

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL**



**DETECCIÓN DE RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS EN
EFLUENTES DE ESTACIONES DEPURADORAS DE
AGUAS RESIDUALES DE LA PROVINCIA DE VALÈNCIA**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: Arnau Bertomeu Bartual

**TUTOR/A: M^a Ángeles Castillo López
Ana González Pellicer**

Curso Académico: 2016-2017

VALÈNCIA, JULIO 2017

Datos personales

Alumno/a: Arnau Bertomeu Bartual

Datos del Trabajo Fin de Grado

Título del TFG:	Detección de resistencias a antibióticos en efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales de la provincia de València.	
Lugar de realización:	Departamento de Biotecnología	Fecha de lectura: Julio 2017
Titulación:	Grado en Biotecnología	
Especialidad:	Microbiología	
Director/a:	M ^a Ángeles Castillo López Ana González Pellicer	

Resumen

Los antibióticos son uno de los fármacos de mayor uso, se emplean tanto en humanos como en animales; este elevado consumo está relacionado con el incremento de la aparición de bacterias resistentes a éstos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el aumento de bacterias resistentes a antibióticos representa uno de los tres mayores peligros para la salud pública del siglo XXI. Gran parte de los antibióticos acaban en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) debido a una mala gestión en su eliminación y a una estructura química que les permite ser activos durante largos periodos de tiempo. Las EDARs terminan por constituir un ecosistema de acumulación y dispersión al medio de bacterias resistentes. Otro factor que se debe tener en cuenta son los genes de resistencia, éstos son los responsables de inhