antibiótico, 6 de ellos mostraron multirresistencia, 4 procedentes de aguas de pozo y 2 de agua superficial. Se detectaron 4 perfiles distintos, en todos los cuales aparecía resistencia a las familias de betalactámicos y tetraciclina (Tabla 53). Las combinaciones **BLA-SUL-TET** y **BLA-QNL-SUL-TET** fueron las más frecuentes, encontrándose cada una de ellas en 2 aislados. Destaca uno de los aislados, procedente de aguas de pozo, resistente a 7 de las 8 familias de antibióticos probadas.

Tabla 52. Frecuencia de detección de resistencias y multirresistencias en los aislados de *E. coli* procedentes de aguas continentales.

Origen muestra	Nº de aislados de <i>E. coli</i>	Nº de aislados resistentes de <i>E. coli</i> (%)														Nº de MDR (%)
		SMX	TMP	CIP	TET	MER	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN	
Pozo	34	7 (21)	5 (15)	4 (12)	6 (18)	1 (3)	1 (3)	3 (9)	1 (3)	1 (3)	0	1 (3)	0	5 (15)	1 (3)	4 (12)
Superficial	20	3 (15)	2 (10)	2 (10)	4 (20)	0	0	1 (5)	0	0	0	0	0	3 (15)	1 (5)	2 (10)
Fuente	4	1 (25)	1 (25)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (25)	0	0 (0)
Total (%)	58	11 (19)	8 (14)	6 (10)	10 (17)	1 (2)	1 (2)	4 (7)	1 (2)	1 (2)	0	1 (2)	0	9 (16)	2 (4)	6 (10)

SMX: sulfametoxazol; TMP: trimetoprim; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; MER: meropenem; AZI: azitromicina; NAL: ácido nalidíxico; FOT: cefotaxima; CHL: cloranfenicol; TGC: tigeciclina; TAZ: ceftazidima; COL: colistina; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina. MDR: multirresistencia (resistencia \geq 3 familias de antibióticos).

Tabla 53. Perfiles y número de aislados de *E. coli* multirresistentes procedentes de aguas continentales.

	AMG	BLA	FEN	MCL	QNL	POL	SUL	TET	<i>E. coli</i> (%)
									2 (3)
									1 (2)
									2 (3)
									1 (2)
Total	2	4	1	1	2	0	3	4	6

AMG: Aminoglucósidos; BLA: Betalactámicos; FEN: Anfenícolos; MCL: Macrólidos; QNL: Quinolonas; POL: Polimixinas; SUL: Sulfonamidas; TET: Tetraciclinas; Casilla sombreada: Resistencia a familia de antibióticos.

En cuanto a las resistencias presentadas por los aislados de enterococos, únicamente, 11 de los 63 aislamientos (17,4%) mostraron resistencia al menos a 1 antibiótico de los ensayados (Tabla 54). Siete de ellos provenían de aguas de pozo, 3 de aguas superficiales y 1 de agua de fuente, sin que se encontrara relación de dependencia entre resistencia y origen del aislado ($p > 0.05$).

La resistencia a tetraciclina fue la más frecuente (8 aislados) seguida de eritromicina (5 aislados) y ciprofloxacino (3 aislados). Es de destacar que 2 aislados procedentes de agua de pozo mostraron resistencia a la vancomicina.

Tres cepas, procedentes de agua de pozo, presentaron multirresistencia (Tabla 55), detectándose 3 perfiles distintos, uno para cada una de ellas, con resistencia frente a 3, 5 y 7 familias distintas de antibióticos. Todas presentaban resistencia a los macrólidos.

Tabla 54. Frecuencia de detección de resistencias y multirresistencias en los aislados de *Enterococcus* spp. procedentes de aguas continentales.

Origen muestra	Nº aislados de <i>Enterococcus</i> sp.	Nº de aislados resistentes de <i>Enterococcus</i> spp.											Nº de MDR (%)	
		AMP	CHL	CIP	DAP	ERI	GEN	LIN	QUIN/DAL	TEI	TET	TIG		VAN
Pozo	36	2 (6)	1 (3)	2 (6)	1 (3)	3 (8)	1 (3)	2 (6)	0	2 (6)	5 (14)	0	2 (6)	3 (8)
Superficial	22	0	0	1 (5)	0	2 (9)	0	0	0	0	2 (9)	0	0	0 (0)
Fuente	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (20)	0	0	0 (0)
Total (%)	63 (100)	2 (3)	1 (2)	3 (5)	1 (2)	5 (8)	1 (2)	2 (3)	0	2 (3)	8 (13)	0	2 (3)	3 (5)

AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; DAP: daptomicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; LIN: Linezolid; QUIN/DAL: quinupristina/dalfopristina; TEI: teicoplanina; TET: tetraciclina; TIG: tigeciclina; VAN: vancomicina. MDR: multirresistencia (resistencia \geq 3 familias de antibióticos).

Tabla 55. Perfiles de multirresistencia en los aislados de *Enterococcus* spp. procedentes de aguas continentales.

	AMG	BLA	FEN	GLU	LIP	MCL	QNL	OXA	TET	<i>Enterococcus</i> spp.(%)
										1 (2)
										1 (2)
										1 (2)
Total	1	2	1	2	1	3	1	2	2	3

AMG: Aminoglucósidos; BLA: Betalactámicos; FEN: Anfencóles; GLU: Glucopéptidos; LIP: Lipopéptidos cíclicos MCL: Macrólidos; QNL: Quinolonas; OXA: Oxazolidinonas; TET: Tetraciclinas; Casilla sombreada: Resistencia a familia de antibióticos.

2.3. Detección de la presencia de ARG en las muestras de agua de costa

Se realizó la detección de los 5 genes de resistencia a antibióticos (ARG) tanto directamente en las muestras de agua de mar como en los aislados de *E. coli* y enterococos, siguiendo los pasos descritos en el apartado de Material y Métodos.

2.3.1. Detección directa de ARG en las muestras de agua

De las 77 muestras estudiadas, 44 (57%) fueron positivas para al menos uno de los genes estudiados (Tabla 56).

Tabla 56. Detección de ARG en muestras de agua de costa.

Zona de muestreo	Nº de muestras	Nº de muestras positivas (%)				
		<i>bla</i> TEM	<i>qnr</i> S	<i>erm</i> B	<i>sul</i> I	<i>tet</i> W
VN	21	6 (29)	5 (24)	0 (0)	3 (14)	5 (24)
VS	30	15 (50)	9 (30)	0 (0)	5 (17)	0 (0)
AN	26	15 (58)	11 (42)	1 (4)	10 (39)	8 (31)
Total	77	36 (47)	25 (33)	1 (1)	18 (23)	13 (17)

VN: Valencia Norte; VS: Valencia Sur; AN: Alicante Norte.

El gen *bla*TEM fue el más prevalente en las muestras (47%), seguido del gen *qnr*S (33%) y *sul*I (23%). El gen *tet*W se detectó en el 17% de las muestras, mientras que *erm*B solo estaba presente en 1 muestra, procedente de Alicante Norte. De las tres zonas de muestreo, Alicante Norte fue donde se encontró una mayor prevalencia de genes. Mediante el estudio estadístico solo se detectó una dependencia estadísticamente significativa entre el gen *tet*W y la zona de Alicante Norte ($\chi^2=10,384$, $p < 0,05$), no detectándose en ninguna de las muestras provenientes de Valencia Sur.

2.3.2. Detección de ARG en los aislados de *E. coli* procedentes de aguas de costa

Se estudió también la presencia de los 5 genes de resistencia seleccionados en los 57 aislados de *E. coli* procedentes de las distintas muestras de agua de mar (Tabla 57).

Tabla 57. Detección de ARG en los aislados de *E. coli* procedentes de agua de costa.

Zona de muestreo	Nº de aislados	Nº de muestras positivas (%)				
		<i>bla</i> TEM	<i>qnr</i> S	<i>erm</i> B	<i>sul</i> I	<i>tet</i> W
VN	14	13 (93)	4 (29)	0 (0)	13 (93)	2 (14)
VS	23	21 (91)	11 (48)	1 (4)	21 (91)	11 (48)
AN	20	19 (95)	6 (30)	2 (10)	19 (95)	10 (50)
Total	57	53 (93)	21 (37)	3 (5)	53 (93)	23 (40)

VN: Valencia Norte; VS: Valencia Sur; AN: Alicante Norte.

El gen *bla*TEM, junto con el gen *sull*, fueron los más frecuentemente detectados, encontrándose cada uno en 53 cepas de *E. coli* (93%). Le siguieron en frecuencia los genes *qnr*S y el gen *tet*W, presentes en el 37% y 40% de las muestras respectivamente. El gen *erm*B solo se detectó en 3 de los aislados (5%). El análisis estadístico no mostró ninguna relación de dependencia entre la zona de muestreo y la frecuencia de detección de genes en los aislados de *E. coli* ($p > 0,05$).

2.3.3. Estudio comparativo de la presencia de ARG en las muestras de agua y los aislados de aguas de costa

Para la mayoría de los genes investigados, y en las tres zonas analizadas, la presencia de éstos fue mayor en los aislados que en las aguas analizadas directamente (Figura 31). En Valencia Norte se detectaron los genes *bla*TEM y *sull* en cantidades significativamente mayores en las cepas de *E. coli* que en las muestras de agua de mar ($\chi^2 = 13,988$, $p = 0,0002$ y $\chi^2 = 20,896$, $p = 0,000$, respectivamente). En Valencia Sur aparte de con los genes *bla*TEM y *sull* ($\chi^2 = 10,194$, $p = 0,0014$ y $\chi^2 = 29,020$, $p = 0,000$, respectivamente), se encontraron diferencias significativas en el gen *tet*W, que no fue detectado en ninguna de las muestras de agua de mar ($\chi^2 = 18,106$, $p = 0,0000$). En Alicante Norte se encontraron diferencias significativas en los genes *bla*TEM y *sull*, que se detectaron en mayor medida en las cepas ($\chi^2 = 8,160$, $p = 0,0043$ y $\chi^2 = 15,120$, $p = 0,0001$, respectivamente).

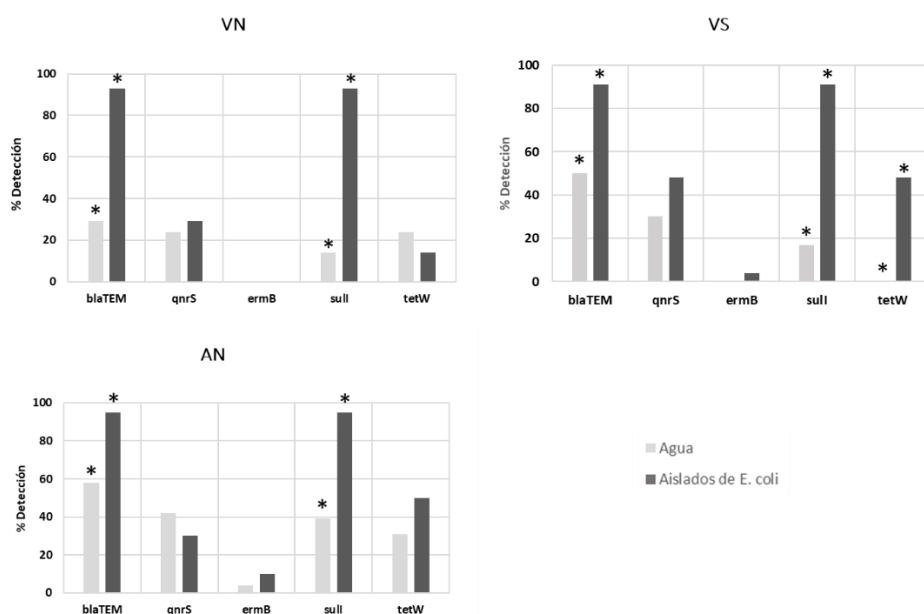


Figura 31. Comparación de la detección de los ARG entre los aislamientos de *E. coli* y las muestras de agua de costa en las diferentes zonas de muestreo *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la aparición de genes en muestras de agua y en aislados de *E. coli*. VN: Valencia Norte; VS: Valencia Sur; AN: Alicante Norte.

2.3.4. Detección de ARG en los aislados de *Enterococcus* spp.

Se determinó la presencia de 4 genes de resistencia en los 30 enterococos procedentes de las distintas muestras de agua de costa (Tabla 58).

Tabla 58. Detección de ARG en aislados de *Enterococcus* spp. procedentes de agua de costa.

Zona de muestreo	Nº de aislados <i>Enterococcus</i> spp.	Nº de aislados positivos (%)			
		<i>bla</i> TEM	<i>qnr</i> S	<i>erm</i> B	<i>tet</i> W
VN	9	3 (33)	0 (0)	1 (11)	0 (0)
VS	12	1 (8)	0 (0)	1 (8)	0 (0)
AN	9	8 (44)	0 (0)	0 (0)	1 (11)
Total	30	12 (40)	0 (0)	2 (7)	1 (3)

VN: Valencia Norte; VS: Valencia Sur; AN: Alicante Norte.

El gen *bla*TEM se detectó en el 40% de los aislados (12 cepas), siendo el más prevalente. El gen *erm*B se detectó solo en dos cepas (7%), una de Valencia Norte y otra de Valencia Sur, y el gen *tet*W solo se detectó en una cepa (3%) procedente de Alicante Norte. El gen *qnr*S no se detectó en ninguna de los aislados. No se encontró ninguna relación estadísticamente significativa entre la zona de muestreo y la aparición de genes en las cepas ($p > 0,05$).

2.3.5. Estudio comparativo entre las resistencias fenotípicas y la presencia de ARG en los aislados de *E. coli* y *Enterococcus* spp. procedentes de aguas de costa

Al igual que en el estudio de las aguas de riego, con la finalidad de relacionar el fenotipo de resistencia de las cepas con la presencia de los genes estudiados, se seleccionó un antibiótico de cada familia, relacionándolo con el ARG determinante de resistencias a dicha familia, y se comparó la frecuencia de detección de resistencia a dicho antibiótico con la frecuencia de detección del ARG correspondiente en todas las cepas de *E. coli* y *Enterococcus* spp. aisladas de las aguas de mar.

De la familia de los betalactámicos se seleccionaron ampicilina, cefotaxima y ceftazidima; de la familia de las tetraciclinas, la tetraciclina; de la familia de las sulfonamidas, el sulfametoxazol; de la familia de las quinolonas, el ciprofloxacino y el ácido nalidíxico; y de la familia de los macrólidos, la azitromicina. La resistencia generada por los mismos en las cepas de *E. coli* se relacionó con la presencia del gen *bla*TEM, el gen *tet*W, el gen *sull*, el gen *qnr*S y el gen *erm*B, respectivamente (Tabla 59).

Tabla 59. Comparación entre la presencia de ARG y las resistencias fenotípicas detectadas en aislados de *E. coli* procedentes de aguas de costa.

Resistencia fenotípica (nº aislados)		Presencia del gen (nº aislados, %)
Betalactámicos		<i>blaTEM</i>
AMP	20	19 (95 %)
FOT	2	2 (100%)
TAZ	5	4 (80%)
Sulfonamidas		<i>sulI</i>
SMX	9	8 (89%)
Tetraciclinas		<i>tetW</i>
TET	8	5 (62%)
Quinolonas		<i>qnrS</i>
CIP	10	4 (40%)
NAL	8	5 (62%)
Macrólidos		<i>ermB</i>
AZI	5	1 (20%)

AMP: ampicilina; FOT: cefotaxima; TAZ: ceftazidima; SMX: sulfametoxazol; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacino; NAL: ácido nalidixico; AZI: azitromicina.

El gen *blaTEM* fue detectado en el 100% en los aislados de *E. coli* que mostraron resistencia a FOT, en el 95% de los aislados resistentes a AMP, y en un 80% de las cepas resistentes a TAZ. El gen *sulI*, fue detectado en 8 de los 9 aislados con resistencia a SMX (89%). Niveles inferiores fueron detectados para los genes *tetW* y *qnrS* en los aislados con resistencias mostradas en el ensayo Sensititre a TET (62%), y CIP (40%) y NAL (62%), respectivamente. En cuanto al gen *ermB*, sólo se detectó en 1 (20%) de los aislados resistentes a AZI.

En el caso de los enterococos, las resistencias a la mayoría de los antibióticos detectados fueron demasiado bajas para obtener resultados estadísticamente significativos. Por ello, para este estudio se seleccionó únicamente la familia de las tetraciclinas, antibiótico frente al que más resistencias fenotípicas se habían observado. Solo en 1 de los 6 los aislados resistentes a este antibiótico se detectó el gen *tetW*.

V. Discusión

Una de las herramientas más importantes para el manejo de las resistencias a los antibióticos es la vigilancia epidemiológica, en la que la información de los patrones locales de resistencia en la población es orientativa para la elección inicial de la terapia correspondiente. Sin embargo, esta vigilancia de las resistencias en humanos debe completarse con una monitorización medioambiental, dentro de un enfoque “One Health”, para poder abordar el problema de forma holística, única estrategia efectiva en un mundo cada vez más globalizado, en el que la dispersión medioambiental de bacterias y genes de resistencias a antibióticos se considera una de las principales amenazas para la salud mundial.

En este trabajo hemos estudiado distintos tipos de agua, a fin de obtener información integrada de la contaminación y los patrones locales de resistencia a antibióticos de bacterias indicadoras, con el objetivo de determinar el potencial de estos sistemas acuáticos como medios de dispersión de determinantes de resistencias a antibióticos en el ambiente

Para ello, hemos acotado geográficamente nuestro estudio al área metropolitana de Valencia y otros puntos de la Comunidad Valenciana. Se han estudiado dos tipos de sistemas acuáticos. Por una parte, aguas destinadas al riego agrícola, tanto de efluentes terciarios de EDAR como superficiales (canales de riego y agua de río). Por otra, aguas costeras y continentales subterráneas. Tanto sus características como el riesgo que suponen para la llegada de determinantes de resistencia a antibióticos al ser humano son diferentes, y hemos considerado que la visión conjunta de ambos tipos de aguas puede aportarnos una valoración general sobre el nivel de presión medioambiental por la presencia de determinantes de resistencias, así como un mayor conocimiento sobre cómo estas resistencias se dispersan o se concentran en sistemas acuáticos concretos, proporcionando con ello una aproximación estimativa del riesgo existente para la población.

En la actualidad, la legislación de la Unión Europea no incluye una regulación específica con respecto a la presencia de ARB y ARG, ni establece sus umbrales de concentración en ningún tipo de agua. Tampoco existe normativa sobre metodologías para la vigilancia y monitorización de las AMR en estas muestras. En Europa, el consenso del grupo COST (Cooperación Europea en Ciencia y Tecnología) y Action DARE (Detección de Resistencias Antimicrobianas en Europa) recomienda el monitoreo integral de todos los posibles elementos relacionados con el desarrollo de AMR, incluidos ARG que son representativos (por ejemplo; *sul*, *bla*, *tet*, *qnr*, *van*, *erm*, etc.) así como *E. coli* y varias bacterias patógenas oportunistas ampliamente diseminadas (Berendonk *et al.*, 2015).

En este trabajo se analizaron, por una parte, los niveles de resistencia a antibióticos en bacterias indicadoras de contaminación fecal presentes en las muestras y, por otra, los ARG presentes en los genomas de cepas aisladas de las mismas. La combinación de ambos métodos se ajusta a las recomendaciones europeas y da como resultado una comprensión más completa del problema de la resistencia a los antibióticos en los ecosistemas acuáticos y agrícolas (McLain *et al.*, 2016).

1. Aguas destinadas al riego agrícola

La utilización de aguas superficiales y de aguas provenientes de las EDAR para el riego ha sido categorizada como un importante factor de riesgo para la dispersión de AMR, tanto en el ambiente en general como en los alimentos vegetales regados con estas aguas, aspecto más directamente implicado en el riesgo para la salud humana, ya que en muchas ocasiones estos alimentos se consumen sin tratamiento térmico posterior (Pachepsky *et al.*, 2011).

En esta parte del trabajo se estudiaron primero aguas procedentes de tres plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (EDAR). La monitorización de las aguas residuales es aconsejada por muchos autores como medio para predecir la aparición de ARB y ARG en la población (Hutinel *et al.*, 2019; Pärnänen *et al.*, 2019; Aarestrup y Woolhouse, 2020; Huijbers *et al.*, 2020; Sims y Kasprzyk-Hordern, 2020; Blaak *et al.*, 2021).

La normativa española basada en el Real Decreto 1620/2007 (R.D. 1620/2007) del 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, establece como patrón microbiológico la presencia de *E. coli* como indicador de contaminación fecal. En este estudio incluimos, además, la población de coliformes totales presentes en las muestras, un buen indicador del riesgo higiénico-sanitario (R.D. 140/2003).

La documentación bibliográfica nos dice que la abundancia de coliformes y coliformes fecales en el afluente de un EDAR está en un rango de 7-9 log₁₀ UFC/100 mL para los primeros y 6-8 log₁₀ UFC/100 mL para los segundos, y los tratamientos clásicos con fango activado reducen las densidades de microorganismos de 1 a 3 órdenes de magnitud, generalmente debido a las actividades de los protozoos, la competencia con el resto de la microflora y la sedimentación de flóculos (George *et al.*, 2002). Otros autores señalan una capacidad de reducción de la carga bacteriana para coliformes fecales, *Enterococcus* spp. y *E. coli* de hasta 3,21 a 2,52 (log₁₀ UFC/100 mL) tras un tratamiento secundario basado en fangos activados/nitrificación-desnitrificación (Teshome *et al.*, 2020). En nuestro caso, los recuentos bacterianos de las muestras tomadas tras el tratamiento secundario en las diferentes EDAR fueron en su mayoría mayores de > 4 log₁₀

UFC/100 mL, lo que indicaría una gran carga microbiana inicial. Este dato es coherente con el hecho de que todas estas estaciones reciben aporte de aguas urbanas densamente habitadas, con una importante actividad sanitaria e industrial.

Cuando valoramos estadísticamente el tratamiento terciario (ST) respecto al tratamiento secundario (SS), observamos una clara reducción de la carga de coliformes y *E. coli* en todas las EDAR, siendo mayor en la EDAR 1. La reducción obtenida en nuestro estudio para las EDAR 1 y 2 (Tabla 12 y 13) coincide con el rango establecido en estudios previos de entre 1 y 3 log₁₀ (Galvin *et al.*, 2010; Blaak *et al.*, 2015; Pallares-Vega *et al.*, 2021; Van Heijnsbergen *et al.*, 2022). Un macroestudio realizado en Inglaterra (Raven *et al.*, 2019) para *E. coli* en 20 plantas de tratamiento, concluye que los tratamientos secundarios tienen una reducción media de 2,18 log₁₀ respecto al afluente, los tratamientos terciarios de 3,13 log₁₀, y los tratamientos terciarios con la aplicación de desinfección ultravioleta de 4,78 log₁₀, valores superiores a los obtenidos en nuestro estudio. Es probable que estas diferencias provengan fundamentalmente de los diferentes métodos de tratamiento de cada EDAR, ya que es difícil encontrar un modelo único y similar al aplicado en las estaciones analizadas en nuestro trabajo.

No existe legislación específica sobre la calidad microbiológica de las aguas a la salida de una EDAR. Sin embargo, y puesto que en los tres casos estas aguas se vierten a cauces que son luego utilizados para el riego, comparamos los resultados obtenidos con la normativa española para reutilización de las aguas depuradas. El límite legal impuesto en nuestro país para *E. coli* es de 2 log₁₀ UFC/100 mL (R.D. 1620/2007), mayor que los recuentos medios obtenidos tanto para la EDAR 1 (media 1,1 log₁₀ UFC/100 mL) como para la EDAR 2 (media 1,9 log₁₀ UFC/100 mL). En el caso de la EDAR 3, tras el tratamiento terciario se encontró una altísima carga bacteriana, superior al límite establecido. Aunque prácticamente todo el procesamiento de las aguas en las tres EDAR es similar, en la EDAR 3 se omite el paso de filtración en arena en el tratamiento terciario, respecto a las otras dos estaciones. Los filtros de arena han demostrado su eficacia en la eliminación de microorganismos y compuestos químicos (Hijnen *et al.*, 2004). Diversos autores informan de reducciones de 1,5 a 3,7 log₁₀ tras filtración en plantas de campo para *E. coli* y enterococos (Guchi, 2015; Maiyo *et al.*, 2023). La inexistencia de este paso en la EDAR 3 podría explicar las discrepancias observadas en este caso. Tras consultar los datos actuales del diagrama de funcionamiento esta EDAR vemos que la filtración en arena ha sido recientemente incluida (Entitat de Sanejament d'Aigües, 2023).

Por otra parte, los niveles de *E. coli* detectados tras el tratamiento terciario eran significativamente más bajos en la EDAR 1 que en las otras dos estaciones depuradoras, lo que parece indicar que esta EDAR posee un tratamiento más efectivo para la eliminación de

microorganismos. Al estudiar los diferentes procesos que tienen lugar, esta planta es la que aplica un mayor número de pasos, lo que podría determinar su mayor eficacia. Sin embargo, hay que considerar también que la EDAR 2 gestiona una carga poblacional seis veces superior a la EDAR 1, lo que supone una influencia antropogénica más elevada, a lo que hay que añadir que es la planta de tratamiento donde confluyen los mayores hospitales del área metropolitana de Valencia. La influencia hospitalaria tanto en la carga bacteriana como en la resistencia antimicrobiana ha sido ampliamente confirmada en diferentes estudios (George *et al.*, 2002), y es avalada por nuestros resultados.

Para valorar la carga global de microorganismos resistentes a antibióticos presentes en los efluentes de las EDAR, decidimos utilizar un método consistente en hacer recuentos en el medio convencional, adicionado con antibióticos utilizados frecuentemente como marcadores generales de la presión antibiótica selectiva en un ecosistema. Estudios previos ya habían sugerido que los recuentos de *E. coli* en medios selectivos con distintos antibióticos son un buen indicador de los niveles generales de resistencia en un ecosistema contaminado (Alexander *et al.*, 2008), por lo que este método se consideró de especial aplicabilidad en nuestro caso, ampliando el estudio a las poblaciones de coliformes fecales.

Como antibióticos-modelo utilizamos la ampicilina, ciprofloxacino, eritromicina, sulfametoxazol y oxitetraciclina. Estos compuestos han sido utilizados desde hace mucho tiempo tanto en la práctica clínica como veterinaria, con el consiguiente desarrollo y perfeccionamiento de mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos (Tadesse *et al.*, 2012). Los niveles de resistencia a los mismos se consideran predictores de las resistencias a muchos otros antibióticos de la misma familia (IDEXX Laboratories, 2019) y han sido previamente utilizados por otros autores (Pei *et al.*, 2006; Proia *et al.*, 2018).

Nos centramos en los resultados obtenidos para el efluente ST, ya que es el que se vierte a las diferentes acequias y es utilizado para el riego.

En todas las muestras se encontraron numerosas colonias, tanto de coliformes como de *E. coli*, capaces de crecer en los medios con todos los antibióticos testados, con porcentajes muy elevados respecto a la muestra control (recuento en medios sin antibióticos). La eritromicina fue el antibiótico menos efectivo, tanto frente a coliformes como a *E. coli*. Este dato era esperable, ya que la acción de la eritromicina para las bacterias gramnegativas se ve minorada por la dificultad del antibiótico de penetrar a través de la pared celular (Martínez y del Pozo, 2002), siendo, por tanto, una resistencia parcialmente intrínseca. Además, otros mecanismos, tales como la producción de fosfotransferasas y estererasas que inactivan el antibiótico, la metilación

del punto diana o las bombas de expulsión son mecanismos que utilizan profusamente las enterobacterias frente a los macrólidos (Kakoullis *et al.*, 2021). Al comparar nuestros resultados encontramos en la bibliografía niveles de resistencia para este antibiótico en muestras de EDAR de hasta el 100% para *E. coli* (Sidrach-Cardona *et al.*, 2014).

Respecto al resto de antibióticos, coincidiendo con otros estudios (Manaia *et al.*, 2012), los medios en los que fueron capaces de crecer más microorganismos fueron aquellos adicionados con ampicilina. En los resultados encontrados en la bibliografía para *E. coli* en muestras de EDAR se establece un rango de resistencia para este antibiótico muy variado, dependiente de la fase y el método de tratamiento. Los porcentajes de resistencia en Europa van desde el 2% al 34% (Reinthal *et al.*, 2003; Galvin *et al.*, 2010; Łuczkiwicz *et al.*, 2010a; Ibekwe *et al.*, 2011; Blaak *et al.*, 2015; Turolla *et al.*, 2018), pero también se han reportado resistencias a este antibiótico de hasta el 81,5% en el efluente de una planta de tratamiento terciario en Portugal (Bessa *et al.*, 2014). En un estudio multicéntrico realizado en Europa en 2020, se encontró que en España la prevalencia de la resistencia a la ampicilina en EDAR fue del 36% (Huijbers *et al.*, 2020).

Los recuentos adicionados con el resto de los antibióticos mostraron que el ciprofloxacino y la oxitetraciclina eran, en general, los antibióticos más efectivos frente a estas bacterias, aunque los medios adicionados con oxitetraciclina presentaron elevadas tasas de crecimiento de coliformes en la EDAR 2 y de *E. coli* en los efluentes de las EDAR 1 y 2.

Al revisar la bibliografía, y siempre teniendo en cuenta las dificultades en las comparaciones debido a que los tratamientos/procesos que sigue cada EDAR son diferentes, no solo en cada país, sino dentro de una misma localización geográfica, observamos resultados dispares. Se ha podido observar en varios estudios que la resistencia encontrada en Europa en cepas ambientales de *E. coli* frente a sulfametoxazol oscila entre el 5% y el 24%, frente a la tetraciclina oscila entre el 3% y el 60% y frente al ciprofloxacino se sitúa entre el 2% y el 42% (Łuczkiwicz *et al.*, 2013; Blaak *et al.*, 2014; Sidrach-Cardona *et al.*, 2014; Kotlarska *et al.*, 2015; Flach *et al.*, 2018; Schwermer *et al.*, 2018; Pantanella *et al.*, 2020; Kraupner *et al.*, 2021), lo que estaría en consonancia con nuestro estudio.

Los porcentajes de reducción de los recuentos a la salida de las EDAR (efluente terciario) respecto a los niveles detectados en el efluente secundario fueron similares a los observados en el medio control para todos los antibióticos probados, e incluso menores en algunos casos. Se observó que las EDAR 2 y 3 liberaban al medio ambiente mayor cantidad de *E. coli* capaces de soportar concentraciones de antibióticos que deberían ser inhibitorias que la EDAR 1: En la EDAR

2, casi el 50% de la población resistente a ampicilina no era eliminada durante el tratamiento, mientras que la EDAR 3 liberaba mayor población de microorganismos capaces de crecer en presencia de ciprofloxacino (con reducciones menores del 50% respecto a los niveles detectados en el efluente secundario) y oxitetraciclina (menos del 40% de reducción) que las otras EDAR. Los factores que podrían intervenir en estas elevadas tasas de microorganismos presuntamente resistentes capaces de “escapar” al tratamiento terciario son diversos. Al afluente de las EDAR llegan microorganismos con resistencias previas, debido a la amplia utilización de antibióticos en el ambiente hospitalario y extrahospitalario. Otro factor importante es la gran carga de residuos de antibióticos y otros productos químicos presentes en el agua de las EDAR, lo que ejerce una gran presión selectiva que influye de forma determinante en la selección de cepas resistentes (Rizzo *et al.*, 2013). En cualquier caso, nuestro trabajo confirma que el tratamiento terciario habitual disminuye la carga total de microorganismos en el agua depurada, pero no es eficaz para disminuir los porcentajes de bacterias resistentes, respecto a la población total, que son liberadas al medio ambiente.

Una de las valoraciones que realizamos en nuestro estudio fue la influencia de la estacionalidad (primavera y otoño) en los recuentos. Al comparar los datos, se observó una aparente mayor abundancia de coliformes totales en las muestras tomadas en otoño, estadísticamente significativa en las EDAR 1 y 2 para algunos antibióticos. En el caso de *E. coli* se observaron también recuentos significativamente mayores en otoño para algunos antibióticos. Sin embargo, estos resultados no fueron consistentes en todas las EDAR ni para todos los antibióticos. Tenemos que tener presente que, aunque la estacionalidad ha sido muy documentada tanto para comunidades bacterianas concretas como para el resistoma global de las aguas (Crump *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2011; Pajdak-Stós y Fiałkowska, 2012; Su *et al.*, 2017), fundamentalmente se basa en las variaciones de temperatura, que en nuestro caso son muy similares en primavera y otoño, por lo que podemos pensar que sea la pluviosidad en nuestra área geográfica, mayor en otoño que en primavera, mediante la conducción de escorrentía hacia las EDAR, la causa de las diferencias significativas que se han observado.

Otro objetivo que nos hemos planteado en este trabajo siguiendo las recomendaciones de vigilancia ya reseñadas previamente, es la evaluación de los patrones de resistencia a los antibióticos de las bacterias presentes en las distintas EDAR, para determinar los niveles globales, los antibióticos de especial relevancia frente a los que puedan detectarse resistencias y, si fuera posible, trazar el origen de estas resistencias. Esta evaluación se puede llevar a cabo bien por métodos basados en cultivos o bien por métodos moleculares (Rizzo *et al.*, 2013). En nuestro estudio hemos empleado ambos.

Con la finalidad de investigar los perfiles de resistencia y multiresistencia se seleccionó un número de cepas de *E. coli* similar para cada EDAR y efluente, y se estudió la CMI de cada una de las cepas frente a una batería de 14 antibióticos. La resistencia individual a ampicilina (70% a 86%, dependiendo de la EDAR) seguida de la tetraciclina (67% a 75%), sulfometoxazol (59% a 68%), ciprofloxacino (50% a 75%) y trimetoprim (56% a 70%) fueron las más frecuentes. Esto está en consonancia con otros estudios similares (Bessa *et al.*, 2014; Pormohammad *et al.*, 2019) y también con estudios de evolución de resistencia de *E. coli* para humanos y animales, que describen un incremento sustancial y significativo de las resistencias a la ampicilina, sulfonamida y tetraciclina con el tiempo (Tadesse *et al.*, 2012). Es de destacar que la resistencia de la ampicilina y, en general, a las aminopenicilinas, sigue siendo muy prevalente en los países del Sur de Europa y sobre todo en España (Huijbers *et al.*, 2020), donde su prescripción es elevada.

Por otra parte, uno de cada tres aislados presentaron resistencia al cloranfenicol, antibiótico de baja prescripción por su toxicidad, resultado que coincide con estudios previos (Bischoff *et al.*, 2005; Tadesse *et al.*, 2012).

Como resultados de especial relevancia por su posible impacto en la salud humana, ya que son antibióticos muy utilizados para tratar infecciones severas (Mosquito *et al.*, 2011), cabe destacar que, aunque con menor tasa de resistencia, las cefalosporinas de tercera generación como la ceftazidima (tasas de resistencia entre el 15% a 18%) y la cefotaxima (tasas de resistencia entre 13% a 20%) presentaron niveles de resistencia importantes.

También hay que señalar la presencia de bacterias resistentes al meropenem (0% a 11% dependiendo de la EDAR), por la importancia de los carbapenémicos como fármacos de última línea en infecciones por bacterias multiresistentes (Machado *et al.*, 2023). Nuestros resultados fueron, sin embargo, inferiores respecto a otros estudios, en los que se han observado niveles de resistencia de hasta el 25% (Machado *et al.*, 2023), lo que produce algo de tranquilidad sobre sus posibilidades de uso como antibiótico alternativo.

Hay que destacar, así mismo, el hallazgo de seis cepas de *E. coli* resistentes a la colistina, debido a que este antibiótico está asociado al tratamiento, como opción de última línea terapéutica, de infecciones graves por bacterias gramnegativas (Liu *et al.*, 2016; Klein *et al.*, 2018). Es especialmente alarmante el hecho de que todas las cepas en las que se detectó presentaban multiresistencia, con el consiguiente peligro adicional para la Salud Pública.

Cuando se buscó la relación entre el número de aislados resistentes a un determinado antibiótico y su EDAR de origen, únicamente se encontraron mayores tasas para el ácido nalidíxico, ciprofloxacino y tigeciclina entre las cepas procedentes de la EDAR 2. Aunque, como

ya se ha comentado, esta estación recibe aguas de la mayoría de los hospitales de Valencia, estas familias de antibióticos también son de uso habitual entre la población, por lo que consideramos que no puede establecerse ninguna relación causal entre el tipo de aguas que tratan las diferentes EDAR urbanas y las resistencias a antibióticos que dispersan a los cauces de vertido.

En este trabajo se han detectado en los efluentes de las tres EDAR un porcentaje de cepas de *E. coli* multirresistentes (considerándose como tal la resistencia a tres o más familias de antibióticos distintas) muy elevado, y similar para todas ellas, de aproximadamente un 70% de los aislados analizados. Estos resultados coinciden con otros estudios (Bessa *et al.*, 2014). Los perfiles de multirresistencia de las cepas eran muy diversos, pero mayoritariamente se encontraron resistencias a betalactámicos (86% a 93% dependiendo de la EDAR), sulfonamidas (entre el 87% y 100%) y tetraciclinas, asociadas con resistencias a una o varias de las familias, quinolonas, aminoglucósidos y anfenicoles en cualquier combinación, coincidiendo con los resultados de otros autores (Reinthal *et al.*, 2003; Ferreira da Silva *et al.*, 2007; Laroche *et al.*, 2009; Łuczkiwicz *et al.*, 2010a; Ibekwe *et al.*, 2011; Flores Ribeiro *et al.*, 2012). Es de destacar que 3 aislados en la EDAR 2 presentaron multirresistencia a todas las familias de antibióticos ensayados, resultado muy preocupante por el riesgo que pueda suponer la dispersión de una población clonal en el ambiente.

Otro de los objetivos de este trabajo era evaluar la eficacia del tratamiento terciario de las EDAR para eliminar microorganismos resistentes y/o multirresistentes a antibióticos, disminuyendo así la carga que es vertida al ambiente. Para ello se compararon los niveles de resistencia obtenidos a la entrada (SS) y a la salida del efluente terciario (ST). Aunque, como se ha comentado previamente, el tratamiento terciario disminuyó la carga total de microorganismos en 1-3 \log_{10} UFC, no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de reducción obtenidos para la población control y para las bacterias crecidas en presencia de antibióticos en ninguna de las EDAR. Tampoco disminuyó de forma significativa el número de aislados de *E. coli* resistentes a ningún antibiótico. De hecho, tanto los aislados de *E. coli* resistentes a colistina como a ampicilina aumentaron de forma significativa en el efluente terciario. También las cepas resistentes a meropenem, ácido nalidíxico, cloranfenicol, tigeciclina y gentamicina aumentaron ligeramente, aunque en proporciones no significativas. Además, se observó un marcado aumento del porcentaje de cepas resistentes en el efluente ST respecto de SS para ampicilina en una de las EDAR. Tampoco se observó ninguna reducción estadísticamente significativa en el porcentaje de cepas multirresistentes tras el tratamiento terciario respecto a las presentes en el efluente secundario.

Esto evidencia que el tratamiento es efectivo para la disminución de la población bacteriana, pero no así para la eliminación de cepas resistentes ni, como veremos más tarde, de ARG (LaPara *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2015; Cacace *et al.*, 2019; Hiller *et al.*, 2019; Divyashree *et al.*, 2020; Nappier *et al.*, 2020), incluso empleándose un tratamiento terciario que incluye la radiación ultravioleta.

Por otra parte, hay que considerar que en las EDAR existe un alto movimiento de transferencia horizontal de genes, lo que significa que la tasa de ARB, no solo puede que no disminuya (Silva *et al.*, 2006; Korzeniewska *et al.*, 2013; Amador *et al.*, 2015; Blaak *et al.*, 2015), sino que la EDAR puedan actuar como “reactor biológico” para el desarrollo de nuevas resistencias. Existe un consenso mundial en que las aguas municipales sin tratar, los lodos de las aguas residuales y los efluentes de las aguas residuales tratadas son reservorios genéticos que favorecen el intercambio genético, actuando como puntos críticos para que las resistencias evolucionen y se propaguen (Cacace *et al.*, 2019). De hecho, diversos estudios han reportado mayor proporción de resistencias para las enterobacterias y *E. coli* en el efluente de las EDAR que en el afluente (Łuczkiwicz *et al.*, 2010a; Rizzo *et al.*, 2013; Biswal *et al.*, 2014; Al-Jassim *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2018). Nuestros resultados coinciden con estas observaciones, avalando que las EDAR deban ser un punto de control y vigilancia de la presencia de determinantes de resistencia a los antibióticos, previamente a su vertido a otros cauces de agua o a su reutilización.

Como un segundo objetivo para la monitorización de estas resistencias hemos estudiado la presencia de ARG en los efluentes de las EDAR. Los ARG se consideran contaminantes emergentes debido a su ubicuidad y persistencia (Guo y Kong, 2019). Diversos autores sugieren que la abundancia relativa de ARG se incrementa en los efluentes (Korzeniewska *et al.*, 2013; Pazda *et al.*, 2019, Sabri *et al.*, 2020), finalizando en aguas superficiales y subterráneas. El principal motivo sería la presión selectiva que ejercen la alta concentración de antibióticos y residuos de estos en las comunidades de altas concentraciones bacterianas de las EDAR, formando biofilms donde los ARG pueden multiplicarse y transferirse entre las bacterias (Petrovich *et al.*, 2018; Huijbers *et al.*, 2019; Ngigi *et al.*, 2020; Osińska *et al.*, 2020).

Los genes probados en nuestro trabajo confieren resistencia a las sulfonamidas (*sull*), a las quinolonas (*qnrS*), a los antibióticos macrólidos-lincosamida-estreptogramina B (MLS_B) como la eritromicina, la azitromicina y la claritromicina (*ermB*), a las tetraciclinas (*tetW*) y a los betalactámicos tipo A como la ampicilina (*bla*TEM) (Pärnänen *et al.*, 2019).

La elección de los ARG seleccionados se basó en varios factores: Por una parte, su capacidad para conferir resistencia a diferentes tipos de antibióticos con varios modos de acción, representando diferencias fenotípicas significativas en los principales huéspedes bacterianos de las aguas residuales. Además, estas familias de antibióticos se encuentran entre las más antiguas y utilizadas en medicina humana y animal (Kools *et al.*, 2008; Hammerum y Heuer, 2009), debido a su amplio espectro de actividad y bajo coste (Harnisz *et al.*, 2011; ECDC, 2015). Por otro lado, estos cinco genes son considerados buenos indicadores de la presencia global de AMR en el ambiente: Mientras que los genes *sulI* y *ermB* se vinculan principalmente con taxones medioambientales, *tetW* y *blaTEM* se relacionan con taxones asociados a humanos (Yin *et al.*, 2019). El gen *blaTEM* es el principal responsable de los altos porcentajes de resistencia frente a la ampicilina en *E. coli*, considerándose un precursor de las betalactamasas de espectro extendido (Emery y Weymouth, 1997). La detección del gen *tetW* se justifica por su papel como mediador en la resistencia contra la tetraciclina, el segundo antibiótico más común en el mundo y utilizado como aditivo alimentario en alimentación animal en algunos países (Gu y Karthikeyan, 2008). En el caso del gen *ermB*, hay que tener en cuenta que la eritromicina es un antibiótico macrólido que es utilizado como sustituto de la penicilina en pacientes con resistencia a esta o con infecciones resistentes a betalactámicos (Jelić y Antolović, 2016). De hecho, en la Comunidad Valenciana los macrólidos fue la segunda familia de antibióticos más consumida en 2021 (13%) (PRAN, 2023). La búsqueda de genes de resistencia frente a las sulfonamidas (*sulI*), pese a ser un antibiótico que en humanos se utilizan cada vez menos, (10% del consumo total de antibióticos en humanos en 2016, según De Greeff y NethMap, 2018) se justifica por el uso histórico prolongado de este antibiótico tanto en humanos como en ganadería, su asociación con elementos genéticos móviles (Davies y Davies, 2010; Baran *et al.*, 2011) y la presencia de residuos de esta familia de antibiótico en aguas residuales que podrían ejercer una presión co-selectiva (Schmitt *et al.*, 2017). En cuanto al gen *qnrS*, su selección estaría justificada porque las quinolonas se usan ampliamente a nivel mundial en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades, incluidas infecciones del tracto urinario, respiratorias y gastrointestinales, y debido a su amplio uso, la tasa de resistencia a las mismas ha aumentado desde la década de 1990 (Aldred *et al.*, 2014). El gen *qnrS* tiene una gran prevalencia en distintos ecosistemas naturales (Marti *et al.*, 2016; Castrignanò *et al.*, 2018), a la vez que confiere una sensibilidad reducida a las fluoroquinolonas (Marti *et al.*, 2014; Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2015).

La presencia de los ARG seleccionados ha sido, además, reportada en estudios previos realizados en muestras de aguas residuales. Por ejemplo, en Italia y en China fueron encontrados en efluentes de EDAR múltiples ARG como *sul*, *qnr*, *erm* y *tet* (Lee *et al.*, 2017). Estudios en Europa

encontraron *sull*, *ermB*, *tetW*, *blaTEM* frecuentemente tanto en afluentes como en efluentes de EDAR (Pärnänen *et al.*, 2019; Pazda *et al.*, 2019). En un estudio realizado en España fueron encontrados en efluentes todos los genes estudiados en nuestro trabajo (*blaTEM*; *sull*; *qnrS*; *ermB*; *tetW*) (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2015). En otro estudio realizado en Alemania en siete EDAR se encontró que el gen más abundante fue el *ermB* seguido de los genes *tetM* y *blaTEM* (Hembach *et al.*, 2017).

El estudio de la presencia de todos estos genes directamente en el agua de las EDAR mostró una amplísima frecuencia de detección, siendo el gen *blaTEM* el más prevalente (92% a 100% según la EDAR) y el *ermB* el de menor frecuencia (50% a 75%). Al haber empleado PCR cualitativa a partir de la extracción de DNA total de la muestra de agua, no podemos diferenciar si el origen de estos ARG proviene de células bacterianas (iARG) o de ARG extracelular (eARG), siendo una de las limitaciones de esta tecnología.

Numerosos trabajos han sugerido que los efluentes de las EDAR pueden ser una fuente de ARG y elementos móviles, transportando esa resistencia al medio ambiente, independientemente de los procesos de tratamientos de las EDAR (Freeman *et al.*, 2018; Karkman *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018). En nuestro estudio hemos confirmado esta hipótesis, constatando la presencia mayoritaria de todos los genes de resistencia estudiados y comprobando que, tras los tratamientos secundario y terciario con desinfección, seguimos encontrando no solo ARB, sino ARG que van a ser descargados posteriormente a otros medios acuáticos u otros ecosistemas terrestres, en caso de que sean utilizadas para riego.

Los análisis estadísticos que hemos realizado no establecen una clara relación de dependencia de los diferentes genes, ni con la EDAR, ni con el tipo de efluente o la estacionalidad. Es improbable que factores medioambientales como el clima o la latitud sean factores influyentes de forma determinante en la presencia de distintos ARG, ya que la abundancia de estos no exhibe un patrón biogeográfico (Zhu *et al.*, 2017; Cacace *et al.*, 2019), aunque un estudio reciente (Yue *et al.*, 2022) establece que la temperatura puede afectar indirectamente a la transferencia horizontal de genes, sugiriendo que un descenso de la temperatura implica un incremento en los ARG (Schages *et al.*, 2020). En nuestro caso, las diferencias de temperatura entre otoño y primavera en Valencia no parecen ser suficientes para que este parámetro les afecte.

La presencia de los genes de resistencia en los efluentes confirma la eliminación insuficiente de estos durante los tratamientos convencionales de las aguas residuales (Gwenzi *et al.*, 2020). La efectividad en el tratamiento en las EDAR depende de su diseño, de su tamaño, de

la concentración de ARB y ARG antes del tratamiento, del tipo y condiciones operacionales del proceso biológico, y de la existencia de un tratamiento terciario avanzado (Krzeminski *et al.*, 2019), siendo este último especialmente importante. El paso de desinfección se lleva a cabo en nuestras EDAR por radiación ultravioleta, a dosis de 100 mJ/cm² según las recomendaciones del National Water Research institute (National Water Research institute, 2012). Diferentes estudios nos dicen que este tipo de tratamiento tiene una eficiencia muy baja para la eliminación de los ARG (Wen *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020a), necesitándose una dosis para su eliminación de 200 mJ/cm² (McKinney y Pruden, 2012), muy superior a la empleada en las EDAR estudiadas.

Respecto a la eficacia del tratamiento para la eliminación de estos ARG, un estudio de nuestro país encontró que la concentración de genes de *ermB* y *tetW* disminuyeron como resultado del tratamiento de depuración, mientras que las concentraciones relativas de *bla*TEM, *qnrS* y *sull* fueron más elevadas en las muestras de efluentes que en los afluentes (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2015). En nuestro estudio no hemos realizado cuantificación mediante qPCR, aunque sería importante llevar a cabo nuevos estudios con estas metodologías, para poder valorar la abundancia relativa de estos genes en el efluente y la eficacia de la EDAR para su eliminación antes de llegar al medio ambiente.

Una vez verificada la presencia de los cinco ARG en muestras de agua de las EDAR, hemos estudiado la presencia de estos ARG en las cepas aisladas de *E. coli*, con el fin de establecer su posible relación con los patrones fenotípicos de resistencia encontrados en las mismas. *E. coli* ha demostrado ser un importante reservorio de genes de resistencia a los antibióticos, que pueden transferirse a bacterias patógenas, contribuyendo así a propagar las resistencias (Katakweba *et al.*, 2018; Odonkor y Addo, 2018). Por lo tanto, la búsqueda y detección de cepas de *E. coli* resistentes constituye una buena predicción de la presencia de bacterias resistentes clínicamente relevantes y los genes asociados a estas (Gekenidis *et al.*, 2018).

La alta prevalencia del gen *bla*TEM en los aislados de *E. coli* de las muestras de EDAR ha sido confirmada en otros estudios donde se detectan porcentajes en efluentes del 73% (Osińska *et al.*, 2016) y en un estudio realizado en Brasil con enterobacterias resistentes a múltiples antibióticos provenientes de EDAR, empleando un tratamiento similar al de nuestro estudio, se encontró una prevalencia similar en el gen *bla*TEM y superior en el gen *sull*, con porcentajes para cada una de ellas alrededor del 80%, mientras que para *ermB* y *qnrS* el porcentaje descendió alrededor del 35% (Machado *et al.*, 2023).

Cuando estudiamos la presencia/ausencia de estos genes teniendo como objetivo la frecuencia y distribución de los determinantes de resistencia fenotípicos de resistencia/sensibilidad, comprobamos que existía una relación estadísticamente significativa entre la resistencia al antibiótico y la presencia de varios de los genes correspondientes, como *bla*TEM y *sull*. La presencia del gen *bla*TEM se corresponde con los valores de resistencia en las CMI a la ampicilina (97%), como ya ha sido demostrado en otros estudios (Wang *et al.*, 2020b). Un 57% de las cepas resistentes al sulfometoxazol poseían el gen *sull*, concordando con los resultados citados en la bibliografía, donde este gen se encuentra generalmente asociado con elementos móviles y es el mecanismo de resistencia prioritario para este antibiótico. Entendemos que las otras cepas de nuestro estudio resistentes a sulfametoxazol que no poseen este gen podrían contener otros genes, como *sull* o *drfA*, que están implicados también en la resistencia, y que van generalmente asociados a integrones del tipo 1 y 2 (Chopra y Roberts, 2001; Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

El gen *tetW* estaba presente en un porcentaje del 30% de las cepas resistentes de *E. coli*, sin embargo, las CMI para la tetraciclina de todos los *E. coli* procedentes de las diferentes EDAR dieron niveles de resistencia del 70%. Posiblemente otros genes, como *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetJ*, *tetL* y *tetY* son los responsables de esta diferencia (Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

El gen de resistencia *qnrS* se encontraba presente en un rango del 28% al 32% de todas las cepas de *E. coli* resistentes en los diferentes EDAR, pero cuando se relacionó con las CMI encontradas para las dos quinolonas de nuestro estudio, solo el 29% de las cepas resistentes al ciprofloxacino y el 34% de las resistentes al ácido nalidixico presentaban el gen *qnrS*, hallazgo esperable, ya que hay muchos otros mecanismos de resistencia (Ruiz, 2003), siendo muy frecuente, en el caso del ciprofloxacino, la mutación puntual en el codón 83 y 87 a nivel del gen de la *gyrA* (Cattoir y Nordmann, 2009).

Respecto al gen de resistencia *ermB*, encontramos que solo un 16% de las cepas resistentes a la azitromicina eran portadoras del gen. Como ya hemos comentado anteriormente, *E. coli* es parcialmente resistente a los macrólidos de forma intrínseca, debido a la impermeabilidad de la membrana externa, aunque puede adquirir genes de resistencia a los macrólidos por transferencia horizontal de genes (Vaara, 1993; Gomes *et al.*, 2017). Se piensa que el motivo que lleva a *E. coli* a adquirir estos determinantes de resistencia a pesar de la resistencia intrínseca podría ser consecuencia de la exposición a altas concentraciones de estos antibióticos, ya que los macrólidos se absorben mal y tienden a acumularse en el tracto gastrointestinal, confiriendo a las bacterias que adquieren el gen *ermB* un grado de resistencia a los macrólidos mucho mayor (Ma *et al.*, 2022). Así, aunque para estas cepas de *E. coli*, la

adquisición de estos genes pueda no suponer un gran beneficio ecológico, su presencia en ellas sí que supone un alto riesgo para la transferencia a otros microorganismos presentes en las muestras que previamente fueran sensibles a los macrólidos.

Otra parte de nuestro estudio fueron las aguas de riego, como fuente de dispersión de determinantes de resistencia a antibióticos. Para ello se evaluó también la presencia de ARB y ARG en una red de acequias de la Huerta Valenciana (Valencia, España).

La propagación de genes de resistencia a los antibióticos se ha estudiado ampliamente en las aguas residuales destinadas al riego de suelos agrícolas, pero menos en los canales de riego superficiales. La red de acequias de la Huerta Valenciana es un sistema ideal para investigar la presencia de ARB y ARG, ya que existe una fuerte interacción con el ecosistema humano y sus actividades (domésticas, agrícolas e industriales), por lo que este tipo de aguas superficiales podrían ser una vía importante por la que se difunden las ARB y los ARG.

Nuestro primer paso fue evaluar la calidad microbiológica de estas aguas, mediante la determinación de los niveles de *E. coli* presentes en las mismas. El límite de este microorganismo para aguas superficiales de riego aconsejado por la Directiva Española (R.D. 1620/2007) es de 100 *E. coli* por 100 mL de agua, para aguas que entren en contacto con productos comestibles que no vayan a ser cocinados antes de su consumo, y algún autor ha establecido que valores de *E. coli* superiores a 2,35 log₁₀ UFC/100 mL fueron predictivos de la presencia de patógenos en alimentos cultivables (Truchado *et al.*, 2018). En este estudio, el límite aconsejado por la Directiva Española ha sido superado ampliamente en todas las muestras analizadas. Por lo tanto, sería necesario establecer una mayor vigilancia de la calidad de estas aguas mediante la aplicación de programas de muestreo (Uyttendaele *et al.*, 2015), así como el desarrollo de técnicas efectivas de saneamiento.

Las muestras provenientes de la acequia de Vera, la acequia de Rascanya y el barranco de Carraixet, fueron los sitios con los recuentos de *E. coli* significativamente más altos. Aunque las tres acequias estudiadas tienen un origen geográfico común, que es el río Turia, los recorridos son diferentes. Las acequias de Vera y de Rascanya son acequias de riego con largos recorridos, de más de nueve kilómetros, cuyas aguas han atravesado la ciudad de Valencia y los campos de los alrededores, llevando consigo bacterias procedentes de las zonas urbanas, aguas residuales y suelos fertilizados con estiércol. Además, también pueden estar contaminadas por materia fecal humana o animal, presente en las inmediaciones de los canales de riego. En el caso del barranco de Carraixet, este pasa por doce municipios con un alto componente agrícola y elevada

densidad de población, recibiendo además los efluentes de dos EDAR, lo que explicaría los elevados recuentos de *E. coli* obtenidos.

En el estudio estadístico también se pudo observar que el momento de muestreo en algunos lugares tuvo un efecto significativo, observándose que los mayores recuentos de *E. coli* correspondieron a la segunda temporada del muestreo. Probablemente se deba a fuertes lluvias en los días previos a estos muestreos, las cuales habrían movido componentes de los suelos agrícolas, así como removido los microorganismos que se encuentran en los sedimentos de las acequias de riego. Varios estudios sostienen que los sedimentos pueden actuar como reservorio de bacterias (Alm *et al.*, 2003; De Oliveira y Pinhata, 2008; Sidrach-Cardona *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016) proporcionando nutrientes y protección contra la luz o la depredación. Diversos autores ya establecieron que la calidad microbiológica del agua de irrigación está afectada por las condiciones climáticas (precipitaciones), la localización geográfica (presencia de animales domésticos o salvajes) y la estacionalidad (temperatura del agua) (Allende y Monaghan, 2015) y en el caso concreto de *E. coli*, de la fuente de agua de irrigación, el clima y la metodología empleada para su cuantificación (Truchado *et al.*, 2018).

En los recuentos realizados en placas de cultivo adicionadas con antibiótico, se detectó un alto porcentaje de cepas resistentes a la eritromicina, el sulfametoxazol y la ampicilina. Los niveles de contaminación en *E. coli* resistentes a antibióticos estuvieron en el mismo orden que los obtenidos en estudios previos de canales de riego (Czekalski *et al.*, 2012; Bessa *et al.*, 2014; Brooks *et al.*, 2014; Udikovic-Kolic *et al.*, 2014; Blaak *et al.*, 2015; Truchado *et al.*, 2018), donde la mayor concentración de ARB se encontró en aguas superficiales o subterráneas que han sido objeto de contaminación por aguas residuales, estiércol animal y actividad agrícola.

Las tasas de resistencia a la eritromicina y las aminopenicilinas fue similar a la encontrada en las EDAR, y esperable, tal como se ha comentado previamente. En el caso del sulfametoxazol, cuya prevalencia fue más elevada que la encontrada en las EDAR, podría proceder fundamentalmente de la escorrentía de los campos que atraviesan las acequias, río o barranco. Se ha demostrado que la irrigación agrícola de los campos con agua fresca o con aguas tratadas potencian la presencia del gen *sull*. Teniendo en cuenta la alta movilidad de este gen junto con el *int1* (Gillings *et al.*, 2015; Gillings, 2017), se cree que la continua irrigación lleva al enriquecimiento de este gen en el suelo y el subsuelo poroso (Kampouris *et al.*, 2021). La presencia de agentes selectivos, como el sulfametoxazol, promocionaría la selección de este ARG y/o promocionaría su transferencia horizontal. El sulfometoxazol se usa ampliamente y tiene una tasa de atenuación natural muy baja (Li *et al.*, 2019) encontrándose en grandes concentraciones en las EDAR (Nikolaou *et al.*, 2007; Barnes *et al.*, 2008; Avisar *et al.*, 2009; Michael *et al.*, 2013),

persiste en el medio ambiente subterráneo (Barnes *et al.*, 2008; Avisar *et al.*, 2009) y tiene una alta prevalencia en el medio ambiente acuático (Watkinson *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2012). Se ha demostrado, además, que el incremento de prevalencia del *sull* en su camino hacia los acuíferos depende de la concentración de sulfametoxazol en el agua (Lüneberg *et al.*, 2018).

Es de destacar que en las muestras de estas acequias se encontraron niveles de resistencias a sulfametoxazol, ciprofloxacino, azitromicina y cefotaxima significativamente mayores que en el resto de los tipos de aguas, incluidos los efluentes de EDAR, un dato muy poco tranquilizador, ya que estas aguas están en contacto directo con todos los ambientes (agrícola, baño, pesca, etc.) a través de los cuales estas resistencias pueden llegar al ser humano.

Los perfiles de resistencia de las cepas de *E. coli* confirmaron los resultados obtenidos en las placas de cultivo con este antibiótico, ya que el sulfametoxazol fue el antibiótico frente al que se encontró un mayor número de cepas resistentes en este tipo de aguas (97%). La misma correspondencia se observó para el resto de los antibióticos ensayados, siendo las resistencias a la ampicilina, tetraciclina y ciprofloxacino, también muy frecuentes. Las resistencias al sulfametoxazol, ampicilina y tetraciclina son, en varios estudios, las más prevalentes en el caso de aguas superficiales de riego que provienen de ríos y lagos (Laroche *et al.*, 2009; Ibekwe *et al.*, 2011; Ham *et al.*, 2012; Koczura *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2012; Rizzo *et al.*, 2013; Blaak *et al.*, 2015; Rosas *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015b; Guruge *et al.*, 2021). En un trabajo de revisión bibliográfica y metaanálisis sobre la prevalencia de resistencias de *E. coli* en muestras ambientales, también se demostró una alta resistencia para estos tres antibióticos, no así para el ciprofloxacino (Pormohammad *et al.*, 2019). La resistencia a los aminoglucósidos encontrada en este trabajo fue baja, lo que coincide con estudios anteriores (Hara *et al.*, 2018).

Respecto a la multirresistencia, se detectaron un total de 15 perfiles distintos, apareciendo en todos ellos resistencia a los betalactámicos. En un trabajo similar de Wang *et al.* (2013) se observaron 31 perfiles diferentes de multirresistencia en 114 aislados de *E. coli*. Otros estudios realizados en ríos (Ram *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008; Ibekwe *et al.*, 2011), han mostrado una amplia variedad de perfiles de multirresistencia, que suele ser atribuido a los diferentes orígenes de los aislamientos (Osińska *et al.*, 2017).

En nuestro caso, el Barranco de Carraixet mostró la mayor tasa de multirresistencia (88% de sus aislados de *E. coli*), presentando cuatro fenotipos diferentes. Además, tres aislados de *E. coli* fueron resistentes a 9 de los 14 antibióticos probados. En este barranco acaban los efluentes de dos EDAR, que, como se ha visto previamente (Silva *et al.*, 2006; Korzeniewska *et al.*, 2013; Amador *et al.*, 2015; Blaak *et al.*, 2015) y se ha confirmado en este estudio, aunque reducen la

concentración de bacterias, no lo hacen con la proporción de ARB. Este es un resultado relevante, ya que el barranco de Carraixet desemboca en el mar y se ha sugerido que las aguas costeras pueden actuar como un nuevo reservorio de determinantes de la resistencia antimicrobiana, contribuyendo a su diseminación ambiental (Bennani *et al.*, 2012).

Las muestras de la acequia de Vera mostraron una tasa de multirresistencias del 64% entre sus aislados de *E. coli*. Esta alta tasa se asocia principalmente a las actividades agrícolas de los lugares por los que atraviesa. También hay que considerar que, en el punto de muestreo seleccionado, el agua ha realizado un recorrido más largo por el subsuelo de la ciudad de Valencia, lo que plantea la posibilidad de contacto con fuentes de contaminación antropogénicas.

En las muestras del río Turia se observó un alto porcentaje de multirresistencias (80%), dato esperable, puesto que estas aguas fueron recolectadas en una zona poco profunda y en un área muy poblada, lo que facilita el contacto con humanos y animales. Se sabe que las actividades antropogénicas promueven el enriquecimiento y la propagación de los determinantes de resistencia a antibióticos (Jia *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019b), que en nuestro caso están relacionados con los antibióticos más prescritos en nuestro país.

Al analizar los ARG presentes, se observó que los genes *bla*TEM y *tet*W estaban presentes en prácticamente todas las muestras de agua, mientras que el resto de genes, *sull*, *qnr*S y *erm*B también presentaron un alto porcentaje de prevalencia. Estudios previos han demostrado que los genes *bla*TEM y *sull* están muy extendidos entre las bacterias ambientales (Marti y Balcazar, 2013). Por otra parte, la abundancia del gen *tet*W está estrechamente relacionada con las prácticas agrícolas (Patterson *et al.*, 2007). Cuando comparamos los datos obtenidos en este trabajo con la bibliografía disponible, vemos diferencias en los ARG más prevalentes, pero todos tienen un denominador común, y este es la elevada presencia global de estos ARG. Un estudio llevado a cabo en Brasil para los genes *bla*TEM, *erm*B, *qnr*S y *sull* encontró, como en nuestro estudio, la presencia de estos ARG en todas las muestras tomadas en distintos puntos de un río a su paso por una ciudad (Arsand *et al.*, 2020). Otro estudio, realizado en Alemania y Australia, detectó el gen *sull* en todas las muestras estudiadas, mientras que otros ARG se encontraron en un alto porcentaje (Stoll *et al.*, 2012). La presencia del gen *sull*, a mayor concentración que cualquiera de los otros ARG, ha sido publicada en otros estudios (Dungan *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2020) y resultados similares a los nuestros se encontraron en un estudio realizado en dos importantes ríos de Italia (Pantanella *et al.*, 2020).

Otro punto importante en esta investigación era comprobar la carga genómica de estos ARG en *E. coli*. *bla*TEM fue el más detectado (96%), confirmando estudios previos que habían informado que este gen está ampliamente presente en cepas aisladas de *E. coli* procedentes de cuerpos de agua en países como España, Australia, Francia, China, Polonia o India (Lartigue *et al.*, 2005; Tristram y Nichols, 2006; Garcia-Cobos *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Ojdana *et al.*, 2014; Bajaj *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2018).

Al comparar los resultados de la CMI de las cepas de *E. coli* seleccionadas y la presencia en estas de los diferentes genes de resistencia, se observó que, al igual que ocurría en el caso de las EDAR, con el primer método se detectó un mayor porcentaje de resistencias a cada antibiótico de lo que la presencia de los respectivos genes de resistencia seleccionados podría hacer esperar, salvo en el caso del gen *bla*TEM. Este resultado no es sorprendente, ya que existe una gran variedad de genes que codifican resistencias al mismo grupo de antibióticos, además de otros mecanismos de resistencia que pueden intervenir, tal como se ha comentado previamente en esta discusión. Es de destacar que, mientras que la presencia en las muestras de agua del gen *ermB* era muy elevada, su presencia en *E. coli* fue prácticamente nula, apoyando que la resistencia de *E. coli* a los macrólidos es fundamentalmente intrínseca, y solo unas pocas cepas adquieren el gen *ermB* u otros genes de resistencia a los macrólidos (Ma *et al.*, 2022).

Haciendo una recapitulación de los principales resultados obtenidos en esta parte del trabajo, en la que se analizaron aguas destinadas al riego agrícola de la zona de Valencia, procedentes de efluentes de EDAR y de vías de agua superficiales, hay que destacar que, aunque la principal función de las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) es la eliminación o disminución de sustancias y microorganismos nocivos para los seres humanos, hemos encontrado que esta depuración no es suficiente para eliminar el riesgo de dispersión de AMR en el medio ambiente. La alta densidad y diversidad de microorganismos, presencia de antibióticos y sus residuos, otros compuestos químicos (biocidas y metales pesados) y un medio rico en nutrientes existentes en las EDAR las convierten en el nicho idóneo para la transferencia vertical y horizontal de genes de resistencia a otras bacterias (Rizzo *et al.*, 2013; Osińska *et al.*, 2016; Turolla *et al.*, 2018) bajo presión selectiva, incluso a bajas concentraciones de antibióticos (Cantas *et al.*, 2013; Birošová *et al.*, 2014; Hall *et al.*, 2017). Todo ello provoca un claro peligro de transferencia de estos determinantes de resistencia al medio ambiente. Las EDAR no fueron diseñadas con la finalidad de realizar la eliminación de ARB, ni de ARG y, como se ha comprobado en este estudio, los tratamientos terciarios con desinfección ultravioleta no son suficientemente efectivos, de forma que, aunque los recuentos obtenidos entren dentro de los límites establecidos por la legislación para el uso de estas aguas para el riego, los microorganismos que

arroja el efluente tienen un elevado nivel de determinantes de resistencia a los antibióticos que finalizarán en el medio ambiente.

Es de destacar también que, tanto los niveles de microorganismos capaces de crecer en medios con antibióticos, como los porcentajes de cepas resistentes de *E. coli* a cada uno de los antibióticos testados, fueron casi idénticos en los efluentes de EDAR y en las aguas superficiales de riego, demostrando la homogeneidad de los patrones de resistencia que circulan a través del medio acuático en nuestra área geográfica. La única excepción es que, a diferencia de lo encontrado en las EDAR, en las aguas superficiales no se detectó ninguna cepa resistente al meropenem ni a la colistina, dos antibióticos utilizados en caso de fallo de otros antibióticos y que tienen una procedencia probablemente hospitalaria.

Por otra parte, los altos niveles de ARB y ARG detectados en las aguas de riego y el hecho de no haberse observado diferencias significativas entre el sitio o el momento de muestreo y la detección de bacterias multirresistentes en ningún tipo de agua, son datos preocupantes, ya que evidencian el alto grado de dispersión de los mismos por todos los ambientes acuáticos y agrícolas, así como el riesgo de transferencia potencial de ARB y ARG a los cultivos alimentarios, confirmando el potencial de estas aguas para contribuir a que estos determinantes de resistencias alcancen al ser humano.

El uso de *E. coli* como indicador de resistencias ha mostrado ser de gran utilidad. Este microorganismo se ha utilizado previamente como monitor de la propagación de bacterias resistentes a antibióticos en aguas recicladas (Watkinson *et al.*, 2007) y es un potente vector de diseminación de ARG en el medio ambiente (Aristizábal-Hoyos *et al.*, 2019). Esto es especialmente relevante, dada la elevada carga de cepas de *E. coli* resistentes que hemos encontrado en todas las muestras analizadas en este trabajo.

Por último, la presencia de ARG en muestras tomadas directamente de estas aguas en comparación con las resistencias observadas en las cepas de *E. coli* seleccionadas, corrobora la hipótesis de que los estudios dependientes del cultivo pueden subestimar la prevalencia de genes de resistencia que están presentes en muestras ambientales (Henriques *et al.*, 2006).

Consideramos que el estudio de los niveles de AMR en aguas de riego podrían ayudar a proporcionar una mejor comprensión de este problema y mejorar el manejo de la contaminación causada por los antibióticos y los genes de resistencia relacionados, implementando medidas adecuadas para su control en nuestra área geográfica.

Sería conveniente ampliar el estudio a otros ARG, para mejorar la correlación con los resultados fenotípicos. En este sentido, el seguimiento metagenómico mediante técnicas de

secuenciación masiva de nueva generación (Next generation sequencing, NGS) para la detección de todos los ARG presentes y la posible aparición de nuevos ARG se perfila como una potentísima herramienta. También la cuantificación de los niveles de estos ARG mediante PCR cuantitativa es fundamental en la vigilancia de los riesgos de transmisión de las ARM.

Creemos que se deberían establecer puntos críticos de vigilancia en estas acequias y canales de riego para monitorizar tanto ARB como ARG, ya que han demostrado ser hábitats muy influenciados por la actividad urbana y agrícola, por los efluentes de las EDAR que finalizan en ellos, la irrigación con aguas residuales tratadas, las aguas pluviales urbanas, la escorrentía asociada, etc., finalizando en el medio ambiente y entrando posteriormente en la cadena alimentaria o en nichos clínicamente relevantes.

2. Aguas de costa y aguas continentales

Esta parte del trabajo se realizó con el objetivo de conocer la calidad microbiológica de las aguas costeras y continentales de nuestra área geográfica, así como los niveles de resistencia a antibióticos en ellas, teniendo en cuenta la legislación existente y las recomendaciones para la monitorización de AMR en el ambiente descritas en el apartado anterior.

Los vertidos desde las EDAR, la escorrentía fluvial o el contacto con humanos y animales se identifican como las principales fuentes para la aparición de resistencia a los antibióticos en ambientes marinos (Hatosy y Martiny, 2015), pero pueden influir otros factores, tales como las actividades de la acuicultura o el papel de los microorganismos marinos, mediante la producción de antibióticos que pueden intervenir en la selección de la resistencia (Tortorella *et al.*, 2018). Hay que señalar que todas las EDAR que vierten sus aguas a las zonas costeras analizadas en este trabajo lo hacen a través de emisarios submarinos, en zonas donde las corrientes favorecen su dispersión en alta mar y evitan el reflujo hacia tierra.

Para la evaluación de la calidad del agua de costa hemos tomado como referencia el Real Decreto 1341/2007, del 11 de octubre, sobre la calidad de las aguas de baño, mediante el recuento de los indicadores de contaminación fecal, *E. coli* y *Enterococcus* spp. Los enterococos se consideran microorganismos robustos capaces de resistir muchos factores estresantes ambientales, que exhiben mayor persistencia que *E. coli* (Vergaray *et al.*, 2007; Schneeberger *et al.*, 2015), especialmente en el agua de mar, ya que soportan mejor las condiciones salinas del medio. Se ha estimado que la supervivencia de *E. coli* en agua marina es de 0,8 días mientras que la de los enterococos es de 2,4 días (Noble *et al.*, 2003).

En nuestro estudio, las medias de los recuentos de *E. coli* (1,3 a 1,8 log₁₀ UFC/100 mL) y de *Enterococcus* spp. (1,4 a 1,9 log₁₀ UFC/100 mL) se encuentran en la calificación de calidad de

agua “excelente” y dentro del rango o promedio calculado a partir de la recopilación de múltiples estudios en aguas marinas a nivel mundial, que abarcan cuatro décadas de investigación (Korajkic *et al.*, 2018), siendo para *E. coli* de 0,59 a 3,51 log₁₀ UFC/100 mL y para *Enterococcus* spp. de 0,63 a 3,21 log₁₀ UFC/100 mL. En un macroestudio realizado en España entre 2012 y 2015, que comprendía 1392 playas de todo el país (Aragónés *et al.*, 2016), se detectó para el Mediterráneo sur, donde se tomaron nuestras muestras, una media de 1,4 log₁₀ UFC/100 mL para *E. coli* y 1,32 log₁₀ UFC/100 mL para *Enterococcus* spp., siendo la media nacional de 1,93 y 1,65 log₁₀ UFC/100 mL respectivamente para cada uno de los microorganismos. Nuestros valores se encontraban dentro de esas medias, aunque encontramos alguna muestra con valores de *E. coli* de 3,8 log₁₀ UFC/100 mL y alguna muestra de *Enterococcus* spp. con niveles de 2,9 log₁₀ UFC/100 mL. Ambos resultados sobrepasan los valores permitidos y podrían ser debidos a vertidos de materia fecal por algún problema de canalización o a la escorrentía causada por las lluvias. Por otra parte, estas muestras excepcionalmente contaminadas fueron tomadas en verano, en playas cercanas a la ciudad de Valencia, donde no solo una parte de la población autóctona (Valencia y su área metropolitana tiene una población de alrededor de un millón y medio de habitantes) sino una gran cantidad de turistas, se bañan durante esas fechas (seiscientos mil turistas visitan la ciudad en Valencia en verano). En general, las playas en ambientes urbanos, como es nuestro caso, tienen una calidad menor que en ambientes semi-urbanos o naturales (May *et al.*, 1998; Winter y Duthie, 1998; McLellan, 2004; Ariza *et al.*, 2010), asociado al número de gente que usa las playas, así como las mascotas y pájaros, especialmente gaviotas, que tienen acceso a ellas (Whitman *et al.*, 2004; Haugland *et al.*, 2005; Abdelzaher *et al.*, 2010). Por todo ello es difícil establecer el origen de esta contaminación.

El porcentaje de las cepas de *E. coli* resistentes a al menos un antibiótico fue del 60%, porcentaje similar al obtenido en un estudio realizado en playas de Brasil (Da Costa *et al.*, 2015), e inferior a otros tres estudios, uno en Portugal con porcentajes del 90% (Alves *et al.*, 2014), otro en China con porcentajes del 80% (Wang *et al.*, 2015) y otro en Kuwait con porcentajes de hasta el 90% (Al-Sarawi *et al.*, 2018). La resistencia a la ampicilina fue la más frecuente, apareciendo en un tercio de los aislados y confirmando que la resistencia a los betalactámicos en el medio ambiente acuático es la más prevalente (Watkinson *et al.*, 2007; Al-Bahry *et al.*, 2009; Da Costa *et al.*, 2015; Letchumanan *et al.*, 2015; Sanlitürk y Güran, 2022). Otros antibióticos como el ciprofloxacino, ácido nalidíxico, tetraciclina y sulfametoxazol, presentaban ratios de resistencia que oscilaban entre el 14% y 18%. En un estudio realizado en agua de mar de Portugal, se obtuvieron porcentajes de resistencia similares a los nuestros para los

antibióticos antes citados, salvo para la tetraciclina, donde el porcentaje de resistencia fue del 40% de los aislados (Alves *et al.*, 2014). Otro estudio realizado en la isla del Rey Jorge en la Antártida, lugar extremo donde la presencia humana se debe a las bases científicas instaladas y con un control muy estricto de eliminación de contaminación fecal, ha encontrado un porcentaje de *E. coli* resistentes a al menos un antibiótico, del 45%. De ellos, el 40% eran resistentes a la ampicilina, el 28% a la tetraciclina y el 18% a la sulfonamida, y el 8% de las cepas presentaban multiresistencia (Hernández *et al.*, 2019). Esto refleja una resistencia común a los betalactámicos a nivel mundial, con porcentajes diversos de resistencia a otros antibióticos, dependiendo de la localización geográfica. En este trabajo no se detectó ninguna relación entre el número de cepas resistentes a cualquier antibiótico y la zona de donde fueron aisladas, lo que confirma estos datos previos, y demuestra la capacidad de las AMR para distribuirse homogéneamente en el agua de mar.

El 9% de las cepas de *E. coli* mostraron multiresistencia, de nuevo con la familia de betalactámicos presentes en todos ellos. Al comparar estos datos con otros estudios vemos porcentajes de multiresistencia muy diversos, lo que apoya la idea de que la mayoría de las ARB multiresistentes no son de origen ambiental, sino que se originan en lugares de alta presión selectiva (ecosistemas con alta contaminación) y los niveles encontrados en cada zona geográfica van muy en consonancia con las políticas de empleo de antibióticos en ellas (ECDC, 2021a).

Los enterococos mostraron bajos niveles de resistencia (23%), en comparación con otros estudios realizados en playas del mar Mediterráneo; por ejemplo, en Italia, con un 38% de cepas resistentes (Vignaroli *et al.*, 2018) o en Túnez, donde esta resistencia llega hasta el 75% (Alibi *et al.*, 2021). Solo se obtuvieron cepas resistentes frente a la tetraciclina (20% de los aislados) y frente a la daptomicina (3% de los aislados), siendo este último un fármaco de poco uso. Estos datos confirman los obtenidos por otros autores respecto a la prevalencia de la resistencia a la tetraciclina (Moore *et al.*, 2008; Vignaroli *et al.*, 2018), pero contrastan con otros estudios con una alta resistencia a diferentes agentes, tales como la eritromicina (De Oliveira y Pinhata, 2008), a la ampicilina (Rathnayake *et al.*, 2012; Alipour *et al.*, 2014) al ciprofloxacino (Łuczkiwicz *et al.*, 2010b; Alipour *et al.*, 2014; Echapare *et al.*, 2019) o al cloranfenicol (Alipour *et al.*, 2014; Echapare *et al.*, 2019), ya que en nuestro estudio no apareció ningún aislado resistente a estos antibióticos. Es muy importante resaltar que ningún aislado presentaba resistencia a la vancomicina, coincidiendo con un estudio similar en Italia (Vignaroli *et al.*, 2018). Tampoco se encontró ningún aislado de *Enterococcus* spp. multiresistente. Estos datos son alentadores, puesto que los enterococos resistentes a antibióticos encontrados en las aguas marinas costeras

suelen estar muy relacionados con aislados clínicos humanos, probablemente originados a partir de efluentes urbanos (Vignaroli *et al.*, 2013; Di Cesare *et al.*, 2014).

Respecto a la presencia de ARG en agua, se encontró que un 57% de las muestras de agua costera contenían algún gen de resistencia, porcentaje menor que el encontrado en aguas de riego. Todos los genes estudiados tenían una prevalencia menor a los encontrados en otras aguas, siendo el gen *bla*TEM, presente en el 47% de las muestras, el más frecuente. Existen otros estudios en el Mediterráneo en los que este gen es detectado en prácticamente todas las muestras (Alves *et al.*, 2014; Gambino *et al.*, 2022), confirmando que las resistencias a los betalactámicos causadas por la presencia del gen *bla*TEM son las más frecuentes en los ecosistemas marinos (Hatosy y Martiny, 2015; Alduina *et al.*, 2020).

Cuando valoramos el contenido de ARG en *E. coli*, se mantuvo el mismo patrón genotípico que en los encontrados en los demás tipos de agua. El gen *bla*TEM, junto con el gen *sull*, fueron los más detectados, observándose para este último una prevalencia superior a la encontrada en los aislados de otros tipos de agua. El gen *qnrS* y el gen *tetW* se detectaron prácticamente en los mismos porcentajes (37% y 40%), mientras que el gen *ermB* solo se detectó en tres de los aislados (5%). La coincidencia, tanto en el patrón de ARG, como en la prevalencia para los aislados en los distintos tipos de aguas, sugeriría que los *E. coli* resistentes aislados en agua de mar provienen posiblemente de contaminación fecal.

En el caso de *Enterococcus* spp., se decidió no incluir el gen *sull* en el estudio, ya que los enterococos son considerados clínicamente resistentes a las sulfonamidas, incluso aunque muestren cierta sensibilidad *in vitro* (CLSI, 2020), por lo que consideramos que su detección no aportaba información relevante.

En estos aislados, el gen *bla*TEM se detectó en 12 aislados, siendo el más prevalente, aunque ninguno de ellos mostró resistencia frente a la ampicilina. Este resultado está en consonancia con otros estudios que verifican que esta resistencia es en parte intrínseca, por la baja afinidad de su unión de las PBP (Kakoullis *et al.*, 2021) y que el nivel de expresión de betalactamasas en estas especies es bajo (Hollenbeck y Rice, 2012; Guzman Prieto *et al.*, 2016). La presencia de los otros ARG estudiados fue muy baja o nula, como el gen *qnrS*, que no se detectó en ninguna de las cepas aisladas. Se ha reportado que en estos microorganismos es normal la adquisición de esta resistencia a través de otros genes o mutaciones cromosómicas (Miller *et al.*, 2014). Al igual que para *E. coli*, tampoco se mostró ninguna relación de dependencia entre la zona de muestreo y la aparición de genes en las cepas.

Los ARG fueron detectados en mayor medida en los aislados de *E. coli* que en las muestras de agua directa. Estos resultados son diferentes a los encontrados en otros tipos de agua analizados, donde el porcentaje de detección de ARG en agua directa, por la variedad de microorganismos que intervienen con distintos contenidos de ARG y los eARG, suele ser mayor que el encontrado en las cepas de *E. coli*. Para analizar las muestras de agua marina directamente, se parte de la membrana de filtración en la que han quedado retenidas bacterias de diferentes orígenes, fagos y partículas que pueden contener diferentes sustancias. Teniendo en cuenta esto, podemos sospechar de dos posibles causas de esta diferencia: una de ellas es el límite de detección de la propia PCR, ya que el medio marino es un medio diluido, por lo que el filtrado podría aportar poco material genético para la amplificación, mientras que para la detección de los ARG de *E. coli* se parte de colonias puras con gran carga de DNA. Otra posible causa podría ser que la PCR realizada para muestras marinas directamente de los filtros puede estar afectada por diversos inhibidores, sustancias presentes como polifenoles, algunos restos de ácidos o glicógeno, todos ellos presentes en el medio marino y conocidos por su capacidad de inhibir la PCR (Schrader *et al.*, 2012).

Respecto a la correlación entre el genotipo de ARG y el fenotipo de resistencia/sensibilidad de la CMI a antibióticos representativos correspondientes, los resultados para las cepas de *E. coli* fueron muy parecidos a los obtenidos en las aguas de EDAR y aguas de riego, ya discutidos previamente. En el caso de los enterococos, la tetraciclina es casi el único antibiótico frente al que aparecían resistencias, pero solo una de las seis cepas resistentes a este antibiótico poseía el gen *tetW*. Algunos autores han sugerido que el ARG más prevalente en *Enterococcus* spp. para proporcionar resistencia frente a las tetraciclinas es el *tetM* (Murray, 1998; Tannock, 1999; Roberts, 2005), aunque existen otros ARG que pueden haber provocado esta resistencia, como ya se ha comentado previamente.

En cuanto a las aguas continentales, entendiendo como tal todos los cuerpos de agua dulce permanentes que se encuentran sobre o debajo de la superficie de la tierra, estas se encuentran bajo la influencia de una gran cantidad de factores que influyen directamente en su calidad, y por tanto en el riesgo para la salud humana (Murphy *et al.*, 2017). Estas aguas superficiales y subterráneas son nuestras principales fuentes de agua potable, pero son también el destino de contaminación fecal, fármacos y sus residuos, a partir de EDAR, sistemas sépticos y escorrentías (Nwosu, 2001; Baquero *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2011; Andrade *et al.*, 2018; Chique *et al.*, 2021). El ingreso de materia fecal de origen animal o humano representa una amenaza clave para la calidad del agua y la Salud Pública, ya que pueden contener microorganismos patógenos (Hynds *et al.*, 2014; Murphy *et al.*, 2017; Kauppinen *et al.*, 2018;

Chique *et al.*, 2021). Asegurar la calidad del agua es, por tanto, fundamental, controlando peligros emergentes como puede ser las AMR presentes en ella (Pruden *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2011). De hecho, varios estudios han detectado ARB y ARG en fuentes de agua potable sin tratar, como ríos y lagos (Wellington *et al.*, 2013; Bartley *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2021), pozos (Zhang *et al.*, 2015a; Zhang *et al.*, 2015c) y aguas subterráneas (Murphy *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2022).

Para su consumo, estas aguas serán potabilizadas mediante productos químicos, como la cloración, o procesos físicos, como la filtración en membrana (Shannon *et al.*, 2008), ya que la legislación exige que la presencia de microorganismos en el agua potable sea nula (WHO, 2022b). Por ello, en este trabajo hemos estudiado la calidad de las diferentes fuentes de agua, no desde el punto de vista de su posterior consumo humano, sino para valorar su papel como reservorios y medios de dispersión de ARB y ARG al ambiente. Dada la inexistencia de reglamentación específica, hemos seguido los mismos criterios microbiológicos empleados en los estudios del agua de costa, determinando la presencia y resistencias a antibióticos de indicadores fecales, *E. coli* y *Enterococcus* spp., aislados de estas muestras.

Las aguas superficiales formadas por los ríos Turia y Júcar, así como las masas de agua subterránea de la Plana de Valencia (norte-sur, Buñol, Cheste y Sierra del Ave) con recursos hídricos de 500 hm³ al año, representaron el objeto de nuestro estudio, a través de 102 muestras tomadas en pozos, aguas superficiales y fuentes. Estas masas de agua están localizadas geográficamente en un espacio con una elevada aglutinación de población, un importante desarrollo ganadero e industrial y una intensa actividad agrícola.

Los recuentos obtenidos para *E. coli* oscilaron en un rango de 0,3 a 3,5 log₁₀ UFC/100 mL, mientras que, para enterococos, se encontraron dentro de un rango de 0,2 a 2,4 log₁₀ UFC/100 mL. Algunas muestras registraron recuentos altos como, por ejemplo, una muestra con > 3,3 log₁₀ UFC/100 mL de *E. coli*. Esto puede deberse a que los puntos de recogida estén localizados cerca de lugares de descarga de acequias, desagües o aguas residuales, ya que algunos acuíferos son muy vulnerables a la contaminación bacteriana como resultado de sus características hidrogeológicas (Mahler *et al.*, 2000; Dussart-Baptista *et al.*, 2003, 2007; Staley y Sadowsky, 2018). También hay que considerar otros mecanismos que pueden intervenir en la contaminación de este tipo de aguas, como el diseño de la fuente, su ubicación, su mantenimiento y los patrones de uso de la tierra (Hynds *et al.*, 2012; Wallender *et al.*, 2014; Atherholt *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2018).

Los recuentos de aguas superficiales obtenidos en este trabajo están en consonancia con otros estudios, como el realizado en el río Hudson, donde los recuentos de *E. coli* y enterococos fueron de 0 a 3,4 log₁₀ UFC/100 mL (Brooks *et al.*, 2020) o como el realizado en un río alemán donde los recuentos medios de *E. coli* y enterococos fueron de 1,2 a 4,4 log₁₀ UFC/100 mL y de 0,5 a 4,1 log₁₀ UFC/100 mL respectivamente (Herrig *et al.*, 2020). En nuestro país se encontró en el río Besòs una media de 3,3 a 3,9 log₁₀ UFC/100 mL para *E. coli* y de 2,6 a 4,4 log₁₀ UFC/100 mL para enterococos (Jurado *et al.*, 2019a).

En el caso de aguas de origen subterráneo, solo una de las ocho fuentes testadas (13%) presentó valores por encima de 1 log₁₀ UFC/100 mL para *E. coli* y tres (38%) para enterococos, mientras que el resto fueron menores a 1 log₁₀ UFC/100 mL para ambos microorganismos. En los pozos, el 22% de las muestras de *E. coli* y el 37% de las muestras de enterococos presentaron valores por encima de 1 log₁₀ UFC/100 mL. En general, los valores de recuentos de *E. coli* registrados por nosotros están dentro de los valores normales reportados para este tipo de aguas (Stoll *et al.*, 2012; Fernando *et al.*, 2016; Gomes Freitas *et al.*, 2017). En un estudio de Estados Unidos, los recuentos de *E. coli* fueron de 0 a 2,4 log₁₀ UFC/100 mL (Olson *et al.*, 2022); en otro realizado en Francia los recuentos medios fueron de 0,7 a 2,7 log₁₀ UFC/100 mL (Henriot *et al.*, 2022) y en otro estudio realizado en Irlanda durante un periodo de diez años en 132 pozos, el 29% de estos presentaron valores de recuentos de *E. coli* por encima de 1 log₁₀ UFC/100 mL (Andrade *et al.*, 2022). Por otro lado, estudios que han incluido tanto *E. coli* como enterococos han dado valores medios de la presencia de ambos microorganismos de 0 a 2,7 log₁₀ UFC/100 mL (Jurado *et al.*, 2019a; Goshu *et al.*, 2021) y en un estudio de Portugal realizado durante 4 años se encontró que el 59% de las muestras fueron positivas para *E. coli* y el 62% para enterococos (Teixeira *et al.*, 2018).

Aunque las aguas subterráneas parecen que representan un recurso hídrico seguro, en gran parte debido a la capacidad de atenuación de los contaminantes de las capas del subsuelo suprayacente, aún son susceptibles de contaminación microbiológica (Bradford y Harvey, 2017). Los orígenes de esta contaminación en nuestra área provienen, por una parte, de la actividad agrícola, llegando a los acuíferos a través de filtraciones de aguas de riego (Ballesteros *et al.*, 2009); de la eliminación de aguas residuales de fuentes domésticas, municipales o industriales (Andrade *et al.*, 2018); y de la escorrentía provocada por las lluvias, posteriormente filtrada (Hynds *et al.*, 2012; Moreira y Bondelind, 2017; Murphy *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2018). Otros factores que juegan a favor de esta contaminación son el clima (las altas temperaturas incrementan la concentración bacteriana), la humedad del suelo, el entorno hidrogeológico local y las infraestructuras específicas de la fuente (diseño del pozo, mantenimiento, etc.) (Hynds

et al., 2012; Wallender *et al.*, 2014; Atherholt *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2018). Hay que mencionar una investigación internacional que sugiere una posible adaptación de *E. coli* a los entornos de aguas subterráneas, provocando una sobreestimación de los eventos de contaminación persistentes (Touchon *et al.*, 2020; Tropea *et al.*, 2021). En cualquier caso, si se considera la legislación sobre aguas para contacto humano mediante el baño, aplicadas para nuestro propósito, los niveles encontrados no supusieron, en general, un riesgo para la salud.

En este estudio, el 28% de las cepas de *E. coli* aisladas fueron resistentes a al menos uno de los antibióticos ensayados y el 10% presentó multirresistencia. Teniendo en cuenta el origen de las muestras de agua, los aislamientos de aguas de pozo mostraron la mayor tasa de resistencia a los antibióticos y el mayor índice de multirresistencia. Al comparar nuestros resultados con los encontrados por otros autores, destaca la revisión realizada por Andrade *et al.* (2020) sobre setenta publicaciones relacionadas con la resistencia de microorganismos en aguas subterráneas, que mostró que el 80,2% de los aislados eran resistentes a al menos un antibiótico (fueron identificadas ARB en el 76,9% de los pozos y fuentes) y el 57,2% de ellos eran multirresistentes. En concreto, el porcentaje de resistencia de *E. coli* a, al menos, un antibiótico osciló entre el 50% y 100% (31 estudios) con una media del 79,8% de los aislados y para enterococos entre el 78% y 100% (10 estudios), situándose la mutirresistencia para *E. coli* entre el 10% y el 80% con una media del 45,4% de los aislados y, para enterococos entre el 28% y 100%. La diferencia es muy grande respecto a nuestros datos, ya que los niveles de resistencia encontrados en este trabajo son mucho menores, lo cual es una buena noticia.

Respecto a los diferentes antibióticos, se observó que la mayoría de los aislados de *E. coli* fueron resistentes a tetraciclina y sulfametoxazol, seguidos de ampicilina, coincidiendo con otros estudios (Pereira *et al.*, 2013; Kotlarska *et al.*, 2015; Rosas *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015b; Stange *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017; Dungan y Bjorneberg, 2021). Estos resultados coinciden también con los obtenidos para otros tipos de aguas analizados en este trabajo, y eran esperables puesto que, como ya se ha comentado, son antibióticos que han sido ampliamente utilizados en medicina humana y veterinaria (Jiang *et al.*, 2013; Maal-Bared *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013).

Tenemos que destacar los mayores porcentajes de resistencias detectados en las cepas obtenidas de agua de pozo y destacar su importancia respecto a las barreras de resistencia, ya que encontramos una cepa de *E. coli* resistente a once de los catorce antibióticos ensayados, incluyendo a cefalosporinas de tercera generación y a meropenem. La presencia de cepas multirresistentes en aguas de pozo se ha descrito previamente (Amaya *et al.*, 2012) y se ha demostrado que existe una incidencia sorprendentemente alta de *E. coli* resistente a los

antibióticos en las aguas subterráneas rurales, quizás debido a la escorrentía de las granjas o a las fugas de tanques sépticos (Kümmerer, 2009).

En cuanto a los *Enterococcus* spp., solo el 17% de las cepas aisladas fueron resistentes a al menos un antibiótico, la mayoría a la tetraciclina y eritromicina, coincidiendo con estudios previos (Łuczkiwicz *et al.*, 2010b; Enayati *et al.*, 2015) y únicamente 3 de ellas mostraron multirresistencia.

A pesar de los bajos niveles detectados, hay que destacar que dos aislados de enterococos procedentes de pozos fueron resistentes a la vancomicina, fenómeno que no se había detectado en los estudios de aguas marinas. Este hecho es preocupante, ya que indica que las aguas continentales podrían representar un reservorio de resistencia, con capacidad de transmisión a otros microorganismos, como el género *Staphylococcus* (Guzman Prieto *et al.*, 2016). No es frecuente encontrar esta resistencia en ambientes acuáticos, habiéndose sugerido que su origen está relacionado con la descarga de aguas residuales procedentes de hospitales. La resistencia a la vancomicina se considera una amenaza grave por parte de los organismos internacionales, ya que solo existen unos pocos antibióticos (linezolid, quinupristin/dalfopristin, daptomicina y tigeciclina) disponibles para el tratamiento de estas infecciones, y desafortunadamente, la resistencia a estos antibióticos se está incrementando (EFSA y ECDC, 2021; Cho *et al.*, 2020).

Respecto a la alta tasa de resistencia a la tetraciclina para ambos microorganismos estudiados, puede deberse en primer lugar a que estos compuestos tienen una alta capacidad de combinación con el suelo y sus componentes minerales, lo que provoca su retención y dispersión en el sedimento después de ser descargadas en las distintas aguas (Pils y Laird, 2007; Xu y Li, 2010), y por otro lado, a que los genes de resistencia frente a tetraciclina (*tet*) se propagan fácilmente entre bacterias gramnegativas y llegan a ser encontrados hasta en el 100% de las muestras de aguas de ríos y lagos (Su *et al.*, 2020). En el estudio de Andrade *et al.* (2020), los enterococos mostraron altos niveles de resistencia frente a cefalosporinas de segunda y tercera generación, lincosamidas, sulfonamidas y penicilinas. En otros estudios donde se ha cuantificado la presencia de ARG en aguas subterráneas, aguas superficiales y sedimentos cercanos a un núcleo urbano, como sería nuestro caso, los ARG más frecuentes son, por orden: betalactámicos > sulfonamidas > tetraciclinas (Wu *et al.*, 2020), resultados similares a los nuestros.

Todos los patrones de multirresistencia para *E. coli* incluyeron resistencia frente a betalactámicos y tetraciclinas, asociados en la mayor parte de los casos a sulfonamidas, siendo el perfil BLA-SUL-TET el más frecuente, coincidiendo con otros estudios (Flores Ribeiro *et al.*,

2012; Chen *et al.*, 2017). Es de destacar, como hemos comentado previamente, la presencia en una de las cepas de *E. coli* aislada de pozo, de resistencia a casi todos los antibióticos ensayados, demostrando la plasticidad de esta bacteria para adquirir resistencias y el riesgo al que está sometida la población frente a este tipo de microorganismos. Respecto a los enterococos, se detectaron muy pocos casos de multiresistencia, estando la eritromicina presente en todos ellos.

Los ambientes de aguas continentales y en concreto de aguas subterráneas, se podrían considerar como reservorios ideales para la diseminación de resistencias a antibióticos (Lupo *et al.*, 2012). A diferencia de las aguas superficiales, las aguas subterráneas se mantienen por lo general mucho tiempo retenidas, lo cual puede conducir a una proliferación bacteriana prolongada, a su exposición a residuos de antimicrobianos a bajas concentraciones, ARB y ARG, en una zona confinada y, además, están protegidos de los efectos del ambiente como los rayos ultravioletas y la temperatura (Van Schaik, 2015; Williams-Nguyen *et al.*, 2016). En un estudio llevado a cabo en nuestro país en distintos pozos cercanos a instalaciones ganaderas, se detectaron genes de resistencia frente a las sulfamidas (*sull*), macrólidos (*ermB*), tetraciclinas (*tetW*) y fluoroquinolonas (*qnrS*) (PRAN Medio Ambiente, 2022), lo que confirma el impacto que tienen las actividades que se realizan sobre el terreno en la microbiota del acuífero y su perfil de resistencia. Como consecuencia de todo ello, surge la hipótesis de que los sistemas de agua dulce se han convertido en puntos críticos de evolución de ARB y diseminación de ARG mediante la transferencia horizontal de genes (Stoll *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Rafraf *et al.*, 2016; Bartley *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2021) a partir de los cuales la resistencia antimicrobiana podría llegar al agua potable (Sidrach-Cardona *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015a; Deng *et al.*, 2016; Egervärn *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2020). Los sistemas de agua potable pueden promover y diseminar las resistencias a antimicrobianos mediante la formación de biopelículas en las tuberías, los depósitos sueltos y los sólidos en suspensión, en los que las bacterias se agrupan adquiriendo una mayor resistencia frente a los tratamientos potabilizadores y los antimicrobianos (Liu *et al.*, 2017). Sin embargo, falta información sobre los mecanismos y vías de transferencia de ARG en los sistemas de tratamiento y distribución de agua potable y aún no está claro si la presencia de ARB y ARG ambientales en el agua potable previamente a su tratamiento tiene impacto significativo en la exposición humana a ARB patógenas (Nnadozie y Odume, 2019).

En conclusión, podemos establecer que, por los niveles de AMR detectados, los perfiles de resistencias encontrados (incluso a antibióticos de última línea) y las distancias que recorren, las aguas continentales tienen una relevancia considerable en la dispersión de determinantes

de resistencias a antibióticos en nuestra área geográfica. Se requiere una mayor investigación que combine la trazabilidad de la fuente microbiana, más pruebas de resistencia a los antibióticos y una valoración precisa de la concentración de antibióticos presentes en ellas para caracterizar el riesgo que suponen.

Por último, al analizar conjuntamente todos los tipos de aguas estudiadas en este trabajo (Anexos II a VI), se observan diferencias significativas en los niveles de ARB detectados entre las aguas de riego (mucho más contaminadas), por una parte, y las aguas costeras y continentales por otra, pero con una gran homogeneidad en las frecuencias relativas de resistencias a los diferentes antibióticos en todas ellas, siendo siempre la ampicilina y el sulfometoxazol los antibióticos más prevalentes, seguidos por tetraciclinas y ciprofloxacino. Se han detectado un gran número de cepas de *E. coli* multirresistentes, así como resistencias a antibióticos de muy alta relevancia clínica, incluso de última opción terapéutica, en todos los ambientes acuáticos analizados, aunque en el caso de las aguas de riego, estas cepas resistentes se aislaron todas en los efluentes de EDAR y no se encontraron en cauces superficiales. Respecto a los perfiles de multirresistencia encontrados, es también llamativo que los más prevalentes en todos los tipos de aguas analizadas fueron siempre los dos mismos perfiles (BLA-SUL-TET y BLA-QNL-SUL-TET). Esta homogeneidad en los resultados obtenidos en cuanto a antibióticos frente a los que se detectaron más resistencias, presencia de ARG y perfiles de multirresistencia comunes en todas las aguas estudiadas, hacen pensar que existe una interrelación e intercambio de determinantes de AMR entre todos estos sistemas acuáticos.

Consideramos que este trabajo ofrece una visión integrada sobre el papel del agua como agente ambiental de dispersión de las resistencias a antibióticos en el área de Valencia. Aunque se trata de un estudio orientado a disponer de una estimación previa, a partir del cual deberían realizarse otros con mayor número y tipos de muestras, estudiando otros microorganismos y genes, y relacionando los resultados con los niveles de residuos de antibióticos detectados para poder realizar una adecuada caracterización del riesgo, nuestros resultados corroboran la necesidad de establecer sistemas de vigilancia de las AMR, no solo en la práctica clínica o en las granjas, sino también en el agua, para garantizar un abordaje eficaz de este problema, tal como demanda la estrategia “One Health” de salud global.

VI. Conclusiones

1. La mayoría de las aguas destinadas al riego agrícola analizadas en el presente trabajo no cumplen con los estándares de calidad establecidos por la normativa española. Esta situación plantea un potencial riesgo sanitario, dado que muchos de los productos cultivados en esta región se consumen crudos. Además, la descarga de parte de estas aguas contaminadas al mar representa un riesgo medioambiental.

2. La calidad microbiológica del efluente terciario fue diferente en las tres Estaciones Depuradoras de Aguas residuales (EDAR) analizadas. Una mayor calidad desde el punto de vista microbiológico se relaciona con un tratamiento terciario que incluya un paso de filtración.

3. El tratamiento terciario en las EDAR es efectivo para la reducción de la contaminación global por bacterias de origen fecal. Sin embargo, no disminuye significativamente la ratio de población bacteriana resistente a antibióticos, ni de genes de resistencia en el efluente vertido al medio ambiente, lo que confirma que el tratamiento depurador no es un método adecuado para disminuir el riesgo de dispersión de determinantes de resistencias al medio ambiente.

4. Las ratios de bacterias resistentes a antibióticos y genes de resistencia han sido mayores en el efluente terciario respecto al efluente de entrada en algunos casos, confirmando que las EDAR pueden actuar como reactores biológicos, potenciando la transmisión de resistencias entre los microorganismos presentes.

5. En todas las aguas de riego, tanto efluentes terciarios de EDAR como cursos superficiales, se ha detectado un elevado número de cepas capaces de crecer en medios adicionados con antibióticos. Además, no se han observado diferencias significativas entre el sitio o el momento de muestreo y las resistencias observadas. Estos resultados ponen de manifiesto el potencial de las aguas de riego para actuar como reservorios y dispersores de determinantes de resistencia a los antibióticos, a la vez que evidencian que su vertido y distribución puede ejercer una importante presión selectiva sobre el microbioma medioambiental.

6. Los altos niveles de ARB y ARG detectados en las aguas de riego destacan el riesgo existente de transferencia a los cultivos alimentarios, confirmando el potencial de estas aguas para contribuir a que estos determinantes de resistencias alcancen al ser humano.

7. Los niveles de microorganismos indicadores de contaminación fecal detectados en las aguas de costa y sistemas acuáticos continentales permiten clasificarlas en la categoría de “Excelente”.

8. Los porcentajes de bacterias resistentes a antibióticos y genes de resistencia detectados en aguas de costa y sistemas acuáticos continentales son, en general, menores a los reportados en la bibliografía. Este resultado, aunque positivo, debería ser confirmado por nuevos estudios más exhaustivos y periódicos, que permitan la vigilancia de su evolución.

9. Todas las cepas de *E. coli* aisladas de los distintos tipos de agua presentaron niveles muy altos de resistencia a la ampicilina, tetraciclinas, sulfametoxazol, trimetoprim, ciprofloxacino y ácido nalidíxico. También se han encontrado niveles de multirresistencias muy altos, sobre todo frente a betalactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas. Esto puede suponer un riesgo, ya que se trata de los antibióticos más utilizados en la práctica médica comunitaria.

10. Aunque en número bajo, se han encontrado cepas de *E. coli* resistentes a meropenem y la colistina en todos los sistemas acuáticos analizados, excepto en aguas de riego superficiales. Puesto que ambos son antibióticos de última opción terapéutica, este resultado supone un motivo de preocupación y un argumento para establecer un sistema de vigilancia de su presencia en las aguas.

11. El número de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a los antibióticos más habituales aisladas en aguas de costa y continentales es escaso, siendo las resistencias a la eritromicina y tetraciclina las más prevalentes. También es muy escaso el número de cepas multirresistentes detectadas.

12. En aguas de pozo se han aislado dos cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a la vancomicina, última opción terapéutica en infecciones muy graves producidas por microorganismos grampositivos. Teniendo en cuenta este resultado, así como la movilidad y flujo al que están sometidas estas aguas, se plantea la necesidad de incluir estos sistemas acuáticos en los programas de vigilancia de AMR.

13. Los genes de resistencia *bla*TEM, *sull*, *tet*W y *qnr*S, están presentes en casi todas las aguas de EDAR y riego y, en menor proporción, en aguas de mar, lo que demuestra la ubicuidad y persistencia de estos genes en todos los ecosistemas acuáticos de nuestra área geográfica y supone un riesgo evidente para el medio ambiente y la salud humana, debido a la posibilidad de transmisión de estos genes a microorganismos patógenos.

14. Se ha detectado una mayor presencia de ARG en muestras tomadas directamente de aguas que en las cepas de *E. coli* seleccionadas, lo que apoya la idea de que los estudios dependientes del cultivo pueden subestimar la prevalencia de genes de resistencia que están presentes en muestras ambientales, y refuerza la necesidad de vigilar directamente estos ARG, y no solo las bacterias indicadoras.

15. El hecho de que no existe relación entre la estacionalidad o el origen de las aguas analizadas con las resistencias a antibióticos detectadas de forma más prevalente, así como la coincidencia en los perfiles de multiresistencia más frecuentes en todos los tipos de aguas analizadas refuerzan la idea de que, en el área de Valencia, existe un flujo continuo de determinantes de resistencias entre todos los sistemas acuáticos.

Los resultados obtenidos nos llevan a proponer:

- Un mayor control de los distintos ecosistemas acuáticos, especialmente las aguas destinadas al riego, incluyendo además de los marcadores obligatorios establecidos por la legislación, parámetros relacionados con la evolución de las resistencias a antibióticos, tales como:

- Monitorizar la evolución de los patrones de resistencia, tanto genotípicos como fenotípicos, en, al menos, *E. coli* y *Enterococcus* spp.
- Cuantificar periódicamente una amplia variedad de genes de resistencia que cubran el espectro de las familias de antibióticos más utilizadas en nuestro país.
- Monitorizar la presencia en las aguas de residuos de antibióticos, metales pesados y biocidas, ya que pueden actuar como agentes selectivos promotores de resistencias.

- La promoción, por parte de los estamentos científicos y administrativos, de estudios de Evaluación del Riesgo de la presencia de determinantes de resistencias a los antibióticos en los sistemas acuáticos, para poder establecer normativas reguladoras y metodologías de control.

VII. Bibliografía

- Aarestrup, F. M. y Woolhouse, M. E. (2020). Using sewage for surveillance of antimicrobial resistance. *Science*, 367(6478), 630-632. doi: 10.1126/science.aba3432.
- Abdelzaher, A.M., Wright, M.E., Ortega, C., Solo-Gabriele, H.M., Miller, G., Elmir, S., Newman, X., Shih, P., Bonilla, J.A., Bonilla, T.D., Palmer, C.J., Scott, T., Lukasik, J., Harwood, V.J., McQuaig, S., Sinigalliano, C., Gidley, M., Plano, L.R., Zhu, X., ... Fleming, L.E. (2010). Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), 724-732. doi: 10.1128/AEM.02127-09.
- Abe, K., Nomura, N., y Suzuki, S. (2020). Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(5), fiae031. doi: 10.1093/femsec/fiae031.
- Afsharnia, M., Naraghi, B., Mardaneh, J., Kianmehr, M., y Biglari, H. (2018). The data of *Escherichia coli* strains genes in different types of wastewater. *Data in Brief*, 21, 763-766. doi: 10.1016/j.dib.2018.08.167.
- Agencia Estatal de Meteorología, AEMET. (2023). Análisis Estacional. València. Consultado el 17 de marzo de 2023. Disponible en: https://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/vigilancia_clima/analisis_estacional?w=3&l=8416&datos=prec
- Agga, G. E., Couch, M., Parekh, R. R., Mahmoudi, F., Appala, K., Kasumba, J., Loughrin, J.H., y Conte, E. D. (2022). Lagoon, anaerobic digestion, and composting of animal manure treatments impact on tetracycline resistance genes. *Antibiotics (Basel)*, 11(3), 391. doi: 10.3390/antibiotics11030391.
- Aguas de las Cuencas Mediterráneas S. A. (acuaMed). (2006). Consultado el 28 de septiembre de 2023. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/content/dam/mitesco/es/agua/planes-y-estrategias/informes-de-viabilidad-de-obras-hidraulicas/informe_viabilidad_3_2_c_reutilizacion_pinedo_tcm30-82652.pdf
- Agyeman, W. Y., Bisht, A., Gopinath, A., Cheema, A. H., Chaludiya, K., Khalid, M., Nwosu M., Konka, S., y Khan, S. (2022). A systematic review of antibiotic resistance trends and treatment options for hospital-acquired multidrug-resistant infections. *Cureus*, 14(10), e29956. doi: 10.7759/cureus.29956.
- Ahmad, N., Joji, R. M., y Shahid, M. (2023). Evolution and implementation of One Health to control the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes: A review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1065796. doi: 10.3389/fcimb.2022.1065796.
- Aigües de Paterna. (2023). Consultado el 28 de septiembre de 2023. Disponible en: <https://www.aiguesdepaterna.es/reutilizacion>
- Al-Bahry, S. N., Mahmoud, I. Y., Al-Belushi, K. I. A., Elshafie, A. E., Al-Harthy, A., y Bakheit, C. K. (2009). Coastal sewage discharge and its impact on fish with reference to antibiotic resistant enteric bacteria and enteric pathogens as bio-indicators of pollution. *Chemosphere*, 77(11), 1534-1539. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.09.052.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., y Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565-1574. doi: 10.1021/bi5000564.

- Alduina, R., Gambino, D., Presentato, A., Gentile, A., Sucato, A., Savoca, D., Filippello, S., Visconti, G., Caracappa, G., Vicari, D., y Arculeo, M. (2020). Is Caretta Caretta a carrier of antibiotic resistance in the Mediterranean Sea?. *Antibiotics (Basel)*, *9*(3), 116. doi: 10.3390/antibiotics9030116.
- Alexander, J., Bollmann, A., Seitz, W., y Schwartz, T. (2015). Microbiological characterization of aquatic microbiomes targeting taxonomical marker genes and antibiotic resistance genes of opportunistic bacteria. *Science of the Total Environment*, *512-513*, 316-325. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.01.046.
- Alexander, T. W., Yanke, L. J., Topp, E., Olson, M. E., Read, R. R., Morck, D. W., y McAllister, T. A. (2008). Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria in feedlot cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(14), 4405-4416. doi: 10.1128/AEM.00489-08.
- Alibi, S., Beltifa, A., Hassen, W., Jaziri, A., Soussia, L., Zbidi, F., y Ben Mansour, H. (2021). Coastal surveillance and water quality monitoring in the Rejiche sea—Tunisia. *Water Environment Research*, *93*(10), 2025-2033. doi: 10.1002/wer.1573.
- Alipour, M., Hajiesmaili, R., Talebjannat, M., y Yahyapour, Y. (2014). Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from the river and coastal waters in northern Iran. *The Scientific World Journal*, *2014*, 287458. doi: 10.1155/2014/287458.
- Al-Jassim, N., Ansari, M. I., Harb, M., y Hong, P. Y. (2015). Removal of bacterial contaminants and antibiotic resistance genes by conventional wastewater treatment processes in Saudi Arabia: is the treated wastewater safe to reuse for agricultural irrigation?. *Water Research*, *73*, 277-290. doi: 10.1016/j.watres.2015.01.036.
- Allende, A. y Monaghan, J. (2015). Irrigation water quality for leafy crops: a perspective of risks and potential solutions. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *12*(7), 7457-7477. doi: 10.3390/ijerph120707457.
- Allen-Scott, L. K., Buntain, B., Hatfield, J. M., Meisser, A., y Thomas, C. J. (2015). Academic institutions and one health: building capacity for transdisciplinary research approaches to address complex health issues at the animal–human–ecosystem interface. *Academic Medicine*, *90*(7), 866-871. doi: 10.1097/ACM.0000000000000639.
- Alm, E. W., Burke, J., y Spain, A. (2003). Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. *Water Research*, *37*(16), 3978-3982. doi: 10.1016/S0043-1354(03)00301-4.
- Al-Sarawi, H. A., Jha, A. N., Baker-Austin, C., Al-Sarawi, M. A., y Lyons, B. P. (2018). Baseline screening for the presence of antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from Kuwait's marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, *129*(2), 893-898. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.10.044.
- Alves, M. S., Pereira, A., Araújo, S. M., Castro, B. B., Correia, A. C., y Henriques, I. (2014). Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 426. doi: 10.3389/fmicb.2014.00426.

- Amador, P. P., Fernandes, R. M., Prudêncio, M. C., Barreto, M. P., y Duarte, I. M. (2015). Antibiotic resistance in wastewater: Occurrence and fate of *Enterobacteriaceae* producers of Class A and Class C β -lactamases. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 50(1), 26-39. doi: 10.1080/10934529.2015.964602.
- Amador, P., Fernandes, R., Prudêncio, C., y Duarte, I. (2019). Prevalence of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* on Portuguese livestock manure. *Antibiotics (Basel)*, 8(1), 23. doi: 10.3390/antibiotics8010023.
- Amaya, E., Reyes, D., Paniagua, M., Calderón, S., Rashid, M. U., Colque, P., Kühn, I., Möllby, R., Weintraub, A., y Nord, C. E. (2012). Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from different aquatic environmental sources in León, Nicaragua. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(9), E347-E354. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03930.x.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289(1036), 321-331. doi: 10.1098/rstb.1980.0049.
- Ambrožič Avguštin, J., Keber, R., Zerjavic, K., Orazem, T., y Grabnar, M. (2007). Emergence of the quinolone resistance-mediating gene aac (6')-Ib-cr in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 4171-4173. doi: 10.1128/AAC.01480-06.
- Aminov, R. I., Garrigues-Jeanjean, N., y Mackie, R. (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 22-32. doi: 10.1128/AEM.67.1.22-32.2001.
- Amos, G. C., Ploumaki, S., Zhang, L., Hawkey, P. M., Gaze, W. H., y Wellington, E. M. (2018). The widespread dissemination of integrons throughout bacterial communities in a riverine system. *The ISME Journal*, 12(3), 681-691. doi: 10.1038/s41396-017-0030-8.
- AMR Industry Alliance, Progress Report. (2020). Consultado el 22 de marzo de 2023. Disponible en: <https://www.amrindustryalliance.org/wp-content/uploads/2020/01/AMR-2020-Progress-Report.pdf>
- Andrade, L., Boudou, M., Hynds, P., Chique, C., Weatherill, J., y O'Dwyer, J. (2022). Spatiotemporal dynamics of *Escherichia coli* presence and magnitude across a national groundwater monitoring network, Republic of Ireland, 2011–2020. *Science of the Total Environment*, 840, 156311. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156311.
- Andrade, L., Kelly, M., Hynds, P., Weatherill, J., Majury, A., y O'Dwyer, J. (2020). Groundwater resources as a global reservoir for antimicrobial-resistant bacteria. *Water Research*, 170, 115360. doi: 10.1016/j.watres.2019.115360.
- Andrade, L., O'Dwyer, J., O'Neill, E., y Hynds, P. (2018). Surface water flooding, groundwater contamination, and enteric disease in developed countries: A scoping review of connections and consequences. *Environmental Pollution*, 236, 540-549. doi: 10.1016/j.envpol.2018.01.104.
- Anjum, M. F., Schmitt, H., Börjesson, S., Berendonk, T. U., WAWES network. (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. doi: 10.1016/j.mib.2021.09.011.

- Antunes, P., Machado, J., y Peixe, L. (2006). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2), 297-304. doi: 10.1093/jac/dkl242.
- Aragónés, L., López, I., Palazón, A., López-Úbeda, R., y García, C. (2016). Evaluation of the quality of coastal bathing waters in Spain through fecal bacteria *Escherichia coli* and *Enterococcus*. *Science of the Total Environment*, 566-567, 288-297. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.106.
- Aristizábal-Hoyos, A. M., Rodríguez, E. A., Arias, L., y Jiménez, J. N. (2019). High clonal diversity of multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Management*, 245, 37-47. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.05.073.
- Ariza, E., Jimenez, J. A., Sarda, R., Villares, M., Pinto, J., Fraguell, R., Roca, E., Marti, C., Valdemoro, H., Ballester, R., y Fluvia, M. (2010). Proposal for an integral quality index for urban and urbanized beaches. *Environmental Management*, 45(5), 998-1013. doi: 10.1007/s00267-010-9472-8.
- Arsand, J. B., Hoff, R. B., Jank, L., Bussamara, R., Dallegrove, A., Bento, F. M., Kmetzsch, L., Falção, D.A., do Carmo Ruaro Peralba, M., de Araujo Gomes, A., y Pizzolato, T. M. (2020). Presence of antibiotic resistance genes and its association with antibiotic occurrence in Dilúvio River in southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 738, 139781. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139781.
- Ashton, P. M., Nair, S., Dallman, T., Rubino, S., Rabsch, W., Mwaigwisya, S., Wain, J., y O'grady, J. (2015). MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. *Nature Biotechnology*, 33(3), 296-300. doi: 10.1038/nbt.3103.
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T.H., Rasool, M.H., Shahid, A., Xueshan, X., y Baloch, Z. (2021). Antibiotic resistance: one health one world outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 771510. doi: 10.3389/fcimb.2021.771510.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M.A., Alvi, R.F., Aslam, M.A., Qamar, M.U., Salamat, M.K.F., y Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645-1658. doi: 10.2147/IDR.S173867.
- Atherholt, T. B., Procopio, N. A., y Goodrow, S. M. (2017). Seasonality of coliform bacteria detection rates in New Jersey domestic wells. *Ground Water*, 55(3), 346-361. doi: 10.1111/gwat.12482.
- Auerbach, E. A., Seyfried, E. E., y McMahon, K. D. (2007). Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Research*, 41(5), 1143-1151. doi: 10.1016/j.watres.2006.
- Avisar, D., Lester, Y., y Ronen, D. (2009). Sulfamethoxazole contamination of a deep phreatic aquifer. *Science of the Total Environment*, 407(14), 4278-4282. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.03.032.
- Badau, E. (2021). A One Health perspective on the issue of the antibiotic resistance. *Parasite*, 28, 16. doi: 10.1051/parasite/2021006.

- Bajaj, P., Singh, N. S., Kanaujia, P. K., y Viridi, J. S. (2015). Distribution and molecular characterization of genes encoding CTX-M and AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from an Indian urban aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 505, 350-356. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.09.084.
- Ballesteros, B., Pernía, J., García, O., Domínguez, J., Díaz, E., Espinós, T., Rodríguez, T., y Rosado, S. (2009). Análisis de la evolución y el estado de las masas de agua subterránea utilizadas en épocas de sequía en la cuenca del Júcar. Consultado el 14 de abril de 2023. Disponible en: <https://www.chj.es/es-es/medioambiente/gestionsequia/Paginas/InformesdeSeguimiento.aspx>
- Baquero, F., Martínez, J. L., y Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260-265. doi: 10.1016/j.copbio.2008.05.006.
- Baran, A., Kwiatkowska, A., y Potocki, L. (2023). Antibiotics and Bacterial Resistance—A Short Story of an Endless Arms Race. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5777. doi: 10.3390/ijms24065777.
- Baran, W., Adamek, E., Ziemiańska, J., y Sobczak, A. (2011). Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Journal of Hazardous Materials*, 196, 1-15. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.082.
- Barnes, K. K., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Meyer, M. T., y Barber, L. B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—I) Groundwater. *Science of the Total Environment*, 402(2-3), 192-200. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.04.028.
- Bartley, P. S., Domitrovic, T. N., Moretto, V. T., Santos, C. S., Ponce-Terashima, R., Reis, M. G., Barbosa, L.M., Blanton, R.E., Bonomo, R.A., y Perez, F. (2019). Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* from surface waters in urban Brazil highlights the risks of poor sanitation. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(6), 1369-1377. doi: 10.4269/ajtmh.18-0726.
- Baur, B., Hanselmann, K., Schlimme, W., y Jenni, B. (1996). Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3673-3678. doi: 10.1128/aem.62.10.3673-3678.1996.
- Bengtsson-Palme, J., Hammaren, R., Pal, C., Östman, M., Björleinius, B., Flach, C. F., Fick, J., Kristiansson, E., Tysklind, M., y Larsson, D. G. J. (2016). Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics. *Science of the Total Environment*, 572, 697-712. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.228.
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., y Larsson, D. J. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(1), fux053. doi: 10.1093/femsre/fux053.
- Bengtsson-Palme, J., Larsson, D. J., y Kristiansson, E. (2017). Using metagenomics to investigate human and environmental resistomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), 2690-2703. doi: 10.1093/jac/dkx199.

- Bennani, Y., Košutić, K., Dražević, E., y Rožić, M. (2012). Wastewater from wood and pulp industry treated by combination of coagulation, adsorption on modified clinoptilolite tuff and membrane processes. *Environmental Technology*, 33(10-12), 1159-1166. doi: 10.1080/09593330.2011.610828. doi: 10.1080/09593330.2011.610828.
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., y Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 310-317. doi: 10.1038/nrmicro3439.
- Berglund, F., Böhm, M. E., Martinsson, A., Ebmeyer, S., Österlund, T., Johnning, A., Larsson, D.G.J., y Kristiansson, E. (2020). Comprehensive screening of genomic and metagenomic data reveals a large diversity of tetracycline resistance genes. *Microbial Genomics*, 6(11), mgen000455. doi: 10.1099/mgen.0.000455.
- Berglund, F., Marathe, N. P., Österlund, T., Bengtsson-Palme, J., Kotsakis, S., Flach, C. F., Larsson, D.G.J., y Kristiansson, E. (2017). Identification of 76 novel B1 metallo- β -lactamases through large-scale screening of genomic and metagenomic data. *Microbiome*, 5(1), 134. doi: 10.1186/s40168-017-0353-8.
- Bessa, L. J., Barbosa-Vasconcelos, A., Mendes, Â., Vaz-Pires, P., y Martins da Costa, P. (2014). High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in river water, upstream and downstream of a wastewater treatment plant. *Journal of Water and Health*, 12(3), 426-435. doi: 10.2166/wh.2014.160.
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., Barton, H.A., y Wright, G. D. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*, 7(4), e34953. doi: 10.1371/journal.pone.0034953.
- Birošová, L., Mackuľak, T., Bodík, I., Ryba, J., Škubák, J., y Grabic, R. (2014). Pilot study of seasonal occurrence and distribution of antibiotics and drug resistant bacteria in wastewater treatment plants in Slovakia. *Science of the Total Environment*, 490, 440-444. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.030.
- Bischoff, K. M., White, D. G., Hume, M. E., Poole, T. L., y Nisbet, D. J. (2005). The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1), 285-291. doi: 10.1016/j.femsle.2004.12.017.
- Biswal, B. K., Mazza, A., Masson, L., Gehr, R., y Frigon, D. (2014). Impact of wastewater treatment processes on antimicrobial resistance genes and their co-occurrence with virulence genes in *Escherichia coli*. *Water Research*, 50, 245-253. doi: 10.1016/j.watres.2013.11.047.
- Blaak, H., de Kruijf, P., Hamidjaja, R. A., van Hoek, A. H., de Roda Husman, A. M., y Schets, F. M. (2014). Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Veterinary Microbiology*, 171(3-4), 448-459. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.007.

- Blaak, H., Kemper, M. A., de Man, H., van Leuken, J. P., Schijven, J. F., van Passel, M. W., Schmitt, H., y de Roda Husman, A. M. (2021). Nationwide surveillance reveals frequent detection of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Dutch municipal wastewater. *Science of the Total Environment*, 776, 145925. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145925.
- Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R. A., Schets, F. M., y de Roda Husman, A. M. (2015). Multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch surface water and wastewater. *PLoS One*, 10(6), e0127752. doi: 10.1371/journal.pone.0127752.
- Blahna, M. T., Zalewski, C. A., Reuer, J., Kahlmeter, G., Foxman, B., y Marrs, C. F. (2006). The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim–sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4), 666-672. doi: 10.1093/jac/dkl020.
- Bonardi, S. y Pitino, R. (2019). Carbapenemase-producing bacteria in food-producing animals, wildlife and environment: A challenge for human health. *Italian Journal of Food Safety*, 8(2), 7956. doi: 10.4081/ijfs.2019.7956.
- Boxall, A. B., Hardy, A., Beulke, S., Boucard, T., Burgin, L., Falloon, P. D., Haygarth, P.M., Hutchinson, T., Kovats, R.S., Leonardi, G., Levy, L.S., Nichols, G., Parsons, S.A., Potts, L., Stone, D., Topp, E., Turley, D.B., Walsh, K., Wellington, E.M., y Williams, R. J. (2009). Impacts of climate change on indirect human exposure to pathogens and chemicals from agriculture. *Environmental Health Perspectives*, 117(4), 508-514. doi: 10.1289/ehp.0800084.
- Boy-Roura, M., Mas-Pla, J., Petrovic, M., Gros, M., Soler, D., Brusi, D., y Menció, A. (2018). Towards the understanding of antibiotic occurrence and transport in groundwater: Findings from the Baix Fluvià alluvial aquifer (NE Catalonia, Spain). *Science of the Total Environment*, 612, 1387-1406. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.012.
- Bradford, S. A. y Harvey, R. W. (2017). Future research needs involving pathogens in groundwater. *Hydrogeology Journal*, 25(4), 931-938. doi: 10.1007/s10040-016-1501-0.
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., y Karaman, R. (2020). Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, 25(6), 1340. doi: 10.3390/molecules25061340.
- Brody, T. M., Larner, J., Minneman, K. P., y Wecker, L. (2005). *Brody's Human Pharmacology: Molecular to Clinical*. Elsevier Mosby.
- Brolund, A., Lagerqvist, N., Byfors, S., Struelens, M. J., Monnet, D. L., Albiger, B., y Kohlenberg, A. (2019). European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network EURGen-Net Capacity Survey Group. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Euro Surveill*, 24(9), 1900123. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.9.1900123.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., y Mietzner, T. A. (2014). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg-26*. AMGH Editora.
- Brooks, Y. M., Spirito, C. M., Bae, J. S., Hong, A., Mosier, E. M., Sausele, D. J., Fernandez-Baca, C.P., Epstein, J.L., Shapley, D.J., Goodman, L.B., Anderson, R.R., Glaser, A.L., y Richardson, R. E. (2020). Fecal indicator bacteria, fecal source tracking markers, and pathogens detected in two Hudson River tributaries. *Water Research*, 171, 115342. doi: 10.1016/j.watres.2019.115342.

- Brückner, R., Nuhn, M., Reichmann, P., Weber, B., y Hakenbeck, R. (2004). Mosaic genes and mosaic chromosomes—genomic variation in *Streptococcus pneumoniae*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(2-3), 157-168. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.06.019.
- Bryan, A., Shapir, N., y Sadowsky, M. J. (2004). Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2503-2507. doi: 10.1128/AEM.70.4.2503-2507.2004.
- Buelow, E., Rico, A., Gaschet, M., Lourenço, J., Kennedy, S. P., Wiest, L., Ploy, M.C., y Dagot, C. (2020). Hospital discharges in urban sanitation systems: Long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome. *Water Research X*, 7, 100045. doi: 10.1016/j.wroa.2020.100045.
- Burnham, J. P. (2021). Climate change and antibiotic resistance: A deadly combination. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 8, 2049936121991374. doi: 10.1177/2049936121991374.
- Bush, K. y Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976. doi: 10.1128/AAC.01009-09.
- Bush, K., Jacoby, G. A., y Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211-1233. doi: 10.1128/AAC.39.6.1211.
- Cacace, D., Fatta-Kassinos, D., Manaia, C. M., Cytryn, E., Kreuzinger, N., Rizzo, L., Karaolia, P., Schwartz, T., Alexander, J., Merlin, C., Garelick, H., Schmitt, H., de Vries, D., Schwermer, C.U., Meric, S., Ozkal, C.B., Pons, M.N., Kneis, D., y Berendonk, T. U. (2019). Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Research*, 162, 320-330. doi: 10.1016/j.watres.2019.06.039.
- Cahill, N., O'Connor, L., Mahon, B., Varley, Á., McGrath, E., Ryan, P., Cormican, M., Brehony, C., Jolley, K.A., Maiden, M.C., Brisse, S., y Morris, D. (2019). Hospital effluent: A reservoir for carbapenemase-producing *Enterobacterales*?. *Science of the Total Environment*, 672, 618-624. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.428.
- Cantas, L., Shah, S. Q., Cavaco, L. M., Manaia, C. M., Walsh, F., Popowska, M., Garelick, H., Bürgmann, H., y Sørum, H. (2013). A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 4, 96. doi: 10.3389/fmicb.2013.00096.
- Cantón, R., Loza, E., Aznar, J., Castillo, F. J., Cercenado, E., Fraile-Ribot, P. A., González-Romo, F., López-Hontangas, J.L., Rodríguez-Lozano, J., Suárez-Barrenechea, A.I., Tubau, F., Díaz-Regañón, J., y López-Mendoza, D.; SMART-Spain Working Group. (2019). Monitoring the antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms involved in intraabdominal and urinary tract infections recovered during the SMART study (Spain, 2016 and 2017). *Revista Española de Quimioterapia*, 32(2), 145-155.
- Cao, D., Shi, F., Ruan, W., Lu, Z., y Chai, M. (2011). Seasonal changes in and relationship between soil microbial and microfaunal communities in a *Tamarix chinensis* community in the Yellow River Delta. *African Journal of Biotechnology*, 10(80), 18425-18432. doi: 10.5897/AJB11.1911.

- Cardoso, M. R. A., Cousens, S. N., de Góes Siqueira, L. F., Alves, F. M., y D'Angelo, L. A. V. (2004). Crowding: risk factor or protective factor for lower respiratory disease in young children?. *BMC Public Health*, 4, 19. doi: 10.1186/1471-2458-4-19.
- Castanheira, M., Simner, P. J., y Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrobial Resistance*, 3(3), dlab092. doi: 10.1093/jacamr/dlab092.
- Castrignanò, E., Yang, Z., Bade, R., Baz-Lomba, J. A., Castiglioni, S., Causanilles, A., Covaci, A., Gracia-Lor, E., Hernandez, F., Kinyua, J., McCall, A.K., van Nuijs, A.L.N., Ort, C., Plósz, B.G., Ramin, P., Rousis, N.I., Ryu, Y., Thomas, K.V., de Voogt, P., y Kasprzyk-Hordern, B. (2018). Enantiomeric profiling of chiral illicit drugs in a pan-European study. *Water Research*, 130, 151-160. doi: 10.1016/j.watres.2017.11.051.
- Cattoir, V. y Nordmann, P. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Current Medicinal Chemistry*, 16(8), 1028-1046. doi: 10.2174/092986709787581879.
- Cattoir, V., Poirel, L., y Nordmann, P. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(10), 3801-3804. doi: 10.1128/AAC.00638-08.
- Cauci, S., Karkman, A., Cacace, D., Rybicki, M., Timpel, P., Voolaid, V., Gurke, R., Virta, M., y Berendonk, T. U. (2016). Seasonality of antibiotic prescriptions for outpatients and resistance genes in sewers and wastewater treatment plant outflow. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(5), fiw060. doi: 10.1093/femsec/fiw060.
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., y Aarestrup, F. M. (2009). qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 603-608. doi: 10.1128/AAC.00997-08.
- Chakraborty, N., Jha, D., Roy, I., Kumar, P., Gaurav, S. S., Marimuthu, K., Ng, O.T., Lakshminarayanan, R., Verma, N.K., y Gautam, H. K. (2022). Nanobiotics against antimicrobial resistance: Harnessing the power of nanoscale materials and technologies. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 375. doi: 10.1186/s12951-022-01573-9.
- Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., y Hanage, W. P. (2015). Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be?. *Evolutionary Applications*, 8(3), 240-247. doi: 10.1111/eva.12185.
- Chelaghma, W., Loucif, L., Bendahou, M., y Rolain, J. M. (2021). Vegetables and fruit as a reservoir of β -lactam and colistin-resistant Gram-negative bacteria: A Review. *Microorganisms*, 9(12), 2534. doi: 10.3390/microorganisms9122534.
- Chen, J., McIlroy, S. E., Archana, A., Baker, D. M., y Panagiotou, G. (2019a). A pollution gradient contributes to the taxonomic, functional, and resistome diversity of microbial communities in marine sediments. *Microbiome*, 7(1), 104. doi: 10.1186/s40168-019-0714-6.

- Chen, J., Yu, Z., Michel Jr, F. C., Wittum, T., y Morrison, M. (2007). Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4407-4416. doi: 10.1128/AEM.02799-06.
- Chen, Y., Su, J. Q., Zhang, J., Li, P., Chen, H., Zhang, B., Gin, K.Y., y He, Y. (2019b). High-throughput profiling of antibiotic resistance gene dynamic in a drinking water river-reservoir system. *Water Research*, 149, 179-189. doi: 10.1016/j.watres.2018.11.007.
- Chen, Z., Yu, D., He, S., Ye, H., Zhang, L., Wen, Y., Zhang, W., Shu, L., y Chen, S. (2017). Prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in drinking water sources in Hangzhou City. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1133. doi: 10.3389/fmicb.2017.01133.
- Chique, C., Hynds, P., Burke, L. P., Morris, D., Ryan, M. P., y O'Dwyer, J. (2021). Contamination of domestic groundwater systems by verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC), 2003–2019: A global scoping review. *Water Research*, 188, 116496. doi: 10.1016/j.watres.2020.116496.
- Cho, S., Jackson, C. R., y Frye, J. G. (2020). The prevalence and antimicrobial resistance phenotypes of *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Enterococcus sp.* in surface water. *Letters in Applied Microbiology*, 71(1), 3-25. doi: 10.1111/lam.13301.
- Chopra, I., y Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232-260. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2020). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Consultado el 5 de octubre de 2023. Disponible en: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>
- Collignon, P., Beggs, J. J., Walsh, T. R., Gandra, S., y Laxminarayan, R. (2018). Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *The Lancet Planetary Health*, 2(9), e398-e405. doi: 10.1016/S2542-5196(18)30186-4.
- Connor, C. H., Zucoloto, A. Z., Munnoch, J. T., Yu, I. L., Corander, J., Hoskisson, P. A., McDonald, B., y McNally, A. (2023). Multidrug-resistant *E. coli* encoding high genetic diversity in carbohydrate metabolism genes displace commensal *E. coli* from the intestinal tract. *PLoS Biology*, 21(10), e3002329. doi: 10.1371/journal.pbio.3002329.
- Cook, M. A. y Wright, G. D. (2022). The past, present, and future of antibiotics. *Science Translational Medicine*, 14(657), eabo7793. doi: 10.1126/scitranslmed.abo7793.
- Coque, T. M., Novais, Â., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Cantón, R., y Nordmann, P. (2008). Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*, 14(2), 195-200. doi: 10.3201/eid1402.070350.
- Crump, B. C., Kling, G. W., Bahr, M., y Hobbie, J. E. (2003). Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2253-2268. doi: 10.1128/AEM.69.4.2253-2268.2003.

- Cycon, M., Mroziak, A., y Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Front Microbiol* 10, 338. doi: 10.3389/fmicb.2019.00338.
- Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., y Bürgmann, H. (2012). Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Frontiers in Microbiology*, 3, 106. doi: 10.3389/fmicb.2012.00106.
- Czekalski, N., Gascón Díez, E., y Bürgmann, H. (2014). Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *The ISME Journal*, 8(7), 1381-1390. doi: 10.1038/ismej.2014.8.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., y Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457-461. doi: 10.1038/nature10388.
- Da Costa Andrade, V., Del Busso Zampieri, B., Ballesteros, E. R., Pinto, A. B., y Fernandes Cardoso de Oliveira, A. J. (2015). Densities and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from marine waters and beach sands. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(6), 342. doi: 10.1007/s10661-015-4573-8.
- Dang, H., Zhang, X., Song, L., Chang, Y., y Yang, G. (2007). Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2580-2592. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03494.x.
- Dantas, G., Sommer, M. O., Oluwasegun, R. D., y Church, G. M. (2008). Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*, 320(5872), 100-103. doi: 10.1126/science.1155157.
- Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., y Blair, J. M. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 280-295. doi: 10.1038/s41579-022-00820-y.
- Davies, J. y Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.
- Davis, B. C., Keenum, I., Calarco, J., Liguori, K., Milligan, E., Pruden, A., y Harwood, V. J. (2022). Towards the standardization of *Enterococcus* culture methods for waterborne antibiotic resistance monitoring: A critical review of trends across studies. *Water Research X*, 17, 100161. doi: 10.1016/j.wroa.2022.100161.
- De Greeff, S. C. y NethMap, M. J. (2018). Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands/MARAN 2018: Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2017. *RIVM Report*, 46. doi: 10.21945/RIVM-2020-0065.
- De Oliveira, A. J. F. C. y Pinhata, J. M. W. (2008). Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Research*, 42(8-9), 2242-2250. doi: 10.1016/j.watres.2007.12.002.
- De Oliveira, D. M., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D.L., y Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), e00181-19. doi: 10.1128/CMR.00181-19.

- Del Estado, B. O. (1995). Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. *BOE*, 30.
- Del Estado, B. O. (1996). Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. *BOE*, 77.
- Del Estado, B. O. (2003a). Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. *BOE*, 45, 7228-45.
- Del Estado, B. O. (2003b). Resolución del Conseller de Obras Públicas, Urbanismo y Transportes, de 7 de abril, relativa al Pago de la fase previa a la ocupación por la expropiación forzosa de las obras: "Expediente 2000/33. Reutilización de aguas residuales depuradas de la depuradora del Carraixet. Términos municipales de Alboraya, Tavernes Blanques, y Valencia" y "Expediente 2001/22. Abastecimiento de agua potable al Camp de Morvedre: Fase III. La Baronía. Términos municipales de Algar de Palancia, Algimia de Alfara, Alfara de Algimia, Estivella y Torres Torres". *BOE*, 86, 2897-97.
- Del Estado, B. O. (2007a). Real Decreto 1341/2007, de 11 de octubre, sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño. *BOE*, 257.
- Del Estado, B. O. (2007b). Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. *BOE*, 294.
- Deng, W., Li, N., Zheng, H., y Lin, H. (2016). Occurrence and risk assessment of antibiotics in river water in Hong Kong. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 125, 121-127. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.12.002.
- Di Cesare, A., Eckert, E. M., D'Urso, S., Bertoni, R., Gillan, D. C., Wattiez, R., y Corno, G. (2016). Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 94, 208-214. doi: 10.1016/j.watres.2016.02.049.
- Di Cesare, A., Pasquaroli, S., Vignaroli, C., Paroncini, P., Luna, G. M., Manso, E., y Biavasco, F. (2014). The marine environment as a reservoir of *enterococci* carrying resistance and virulence genes strongly associated with clinical strains. *Environmental Microbiology Reports*, 6(2), 184-190. doi: 10.1111/1758-2229.12125.
- Diario Oficial de la Unión Europea. (2013). Decisión de Ejecución (UE) 2013/652 de la Comisión de 12 de noviembre de 2013 sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos. Consultado el 09 de febrero de 2023. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2013/303/L00026-00039.pdf>
- Diario Oficial de la Unión Europea. (2020a). Decisión de ejecución (UE) 2020/1729 de la Comisión de 17 de noviembre de 2020, relativa a la vigilancia y la notificación de la resistencia a los antimicrobianos de las bacterias zoonóticas y comensales y por la que se deroga la Decisión de Ejecución 2013/652/UE de la Comisión. Consultado el 20 de febrero de 2023. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2020/387/L00008-00021.pdf>
- Diario Oficial de la Unión Europea. (2020b). Reglamento (UE) 2020/741 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de mayo de 2020, relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua. Consultado el 20 de febrero de 2023. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2020/177/L00032-00055.pdf>

- Diehl, D. L. y LaPara, T. M. (2010). Effect of temperature on the fate of genes encoding tetracycline resistance and the integrase of class 1 integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids. *Environmental Science and Technology*, 44(23), 9128-9133. doi: 10.1021/es102765a.
- Directiva 91/271/CEE. (2003). Directiva 91/271/CEE, Sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. Consultado el 3 de octubre de 2023. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/content/dam/mitesco/es/agua/publicaciones/03_Manual_Directiva_91_271_CEE_tcm30-214069.pdf
- Divyashree, M., Mani, M. K., Shama Prakash, K., Vijaya Kumar, D., Veena Shetty, A., Shetty, A. K., y Karunasagar, I. (2020). Hospital wastewater treatment reduces NDM-positive bacteria being discharged into water bodies. *Water Environment Research*, 92(4), 562-568. doi: 10.1002/wer.1248.
- Dodd, M. C., y Huang, C. H. (2007). Aqueous chlorination of the antibacterial agent trimethoprim: reaction kinetics and pathways. *Water Research*, 41(3), 647-655. doi: 10.1016/j.watres.2006.10.029.
- Dong, P., Wang, H., Fang, T., Wang, Y., y Ye, Q. (2019). Assessment of extracellular antibiotic resistance genes (eARGs) in typical environmental samples and the transforming ability of eARG. *Environment International*, 125, 90-96. doi: 10.1016/j.envint.2019.01.050.
- Dungan, R. S. y Bjerneberg, D. L. (2021). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and *Enterococcal* isolates from irrigation return flows in a high-desert watershed. *Frontiers in Microbiology*, 12, 660697. doi: 10.3389/fmicb.2021.660697.
- Dungan, R. S., McKinney, C. W., y Leytem, A. B. (2018). Tracking antibiotic resistance genes in soil irrigated with dairy wastewater. *Science of the Total Environment*, 635, 1477-1483. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.020.
- Durand, G. A., Raoult, D., y Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(4), 371-382. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010.
- Dussart-Baptista, L., Bodilis, J., Barray, S., Frébourg, N., Fournier, M., Dupont, J. P., y Jouenne, T. (2007). Recurrent recovery of *Pseudomonas oryzihabitans* strains in a karstified chalk aquifer. *Water Research*, 41(1), 111-117. doi: 10.1016/j.watres.2006.10.007.
- Dussart-Baptista, L., Massei, N., Dupont, J. P., y Jouenne, T. (2003). Transfer of bacteria-contaminated particles in a karst aquifer: evolution of contaminated materials from a sinkhole to a spring. *Journal of Hydrology*, 284, 285-295. doi: 10.1016/j.jhydrol.2003.08.007.
- Echapare, E. O., Pacala, F. A. A., Mendaño, R. V., y Araza, J. B. (2019). Physico-chemical and microbial analysis of water in Samar mussel farms. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 45(3), 225-230. doi: 10.1016/j.ejar.2019.05.007.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal*, 9(8), 2322.

- Eftim, S. E., Hong, T., Soller, J., Boehm, A., Warren, I., Ichida, A., y Nappier, S. P. (2017). Occurrence of norovirus in raw sewage—a systematic literature review and meta-analysis. *Water Research*, *111*, 366-374. doi: 10.1016/j.watres.2017.01.017.
- Egervärn, M., Englund, S., Ljunge, M., Wiberg, C., Finn, M., Lindblad, M., y Börjesson, S. (2017). Unexpected common occurrence of transferable extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in Swedish surface waters used for drinking water supply. *Science of the Total Environment*, *587-588*, 466-472. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.157.
- Emery, C. L. y Weymouth, L. A. (1997). Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(8), 2061-2067. doi: 10.1128/jcm.35.8.2061-2067.1997.
- Enayati, M., Sadeghi, J., Nahaei, M. R., Aghazadeh, M., Pourshafie, M. R., y Talebi, M. (2015). Virulence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* isolated from water samples. *Letters in Applied Microbiology*, *61*(4), 339-345. doi: 10.1111/lam.12474.
- Entitat de Sanejament d'Aigües (EPSAR). (2017). Consultado el 3 de marzo de 2017 y el 28 de septiembre de 2023. Disponible en: <https://www.epsar.gva.es/index.php/>
- EPA, U. (2002). Method 1603: *Escherichia coli* (*E. coli*) in water by membrane filtration using modified membrane-thermotolerant *Escherichia coli* agar (modified mTEC). *United States Environmental Protection Agency Office of Water*, Washington, DC. https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/method_1603_2009.pdf
- EUCAST, 2009. European Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency. ECDC/EMA Joint Technical Report: The Bacterial Challenge: Time to React. *European Centre for Disease Prevention and Control and European Medicines Agency*, Stockholm, Sweden and London, United Kingdom. Consultado el 3 de octubre de 2023. Disponible en: <http://www.eucast.org>
- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. (2019). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2018. Consultado el 26 de septiembre de 2023. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2015). Antimicrobial consumption interactive database (ESAC-Net). Consultado el 27 de septiembre de 2023. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial-resistance-and-consumption>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2021a). Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net)—annual epidemiological report 2020. *ECDC*, Stockholm. Consultado el 5 de octubre de 2023. Disponible en: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ESAC-Net_AER_2021_final_rev.pdf
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2021b). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net)—annual epidemiological report 2020. *ECDC*, Stockholm. Consultado el 7 de octubre de 2023. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-eueea-ears-net-annual-epidemiological-report-2020>

- European Commission. A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). *European Commission*, 2017. Consultado el 19 de febrero de 2023. Disponible en: https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf
- European Environment Agency (EEA). (2018). Environmental pressures of heavy metal releases from Europe's industry. Consultado el 25 de febrero de 2023. Disponible en: <https://www.eea.europa.eu/publications/environmental-pressures-of-heavy-metal>
- European Food Safety Authority (EFSA), Aerts, M., Battisti, A., Hendriksen, R., Kempf, I., Teale, C., Tenhagen, B.A., Veldman, K., Wasyl, D., Guerra, B., Liébana, E., Thomas-López, D., y Belœil, P. A. (2019). Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food. *EFSA Journal*, 17(6), e05709. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5709.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2008). Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. *EFSA Journal*, 6(4), 141. doi: 10.2903/j.efsa.2008.141r
- European Food Safety Authority y European Centre for Disease Prevention and Control. (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. Consultado el 14 de octubre de 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- European Food Safety Authority y European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA Journal*, 19(4), e06490. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6490.
- Evans, D. R., Griffith, M. P., Sundermann, A. J., Shutt, K. A., Saul, M. I., Mustapha, M. M., Marsh, J.W., Cooper, V.S., Harrison, L.H., y Van Tyne, D. (2020). Systematic detection of horizontal gene transfer across genera among multidrug-resistant bacteria in a single hospital. *Elife*, 9, e53886. doi: 10.7554/eLife.53886.
- Fahrenfeld, N., Ma, Y., O'Brien, M., y Pruden, A. (2013). Reclaimed water as a reservoir of antibiotic resistance genes: distribution system and irrigation implications. *Frontiers in Microbiology*, 4, 130. doi: 10.3389/fmicb.2013.00130.
- Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Donner, E., y Zhang, T. (2020). Challenges related to antimicrobial resistance in the framework of urban wastewater reuse. *Water Research*, 170, 115308. doi: 10.1016/j.watres.2019.115308.
- Fernando, D. M., Tun, H. M., Poole, J., Patidar, R., Li, R., Mi, R., Amarawansa, G.E.A., Fernando, W.G.D., Khafipour, E., Farenhorst, A., y Kumar, A. (2016). Detection of antibiotic resistance genes in source and drinking water samples from a first nations community in Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(15), 4767-4775. doi: 10.1128/AEM.00798-16.
- Ferreira da Silva, M., Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Nunes, O. C., y Manaia, C. M. (2007). Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(1), 166-176. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00268.x.

- Flach, C. F., Genheden, M., Fick, J., y Joakim Larsson, D. G. (2018). A comprehensive screening of *Escherichia coli* isolates from Scandinavia's largest sewage treatment plant indicates no selection for antibiotic resistance. *Environmental Science and Technology*, 52(19), 11419-11428. doi: 10.1021/acs.est.8b03354.
- Fletcher, S. (2015). Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 20(4), 243-252. doi: 10.1007/s12199-015-0468-0.
- Flores Ribeiro, A., Laroche, E., Hanin, G., Fournier, M., Quillet, L., Dupont, J. P., y Pawlak, B. (2012). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in karstic systems: a biological indicator of the origin of fecal contamination?. *FEMS Microbiology Ecology*, 81(1), 267-280. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01382.x.
- Food and Agricultural Organization (FAO), World Health Organization (WHO), Joint FAO/WHO Expert Meeting in Collaboration with OIE on Foodborne Antimicrobial Resistance: Role of the Environment, Crops and Biocides. *FAO and WHO*; Rome, Italy: 2019. Consultado el 10 de octubre de 2023. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241516907>
- Food and Drug Administration (FDA). (2018). FDA approves a new antibacterial drug to treat a serious lung disease using a novel pathway to spur innovation. Consultado el 15 de septiembre de 2023. Disponible en: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-antibacterial-drug-treat-serious-lung-disease-using-novel-pathway-spur-innovation>
- Forsberg, K. J., Patel, S., Gibson, M. K., Lauber, C. L., Knight, R., Fierer, N., y Dantas, G. (2014). Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature*, 509(7502), 612-616. doi: 10.1038/nature13377.
- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O., y Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337(6098), 1107-1111. doi: 10.1126/science.1220761.
- Francine, P. (2022). Systems Biology: New Insight into Antibiotic Resistance. *Microorganisms*, 10(12), 2362. doi: 10.3390/microorganisms10122362.
- Freeman, C. N., Scriver, L., Neudorf, K. D., Truelstrup Hansen, L., Jamieson, R. C., y Yost, C. K. (2018). Antimicrobial resistance gene surveillance in the receiving waters of an upgraded wastewater treatment plant. *Facets*, 3(1), 128-138. doi: 10.1139/facets-2017-0085.
- Gajdács, M. y Albericio, F. (2019). Antibiotic resistance: from the bench to patients. *Antibiotics (Basel)*, 8(3), 129. doi: 10.3390/antibiotics8030129.
- Galvin, S., Boyle, F., Hickey, P., Vellinga, A., Morris, D., y Cormican, M. (2010). Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4772-4779. doi: 10.1128/AEM.02898-09.
- Gambino, D., Savoca, D., Sucato, A., Gargano, V., Gentile, A., Pantano, L., Vicari, D., y Alduina, R. (2022). Occurrence of Antibiotic Resistance in the Mediterranean Sea. *Antibiotics (Basel)*, 11(3), 332. doi: 10.3390/antibiotics11030332.

- Gao, P., He, S., Huang, S., Li, K., Liu, Z., Xue, G., y Sun, W. (2015). Impacts of coexisting antibiotics, antibacterial residues, and heavy metals on the occurrence of erythromycin resistance genes in urban wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(9), 3971-3980. doi: 10.1007/s00253-015-6404-9.
- Gao, P., Mao, D., Luo, Y., Wang, L., Xu, B., y Xu, L. (2012). Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Research*, 46(7), 2355-2364. doi: 10.1016/j.watres.2012.02.004.
- García-Cobos, S., Campos, J., Cercenado, E., Román, F., Lázaro, E., Pérez-Vázquez, M., de Abajo, F., y Oteo, J. (2008). Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae* decreased, except for β -lactamase-negative amoxicillin-resistant isolates, in parallel with community antibiotic consumption in Spain from 1997 to 2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2760-2766. doi: 10.1128/AAC.01674-07.
- García-Sánchez, J. E., García, E., y Merino, M. L. (2010). Cien años de la bala mágica del Dr. Ehrlich (1909–2009). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(8), 521-533. doi: 10.1016/j.eimc.2009.07.009.
- Gaynes, R. (2017). The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 849-853. doi: 10.3201/eid2305.161556.
- Gaze, W. H., Abdousslam, N., Hawkey, P. M., y Wellington, E. M. H. (2005). Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1802-1807. doi: 10.1128/AAC.49.5.1802-1807.2005.
- Gekenidis, M. T., Qi, W., Hummerjohann, J., Zbinden, R., Walsh, F., y 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. doi: 10.1371/journal.pone.0207857.
- Gelband, H., Miller, Petrie, M., Pant, S., Gandra, S., Levinson, J., Barter, D., White, A., y Laxminarayan, R. (2015). The state of the world's antibiotics 2015. *Wound Healing Southern Africa*, 8(2), 30-34.
- George, I., Crop, P., y Servais, P. (2002). Fecal coliform removal in wastewater treatment plants studied by plate counts and enzymatic methods. *Water Research*, 36(10), 2607-2617. doi: 10.1016/s0043-1354(01)00475-4.
- Ghosh, S., Ramsden, S. J., y LaPara, T. M. (2009). The role of anaerobic digestion in controlling the release of tetracycline resistance genes and class 1 integrons from municipal wastewater treatment plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(4), 791-796. doi: 10.1007/s00253-009-2125-2.
- Gilbert, W., Thomas, L. F., Coyne, L., y Rushton, J. (2021). Mitigating the risks posed by intensification in livestock production: the examples of antimicrobial resistance and zoonoses. *Animal*, 15(2), 100123. doi: 10.1016/j.animal.2020.100123.
- Gillings, M. R. (2017). Lateral gene transfer, bacterial genome evolution, and the Anthropocene. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1389(1), 20-36. doi: 10.1111/nyas.13213.

- Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., y Zhu, Y. G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal*, 9(6), 1269-1279. doi: 10.1038/ismej.2014.226.
- Góchez, D., Raicek, M., Pinto Ferreira, J., Jeannin, M., Moulin, G., y Erlacher-Vindel, E. (2019). OIE annual report on antimicrobial agents intended for use in animals: methods used. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 317. doi: 10.3389/fvets.2019.00317.
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V. K., Chaminda, G. T., An, A. K., y Kumar, M. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: a review. *Groundwater for Sustainable Development*, 6, 169-180. doi: 10.1016/j.gsd.2017.12.009.
- Golkar, Z., Bagasra, O., y Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(2), 129-136. doi: 10.3855/jidc.3573.
- Gomes Freitas, D., Silva, R. D. R., Bataus, L. A. M., Barbosa, M. S., da Silva Bitencourt Braga, C. A., y Carneiro, L. C. (2017). Bacteriological water quality in school's drinking fountains and detection antibiotic resistance genes. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1), 5. doi: 10.1186/s12941-016-0176-7.
- Gomes, C., Martínez-Puchol, S., Palma, N., Horna, G., Ruiz-Roldán, L., Pons, M. J., y Ruiz, J. (2017). Macrolide resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*: focus on azithromycin. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(1), 1-30. doi: 10.3109/1040841X.2015.1136261.
- Goshu, G., Koelmans, A. A., y de Klein, J. J. M. (2021). Performance of faecal indicator bacteria, microbial source tracking, and pollution risk mapping in tropical water. *Environmental Pollution*, 276, 116693. doi: 10.1016/j.envpol.2021.116693.
- Grossman, T. H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4), a025387. doi: 10.1101/cshperspect.a025387.
- Gruger, T., Nitiss, J. L., Maxwell, A., Zechiedrich, E. L., Heisig, P., Seeber, S., Pommier, Y., y Strumberg, D. (2004). A mutation in *Escherichia coli* DNA gyrase conferring quinolone resistance results in sensitivity to drugs targeting eukaryotic topoisomerase II. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), 4495-4504. doi: 10.1128/AAC.48.12.4495-4504.2004.
- Gu, C., y Karthikeyan, K. G. (2008). Sorption of the antibiotic tetracycline to humic-mineral complexes. *Journal of Environmental Quality*, 37(2), 704-711. doi: 10.2134/jeq2007.0030.
- Guchi, E. (2015). Review on slow sand filtration in removing microbial contamination and particles from drinking water. *American Journal of Food and Nutrition*, 3(2), 47-55. doi: 10.12691/ajfn-3-2-3.
- Guillaume, G., Verbrugge, D., Chasseur-Libotte, M. L., Moens, W., y Collard, J. M. (2000). PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella* enterica serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. *FEMS Microbiology Ecology*, 32(1), 77-85. doi: 10.1111/j.1574-6941.2000.tb00701.x.

- Gulkowska, A., Leung, H. W., So, M. K., Taniyasu, S., Yamashita, N., Yeung, L. W., Richardson, B.J., Lei, A.P., Giesy, J.P., y Lam, P. K. (2008). Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. *Water Research*, 42(1-2), 395-403. doi: 10.1016/j.watres.2007.07.031.
- Guo, J., Li, J., Chen, H., Bond, P. L., y Yuan, Z. (2017). Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Research*, 123, 468-478. doi: 10.1016/j.watres.2017.07.002.
- Guo, M. T. y Kong, C. (2019). Antibiotic resistant bacteria survived from UV disinfection: Safety concerns on genes dissemination. *Chemosphere*, 224, 827-832. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.004.
- Gupta, S. K., Shin, H., Han, D., Hur, H. G., y Unno, T. (2018). Metagenomic analysis reveals the prevalence and persistence of antibiotic-and heavy metal-resistance genes in wastewater treatment plant. *Journal of Microbiology*, 56(6), 408-415. doi: 10.1007/s12275-018-8195-z.
- Guruge, K. S., Tamamura, Y. A., Goswami, P., Tanoue, R., Jinadasa, K. B. S. N., Nomiya, K., Ohura, T., Kunisue, T., Tanabe, S., y Akiba, M. (2021). The association between antimicrobials and the antimicrobial-resistant phenotypes and resistance genes of *Escherichia coli* isolated from hospital wastewaters and adjacent surface waters in Sri Lanka. *Chemosphere*, 279, 130591. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.130591.
- Guzman Prieto, A. M., van Schaik, W., Rogers, M. R., Coque, T. M., Baquero, F., Corander, J., y Willems, R. J. (2016). Global emergence and dissemination of *enterococci* as nosocomial pathogens: attack of the clones?. *Frontiers in Microbiology*, 7, 788. doi: 10.3389/fmicb.2016.00788.
- Gwenzi, W., Musiyiwa, K., y Mangori, L. (2020). Sources, behaviour and health risks of antimicrobial resistance genes in wastewaters: a hotspot reservoir. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 102220. doi: 10.1016/j.jece.2018.02.028.
- Gyles, C. (2016). One medicine, one health, one world. *The Canadian Veterinary Journal*, 57(4), 345-346.
- Haas, L. F. (1999). Papyrus of Ebers and Smith. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 67(5), 578. doi: 10.1136/jnnp.67.5.578.
- Hall, J. P., Williams, D., Paterson, S., Harrison, E., y Brockhurst, M. A. (2017). Positive selection inhibits gene mobilization and transfer in soil bacterial communities. *Nature Ecology and Evolution*, 1(9), 1348-1353. doi: 10.1038/s41559-017-0250-3.
- Ham, Y. S., Kobori, H., Kang, J. H., Matsuzaki, T., Iino, M., y Nomura, H. (2012). Distribution of antibiotic resistance in urban watershed in Japan. *Environmental Pollution*, 162, 98-103. doi: 10.1016/j.envpol.2011.11.002.
- Hammerum, A. M. y Heuer, O. E. (2009). Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*, 48(7), 916-921. doi: 10.1086/597292.
- Han, X. M., Hu, H. W., Shi, X. Z., Wang, J. T., Han, L. L., Chen, D., y He, J. Z. (2016). Impacts of reclaimed water irrigation on soil antibiotic resistome in urban parks of Victoria, Australia. *Environmental Pollution*, 211, 48-57. doi: 10.1016/j.envpol.2015.12.033.

- Hara, H., Yusaimi, Y. A., Zulkeflee, S. N. M., Sugiura, N., Iwamoto, K., Goto, M., Utsumi, M., Othman, N.B., y Zakaria, Z. (2018). Molecular characterization of multi-drug resistant *Escherichia coli* isolates from tropical environments in Southeast Asia. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 64(6), 284-292. doi: 10.2323/jgam.2018.02.003.
- Harnisz, M., Gołaś, I., y Pietruk, M. (2011). Tetracycline-resistant bacteria as indicators of antimicrobial resistance in protected waters—The example of the Drwęca River Nature Reserve (Poland). *Ecological Indicators*, 11(2), 663-668. doi: 10.1016/j.ecolind.2010.09.005.
- Hassell, J. M., Begon, M., Ward, M. J., y Fèvre, E. M. (2017). Urbanization and disease emergence: dynamics at the wildlife–livestock–human interface. *Trends in Ecology and Evolution*, 32(1), 55-67. doi: 10.1016/j.tree.2016.09.012.
- Hatosy, S. M. y Martiny, A. C. (2015). The ocean as a global reservoir of antibiotic resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(21), 7593-7599. doi: 10.1128/AEM.00736-15.
- Haugland, R. A., Siefring, S. C., Wymer, L. J., Brenner, K. P., y Dufour, A. P. (2005). Comparison of *Enterococcus* measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. *Water Research*, 39(4), 559-568. doi: 10.1016/j.watres.2004.11.011.
- Havenga, B., Ndlovu, T., Clements, T., Reyneke, B., Waso, M., y Khan, W. (2019). Exploring the antimicrobial resistance profiles of WHO critical priority list bacterial strains. *BMC Microbiology*, 19(1), 303. doi: 10.1186/s12866-019-1687-0.
- He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R., y Alvarez, P. J. (2020). Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment. *NPJ Clean Water*, 3(1), 4. doi: 10.1038/s41545-020-0051-0.
- Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E. T., y Schwartz, T. (2017). Occurrence of the mcr-1 colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1282. doi: 10.3389/fmicb.2017.01282.
- Hemmati, F., Salehi, R., Ghotaslou, R., Samadi Kafil, H., Hasani, A., Gholizadeh, P., Nouri, R., y Ahangarzadeh Rezaee, M. (2020). Quorum quenching: A potential target for antipseudomonal therapy. *Infection and Drug Resistance*, 13, 2989-3005. doi: 10.2147/IDR.S263196.
- Hendrickx, L., Hausner, M., y Wuertz, S. (2003). Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter sp.* strain BD413 biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1721-1727. doi: 10.1128/AEM.69.3.1721-1727.2003.
- Hendriksen, R. S., Munk, P., Njage, P., Van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., Röder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S.K., Kjeldgaard, J., Kaas, R.S., Clausen, P.T.L.C., Vogt, J.K., Leekitcharoenphon, P., van de Schans, M.G.M., Zuidema, T., de Roda Husman, A.M., Rasmussen, S., Petersen, B., ... y Aarestrup, F. M. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications*, 10(1), 1124. doi: 10.1038/s41467-019-08853-3.

- Henriot, C. P., Martak, D., Genet, S., Bornette, G., y Hocquet, D. (2022). Origin, fluxes, and reservoirs of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* in aquatic ecosystems of a French floodplain. *Science of the Total Environment*, 834, 155353. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155353.
- Henriques, I. S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M. J., y Correia, A. (2006). Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Research in Microbiology*, 157(10), 938-947. doi: 10.1016/j.resmic.2006.09.003.
- Hernández, A., Sánchez, M. B., y Martínez, J. L. (2011). Quinolone resistance: much more than predicted. *Frontiers in Microbiology*, 2, 22. doi: 10.3389/fmicb.2011.00022.
- Hernández, F., Calisto-Ulloa, N., Gómez-Fuentes, C., Gómez, M., Ferrer, J., González-Rocha, G., Bello-Toledo, H., Botero-Coy, A.M., Boix, C., Ibáñez, M., y Montory, M. (2019). Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic. *Journal of Hazard Materials*, 363, 447-456. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.07.027.
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., y Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*, 4(9), 1432-1442. doi: 10.1038/s41564-019-0503-9.
- Herrig, I., Fleischmann, S., Regnery, J., Wesp, J., Reifferscheid, G., y Manz, W. (2020). Prevalence and seasonal dynamics of bla CTX-M antibiotic resistance genes and fecal indicator organisms in the lower Lahn River, Germany. *PLoS One*, 15(4), e0232289. doi: 10.1371/journal.pone.0232289.
- Hijnen, W. A., Schijven, J. F., Bonne, P., Visser, A., y Medema, G. J. (2004). Elimination of viruses, bacteria and protozoan oocysts by slow sand filtration. *Water Science and Technology*, 50(1), 147-154. doi: 10.2166/wst.2004.0044.
- Hiller, C. X., Hübner, U., Fajnorova, S., Schwartz, T., y Drewes, J. E. (2019). Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review. *Science of the Total Environment*, 685, 596-608. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.315.
- Ho, J. Y., Jong, M. C., Acharya, K., Liew, S. S. X., Smith, D. R., Noor, Z. Z., Goodson, M.L., Werner, D., Graham, D.W., y Eswaran, J. (2021). Multidrug-resistant bacteria and microbial communities in a river estuary with fragmented suburban waste management. *Journal of Hazard Materials*, 405, 124687. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124687.
- Hocquet, D., Muller, A., y Bertrand, X. (2016). What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *Journal of Hospital Infection*, 93(4), 395-402. doi: 10.1016/j.jhin.2016.01.010.
- Holcomb, D. A. y Stewart, J. R. (2020). Microbial indicators of fecal pollution: recent progress and challenges in assessing water quality. *Current Environmental Health Reports*, 7(3), 311-324. doi: 10.1007/s40572-020-00278-1.
- Hollenbeck, B. L. y Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *enterococcus*. *Virulence*, 3(5), 421-433. doi: 10.4161/viru.21282.

- Hooban, B., Joyce, A., Fitzhenry, K., Chique, C., y Morris, D. (2020). The role of the natural aquatic environment in the dissemination of extended spectrum beta-lactamase and carbapenemase encoding genes: A scoping review. *Water Research*, 180, 115880. doi: 10.1016/j.watres.2020.115880.
- Hsu, B. B., Gibson, T. E., Yeliseyev, V., Liu, Q., Lyon, L., Bry, L., Silver, P.A., y Gerber, G. K. (2019). Dynamic modulation of the gut microbiota and metabolome by bacteriophages in a mouse model. *Cell Host and Microbe*, 25(6), 803-814. doi: 10.1016/j.chom.2019.05.001.
- Hsu, L. Y., Apisarnthanarak, A., Khan, E., Suwantararat, N., Ghafur, A., y Tambyah, P. A. (2017). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Enterobacteriaceae* in south and southeast Asia. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), 1-22. doi: 10.1128/CMR.masthead.30-1.
- Hu, J., Shi, J., Chang, H., Li, D., Yang, M., y Kamagata, Y. (2008). Phenotyping and genotyping of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from a natural river basin. *Environmental Science and Technology*, 42(9), 3415-3420. doi: 10.1021/es7026746.
- Hua, J., An, P., Winter, J., y Gallert, C. (2003). Elimination of COD, microorganisms and pharmaceuticals from sewage by trickling through sandy soil below leaking sewers. *Water Research*, 37(18), 4395-4404. doi: 10.1016/S0043-1354(03)00334-8.
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., y Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, 21(12), e51034. doi: 10.15252/embr.202051034.
- Huijbers, P. M., Flach, C. F., y Larsson, D. J. (2019). A conceptual framework for the environmental surveillance of antibiotics and antibiotic resistance. *Environment International*, 130, 104880. doi: 10.1016/j.envint.2019.05.074.
- Huijbers, P. M., Larsson, D. J., y Flach, C. F. (2020). Surveillance of antibiotic resistant *Escherichia coli* in human populations through urban wastewater in ten European countries. *Environmental Pollution*, 261, 114200. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114200.
- Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G., y Sköld, O. J. A. A. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(2), 279-289. doi: 10.1128/AAC.39.2.279.
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., y Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- Hutinel, M., Huijbers, P. M. C., Fick, J., Åhrén, C., Larsson, D. G. J., y Flach, C. F. (2019). Population-level surveillance of antibiotic resistance in *Escherichia coli* through sewage analysis. *Euro Surveillance*, 24(37), 1800497. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.37.1800497.
- Hynds, P. D., Misstear, B. D., y Gill, L. W. (2012). Development of a microbial contamination susceptibility model for private domestic groundwater sources. *Water Resources Research*, 48(12). doi: 10.1029/2012WR012492.
- Hynds, P., Misstear, B. D., Gill, L. W., y Murphy, H. M. (2014). Groundwater source contamination mechanisms: physicochemical profile clustering, risk factor analysis and multivariate modelling. *Journal of Contaminant Hydrology*, 159, 47-56. doi: 10.1016/j.jconhyd.2014.02.001.

- Iannelli, F., Santoro, F., Oggioni, M. R., y Pozzi, G. (2014). Nucleotide sequence analysis of integrative conjugative element Tn 5253 of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 1235-1239. doi: 10.1128/AAC.01764-13.
- Ibekwe, A. M., Murinda, S. E., y Graves, A. K. (2011). Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from human and animal sources uncovers multiple resistances from human sources. *PLoS One*, 6(6), e20819. doi: 10.1371/journal.pone.0020819.
- IDEXX Laboratories, Microbiology guide to interpreting minimum inhibitory concentration (MIC). (2019). Consultado el 4 de octubre de 2023. Disponible en: <https://www.idexx.dk/files/microbiology-guide-interpreting-mic-nordics.pdf>
- Informe Anual del PRAN 2019-2020. (2021a). Consultado el 28 de febrero de 2023. Disponible en: https://www.resistenciaantibioticos.es/sites/default/files/2022-04/informe_anual_pran_2019_2020_0.pdf
- Iskandar, K., Molinier, L., Hallit, S., Sartelli, M., Catena, F., Coccolini, F., Hardcastle, T.C., Roques, C., y Salameh, P. (2020). Drivers of antibiotic resistance transmission in low-and middle-income countries from a “one health” perspective—a review. *Antibiotics (Basel)*, 9(7), 372. doi: 10.3390/antibiotics9070372.
- ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media. Consultado el 4 de abril de 2017. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/53610.html>
- ISO 20776-1: 2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Consultado el 6 de abril de 2017. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/41630.html>
- ISO 7899-2:2001. Water quality. Detection and enumeration of intestinal *enterococci*. Part 2: Membrane filtration method. Consultado el 8 de abril de 2017. Disponible en: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0024730>
- ISO 9308-1:2014. Water quality. Enumeration of *Escherichia coli* and *coliform* bacteria. Part 1: Membrane filtration method for water with low bacterial background flora. Consultado el 8 de abril de 2017. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/55832.html>
- ISO 9308-2: 2012 Water quality – Enumeration of *Escherichia coli* and *coliform* bacteria – Part 2: Most probable number method. Consultado el 9 de abril de 2017. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/52246.html>
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161-182. doi: 10.1128/CMR.00036-08.
- Jaen-Luchoro, D., Karlsson, R., Busquets, A., Piñeiro-Iglesias, B., Karami, N., Marathe, N. P., y Moore, E. R. (2023). Knockout of Targeted Plasmid-Borne β -Lactamase Genes in an Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strain: Impact on Resistance and Proteomic Profile. *Microbiology Spectrum*, 11(1), e0386722. doi: 10.1128/spectrum.03867-22.

- Jäger, T., Hembach, N., Elpers, C., Wieland, A., Alexander, J., Hiller, C., Krauter, G., y Schwartz, T. (2018). Reduction of antibiotic resistant bacteria during conventional and advanced wastewater treatment, and the disseminated loads released to the environment. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2599. doi: 10.3389/fmicb.2018.02599.
- Jelić, D. y Antolović, R. (2016). From erythromycin to azithromycin and new potential ribosome-binding antimicrobials. *Antibiotics (Basel)*, 5(3), 29. doi: 10.3390/antibiotics5030029.
- Ji, X., Shen, Q., Liu, F., Ma, J., Xu, G., Wang, Y., y Wu, M. (2012). Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China. *Journal of Hazard Materials*, 235-236, 178-185. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.07.040.
- Jia, J., Guan, Y., Cheng, M., Chen, H., He, J., Wang, S., y Wang, Z. (2018). Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistance genes in Ba River, China. *Science of the Total Environment*, 642, 1136-1144. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.149.
- Jiang, L., Hu, X., Xu, T., Zhang, H., Sheng, D., y Yin, D. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *Science of the Total Environment*, 458-460, 267-272. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.038.
- Jiao, Y. N., Zhou, Z. C., Chen, T., Wei, Y. Y., Zheng, J., Gao, R. X., y Chen, H. (2018). Biomarkers of antibiotic resistance genes during seasonal changes in wastewater treatment systems. *Environmental Pollution*, 234, 79-87. doi: 10.1016/j.envpol.2017.11.048.
- Jimenez, C. E. P., Keestra, S., Tandon, P., Cumming, O., Pickering, A. J., Moodley, A., y Chandler, C. I. (2023). Biosecurity and water, sanitation, and hygiene (WASH) interventions in animal agricultural settings for reducing infection burden, antibiotic use, and antibiotic resistance: a One Health systematic review. *The Lancet Planet Health*, 7(5), e418-e434. doi: 10.1016/S2542-5196(23)00049-9.
- Jiménez-Belenguer, A. I., Ferrús, M. A., Hernández, M., García-Hernández, J., Moreno, Y., 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 (Basel)*, 12(2), 387. doi: 10.3390/antibiotics12020387.
- Joseph, S. M., Battaglia, T., Maritz, J. M., Carlton, J. M., y Blaser, M. J. (2019). Longitudinal comparison of bacterial diversity and antibiotic resistance genes in New York City sewage. *mSystems*, 4(4), e00327-19. doi: 10.1128/mSystems.00327-19.
- Jubeh, B., Breijyeh, Z., y Karaman, R. (2020). Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*, 25(12), 2888. doi: 10.3390/molecules25122888.
- Jurado, A., Bofill-Mas, S., Vázquez-Suñé, E., Pujades, E., Girones, R., y Rusiñol, M. (2019a). Occurrence of pathogens in the river-groundwater interface in a losing river stretch (Besòs River Delta, Spain). *Science of the Total Environment*, 696, 134028. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134028.

- Jurado, A., Walther, M., y Díaz-Cruz, M. S. (2019b). Occurrence, fate and environmental risk assessment of the organic microcontaminants included in the Watch Lists set by EU Decisions 2015/495 and 2018/840 in the groundwater of Spain. *Science of the Total Environment*, 663, 285-296. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.270.
- Kahrilas, G. A., Blotevogel, J., Stewart, P. S., y Borch, T. (2015). Biocides in hydraulic fracturing fluids: a critical review of their usage, mobility, degradation, and toxicity. *Environmental Science and Technology*, 49(1), 16-32. doi: 10.1021/es503724k.
- Kakoullis, L., Papachristodoulou, E., Chra, P., y Panos, G. (2021). Mechanisms of antibiotic resistance in important gram-positive and gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. *Antibiotics (Basel)*, 10(4), 415. doi: 10.3390/antibiotics10040415.
- Kampouris, I. D., Klümper, U., Agrawal, S., Orschler, L., Cacace, D., Kunze, S., y Berendonk, T. U. (2021). Treated wastewater irrigation promotes the spread of antibiotic resistance into subsoil pore-water. *Environment International*, 146, 106190. doi: 10.1016/j.envint.2020.106190.
- Karam, G., Chastre, J., Wilcox, M. H., y Vincent, J. L. (2016). Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Critical Care*, 20(1), 136. doi: 10.1186/s13054-016-1320-7.
- Karkman, A., Berglund, F., Flach, C. F., Kristiansson, E., y Larsson, D. J. (2020). Predicting clinical resistance prevalence using sewage metagenomic data. *Communications Biology*, 3(1), 711. doi: 10.1038/s42003-020-01439-6.
- Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F., y Virta, M. P. (2018). Antibiotic-resistance genes in waste water. *Trends in Microbiology*, 26(3), 220-228. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.005.
- Karkman, A., Johnson, T. A., Lyra, C., Stedtfeld, R. D., Tamminen, M., Tiedje, J. M., y Virta, M. (2016). High-throughput quantification of antibiotic resistance genes from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(3), fiw014. doi: 10.1093/femsec/fiw014.
- Katakweba, A. A., Muhairwa, A. P., Lupindu, A. M., Damborg, P., Rosenkrantz, J. T., Minga, U. M., Mtambo, M.M.A., y Olsen, J. E. (2018). First report on a randomized investigation of antimicrobial resistance in fecal indicator bacteria from livestock, poultry, and humans in Tanzania. *Microbial Drug Resistance*, 24(3), 260-268. doi: 10.1089/mdr.2016.0297.
- Kauppinen, A., Pitkänen, T., y Miettinen, I. T. (2018). Persistent norovirus contamination of groundwater supplies in two waterborne outbreaks. *Food and Environmental Virology*, 10(1), 39-50. doi: 10.1007/s12560-017-9320-6.
- Keita, K., Darkoh, C., y Okafor, F. (2022). Secondary plant metabolites as potent drug candidates against antimicrobial-resistant pathogens. *SN Applied Sciences*, 4(8), 209. doi: 10.1007/s42452-022-05084-y.
- Khan, F. A., Söderquist, B., y Jass, J. (2019). Prevalence and diversity of antibiotic resistance genes in Swedish aquatic environments impacted by household and hospital wastewater. *Frontiers in Microbiology*, 10, 688. doi: 10.3389/fmicb.2019.00688.
- Khan, G. A., Berglund, B., Khan, K. M., Lindgren, P. E., y Fick, J. (2013). Occurrence and abundance of antibiotics and resistance genes in rivers, canal and near drug formulation facilities—a study in Pakistan. *PLoS One*, 8(6), e62712. doi: 10.1371/journal.pone.0062712.

- Khan, S., Knapp, C. W., y Beattie, T. K. (2016). Antibiotic resistant bacteria found in municipal drinking water. *Environmental Processes*, 3(3), 541-552. doi: 10.1007/s40710-016-0149-z.
- Khan, S., Madhi, S. A., y Olwagen, C. (2023). Structure-based identification of novel inhibitors targeting the enoyl-ACP reductase enzyme of *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 13(1), 21331. doi: 10.1038/s41598-023-48696-z.
- Kim, C., Ryu, H. D., Chung, E. G., Kim, Y., y Lee, J. K. (2018). A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry. *Journal of Environmental Management*, 217, 629-645. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.04.006.
- Kim, D. W. y Cha, C. J. (2021). Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Experimental and Molecular Medicine*, 53(3), 301-309. doi: 10.1038/s12276-021-00569-z.
- Kim, S. Y., Kuppusamy, S., Kim, J. H., Yoon, Y. E., Kim, K. R., y Lee, Y. B. (2016). Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in the agricultural soils of South Korea. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(21), 22190-22196. doi: 10.1007/s11356-016-7574-4.
- King, D. T., Lameignere, E., y Strynadka, N. C. (2014). Structural insights into the lipoprotein outer membrane regulator of penicillin-binding protein 1B. *Journal of Biological Chemistry*, 289(27), 19245-19253. doi: 10.1074/jbc.M114.565879.
- King, D. T., Sobhanifar, S., y Strynadka, N. C. (2017). The mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. *Handbook of Antimicrobial Resistance*, 23, 177-201. doi: 10.1007/978-1-4939-0694-9_10.
- Kizny Gordon, A. E., Mathers, A. J., Cheong, E. Y., Gottlieb, T., Kotay, S., Walker, A. S., Peto, T.E.A., Crook, D.W., y Stoesser, N. (2017). The hospital water environment as a reservoir for carbapenem-resistant organisms causing hospital-acquired infections—a systematic review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 64(10), 1435-1444. doi: 10.1093/cid/cix132.
- Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens, H., y Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15), E3463-E3470. doi: 10.1073/pnas.1717295115.
- Knott-Hunziker, V., Waley, S. G., Orlek, B. S., y Sammes, P. G. (1979). Penicillinase active sites: Labelling of serine-44 in beta-lactamase I by 6. beta.-bromopencillanic acid. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett*, 99(1), 59-61. doi: 10.1016/0014-5793(79)80248-3.
- Koczura, R., Mokracka, J., Jabłońska, L., Gozdecka, E., Kubek, M., y Kaznowski, A. (2012). Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. *Science of the Total Environment*, 414, 680-685. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.10.036.
- Kompes, G., Duvnjak, S., Reil, I., Hendriksen, R. S., Sørensen, L. H., Zdelar-Tuk, M., Habrun, B., Cvetnić, L., Bagarić, A., y Špičić, S. (2023). First Report and Characterization of the mcr-1 Positive Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strain Isolated from Pigs in Croatia. *Microorganisms*, 11(10), 2442. doi: 10.3390/microorganisms11102442.

- Kools, S. A., Boxall, A. B., Moltmann, J. F., Bryning, G., Koschorreck, J., y Knacker, T. (2008). A ranking of European veterinary medicines based on environmental risks. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 4(4), 399-408. doi: 10.1897/IEAM_2008-002.1.
- Korajkic, A., McMinn, B. R., y Harwood, V. J. (2018). Relationships between microbial indicators and pathogens in recreational water settings. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(12), 2842. doi: 10.3390/ijerph15122842.
- Korzeniewska, E. y Harnisz, M. (2013). Beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in hospital effluents. *Journal of Environmental Management*, 123, 1-7. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.03.024.
- Korzeniewska, E., Korzeniewska, A., y Harnisz, M. (2013). Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 96-102. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.014.
- Kotlarska, E., Łuczkiwicz, A., Pisowacka, M., y Burzyński, A. (2015). Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from two wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland). *Environmental Science and Pollution Research*, 22(3), 2018-2030. doi: 10.1007/s11356-014-3474-7.
- Krapner, N., Hutinel, M., Schumacher, K., Gray, D. A., Genheden, M., Fick, J., Flach, C.F., y Larsson, D. J. (2021). Evidence for selection of multi-resistant *E. coli* by hospital effluent. *Environment International*, 150, 106436. doi: 10.1016/j.envint.2021.106436.
- Krzeminski, P., Tomei, M. C., Karaolia, P., Langenhoff, A., Almeida, C. M. R., Felis, E., Gritten, F., Andersen, H.R., Fernandes, T., Manaia, C.M., Rizzo, L., y Fatta-Kassinos, D. (2019). Performance of secondary wastewater treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern implicated in crop uptake and antibiotic resistance spread: A review. *Science of the Total Environment*, 648, 1052-1081. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.130.
- Kumar, M., Ram, B., Sewwandi, H., Honda, R., y Chaminda, T. (2020). Treatment enhances the prevalence of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in the wastewater of Sri Lanka, and India. *Environmental Research*, 183, 109179. doi: 10.1016/j.envres.2020.109179.
- Kümmerer, K. (2009). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use—present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 90(8), 2354-2366. doi: 10.1016/j.jenvman.2009.01.023.
- Kwak, Y. K., Colque, P., Byfors, S., Giske, C. G., Möllby, R., y Kühn, I. (2015). Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* in wastewater in Stockholm during 1 year: does it reflect the resistance trends in the society?. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(1), 25-32. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.09.016.
- Laborda, P., Sanz-García, F., Ochoa-Sánchez, L. E., Gil-Gil, T., Hernando-Amado, S., y Martínez, J. L. (2022). Wildlife and antibiotic resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 873989. doi: 10.3389/fcimb.2022.873989.
- Lam, T., Ellison, C. K., Eddington, D. T., Brun, Y. V., Dalia, A. B., y Morrison, D. A. (2021). Competence pili in *Streptococcus pneumoniae* are highly dynamic structures that retract to promote DNA uptake. *Molecular Microbiology*, 116(2), 381-396. doi: 10.1111/mmi.14718.

- Lamba, M., Graham, D. W., y Ahammad, S. Z. (2017). Hospital wastewater releases of carbapenem-resistance pathogens and genes in urban India. *Environmental Science and Technology*, 51(23), 13906-13912. doi: 10.1021/acs.est.7b03380.
- LaPara, T. M., Burch, T. R., McNamara, P. J., Tan, D. T., Yan, M., y Eichmiller, J. J. (2011). Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-Superior Harbor. *Environmental Science and Technology*, 45(22), 9543-9549. doi: 10.1021/es202775r.
- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., y Petit, F. (2009). Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 118-130. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00655.x.
- Larrea-Murrell, J. A., Rojas-Badía, M. M., Romeu-Álvarez, B., Rojas-Hernández, N. M., y Heydrich-Pérez, M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(3), 24-34.
- Larsson, D. J., Andremont, A., Bengtsson-Palme, J., Brandt, K. K., de Roda Husman, A. M., Fagerstedt, P., Fick, J., Flach, C.F., Gaze, W.H., Kuroda, M., Kvint, K., Laxminarayan, R., Manaia, C.M., Nielsen, K.M., Plant, L., Ploy, M.C., Segovia, C., Simonet, P., Smalla, K., ... Wernersson, A. S. (2018). Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environment International*, 117, 132-138. doi: 10.1016/j.envint.2018.04.041.
- Larsson, D. J., y Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257-269. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x.
- Lartigue, M. F., Fortineau, N., y Nordmann, P. (2005). Spread of novel expanded-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in a university hospital in the Paris area, France. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(7), 588-591. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01172.x.
- Lata, P., Ram, S., Agrawal, M., y Shanker, R. (2009). *Enterococci* in river Ganga surface waters: propensity of species distribution, dissemination of antimicrobial-resistance and virulence-markers among species along landscape. *BMC Microbiology*, 9, 140. doi: 10.1186/1471-2180-9-140.
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Knapp, C. W., Correa Galeote, D., Gálvez, A., y Abriouel, H. (2014). Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and meat products. *PLoS One*, 9(12), e114252. doi: 10.1371/journal.pone.0114252.
- Laws, M., Shaaban, A., y Rahman, K. M. (2019). Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(5), 490-516. doi: 10.1093/femsre/fuz014.
- Lee, J., Jeon, J. H., Shin, J., Jang, H. M., Kim, S., Song, M. S., y Kim, Y. M. (2017). Quantitative and qualitative changes in antibiotic resistance genes after passing through treatment processes in municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 605-606, 906-914. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.250.
- Lee, M. (2023). Deep learning in CRISPR-Cas systems: A review of recent studies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1226182. doi: 10.3389/fbioe.2023.1226182.

- Lee, S., Mir, R. A., Park, S. H., Kim, D., Kim, H. Y., Boughton, R. K., Morris, J.G. Jr., y Jeong, K. C. (2020). Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in the local farm environment and livestock: challenges to mitigate antimicrobial resistance. *Critical Reviews in Microbiology*, *46*(1), 1-14. doi: 10.1080/1040841X.2020.1715339.
- Leonard, A. F., Zhang, L., Balfour, A. J., Garside, R., Hawkey, P. M., Murray, A. K., Ukoumunne, O.C., y Gaze, W. H. (2018). Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environment International*, *114*, 326-333. doi: 10.1016/j.envint.2017.11.003.
- Letchumanan, V., Pusparajah, P., Tan, L. T. H., Yin, W. F., Lee, L. H., y Chan, K. G. (2015). Occurrence and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from shellfish in Selangor, Malaysia. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1417. doi: 10.3389/fmicb.2015.01417.
- Li, L., Liu, D., Zhang, Q., Song, K., Zhou, X., Tang, Z., y Zhou, X. (2019). Occurrence and ecological risk assessment of selected antibiotics in the freshwater lakes along the middle and lower reaches of Yangtze River Basin. *Journal of Environmental Management*, *249*, 109396. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.109396.
- Li, N., Sheng, G. P., Lu, Y. Z., Zeng, R. J., y Yu, H. Q. (2017). Removal of antibiotic resistance genes from wastewater treatment plant effluent by coagulation. *Water Research*, *111*, 204-212. doi: 10.1016/j.watres.2017.01.010.
- Li, S., Ondon, B. S., Ho, S. H., Jiang, J., y Li, F. (2022). Antibiotic resistant bacteria and genes in wastewater treatment plants: From occurrence to treatment strategies. *Science of the Total Environment*, *838*(Pt 4), 156544. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156544.
- Li, T., Wang, Z., Guo, J., de la Fuente-Nunez, C., Wang, J., Han, B., Tao, H., Liu, J., y Wang, X. (2023). Bacterial resistance to antibacterial agents: mechanisms, control strategies, and implications for global health. *Science of the Total Environment*, *860*, 160461. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.160461.
- Li, X. Z. y Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, *69*(12), 1555-1623. doi: 10.2165/11317030-000000000-00000.
- Li, X. Z., Plésiat, P., y Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(2), 337-418. doi: 10.1128/CMR.00117-14.
- Lima, L. M., da Silva, B. N. M., Barbosa, G., y Barreiro, E. J. (2020). β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *208*, 112829. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112829.
- Linton, K. B., Richmond, M. H., Bevan, R., y Gillespie, W. A. (1974). Antibiotic resistance and R factors in coliform *bacilli* isolated from hospital and domestic sewage. *Journal of Medical Microbiology*, *7*(1), 91-103. doi: 10.1099/00222615-7-1-91.
- Liu, G., Zhang, Y., Knibbe, W. J., Feng, C., Liu, W., Medema, G., y van der Meer, W. (2017). Potential impacts of changing supply-water quality on drinking water distribution: A review. *Water Research*, *116*, 135-148. doi: 10.1016/j.watres.2017.03.031.

- Liu, L., Su, J. Q., Guo, Y., Wilkinson, D. M., Liu, Z., Zhu, Y. G., y Yang, J. (2018). Large-scale biogeographical patterns of bacterial antibiotic resistome in the waterbodies of China. *Environment International*, *117*, 292-299. doi: 10.1016/j.envint.2018.05.023.
- Liu, L., Wang, X., An, S., Zhang, X., Chen, L., Li, Y., y Xu, L. (2014). Genetic environment of β -lactamase genes of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with lower respiratory tract infection in China. *Chinese Medical Journal*, *127*(13), 2445-2450.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., y Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(2), 161-168. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
- Lu, J., Jin, M., Nguyen, S. H., Mao, L., Li, J., Coin, L. J., Yuan, Z., y Guo, J. (2018). Non-antibiotic antimicrobial triclosan induces multiple antibiotic resistance through genetic mutation. *Environment International*, *118*, 257-265. doi: 10.1016/j.envint.2018.06.004.
- Lu, S., Lin, C., Lei, K., Wang, B., Xin, M., Gu, X., Cao, Y., Liu, X., Ouyang, W., y He, M. (2020). Occurrence, spatiotemporal variation, and ecological risk of antibiotics in the water of the semi-enclosed urbanized Jiaozhou Bay in eastern China. *Water Research*, *184*, 116187. doi: 10.1016/j.watres.2020.116187.
- Łuczkiwicz, A., Felis, E., Ziembinska, A., Gnida, A., Kotlarska, E., Olanczuk-Neyman, K., y Surmacz-Gorska, J. (2013). Resistance of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. to selected antimicrobial agents present in municipal wastewater. *Journal of Water and Health*, *11*(4), 600-612. doi: 10.2166/wh.2013.130.
- Łuczkiwicz, A., Jankowska, K., Fudala-Książek, S., y Olańczuk-Neyman, K. (2010a). Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, *44*(17), 5089-5097. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.007.
- Łuczkiwicz, A., Jankowska, K., Kurlenda, J., y Olańczuk-Neyman, K. (2010b). Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from surface water. *Water Science and Technology*, *62*(2), 466-473. doi: 10.2166/wst.2010.909.
- Lund, D., Coertze, R. D., Parras-Moltó, M., Berglund, F., Flach, C. F., Johnning, A., Larsson, D.G.J., y Kristiansson, E. (2023). Extensive screening reveals previously undiscovered aminoglycoside resistance genes in human pathogens. *Communications Biology*, *6*(1), 812. doi: 10.1038/s42003-023-05174-6.
- Lüneberg, K., Prado, B., Broszat, M., Dalkmann, P., Díaz, D., Huebner, J., Amelung, W., López-Vidal, Y., Siemens, J., Grohmann, E., y Siebe, C. (2018). Water flow paths are hotspots for the dissemination of antibiotic resistance in soil. *Chemosphere*, *193*, 1198-1206. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.143.
- Lupión, C., López-Cortés, L. E., y Rodríguez-Bano, J. (2014). Medidas de prevención de la transmisión de microorganismos entre pacientes hospitalizados. Higiene de manos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *32*(9), 603-609. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2014.02.003.

- Lupo, A., Coyne, S., y Berendonk, T. U. (2012). Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 18. doi: 10.3389/fmicb.2012.00018.
- Ma, Y., Chen, J., Fong, K., Nadya, S., Allen, K., Laing, C., Ziebell, K., Topp, E., Carroll, L.M., Wiedmann, M., Delaquis, P., y Wang, S. (2021). Antibiotic resistance in shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from surface waters and sediments in a mixed use urban agricultural landscape. *Antibiotics (Basel)*, *10*(3), 237. doi: 10.3390/antibiotics10030237.
- Ma, Y., Pirolo, M., Subramani, P., Gehring, R., Damborg, P., Franzyk, H., y Guardabassi, L. (2022). Macrolide Resistance and In Vitro Potentiation by Peptidomimetics in Porcine Clinical *Escherichia coli*. *mSphere*, *7*(5), e0040222. doi: 10.1128/msphere.00402-22.
- Ma, Y., Wilson, C. A., Novak, J. T., Riffat, R., Aynur, S., Murthy, S., y Pruden, A. (2011). Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons. *Environmental Science and Technology*, *45*(18), 7855-7861. doi: 10.1021/es200827t.
- Maal-Bared, R., Bartlett, K. H., Bowie, W. R., y Hall, E. R. (2013). Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. *Science of the Total Environment*, *443*, 315-323. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.106.
- Machado, E. C., Freitas, D. L., Leal, C. D., de Oliveira, A. T., Zerbini, A., Chernicharo, C. A., y de Araújo, J. C. (2023). Antibiotic resistance profile of wastewater treatment plants in Brazil reveals different patterns of resistance and multi-resistant bacteria in final effluents. *Science of the Total Environment*, *857* (Pt 1), 159376. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.159376.
- 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., y 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*, *18*(3), 268-281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Mahler, B. J., Personné, J. C., Lods, G. F., y Drogue, C. (2000). Transport of free and particulate-associated bacteria in karst. *Journal of Hydrology*, *238*(3-4), 179-193. doi: 10.1016/S0022-1694(00)00324-3.
- Maillard, J. Y. (2018). Resistance of bacteria to biocides. *Microbiology Spectrum*, *6*(2). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0006-2017.
- Maiyo, J. K., Dasika, S., y Jafvert, C. T. (2023). Slow Sand Filters for the 21st Century: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *20*(2), 1019. doi: 10.3390/ijerph20021019.
- Managaki, S., Murata, A., Takada, H., Tuyen, B. C., y Chiem, N. H. (2007). Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta. *Environmental Science and Technology*, *41*(23), 8004-8010. doi: 10.1021/es0709021.

- Manaia, C. M. (2017). Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans: non-direct proportionality between abundance and risk. *Trends in Microbiology*, 25(3), 173-181. doi: 10.1016/j.tim.2016.11.014.
- Manaia, C. M., Vaz-Moreira, I., y Nunes, O. C. (2012). Antibiotic resistance in waste water and surface water and human health implications. *Emerging Organic Contaminants and Human Health*, 173-212. doi: 10.1007/698_2011_118.
- Mannocci, A., La Torre, G., Spagnoli, A., Solimini, A. G., Palazzo, C., y De Giusti, M. (2016). Is swimming in recreational water associated with the occurrence of respiratory illness? A systematic review and meta-analysis. *Journal of Water and Health*, 14(4), 590-599. doi: 10.2166/wh.2016.266.
- Mao, D., Luo, Y., Mathieu, J., Wang, Q., Feng, L., Mu, Q., Feng, C., y Alvarez, P. J. J. (2014). Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation. *Environmental Science and Technology*, 48(1), 71-78. doi: 10.1021/es404280v.
- Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., Hou, J., Mu, Q., y Alvarez, P. J. J. (2015). Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 85, 458-466. doi: 10.1016/j.watres.2015.09.010.
- Mapas de consumo de antibióticos, Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN). (2023). Consultado el 28 de febrero de 2023. Disponible en: <https://www.resistenciaantibioticos.es/es/lineas-de-accion/vigilancia/mapas-de-consumo/consumo-antibioticos-humana>
- Marano, R. B., Zolti, A., Jurkevitch, E., y Cytryn, E. (2019). Antibiotic resistance and class 1 integron gene dynamics along effluent, reclaimed wastewater irrigated soil, crop continua: elucidating potential risks and ecological constraints. *Water Research*, 164, 114906. doi: 10.1016/j.watres.2019.114906.
- Markley, J. L. y Wencewicz, T. A. (2018). Tetracycline-inactivating enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1058. doi: 10.3389/fmicb.2018.01058.
- Marti, E. y Balcazar, J. L. (2013). Real-time PCR assays for quantification of qnr genes in environmental water samples and chicken feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1743-1745. doi: 10.1128/AEM.03409-12.
- Marti, E., Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Balcázar, J. L., y Marcé, R. (2016). Effects of subinhibitory ciprofloxacin concentrations on the abundance of qnrS and composition of bacterial communities from water supply reservoirs. *Chemosphere*, 161, 470-474. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.054.
- Marti, E., Jofre, J., y Balcazar, J. L. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PLoS One*, 8(10), e78906. doi: 10.1371/journal.pone.0078906.
- Marti, E., Variatza, E., y Balcazar, J. L. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 22(1), 36-41. doi: 10.1016/j.tim.2013.11.001.
- Martinez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1667), 2521-2530. doi: 10.1098/rspb.2009.0320.

- Martínez, M. O. Á., y del Pozo, J. A. G. (2002). Eritromicina: descubrimiento, características y aplicaciones. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 21(2), 78-82.
- May, C. W., Horner, R. R., Karr, J. R., Mar, B. W., y Welch, E. B. (1998). The cumulative effects of urbanization on small streams in the Puget Sound Lowland Ecoregion. In *Proceedings of the Puget Sound Research*. Consultado el 21 de octubre de 2023. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/240437080_Effects_of_Urbanization_on_Small_Str_eams_in_the_Puget_Sound_Lowland_Ecoregion
- McArdell, C. S., Molnar, E., Suter, M. J. F., y Giger, W. (2003). Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental Science and Technology*, 37(24), 5479-5486. doi: 10.1021/es034368i.
- McKinney, C. W., y Pruden, A. (2012). Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. *Environmental Science and Technology*, 46(24), 13393-13400. doi: 10.1021/es303652q.
- McLain, J. E., Cytryn, E., Durso, L. M., y Young, S. (2016). Culture-based methods for detection of antibiotic resistance in agroecosystems: Advantages, challenges, and gaps in knowledge. *Journal of Environmental Quality*, 45(2), 432-440. doi: 10.2134/jeq2015.06.0317.
- McLellan, S. L. (2004). Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from urban rivers and beach water. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4658-4665. doi: 10.1128/AEM.70.8.4658-4665.2004.
- McMichael, C. (2015). Climate change-related migration and infectious disease. *Virulence*, 6(6), 548-553. doi: 10.1080/21505594.2015.1021539.
- Mendoza, A., Aceña, J., Pérez, S., De Alda, M. L., Barceló, D., Gil, A., y Valcárcel, Y. (2015). Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: a case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard. *Environmental Research*, 140, 225-241. doi: 10.1016/j.envres.2015.04.003.
- Merrih, H., y Kohli, R. M. (2020). Targeting evolution to inhibit antibiotic resistance. *The FEBS Journal*, 287(20), 4341-4353. doi: 10.1111/febs.15370.
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C. S., Manaia, C. M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., y Fatta-Kassinos, D. J. W. R. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Research*, 47(3), 957-995. doi: 10.1016/j.watres.2012.11.027.
- Miller, W. R., Munita, J. M., y Arias, C. A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12(10), 1221-1236. doi: 10.1586/14787210.2014.956092.
- Mills, M. C. y Lee, J. (2019). The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: Evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. *Environmental Pollution*, 255 (Pt 1), 113143. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113143.

- Modi, S. R., Lee, H. H., Spina, C. S., y Collins, J. J. (2013). Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*, *499*(7457), 219-222. doi: 10.1038/nature12212.
- Moermond, C. T. A., Montforts, M. H. M. M., Roex, E. W. M., y Venhuis, B. J. (2020). Medicijnresten en waterkwaliteit: een update. Consultado el 26 de octubre de 2023. Disponible en: <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2020-0088.html>
- Mohr, K. I. (2016). History of antibiotics research. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *398*, 237-272. doi: 10.1007/82_2016_499.
- Moles, S., Gozzo, S., Ormad, M. P., Mosteo, R., Gómez, J., Laborda, F., y Szpunar, J. (2022). Long-Term Study of Antibiotic Presence in Ebro River Basin (Spain): Identification of the Emission Sources. *Water (Switzerland)*, *14*(7), 1033. Doi: 10.3390/w14071033.
- Moore, D. F., Guzman, J. A., y McGee, C. (2008). Species distribution and antimicrobial resistance of *enterococci* isolated from surface and ocean water. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(4), 1017-1025. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03828.x.
- Moreira, N. A. y Bondelind, M. (2017). Safe drinking water and waterborne outbreaks. *Journal of Water and Health*, *15*(1), 83-96. doi: 10.2166/wh.2016.103.
- Morosini, M. I., Cercenado, E., Ardanuy, C., y Torres, C. (2012). Phenotypic detection of resistance mechanisms in gram-positive bacteria. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *30*(6), 325-332. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2011.09.009.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., y Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *28*(4), 648-656.
- Moura, A., Henriques, I., Ribeiro, R., y Correia, A. (2007). Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *60*(6), 1243-1250. doi: 10.1093/jac/dkm340.
- Munir, M. y Xagorarakis, I. (2011). Levels of antibiotic resistance genes in manure, biosolids, and fertilized soil. *Journal of Environmental Quality*, *40*(1), 248-255. doi: 10.2134/jeq2010.0209.
- Munir, M., Wong, K., y Xagorarakis, I. (2011). Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Research*, *45*(2), 681-693. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.033.
- Munita, J. M. y Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, *4*(2), 10. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Murphy, H., Prioleau, M., Borchardt, M., y Hynds, P. (2017). Epidemiological evidence of groundwater contribution to global enteric disease, 1948–2015. *Hydrogeol. J.* *25*, 981-1001. doi: 10.1007/s10040-017-1543-y.
- Murray, B. E. (1998). Diversity among multidrug-resistant *enterococci*. *Emerging Infectious Diseases*, *4*(1), 37-47. doi: 10.3201/eid0401.980106.

- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Give Chipeta, M., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... y Tasak, N. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- Mutuku, C., Gazdag, Z., y Melegh, S. (2022). Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: Resistance mechanisms and antimicrobial resistance control approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 152. doi: 10.1007/s11274-022-03334-0.
- Muziasari, W. I., Pärnänen, K., Johnson, T. A., Lyra, C., Karkman, A., Stedtfeld, R. D., Tamminen, M., Tiedje, J.M., y Virta, M. (2016). Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associated genes in Baltic Sea sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), fiw052. doi: 10.1093/femsec/fiw052.
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P., y Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 917-919. doi: 10.1080/14756366.2017.1344235.
- Naddeo, V. (2021). One planet, one health, one future: The environmental perspective. *Water Environment Research*, 93(9), 1472-1475. doi: 10.1002/wer.1624.
- Nappier, S. P., Liguori, K., Ichida, A. M., Stewart, J. R., y Jones, K. R. (2020). Antibiotic resistance in recreational waters: state of the science. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(21), 8034. doi: 10.3390/ijerph17218034.
- National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. (2023). Consultado el 27 de septiembre de 2023. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#TEM
- National Water Research Institute (US) y Water Research Foundation. (2012). *Ultraviolet disinfection guidelines for drinking water and water reuse*. National Water Research Institute. Consultado el 2 de noviembre de 2023. Disponible en: https://www.nwri-usa.org/files/ugd/632dc3_c8ab78b05021452c8a520c3b6dba48ca.pdf?index=true
- Naudet, J., d'Orbcastel, E. R., Bouvier, T., Godreuil, S., Dyal, S., Bouvy, S., Rieuvilleneuve, F., Restrepo-Ortiz, C.X., Bettarel, Y., y Auguet, J. C. (2023). Identifying macroplastic pathobiomes and antibiotic resistance in a subtropical fish farm. *Marine Pollution Bulletin*, 194(Pt B), 115267. doi: 10.1016/j.marpolbul.2023.115267.
- Neudorf, K. D., Huang, Y. N., Ragush, C. M., Yost, C. K., Jamieson, R. C., y Hansen, L. T. (2017). Antibiotic resistance genes in municipal wastewater treatment systems and receiving waters in Arctic Canada. *Science of the Total Environment*, 598, 1085-1094. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.151.
- Ngigi, A. N., Magu, M. M., y Muendo, B. M. (2020). Occurrence of antibiotics residues in hospital wastewater, wastewater treatment plant, and in surface water in Nairobi County, Kenya. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(1), 18. doi: 10.1007/s10661-019-7952-8.
- Nicolaou, K. C. y Rigol, S. (2018). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 71(2), 153-184. doi: 10.1038/ja.2017.62.

- Niegowska, M. y Wögerbauer, M. (2022). Improving the risk assessment of antimicrobial resistance (AMR) along the food/feed chain and from environmental reservoirs using qMRA and probabilistic modelling. *EFSA Journal*, 20(Suppl 1), e200407. doi: 10.2903/j.efsa.2022.e200407.
- Nielsen, K. M., Van Weerelt, M. D., Berg, T. N., Bones, A. M., Hagler, A. N., y Van Elsas, J. D. (1997). Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 1945-1952. doi: 10.1128/aem.63.5.1945-1952.1997.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593-656. doi: 10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.
- Nikolaou, M., Schilling, A. N., Vo, G., Chang, K. T., y Tam, V. H. (2007). Modeling of microbial population responses to time-periodic concentrations of antimicrobial agents. *Annals of Biomedical Engineering*, 35(8), 1458-1470. doi: 10.1007/s10439-007-9306-x.
- Nishiyama, M., Ogura, Y., Hayashi, T., y Suzuki, Y. (2017). Antibiotic resistance profiling and genotyping of vancomycin-resistant *enterococci* collected from an urban river basin in the provincial city of Miyazaki, Japan. *Water*, 9(2), 79. doi: 10.3390/w9020079.
- Nnadozie, C. F. y Odume, O. N. (2019). Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environmental Pollution*, 254(Pt B), 113067.
- Noble, R. T., Moore, D. F., Leecaster, M. K., McGee, C. D., y Weisberg, S. B. (2003). Comparison of total *coliform*, fecal *coliform*, and *enterococcus* bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. *Water Research*, 37(7), 1637-1643. doi: 10.1016/S0043-1354(02)00496-7.
- Nwosu, V. C. (2001). Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Research in Microbiology*, 152(5), 421-430. doi: 10.1016/s0923-2508(01)01215-3.
- Odonkor, S. T., y Addo, K. K. (2018). Prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water sources. *International Journal of Microbiology*, 2018, 7204013. doi: 10.1155/2018/7204013.
- Ogawara, H. (2016). Self-resistance in *Streptomyces*, with special reference to β -lactam antibiotics. *Molecules*, 21(5), 605. doi: 10.3390/molecules21050605.
- Ojdana, D., Sacha, P., Wieczorek, P., Czaban, S., Michalska, A., Jaworowska, J., Jurczak, A., Poniowski, B., y Tryniszewska, E. (2014). The occurrence of blaCTX-M, blaSHV, and blaTEM genes in extended-spectrum β -lactamase-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. *International Journal of Antibiotics*, 2014. doi: 10.1155/2014/935842.
- Olson, E., Hargiss, C. L., y Norland, J. (2022). *Escherichia coli* levels and microbial source tracking in stormwater retention ponds and detention basins. *Water Environment Research*, 94(1), e1675. doi: 10.1002/wer.1675.
- Onuoha, S. C. (2018). Distribution and antibiogram of bacterial species in effluents from abattoirs in Nigeria. *Journal of Environmental and Occupational Science*, 7(1), 1-8. doi: 10.5455/jeos.20180412010933.

- Onuoha, S. C., Okafor, C. O., Aduo, B. C., y Nwaka, F. C. (2016). Distribution of antibiotic resistant bacteria from abattoir wastes and its receiving waters at Nkwo-ezzamgbo, Ebonyi State, Nigeria. *World Journal of Medical Sciences*, 13(4), 242-250. doi: 10.5829/idosi.wjms.2016.242.250.
- Ortega, A., Oteo, J., Aranzamendi-Zaldumbide, M., Bartolomé, R. M., Bou, G., Cercenado, E., Conejo, M.C., González-López, J.J., Marín, M., Martínez-Martínez, L., Merino, M., Navarro, F., Oliver, A., Pascual, A., Rivera, A., Rodríguez-Baño, J., Weber, I., Aracil, B., y Campos, J. (2012). Spanish multicenter study of the epidemiology and mechanisms of amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 3576-3581. doi: 10.1128/AAC.06393-11.
- Osińska, A., Harnisz, M., y Korzeniewska, E. (2016). Prevalence of plasmid-mediated multidrug resistance determinants in fluoroquinolone-resistant bacteria isolated from sewage and surface water. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(11), 10818-10831. doi: 10.1007/s11356-016-6221-4.
- Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Felis, E., Bajkacz, S., Jachimowicz, P., Niestępski, S., y Konopka, I. (2020). Small-scale wastewater treatment plants as a source of the dissemination of antibiotic resistance genes in the aquatic environment. *Journal of Hazard Materials*, 381, 121221. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121221.
- Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., y Niestępski, S. (2017). The prevalence and characterization of antibiotic-resistant and virulent *Escherichia coli* strains in the municipal wastewater system and their environmental fate. *Science of the Total Environment*, 577, 367-375. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.203.
- Pachepsky, Y., Shelton, D. R., McLain, J. E., Patel, J., y Mandrell, R. E. (2011). Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. *Advances in Agronomy*, 113, 73-138. doi: 10.1016/B978-0-12-386473-4.00007-5.
- Paget, E. y Simonet, P. (1994). On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 15(1-2), 109-117. doi: 10.1111/j.1574-6941.1994.tb00235.x.
- Pahil, K. S., Gilman, M. S., Baidin, V., Clairfeuille, T., Mattei, P., Bieniossek, C., Dey, F., Muri, D., Baettig, R., Lobritz, M., Bradley, K., Kruse, A.C., y Kahne, D. (2024). A new antibiotic traps lipopolysaccharide in its intermembrane transporter. *Nature*, 625(7995), 572-577. doi: 10.1038/s41586-023-06799-7.
- Pajdak-Stós, A. y Fiałkowska, E. (2012). The influence of temperature on the effectiveness of filamentous bacteria removal from activated sludge by rotifers. *Water Environment Research*, 84(8), 619-625. doi: 10.2175/106143012x13373550427039.
- Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D. J., Larsson, D. J., y Hobman, J. L. (2017). Metal resistance and its association with antibiotic resistance. *Advances in Microbial Physiology*, 70, 261-313. doi: 10.1016/bs.ampbs.2017.02.001.
- Pallares-Vega, R., Leal, L. H., Fletcher, B. N., Vias-Torres, E., van Loosdrecht, M. C., Weissbrodt, D. G., y Schmitt, H. (2021). Annual dynamics of antimicrobials and resistance determinants in flocculent and aerobic granular sludge treatment systems. *Water Research*, 190, 116752. doi: 10.1016/j.watres.2020.116752.

- Pan, M. y Chu, L. M. (2018). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in soils from wastewater irrigation areas in the Pearl River Delta region, southern China. *Science of the Total Environment*, 624, 145-152. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.008.
- Pang, Y. C., Xi, J. Y., Li, G. Q., Shi, X. J., y Hu, H. Y. (2015). Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in a lake for the storage of reclaimed water before and after usage as cooling water. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 17(6), 1182-1189. doi: 10.1039/c5em00177c.
- Pantarella, F., Schippa, S., Gagliardi, A., Venuto, G., y Solimini, A. (2020). Frequency of virulence and antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolates in two rivers of central Italy. *Annali di Igiene: medicina preventiva e di comunita*, 32(3), 322-324. doi: 10.7416/ai.2020.235.
- Pärnänen, K. M., Narciso-da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T. U., Cacace, D., Do, T. T., Elpers, C., Fatta-Kassinos, D., Henriques, I., Jaeger, T., Karkman, A., Martinez, J.L., Michael, S.G., Michael-Kordatou, I., O'Sullivan, K., Rodriguez-Mozaz, S., Schwartz, T., Sheng, H., Sørum, H., ... Manaia, C. M. (2019). Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Science Advances*, 5(3), eaau9124. doi: 10.1126/sciadv.aau9124.
- Partridge, S. R. (2015). What's in a name? IS Swi1 corresponds to transposons related to Tn 2 and Tn 3. *mBio*, 6(5), e01344-15. doi: 10.1128/mBio.01344-15.
- Paterson, G. K., Harrison, E. M., y Holmes, M. A. (2014). The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 22(1), 42-47. doi: 10.1016/j.tim.2013.11.003.
- Patterson, A. J., Colangeli, R., Spigaglia, P., y Scott, K. P. (2007). Distribution of specific tetracycline and erythromycin resistance genes in environmental samples assessed by microarray detection. *Environmental Microbiology*, 9(3), 703-715. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01190.x.
- Paul, M., Wolf, L., Fund, K., Held, I., Winter, J., Eiswirth, M., y Hötzl, H. (2004). Microbiological condition of urban groundwater in the vicinity of leaky sewer systems. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 32(4-5), 351-360. doi: 10.1002/aheh.200400539.
- Pawlowski, A. C., Wang, W., Koteva, K., Barton, H. A., McArthur, A. G., y Wright, G. D. (2016). A diverse intrinsic antibiotic resistome from a cave bacterium. *Nature Communications*, 7(1), 13803. doi: 10.1038/ncomms13803.
- Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., y Mulkiewicz, E. (2019). Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems—a review. *Science of the Total Environment*, 697, 134023. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134023.
- Peacock, S. J. y Paterson, G. K. (2015). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 577-601. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034516.
- Peak, N., Knapp, C. W., Yang, R. K., Hanfelt, M. M., Smith, M. S., Aga, D. S., y Graham, D. W. (2007). Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environmental Microbiology*, 9(1), 143-151. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01123.x.
- Pei, R., Kim, S. C., Carlson, K. H., y Pruden, A. (2006). Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research*, 40(12), 2427-2435. doi: 10.1016/j.watres.2006.04.017.

- Pepper, I. L., Brooks, J. P., y Gerba, C. P. (2018). Antibiotic resistant bacteria in municipal wastes: is there reason for concern?. *Environmental Science and Technology*, 52(7), 3949-3959. doi: 10.1021/acs.est.7b04360.
- Pereira, A., Santos, A., Tacão, M., Alves, A., Henriques, I., y Correia, A. (2013). Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *Science of the Total Environment*, 461-462, 65-71. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.067.
- Pérez Gracia, M.T. (2021). La pandemia silenciosa: resistencia bacteriana a los antibióticos. Consultado el 12 de octubre de 2023. Disponible en: https://repositorioinstitucional.ceu.es/bitstream/10637/13083/1/Pandemia_Perez_2021.pdf
- Pérez, J. I., Álvarez-Arroyo, R., Arrieta, J., Suescun, J. M., Paunero, S., y Gómez, M. A. (2022). Occurrence of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria (ARB) in the Nervión river. *Chemosphere*, 288(Pt 1), 132479. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132479.
- Perreten, V. y Boerlin, P. (2003). A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 1169-1172. doi: 10.1128/AAC.47.3.1169-1172.2003.
- Petrovich, M. L., Zilberman, A., Kaplan, A., Eliraz, G. R., Wang, Y., Langenfeld, K., Duhaime, M., Wigginton, K., Poretsky, R., Avisar, D., y Wells, G. F. (2020). Microbial and viral communities and their antibiotic resistance genes throughout a hospital wastewater treatment system. *Frontiers in Microbiology*, 11, 153. doi: 10.3389/fmicb.2020.00153.
- Petrovich, M., Chu, B., Wright, D., Griffin, J., Elfeki, M., Murphy, B. T., Poretsky, R., y Wells, G. (2018). Antibiotic resistance genes show enhanced mobilization through suspended growth and biofilm-based wastewater treatment processes. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(5). doi: 10.1093/femsec/fiy041.
- Pham, T. D., Ziora, Z. M., y Blaskovich, M. A. (2019). Quinolone antibiotics. *Medchemcomm*, 10(10), 1719-1739. doi: 10.1039/c9md00120d.
- Philipsborn, R., Ahmed, S. M., Brosi, B. J., y Levy, K. (2016). Climatic drivers of diarrheagenic *Escherichia coli* incidence: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(1), 6-15. doi: 10.1093/infdis/jiw081.
- Pils, J. R. y Laird, D. A. (2007). Sorption of tetracycline and chlortetracycline on K-and Ca-saturated soil clays, humic substances, and clay-humic complexes. *Environmental Science and Technology*, 41(6), 1928-1933. doi: 10.1021/es062316y.
- Pires, J., Santos, R., y Monteiro, S. (2023). Antibiotic resistance genes in bacteriophages from wastewater treatment plant and hospital wastewaters. *Science of the Total Environment*, 892, 164708. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.164708.
- Plackett, B. (2020). Why big pharma has abandoned antibiotics. *Nature*, 586(7830), S50-S52. doi: 10.1038/d41586-020-02884-3.
- Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) (2022-2024). (2022). Consultado el 10 de febrero de 2023. Disponible en: <https://www.resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/plan-nacional-frente-la-resistencia-los-antibioticos-pran-2022-2024>

- Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN). (2021b). España mantiene el pulso frente a la pandemia silenciosa: la resistencia a los antibióticos. Consultado el 09 de febrero de 2023. Disponible en: <https://resistenciaantibioticos.es/es/noticias/espana-mantiene-el-pulso-frente-la-pandemia-silenciosa-la-resistencia-los-antibioticos>
- Plotniece, A., Sobolev, A., Supuran, C. T., Carta, F., Björkling, F., Franzyk, H., Yli-Kauhaluoma, J., Augustyns, K., Cos, P., De Vooght, L., Govaerts, M., Aizawa, J., Tammela, P., y Žalubovskis, R. (2023). Selected strategies to fight pathogenic bacteria. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1), 2155816. doi: 10.1080/14756366.2022.2155816.
- Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., y Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.
- Pons, M. J., Gomes, C., y Ruiz, J. (2013). QnrVC, a new transferable Qnr-like family. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(3), 191-192. doi: 10.1016/j.eimc.2012.09.008.
- Poppe, C., Martin, L., Muckle, A., Archambault, M., McEwen, S., y Weir, E. (2006). Characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella* Newport isolated from animals, the environment, and animal food products in Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 70(2), 105-114.
- Pormohammad, A., Nasiri, M. J., y Azimi, T. (2019). Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance*, 12, 1181-1197. doi: 10.2147/IDR.S201324.
- Potter, R. F., D'Souza, A. W., y Dantas, G. (2016). The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Drug Resistance Updates*, 29, 30-46. doi: 10.1016/j.drug.2016.09.002.
- PRAN Medio Ambiente. 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. (2022). Consultado el 28 de febrero de 2023. Disponible en: https://www.resistenciaantibioticos.es/sites/default/files/2022-06/1.1_informe-pran-ma_fuentes-de-emision.pdf
- Price, V. J., McBride, S. W., Hullahalli, K., Chatterjee, A., Duerkop, B. A., y Palmer, K. L. (2019). *Enterococcus faecalis* CRISPR-Cas is a robust barrier to conjugative antibiotic resistance dissemination in the murine intestine. *mSphere*, 4(4), e00464-19. doi: 10.1128/mSphere.00464-19.
- Prinzi, A. y Rohde, R. (2023). The role of bacterial biofilms in antimicrobial resistance. *ASM. org- American Society for Microbiology*. Consultado el 8 de diciembre de 2023. Disponible en: <https://asm.org/articles/2023/march/the-role-of-bacterial-biofilms-in-antimicrobial-re>
- Proia, L., Anzil, A., Subirats, J., Borrego, C., Farr e, M., Llorca, M., Luis, B.J., Servais, P. (2018). Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. *Chemosphere*, 206, 70–82. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.04.163.
- Pruden, A., Arabi, M., y Storteboom, H. N. (2012). Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. *Environmental Science and Technology*, 46(21), 11541-11549. doi: 10.1021/es302657r.

- Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., y Carlson, K. H. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environmental Science and Technology*, 40(23), 7445-7450. doi: 10.1021/es060413l.
- Pulingam, T., Parumasivam, T., Gazzali, A. M., Sulaiman, A. M., Chee, J. Y., Lakshmanan, M., Chin, C.F., y Sudesh, K. (2022). Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 170, 106103. doi: 10.1016/j.ejps.2021.106103.
- Puvača, N. y de Llanos Frutos, R. (2021). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from humans and pet animals. *Antibiotics (Basel)*, 10(1), 69. doi: 10.3390/antibiotics10010069.
- Qin, Z., Munnoch, J. T., Devine, R., Holmes, N. A., Seipke, R. F., Wilkinson, K. A., Wilkinson, B., y Hutchings, M. I. (2017). Formicamycins, antibacterial polyketides produced by *Streptomyces formicae* isolated from African Tetraponera plant-ants. *Chemical Science*, 8(4), 3218-3227. doi: 10.1039/c6sc04265a.
- Quintela-Baluja, M., Chan, C. W., Alnakip, M. E., Abouelnaga, M., y Graham, D. W. (2015). Sanitation, water quality and antibiotic resistance dissemination. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances Educational Programs*. Newcastle University: Fomatex Research Center, 965-75.
- Rafraf, I. D., Lekunberri, I., Sánchez-Melsió, A., Aouni, M., Borrego, C. M., y Balcázar, J. L. (2016). Abundance of antibiotic resistance genes in five municipal wastewater treatment plants in the Monastir Governorate, Tunisia. *Environmental Pollution*, 219, 353-358. doi: 10.1016/j.envpol.2016.10.062.
- Ram, S., Vajpayee, P., y Shanker, R. (2007). Prevalence of multi-antimicrobial-agent resistant, shiga toxin and enterotoxin producing *Escherichia coli* in surface waters of river Ganga. *Environmental Science and Technology*, 41(21), 7383-7388. doi: 10.1021/es0712266.
- Ramirez, M. S. y Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151-171. doi: 10.1016/j.drug.2010.08.003.
- Ramón-García, S., Otal, I., Martín, C., Gómez-Lus, R., y Ainsa, J. A. (2006). Novel streptomycin resistance gene from *Mycobacterium fortuitum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3920-3922. doi: 10.1128/AAC.00223-06.
- Rathnayake, I. U., Hargreaves, M., y Huygens, F. (2012). Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(5), 326-333. doi: 10.1016/j.syapm.2012.05.004.
- Raven, K. E., Ludden, C., Gouliouris, T., Blane, B., Naydenova, P., Brown, N. M., Parkhill, J., y Peacock, S. J. (2019). Genomic surveillance of *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plants as an indicator of clinically relevant pathogens and their resistance genes. *Microbial Genomics*, 5(5), e000267. doi: 10.1099/mgen.0.000267.
- Recchia, G. D. y Hall, R. M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology (Reading)*, 141(Pt 12), 3015-3027. doi: 10.1099/13500872-141-12-3015.

- Reinthal, F. F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckebauer, G., Mascher, F., y Marth, E. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*, *37*(8), 1685-1690. doi: 10.1016/S0043-1354(02)00569-9.
- Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J. C., Combe, M., Pepey, E., Pouyau, L., Vega-Heredía, S., de Verdal, H., y Gozlan, R. E. (2020). Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nature Communications*, *11*(1), 1870. doi: 10.1038/s41467-020-15735-6.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, *4*(3), 482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., Michael, I., y Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of the Total Environment*, *447*, 345-360. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.
- Roberts, M. C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, *245*(2), 195-203. doi: 10.1016/j.femsle.2005.02.034.
- Roberts, M. C. (2011). Mechanisms of bacterial antibiotic resistance and lessons learned from environmental tetracycline-resistant bacteria. *Antimicrobial Resistance in the Environment*, 93-121. doi: 10.1002/9781118156247.ch7.
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Barceló, D., y Balcázar, J. L. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, *69*, 234-242. doi: 10.1016/j.watres.2014.11.021.
- Rosas, I., Salinas, E., Martínez, L., Cruz-Córdova, A., González-Pedrajo, B., Espinosa, N., y Amáñiles-Cuevas, C. F. (2015). Characterization of *Escherichia coli* isolates from an urban lake receiving water from a wastewater treatment plant in Mexico city: fecal pollution and antibiotic resistance. *Current Microbiology*, *71*(4), 490-495. doi: 10.1007/s00284-015-0877-8.
- Rosi-Marshall, E. J. y Kelly, J. J. (2015). Antibiotic stewardship should consider environmental fate of antibiotics. *Environmental Science and Technology*, *49*(9), 5257-5258. doi: 10.1021/acs.est.5b01519.
- Rosini, R., Nicchi, S., Pizza, M., y Rappuoli, R. (2020). Vaccines against antimicrobial resistance. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1578. doi: 10.3389/fimmu.2020.01048.
- Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *51*(5), 1109-1117. doi: 10.1093/jac/dkg222.
- Rusch, M., Spielmeier, A., Zorn, H., y Hamscher, G. (2019). Degradation and transformation of fluoroquinolones by microorganisms with special emphasis on ciprofloxacin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(17), 6933-6948. doi: 10.1007/s00253-019-10017-8.

- Sabri, N., Schmitt, H., Van der Zaan, B., Gerritsen, H. W., Zuidema, T., Rijnaarts, H. H. M., y Langenhoff, A. A. M. (2020). Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 102245. doi: 10.1016/j.jece.2018.03.004.
- Said, L. B., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C. A., Boudabous, A., Ben Slama, K., y Torres, C. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 86-92. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023.
- Sanders, C. C. (2001). Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 32(Supplement 1), S1-S8. doi: 10.1086/319369.
- Şanlıtürk, G. y Güran, M. (2022). Monitoring of microbiological dynamics in beach sand and seawater samples from recreational and non-recreational beaches over a two-year period. *International Journal of Environmental Health Research*, 32(9), 1973-1985. doi: 10.1080/09603123.2021.1931049.
- Sapkota, A. R., Curriero, F. C., Gibson, K. E., y Schwab, K. J. (2007). Antibiotic-resistant *enterococci* and fecal indicators in surface water and groundwater impacted by a concentrated swine feeding operation. *Environmental Health Perspectives*, 115(7), 1040-1045. doi: 10.1289/ehp.9770.
- Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J. A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., Voigt, A., y Kreyenschmidt, J. (2020). Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 727, 138788. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138788.
- Schages, L., Wichern, F., Kalscheuer, R., y Bockmühl, D. (2020). Winter is coming—Impact of temperature on the variation of beta-lactamase and *mcr* genes in a wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*, 712, 136499. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136499.
- Schijven, J. F., Blaak, H., Schets, F. M., y de Roda Husman, A. M. (2015). Fate of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from faecal sources in surface water and probability of human exposure through swimming. *Environmental Science and Technology*, 49(19), 11825-11833. doi: 10.1021/acs.est.5b01888.
- Schmidt, A. S., Bruun, M. S., Dalsgaard, I., y Larsen, J. L. (2001). Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5675-5682. doi: 10.1128/AEM.67.12.5675-5682.2001.
- Schmitt, H., ter Laak, T., y Duis, K. (2017). Development and Dissemination of Antibiotic Resistance in the Environment Under Environmentally Relevant Concentrations of Antibiotics and Its Risk Assessment: Literature Study. *Umwelt Bundesamt*. Consultado el 24 de noviembre de 2023. Disponible en: https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1968/publikationen/2017-01-09_texte_01-2017_resistance_final_track_changes.pdf
- Schneeberger, C. L., O'Driscoll, M., Humphrey, C., Henry, K., Deal, N., Seiber, K., Hill, V.R., y Zarate-Bermudez, M. (2015). Fate and transport of enteric microbes from septic systems in a coastal watershed. *Journal of Environmental Health*, 77(9), 22-30.

- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., y Johne, R. (2012). PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., y Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(3), 325-335. doi: 10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x.
- Schwermer, C. U., Krzeminski, P., Wennberg, A. C., Vogelsang, C., y Uhl, W. (2018). Removal of antibiotic resistant *E. coli* in two Norwegian wastewater treatment plants and by nano-and ultra-filtration processes. *Water Science and Technology*, 77(3-4), 1115-1126. doi: 10.2166/wst.2017.642.
- Scott, L. C., Lee, N., y Aw, T. G. (2020). Antibiotic resistance in minimally human-impacted environments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), 3939. doi: 10.3390/ijerph17113939.
- Selim, S. (2022). Mechanisms of gram-positive vancomycin resistance. *Biomedical Reports*, 16(1), 7. doi: 10.3892/br.2021.1490.
- Seppälä, H., Skurnik, M., Soini, H., Roberts, M. C., y Huovinen, P. (1998). A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(2), 257-262. doi: 10.1128/AAC.42.2.257.
- Serwecińska, L. (2020). Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health. *Water*, 12(12), 3313. doi: 10.3390/w12123313.
- Shannon, M. A., Bohn, P. W., Elimelech, M., Georgiadis, J. G., Marinas, B. J., y Mayes, A. M. (2008). Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature*, 452(7185), 301-310. doi: 10.1038/nature06599.
- Shih, Y. H., Yu, C. C., Chang, K. C., Tseng, Y. H., Li, P. J., Hsia, S. M., Chiu, K.C., y Shieh, T. M. (2022). Synergistic Effect of Combination of a Temoporfin-Based Photodynamic Therapy with Potassium Iodide or Antibacterial Agents on Oral Disease Pathogens In Vitro. *Pharmaceuticals (Basel)*, 15(4), 488. doi: 10.3390/ph15040488.
- Shuval, H. (2003). Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. *Journal of Water and Health*, 1(2), 53-64. doi: 10.2166/wh.2003.0007.
- Sidrach-Cardona, R., Hijosa-Valsero, M., Marti, E., Balcázar, J. L., y Becares, E. (2014). Prevalence of antibiotic-resistant fecal bacteria in a river impacted by both an antibiotic production plant and urban treated discharges. *Science of the Total Environment*, 488-489, 220-227. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.04.100.
- Silva, J., Castillo, G., Callejas, L., López, H., y Olmos, J. (2006). Frequency of transferable multiple antibiotic resistance amongst coliform bacteria isolated from a treated sewage effluent in Antofagasta, Chile. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(5). doi: 10.2225/vol9-issue5-fulltext-7.

- Sims, N. y Kasprzyk-Hordern, B. (2020). Future perspectives of wastewater-based epidemiology: monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environment International*, 139, 105689. doi: 10.1016/j.envint.2020.105689.
- Singh, A. K., Das, S., Singh, S., Gajamer, V. R., Pradhan, N., Lepcha, Y. D., y Tiwari, H. K. (2018). Prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* among the children in rural hill communities of Northeast India. *PLoS One*, 13(6), e0199179. doi: 10.1371/journal.pone.0199179.
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., y Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The Open Microbiology Journal*, 11, 53-62. doi: 10.2174/1874285801711010053.
- Siqueira, A. K., Michael, G. B., Domingos, D. F., Ferraz, M. M., Ribeiro, M. G., Schwarz, S., y Leite, D. S. (2016). Diversity of class 1 and 2 integrons detected in *Escherichia coli* isolates from diseased and apparently healthy dogs. *Veterinary Microbiology*, 194, 79-83. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.05.005.
- Skaland, R. G., Herrador, B. G., Hisdal, H., Hygen, H. O., Hyllestad, S., Lund, V., White, R., Wong, W.K., y Nygård, K. (2022). Impacts of climate change on drinking water quality in Norway. *Journal of Water and Health*, 20(3), 539-550. doi: 10.2166/wh.2022.264.
- Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research*, 32(3-4), 261-273. doi: 10.1051/vetres:2001123.
- Soller, J. A., Eftim, S. E., y Nappier, S. P. (2018). Direct potable reuse microbial risk assessment methodology: Sensitivity analysis and application to State log credit allocations. *Water Research*, 128, 286-292. doi: 10.1016/j.watres.2017.10.034.
- Soraas, A., Sundsfjord, A., Sandven, I., Brunborg, C., y Jenum, P. A. (2013). Risk factors for community-acquired urinary tract infections caused by ESBL-producing *enterobacteriaceae*—a case–control study in a low prevalence country. *PLoS One*, 8(7), e69581. doi: 10.1371/journal.pone.0069581.
- Staley, C. y Sadowsky, M. J. (2018). Practical considerations for sampling and data analysis in contemporary metagenomics-based environmental studies. *Journal of Microbiological Methods*, 154, 14-18. doi: 10.1016/j.mimet.2018.09.020.
- Stange, C., Sidhu, J. P. S., Tiehm, A., y Toze, S. (2016). Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(8), 823-831. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.07.015.
- Stewart, G. J. y Sinigalliano, C. D. (1990). Detection of horizontal gene transfer by natural transformation in native and introduced species of bacteria in marine and synthetic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1818-1824. doi: 10.1128/aem.56.6.1818-1824.1990.
- Stoll, C., Sidhu, J. P., Tiehm, A., y Toze, S. (2012). Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environmental Science and Technology*, 46(17), 9716-9726. doi: 10.1021/es302020s.

- Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., y Robicsek, A. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 664-689. doi: 10.1128/CMR.00016-09.
- Su, H. C., Ying, G. G., Tao, R., Zhang, R. Q., Zhao, J. L., y Liu, Y. S. (2012). Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China. *Environmental Pollution*, 169, 42-49. doi: 10.1016/j.envpol.2012.05.007.
- Su, J. Q., An, X. L., Li, B., Chen, Q. L., Gillings, M. R., Chen, H., Zhang, T., y Zhu, Y. G. (2017). Metagenomics of urban sewage identifies an extensively shared antibiotic resistome in China. *Microbiome*, 5(1), 84. doi: 10.1186/s40168-017-0298-y.
- Su, S., Li, C., Yang, J., Xu, Q., Qiu, Z., Xue, B., Wang, S., Zhao, C., Xiao, Z., Wang, J., y Shen, Z. (2020). Distribution of antibiotic resistance genes in three different natural water bodies—a lake, river and sea. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 552. doi: 10.3390/ijerph17020552.
- Subirats, J., Di Cesare, A., Della Giustina, S. V., Fiorentino, A., Eckert, E. M., Rodriguez-Mozaz, S., Borrego, C.M., y Corno, G. (2019). High-quality treated wastewater causes remarkable changes in natural microbial communities and int11 gene abundance. *Water Research*, 167, 114895. doi: 10.1016/j.watres.2019.114895.
- Sukul, P. y Spitteller, M. (2007). Fluoroquinolone antibiotics in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 191, 131-162. doi: 10.1007/978-0-387-69163-3_5.
- Sun, J., Zhang, H., Liu, Y. H., y Feng, Y. (2018). Towards understanding MCR-like colistin resistance. *Trends in Microbiology*, 26(9), 794-808. doi: 10.1016/j.tim.2018.02.006.
- Suttner, B., Johnston, E. R., Orellana, L. H., Rodriguez-R, L. M., Hatt, J. K., Carychao, D., Carter, M.Q., Cooley, M.B., y Konstantinidis, K. T. (2020). Metagenomics as a public health risk assessment tool in a study of natural creek sediments influenced by agricultural and livestock runoff: potential and limitations. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(6), e02525-19. doi: 10.1128/AEM.02525-19.
- Suzuki, Y., Hashimoto, R., Xie, H., Nishimura, E., Nishiyama, M., Nukazawa, K., y Ishii, S. (2019). Growth and antibiotic resistance acquisition of *Escherichia coli* in a river that receives treated sewage effluent. *Science of the Total Environment*, 690, 696-704. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.07.050.
- Svanström, P. (2014). Pathogens and Antibiotic Resistant Bacteria in Abattoir Waste and Animals—A Study Involving Abattoir Wastewater, Earthworms and Marabou Storks. *Swedish University of Agricultural Sciences*. Consultado el 18 de noviembre de 2023. Disponible en: <https://stud.epsilon.slu.se/>
- Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K. H., Gutzkow, T., Eichler, W., Pühler, A., y Schluter, A. (2009). Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology (Reading)*, 155(Pt 7), 2306-2319. doi: 10.1099/mic.0.028233-0.

- Szymanska, U., Wiergowski, M., Sołtyszewski, I., Kuzemko, J., Wiergowska, G., y Woźniak, M. K. (2019). Presence of antibiotics in the aquatic environment in Europe and their analytical monitoring: Recent trends and perspectives. *Microchemical Journal*, *147*, 729-740. doi: 10.1016/j.microc.2019.04.003.
- Tadesse, D. A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M. J., y McDermott, P. F. (2012). Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(5), 741-749. doi: 10.3201/eid1805.111153.
- Tannock, G. W. (1999). The normal microflora as a reservoir of antibiotic resistance determinants. *Medical Importance of the Normal Microflora*, 388-404. Consultado el 23 de octubre de 2023. Disponible en: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4757-3021-0>
- Taučer-Kapteijn, M., Hoogenboezem, W., Heiliegers, L., de Bolster, D., y Medema, G. (2016). Screening municipal wastewater effluent and surface water used for drinking water production for the presence of ampicillin and vancomycin resistant *enterococci*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *219*(4-5), 437-442. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.04.007.
- Taylor, N. G., Verner-Jeffreys, D. W., y Baker-Austin, C. (2011). Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance?. *Trends in Ecology and Evolution*, *26*(6), 278-284. doi: 10.1016/j.tree.2011.03.004.
- Teixeira, P., Almeida, L., Brandão, J., Costa, S., Pereira, S., y Valério, E. (2018). Non-potable use of Lisbon underground water: microbiological and hydrochemical data from a 4-year case study. *Environmental Monitoring and Assessment*, *190*(8), 455. doi: 10.1007/s10661-018-6828-7.
- Teshome, A., Alemayehu, T., Deriba, W., y Ayele, Y. (2020). Antibiotic resistance profile of bacteria isolated from wastewater systems in Eastern Ethiopia. *Journal of Environmental and Public Health*, *2020*, 2796365. doi: 10.1155/2020/2796365.
- Thanner, S., Drissner, D., y Walsh, F. (2016). Antimicrobial resistance in agriculture. *mBio*, *7*(2), e02227-15. doi: 10.1128/mBio.02227-15.
- The World Bank. (2016). By 2050, drug-resistant infections could cause global economic damage on par with 2008 financial crisis. Consultado el 15 de febrero de 2023. Disponible en: <https://www.worldbank.org/en/news/press-release/2016/09/18/by-2050-drug-resistant-infections-could-cause-global-economic-damage-on-par-with-2008-financial-crisis>
- Tian, M., He, X., Feng, Y., Wang, W., Chen, H., Gong, M., Liu, D., Clarke, J.L., and van Eerde, A. (2021). Pollution by antibiotics and antimicrobial resistance in livestock and poultry manure in China, and countermeasures. *Antibiotics (Basel)*, *10*(5), 539. doi: 10.3390/antibiotics10050539.
- Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T. P., y Van Boeckel, T. P. (2020). Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030. *Antibiotics (Basel)*, *9*(12), 918. doi: 10.3390/antibiotics9120918.
- Torres, C., Alonso, C. A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., Del Campo, R., y Coque, T. M. (2018). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiology Spectrum*, *6*(4). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018.

- Tortorella, E., Tedesco, P., Palma Esposito, F., January, G. G., Fani, R., Jaspars, M., y De Pascale, D. (2018). Antibiotics from deep-sea microorganisms: current discoveries and perspectives. *Marine Drugs*, *16*(10), 355. doi: 10.3390/md16100355.
- Touchon, M., Perrin, A., De Sousa, J. A. M., Vangchhia, B., Burn, S., O'Brien, C. L., Denamur, E., Gordon, D., y Rocha, E. P. (2020). Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, *16*(6), e1008866. doi: 10.1371/journal.pgen.1008866.
- Tristram, S. G. y Nichols, S. (2006). A multiplex PCR for β -lactamase genes of *Haemophilus influenzae* and description of a new bla TEM promoter variant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(1), 183-185. doi: 10.1093/jac/dkl150.
- Tropea, E., Hynds, P., McDermott, K., Brown, R. S., y Majury, A. (2021). Environmental adaptation of *E. coli* within private groundwater sources in southeastern Ontario: Implications for groundwater quality monitoring and human health. *Environmental Pollution*, *285*, 117263. doi: 10.1016/j.envpol.2021.117263.
- Truchado, P., Gil, M. I., Suslow, T., y Allende, A. (2018). Impact of chlorine dioxide disinfection of irrigation water on the epiphytic bacterial community of baby spinach and underlying soil. *PLoS One*, *13*(7), e0199291. doi: 10.1371/journal.pone.0199291.
- Turolla, A., Cattaneo, M., Marazzi, F., Mezzanotte, V., y Antonelli, M. (2018). Antibiotic resistant bacteria in urban sewage: Role of full-scale wastewater treatment plants on environmental spreading. *Chemosphere*, *191*, 761-769. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.099.
- U.S. Environmental Protection Agency, USEPA, U. (2004). Effluent limitations guidelines and new source performance standards for the meat and poultry products, point source category. *Federal Register*, *69*, 54475-54555. Consultado el 21 de septiembre de 2023. Disponible en: <https://www.federalregister.gov/documents/2004/09/08/04-12017/effluent-limitations-guidelines-and-new-source-performance-standards-for-the-meat-and-poultry>
- U.S. Environmental Protection Agency, USEPA, U. (2011). Keeping Raw Sewage and Contaminated Stormwater Out of the Public's Water. Consultado el 28 de septiembre de 2023. Disponible en: <https://www3.epa.gov/region02/water/sewer-report-3-2011.pdf>
- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. B., Dhama, K., Ripon, M.K.H., Gajdacs, M., Sahibzada, M.U.K., Hossain, M.J., y Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, *14*(12), 1750-1766. doi: 10.1016/j.jiph.2021.10.020.
- Udikovic-Kolic, N., Wichmann, F., Broderick, N. A., y Handelsman, J. (2014). Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(42), 15202-15207. doi: 10.1073/pnas.1409836111.
- Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., y Osek, J. (2022). Antibiotic resistance in bacteria—A review. *Antibiotics (Basel)*, *11*(8), 1079. doi: 10.3390/antibiotics11081079.

- Uyttendaele, M., Jaykus, L. A., Amoah, P., Chiodini, A., Cunliffe, D., Jacxsens, L., Holvoet, K., Lau, M., McClure, P., Medema, G., Sampers, I., y Rao Jasti, P. (2015). Microbial hazards in irrigation water: standards, norms, and testing to manage use of water in fresh produce primary production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 336-356. doi: 10.1111/1541-4337.12133.
- Vaara, M. (1993). Outer membrane permeability barrier to azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin in gram-negative enteric bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(2), 354-356. doi: 10.1128/AAC.37.2.354.
- Vakulenko, S. B. y Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 430-450. doi: 10.1128/CMR.16.3.430-450.2003.
- Valero, A., Rodríguez-Gascón, A., Isla, A., Barrasa, H., del Barrio-Tofiño, E., Oliver, A., Canut, A., y Solinís, M. Á. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility in Spain: antimicrobial activity and resistance suppression evaluation by PK/PD analysis. *Pharmaceutics*, 13(11), 1899. doi: 10.3390/pharmaceutics13111899.
- Van Boeckel, T. P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N. G., Gilbert, M., Bonhoeffer, S., y Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low-and middle-income countries. *Science*, 365(6459), eaaw1944. doi: 10.1126/science.aaw1944.
- Van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., y Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME Journal*, 5(2), 173-183. doi: 10.1038/ismej.2010.80.
- Van Heijnsbergen, E., Niebaum, G., Lämmchen, V., Borneman, A., Hernández Leal, L., Klasmeier, J., y Schmitt, H. (2022). (Antibiotic-Resistant) *E. coli* in the Dutch–German Vecht Catchment–Monitoring and Modeling. *Environmental Science and Technology*, 56(21), 15064-15073. doi: 10.1021/acs.est.2c00218.
- Van Huynh, C., van Scheltinga, C. T., Pham, T. H., Duong, N. Q., Tran, P. T., Nguyen, L. H. K., Tung, G. P., Nguyễn, B. N., y Timmerman, J. G. (2019). Drought and conflicts at the local level: Establishing a water sharing mechanism for the summer-autumn rice production in Central Vietnam. *International Soil and Water Conservation Research*, 7(4), 362-375. doi: 10.1016/j.iswcr.2019.07.001.
- Van Puyvelde, S., Deborggraeve, S., y Jacobs, J. (2018). Why the antibiotic resistance crisis requires a One Health approach. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(2), 132-134. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30704-1.
- Van Schaik, W. (2015). The human gut resistome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1670), 20140087. doi: 10.1098/rstb.2014.0087.
- Vázquez-Laslop, N. y Mankin, A. S. (2018). How macrolide antibiotics work. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(9), 668-684. doi: 10.1016/j.tibs.2018.06.011.
- Velpandian, T., Halder, N., Nath, M., Das, U., Moksha, L., Gowtham, L., y Batta, S. P. (2018). Un-segregated waste disposal: an alarming threat of antimicrobials in surface and ground water sources in Delhi. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(29), 29518-29528. doi: 10.1007/s11356-018-2927-9.

- Vergaray, G., Méndez, C., Morante, H., Heredia, V., y Béjar, V. (2007). *Enterococcus* y *Escherichia coli* como indicadores de contaminación fecal en playas costeras de Lima. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de minas, metalurgia y ciencias geográficas*, 10(20), 82-86.
- Versporten, A., Zarb, P., Caniaux, I., Gros, M. F., Drapier, N., Miller, M., Jarlier, V., Nathwani, D., Goossens, H., y May, S. (2018). Antimicrobial consumption and resistance in adult hospital inpatients in 53 countries: results of an internet-based global point prevalence survey. *The Lancet Global Health*, 6(6), e619-e629. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30186-4.
- Vignaroli, C., Luna, G. M., Pasquaroli, S., Di Cesare, A., Petruzzella, R., Paroncini, P., y Biavasco, F. (2013). Epidemic *Escherichia coli* ST131 and *Enterococcus faecium* ST17 in coastal marine sediments from an Italian beach. *Environmental Science and Technology*, 47(23), 13772-13780. doi: 10.1021/es4019139.
- Vignaroli, C., Pasquaroli, S., Citterio, B., Di Cesare, A., Mangiaterra, G., Fattorini, D., y Biavasco, F. (2018). Antibiotic and heavy metal resistance in *enterococci* from coastal marine sediment. *Environmental Pollution*, 237, 406-413. doi: 10.1016/j.envpol.2018.02.073.
- Villanueva-Cabezas, J. P., Winkel, K. D., Campbell, P. T., Wiethoelter, A., y Pfeiffer, C. (2022). One Health education should be early, inclusive, and holistic. *The Lancet Planet Health*, 6(3), e188-e189. doi: 10.1016/S2542-5196(22)00018-3.
- Voigt, A. M., Zacharias, N., Timm, C., Wasser, F., Sib, E., Skutlarek, D., Parcina, M., Schmithausen, R.M., Schwartz, T., Hembach, N., Tiehm, A., Stange, C., Engelhart, S., Bierbaum, G., Kistemann, T., Exner, M., Faerber, H.A., y Schreiber, C. (2020). Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater—An evaluation of clinical influences. *Chemosphere*, 241, 125032. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125032.
- Wachino, J. I. y Arakawa, Y. (2012). Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resistance Updates*, 15(3), 133-148. doi: 10.1016/j.drug.2012.05.001.
- Wales, A. D. y Davies, R. H. (2015). Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics (Basel)*, 4(4), 567-604. doi: 10.3390/antibiotics4040567.
- Wallender, E. K., Ailes, E. C., Yoder, J. S., Roberts, V. A., y Brunkard, J. M. (2014). Contributing factors to disease outbreaks associated with untreated groundwater. *Ground Water*, 52(6), 886-897. doi: 10.1111/gwat.12121.
- Wang, C., Gu, X., Zhang, S., Wang, P., Guo, C., Gu, J., y Hou, J. (2013). Characterization of antibiotic-resistance genes in antibiotic resistance *Escherichia coli* isolates from a lake. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 65(4), 635-641. doi: 10.1007/s00244-013-9932-2.
- Wang, F. H., Qiao, M., Lv, Z. E., Guo, G. X., Jia, Y., Su, Y. H., y Zhu, Y. G. (2014). Impact of reclaimed water irrigation on antibiotic resistance in public parks, Beijing, China. *Environmental Pollution*, 184, 247-253. doi: 10.1016/j.envpol.2013.08.038.

- Wang, J., Chu, L., Wojnárovits, L., y Takács, E. (2020a). Occurrence and fate of antibiotics, antibiotic resistant genes (ARGs) and antibiotic resistant bacteria (ARB) in municipal wastewater treatment plant: An overview. *Science of the Total Environment*, 744, 140997. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140997.
- Wang, K., Reguyal, F., y Zhuang, T. (2021). Risk assessment and investigation of landfill leachate as a source of emerging organic contaminants to the surrounding environment: a case study of the largest landfill in Jinan City, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(15), 18368-18381. doi: 10.1007/s11356-020-10093-8.
- Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., Hooper, D.C., y Wang, M. (2009). New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 1892-1897. doi: 10.1128/AAC.01400-08.
- Wang, R. X., Wang, J. Y., Sun, Y. C., Yang, B. L., y Wang, A. L. (2015). Antibiotic resistance monitoring in *Vibrio* spp. isolated from rearing environment and intestines of abalone *Haliotis diversicolor*. *Marine Pollution Bulletin*, 101(2), 701-706. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.10.027.
- Wang, R., Van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L.A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., y Balloux, F. (2018). The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. *Nature Communications*, 9(1), 1179. doi: 10.1038/s41467-018-03205-z.
- Wang, S., Ma, X., Liu, Y., Yi, X., Du, G., y Li, J. (2020b). Fate of antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and cell-free antibiotic-resistant genes in full-scale membrane bioreactor wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, 302, 122825. doi: 10.1016/j.biortech.2020.122825.
- Wang, S., Xue, N., Li, W., Zhang, D., Pan, X., y Luo, Y. (2020c). Selectively enrichment of antibiotics and ARGs by microplastics in river, estuary and marine waters. *Science of the Total Environment*, 708, 134594. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134594.
- Water JPI (2018). What is contaminating our waters next? CONTAMINANTS OF EMERGING CONCERN (CECS) – NOVEL WAYS TO REDUCE THEIR HUMAN AND ENVIRONMENTAL RISKS. Consultado el 23 de septiembre de 2023. Disponible en: http://www.waterjpi.eu/images/documents/waterjpi_policy_brief_final.pdf
- Watkinson, A. J., Micalizzi, G. B., Graham, G. M., Bates, J. B., y Costanzo, S. D. (2007). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5667-5670. doi: 10.1128/AEM.00763-07.
- Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., y Costanzo, S. D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Science of the Total Environment*, 407(8), 2711-2723. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.059.
- Watts, J. E., Schreier, H. J., Lanska, L., y Hale, M. S. (2017). The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions. *Marine Drugs*, 15(6), 158. doi: 10.3390/md15060158.
- Weber, D. J., Anderson, D., y Rutala, W. A. (2013). The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 26(4), 338-344. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283630f04.

- Weinstein, M. P., Limbago, B., Patel, J. B., Mathers, A., Campeau, S., Mazzulli, T., Eliopoulos, G.M., Patel, R., Galas, M. F., Richter, S. S., Humphries, R. M., Satlin, M., Jenkins, S. G., Swenson, J. M., Lewis II, J. S., y Zimmer, B. L. (2018). M100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 38(3), 1-258.
- Wellcome Trust. (2020). The Global Response to AMR Momentum, Success, and Critical Gaps. Consultado el 2 de octubre de 2023. Disponible en: <https://wellcome.org/reports/global-response-amr-momentum-success-and-critical-gaps>
- Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., Johnson-Rollings, A.S., Jones, D.L., Lee, N.M., Otten, W., Thomas, C.M., y Williams, A. P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2), 155-165. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70317-1.
- Wen, Q., Yang, L., Duan, R., y Chen, Z. (2016). Monitoring and evaluation of antibiotic resistance genes in four municipal wastewater treatment plants in Harbin, Northeast China. *Environmental Pollution*, 212, 34-40. doi: 10.1016/j.envpol.2016.01.043.
- Whitman, R. L., Nevers, M. B., Korinek, G. C., y Byappanahalli, M. N. (2004). Solar and temporal effects on *Escherichia coli* concentration at a Lake Michigan swimming beach. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4276-4285. doi: 10.1128/AEM.70.7.4276-4285.2004.
- Williams, H. G., Day, M. J., Fry, J. C., y Stewart, G. J. (1996). Natural transformation in river epilithon. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 2994-2998. doi: 10.1128/aem.62.8.2994-2998.1996.
- Williams-Nguyen, J., Sallach, J. B., Bartelt-Hunt, S., Boxall, A. B., Durso, L. M., McLain, J. E., Singer, R.S., Snow, D.D., y Zilles, J. L. (2016). Antibiotics and antibiotic resistance in agroecosystems: state of the science. *Journal of Environmental Quality*, 45(2), 394-406. doi: 10.2134/jeq2015.07.0336.
- Wilson, H. y Török, M. E. (2018). Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Microbial Genomics*, 4(7), e000197. doi: 10.1099/mgen.0.000197.
- Winter, J. G. y Duthie, H. C. (1998). Effects of urbanization on water quality, periphyton and invertebrate communities in a southern Ontario stream. *Canadian Water Resources Journal*, 23(3), 245-257. doi: 10.4296/cwrj2303245.
- Woegerbauer, M., Bellanger, X., y Merlin, C. (2020). Cell-free DNA: an underestimated source of antibiotic resistance gene dissemination at the interface between human activities and downstream environments in the context of wastewater reuse. *Frontiers in Microbiology*, 11, 671. doi: 10.3389/fmicb.2020.00671.
- World Health Organization. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Who*, 2017, 1-7. Consultado el 15 de septiembre de 2023. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- World Health Organization. (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. Consultado el 14 de septiembre de 2023. Disponible en: <https://www.emro.who.int/health-topics/drug-resistance/global-action-plan.html>

- World Health Organization. (2019). New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. *Joint News Release*, 29. Consultado el 17 de septiembre de 2023. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>
- World Health Organization. (2020). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: early implementation 2020. Consultado el 20 de septiembre de 2023. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240005587>
- World Health Organization. (2021). TripartiteandUNEP supportOHHLEP's definition of "One health". Consultado el 7 de abril de 2023. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/01-12-2021-tripartite-andunep-support-ohhlep-s-definition-of-one-health>
- World Health Organization. (2022a). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022–2020 data. Consultado el 7 de noviembre de 2023. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2022-2020-data>
- World Health Organization. (2022b). *Guidelines for drinking-water quality: incorporating the first and second addenda*. World Health Organization. Consultado el 7 de noviembre de 2023. Disponible en: <https://www.who.int/teams/environment-climate-change-and-health/water-sanitation-and-health/water-safety-and-quality/drinking-water-quality-guidelines>
- World Health Organization. (2022c). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022. Consultado el 11 de noviembre de 2023. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>
- Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 589-594. doi: 10.1016/j.mib.2010.08.005.
- Wu, D. L., Zhang, M., He, L. X., Zou, H. Y., Liu, Y. S., Li, B. B., Yang, Y.Y., Liu, C., He, L.Y., y Ying, G. G. (2020). Contamination profile of antibiotic resistance genes in ground water in comparison with surface water. *Science of the Total Environment*, 715, 136975. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136975.
- Wu, Y., Battalapalli, D., Hakeem, M. J., Selamneni, V., Zhang, P., Draz, M. S., y Ruan, Z. (2021). Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 401. doi: 10.1186/s12951-021-01132-8.
- Xi, C., Zhang, Y., Marrs, C. F., Ye, W., Simon, C., Foxman, B., y Nriagu, J. (2009). Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5714-5718. doi: 10.1128/AEM.00382-09.
- Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., Zhang, Y., Li, X., y Meng, W. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*, 119, 1379-1385. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.040.
- Xu, L., Ouyang, W., Qian, Y., Su, C., Su, J., y Chen, H. (2016). High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems. *Environmental Pollution*, 213, 119-126. doi: 10.1016/j.envpol.2016.02.013.

- Xu, X. R. y Li, X. Y. (2010). Sorption and desorption of antibiotic tetracycline on marine sediments. *Chemosphere*, 78(4), 430-436. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.10.045.
- Yang, F., Deng, B., Liao, W., Wang, P., Chen, P., y Wei, J. (2019a). High rate of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from human and animal origin. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2729-2737. doi: 10.2147/IDR.S219155.
- Yang, Y., Li, B., Ju, F., y Zhang, T. (2013). Exploring variation of antibiotic resistance genes in activated sludge over a four-year period through a metagenomic approach. *Environmental Science and Technology*, 47(18), 10197-10205. doi: 10.1021/es4017365.
- Yang, Y., Liu, G., Song, W., Ye, C., Lin, H., Li, Z., y Liu, W. (2019b). Plastics in the marine environment are reservoirs for antibiotic and metal resistance genes. *Environment International*, 123, 79-86. doi: 10.1016/j.envint.2018.11.061.
- Yang, Y., Song, W., Lin, H., Wang, W., Du, L., y Xing, W. (2018). Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: a review and meta-analysis. *Environment International*, 116, 60-73. doi: 10.1016/j.envint.2018.04.011.
- Yap, M. N. F. (2013). The double life of antibiotics. *Missouri Medicine*, 110(4), 320-324.
- Ye, J. y Chen, X. (2022). Current Promising Strategies against Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Antibiotics (Basel)*, 12(1), 67. doi: 10.3390/antibiotics12010067.
- Yin, X., Deng, Y., Ma, L., Wang, Y., Chan, L. Y., y Zhang, T. (2019). Exploration of the antibiotic resistome in a wastewater treatment plant by a nine-year longitudinal metagenomic study. *Environment International*, 133(Pt B), 105270. doi: 10.1016/j.envint.2019.105270.
- Yu, X., Sui, Q., Lyu, S., Zhao, W., Liu, J., Cai, Z., Yu, G., y Barcelo, D. (2020). Municipal solid waste landfills: an underestimated source of pharmaceutical and personal care products in the water environment. *Environmental Science and Technology*, 54(16), 9757-9768. doi: 10.1021/acs.est.0c00565.
- Yue, Z., Zhang, J., Zhou, Z., Ding, C., Zhang, T., Wan, L., y Wang, X. (2022). Antibiotic degradation dominates the removal of antibiotic resistance genes during composting. *Bioresource Technology*, 344(Pt B), 126229. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126229.
- Zagui, G. S., de Andrade, L. N., Moreira, N. C., Silva, T. V., Machado, G. P., da Costa Darini, A. L., y Segura-Muñoz, S. I. (2020). Gram-negative bacteria carrying β -lactamase encoding genes in hospital and urban wastewater in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(6), 376. doi: 10.1007/s10661-020-08319-w.
- Zalewska, M., Błażejewska, A., Czapko, A., y Popowska, M. (2021). Antibiotics and antibiotic resistance genes in animal manure—consequences of its application in agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 12, 610656. doi: 10.3389/fmicb.2021.610656.
- Zhang, G. y Hao, Q. (2011). Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism. *The FASEB Journal*, 25(8), 2574-2582. doi: 10.1096/fj.11-184036.
- Zhang, H., Zhou, Y., Guo, S., y Chang, W. (2015a). Prevalence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* isolated from rural well water in Taian, China, 2014. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11488-11492. doi: 10.1007/s11356-015-4387-9.

- Zhang, K., Xin, R., Zhao, Z., Ma, Y., Zhang, Y., y Niu, Z. (2020). Antibiotic resistance genes in drinking water of China: occurrence, distribution and influencing factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188, 109837. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109837.
- Zhang, S. H., Lv, X., Han, B., Gu, X., Wang, P. F., Wang, C., y He, Z. (2015b). Prevalence of antibiotic resistance genes in antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates in surface water of Taihu Lake Basin, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11412-11421. doi: 10.1007/s11356-015-4371-4.
- Zhang, S., Pang, S., Wang, P., Wang, C., Han, N., Liu, B., Han, B., Li, Y., y Anim-Larbi, K. (2016). Antibiotic concentration and antibiotic-resistant bacteria in two shallow urban lakes after stormwater event. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9984-9992. doi: 10.1007/s11356-016-6237-9.
- Zhang, T., Ding, J., Rao, X., Yu, J., Chu, M., Ren, W., Wang, L., y Xue, W. (2015c). Analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* major clonal lineages by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI–TOF MS). *Journal of Microbiological Methods*, 117, 122-127. doi: 10.1016/j.mimet.2015.08.002.
- Zhang, X. X., Zhang, T., y Fang, H. H. (2009b). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), 397-414. doi: 10.1007/s00253-008-1829-z.
- Zhang, X., Li, Y., Liu, B., Wang, J., Feng, C., Gao, M., y Wang, L. (2014). Prevalence of veterinary antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the surface water of a livestock production region in northern China. *PLoS One*, 9(11), e111026. doi: 10.1371/journal.pone.0111026.
- Zhang, Y., Gu, A. Z., Cen, T., Li, X., He, M., Li, D., y Chen, J. (2018). Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment. *Environmental Pollution*, 237, 74-82. doi: 10.1016/j.envpol.2018.01.032.
- Zhang, Y., Marrs, C. F., Simon, C., y Xi, C. (2009a). Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Science of the Total Environment*, 407(12), 3702-3706. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.02.013.
- Zheng, J., Su, C., Zhou, J., Xu, L., Qian, Y., y Chen, H. (2017). Effects and mechanisms of ultraviolet, chlorination, and ozone disinfection on antibiotic resistance genes in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants. *Chemical Engineering Journal*, 317. doi: 10.1016/j.cej.2017.02.076.
- Zhou, Y., Deng, W., Mo, M., Luo, D., Liu, H., Jiang, Y., Chen, W., y Xu, C. (2021). Stimuli-responsive nanoplatfrom-assisted photodynamic therapy against bacterial infections. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, 8, 729300. doi: 10.3389/fmed.2021.729300.
- Zhu, Y. G., Zhao, Y. I., Li, B., Huang, C. L., Zhang, S. Y., Yu, S., Chen, Y.S., Zhang, T., Gillings, M.R., y Su, J. Q. (2017). Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. *Nature Microbiology*, 2, 16270. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.270.
- Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B.A., y Leung, K. Y. (2021). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*, 285, 117402. doi: 10.1016/j.envpol.2021.117402.

- Zinsstag, J., Kaiser-Grolimund, A., Heitz-Tokpa, K., Sreedharan, R., Lubroth, J., Caya, F., Stone, M., Brown, H., Bonfoh, B., Dobell, E., Morgan, D., Homaira, N., Kock, R., Hattendorf, J., Crump, L., Mauti, S., Del Rio Vilas, V., Saikat, S., Zumla, A., ... y de la Rocque, S. (2023). Advancing One human–animal–environment Health for global health security: what does the evidence say?. *The Lancet*, *401*(10376), 591-604. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01595-1.
- Zorgani, A., Daw, H., Sufya, N., Bashein, A., Elahmer, O., y Chouchani, C. (2017). Co-occurrence of plasmid-mediated AmpC β -lactamase activity among *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *The Open Microbiology Journal*, *11*, 195-202. doi: 10.2174/1874285801711010195.
- Zou, H., Zheng, B., Sun, M., Ottoson, J., Li, Y., Berglund, B., Chi, X., Ji, X., Li, X., Stålsby Lundborg, C., y Nilsson, L. E. (2019). Evaluating dissemination mechanisms of antibiotic-resistant bacteria in rural environments in China by using CTX-M-producing *Escherichia coli* as an indicator. *Microbial Drug Resistance*, *25*(7), 975-984. doi: 10.1089/mdr.2018.0431.
- Zurfluh, K., Bagutti, C., Brodmann, P., Alt, M., Schulze, J., Fanning, S., Stephan, R., y Nüesch-Inderbinen, M. (2017). Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase-and 16s rRNA methylase-producing *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *50*(3), 436-440. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.04.017.

VIII. Anexos

Anexo I. Familias de antibióticos utilizados para determinar los perfiles de resistencias en *E. coli* y *Enterococcus* spp.

Familia	Antibiótico
Aminoglucósidos	Gentamicina
Anfenicoles	Cloranfenicol
Betalactámicos	Ampicilina
	Cefotaxima
	Ceftazidima
	Meropenem
Glucopéptidos	Teicoplanina
	Vancomicina
Lipopéptidos cíclicos	Daptomicina
Macrólidos	Azitromicina
	Eritromicina
Oxazolidinona	Linezolid
Polimixinas	Colistina
Quinolonas	Ciprofloxacino
	Ácido Nalidíxico
Sulfonamidas	Sulfametoxazol
	Trimetoprim
Tetraciclinas	Tetracilina
	Tigecilina

Anexo II. Niveles de resistencia encontrados en las Cepas de *E. coli* aisladas de todos los tipos de agua.

Origen muestra	Nº de aislados de <i>E. coli</i>	Nº de aislados resistentes de <i>E. coli</i> (%)														Nº de MDR (%)
		SMX	TMP	CIP	TET	MER	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN	
EDAR ST	78	47 (60)	43 (55)	43 (55)	51 (65)	5 (6)	10 (13)	44 (56)	12 (5)	29 (37)	5 (6)	12 (15)	6 (7)	70 (90)	17 (22)	54 (69)
Superficiales riego	125	121 (97)	65 (52)	75 (60)	81 (65)	0 (0)	30 (24)	69 (55)	25 (20)	34 (27)	0 (0)	21 (17)	0	90 (72)	16 (13)	88 (70)
Costa	57	9 (16)	9 (16)	10 (18)	8 (14)	1 (2)	5 (9)	8 (14)	2 (4)	0 (0)	0 (0)	5 (9)	1 (2)	20 (35)	1 (2)	5 (9)
Continental	58	11 (19)	8 (14)	6 (10)	10 (17)	1 (2)	1 (2)	4 (7)	1 (2)	1 (2)	0	1 (2)	0	9 (16)	2 (4)	6 (10)

SMX: sulfametoxazol; TMP: trimetoprim; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; MER: meropenem; AZI: azitromicina; NAL: ácido nalidíxico; FOT: cefotaxima; CHL: cloranfenicol; TGC: tigeciclina; TAZ: ceftazidima; COL: colistina; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina. MDR: multirresistencia (resistencia \geq 3 familias de antibióticos). ST: Salida Terciario.

Anexo III. Niveles de resistencias encontrados en las cepas de *E. coli* aisladas en todos los tipos de agua.

Nº de aislados resistentes de <i>E. coli</i> (%)				
ANTIBIOTICO	ORIGEN (Nº DE AISLADOS)			
	EDAR ST (78)	AGUAS RIEGO SUPERFICIALES (125)	COSTA (57)	CONTINENTAL (58)
SMX	47 (60)	121 (97)	9 (16)	11 (19)
TMP	43 (55)	65 (52)	9 (16)	8 (14)
CIP	43 (55)	75 (60)	10 (18)	6 (10)
TET	51 (65)	81 (65)	8 (14)	10 (17)
MER	5 (6)	0 (0)	1 (2)	1 (2)
AZI	10 (13)	30 (24)	5 (9)	1 (2)
NAL	44 (56)	69 (55)	8 (14)	4 (7)
FOT	12 (5)	25 (20)	2 (4)	1 (2)
CHL	29 (37)	34 (27)	0 (0)	1 (2)
TGC	5 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TAZ	12 (15)	21 (17)	5 (9)	1 (2)
COL	6 (7)	0 (0)	1 (2)	0 (0)
AMP	70 (90)	90 (72)	20 (35)	9 (16)
GEN	17 (22)	16 (13)	1 (2)	2 (4)
CEPAS MDR	54 (63)	88 (70)	5 (9)	6 (10)

SMX: sulfametoxazol; TMP: trimetoprim; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; MER: meropenem; AZI: azitromicina; NAL: ácido nalidixico; FOT: cefotaxima; CHL: cloranfenicol; TGC: tigeciclina; TAZ: ceftazidima; COL: colistina; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina. MDR: multirresistencia (resistencia ≥ 3 familias de antibióticos). ST: Salida Terciario.

Anexo IV. Perfiles de multirresistencias presentes en más de un tipo de agua.

PERFILES DE MULTIRRESISTENCIAS	EDAR 1	EDAR 2	EDAR 3	AGUA RIEGO SUPERFICIAL	COSTA	CONTINEN TALES
BLA-SUL-TET	10%	7%	13%	5%	2%	3%
BLA-QNL-SUL-TET	12%	11%	13%	9%	2%	3%
BLA-FEN-QNL-SUL-TET	10%	16%	8%	13%	-	-
BLA-FEN-MCL-QNL-SUL-TET	6%	4%	5%	5%	-	-
AMG-BLA-FEN-QNL-SUL-TET	6%	-	8%	5%	-	-
AMG-BLA-FEN-MCL-QNL-SUL-TET	2%	2%	-	-	-	2%
BLA-QNL-SUL	-	5%	3%	6%	-	-
BLA-FEN-SUL-TET	4%	-	3%	2%	-	-
AMG-BLA-QNL-SUL	2%	-	3%	2%	-	-
BLA-QNL-TET	-	5%	-	2%	-	-
BLA-MCL-QNL-SUL-TET	-	-	10%	5%	-	-
AMG-BLA-MCL-SUL-TET	2%	-	-	5%	-	-
AMG-BLA-QNL-SUL-TET	-	4%	3%	-	-	-
AMG-BLA-MCL-QNL-SUL-TET	2%	4%	-	-	-	-

AMG: Aminoglucósidos; BLA: Betalactámicos; FEN: Anfénicoles; MCL: Macrólidos; QNL: Quinolonas; POL: Polimixinas; SUL: Sulfonamidas; TET: Tetraciclinas.

Anexo V. Perfiles de multirresistencia de todas las aguas.

PERFILES	EDAR 1	EDAR 2	EDAR 3	AGUA DE RIEGO SUPERFICIAL	COSTA	CONTINEN TALES
NO MDR	33%	26%	28%	30	91	90
3 FAMILIAS						
BLA-SUL-TET	10%	7%	13%	5%	2%	3%
BLA-QNL-SUL	-	5%	3%	6%	-	-
QNL-SUL-TET	-	-	8%	-	-	-
BLA-QNL-TET	-	5%	-	2%	-	-
BLA-FEN-TET	2%	-	-	-	-	-
FEN-QNL-SUL	2%	-	-	-	-	-
AMG-BLA-QNL	2%	-	-	-	-	-
BLA-POL-SUL	-	-	-	-	2%	-
AMG-BLA-TET	-	-	-	-	-	2%
4 FAMILIAS						
BLA-QNL-SUL-TET	12%	11%	13%	9%	2%	3%
BLA-FEN-SUL-TET	4%	-	3%	2%	-	-
FEN-QNL-SUL-TET	-	4%	-	-	-	-
AMG-BLA-QNL-SUL	2%	-	3%	2%	-	-
AMG-BLA-QNL-TET	-	2%	-	-	-	-
AMG-QNL-SUL-TET	2%	-	-	-	-	-
BLA-FEN-QNL-TET	-	2%	-	-	-	-
BLA-FEN-QNL-SUL	-	2%	-	2%	-	-
BLA-MCL-QNL-SUL	-	-	-	4%	-	-
BLA-MCL-SUL-TET	-	-	-	4%	-	-
BLA-MCL-QNL-TET	-	-	-	-	2%	-

5 FAMILIAS						
BLA-FEN-QNL-SUL-TET	10%	16%	8%	13%	-	-
BLA-MCL-QNL-SUL-TET	-	-	10%	5%	-	-
AMG-BLA-QNL-SUL-TET	-	4%	3%	-	-	-
BLA-MCL-POL-SUL-TET	-	2%	-	-	-	-
BLA-QNL-POL-SUL-TET	2%	-	-	-	-	-
AMG-BLA-MCL-SUL-TET	2%	-	-	5%	-	-
BLA-FEN-MCL-QNL-SUL	-	-	-	2%	-	-
AMG-BLA-MCL-QNL-SUL	-	-	-	-	2%	-
6 FAMILIAS						
BLA-FEN-MCL-QNL-SUL-TET	6%	4%	5%	5%	-	-
AMG-BLA-FEN-QNL-SUL-TET	6%	-	8%	5%	-	-
AMG-BLA-MCL-QNL-SUL-TET	2%	4%	-	-	-	-
AMG-BLA-FEN-MCL-SUL-TET	-	2%	-	-	-	-
7 FAMILIAS						
AMG-BLA-FEN-MCL-QNL-SUL-TET	2%	2%	-	-	-	2%
AMG-BLA-MCL-QNL-POL-SUL-TET	-	2%	-	-	-	-
8 FAMILIAS						
AMG-BLA-FEN-MCL-QNL-POL-SUL-TET	-	5%	-	-	-	-

AMG: Aminoglucósidos; BLA: Betalactámicos; FEN: Anfencílicos; MCL: Macrólidos; QNL: Quinolonas; POL: Polimixinas; SUL: Sulfonamidas; TET: Tetraciclinas.

Anexo VI. Prevalencia de ARG en las aguas.

TIPO DE MUESTRA	Nº de muestras	Nº de muestras positivas (%)				
		<i>blaTEM</i>	<i>qnrS</i>	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>tetW</i>
EDAR	36	34 (94)	31 (86)	23 (64)	31 (86)	32 (89)
SUPERFICIALES PARA RIEGO	25	24 (96)	18 (72)	15 (60)	20 (80)	25 (100)
COSTA	77	36 (47)	25 (33)	1 (1)	18 (23)	13 (17)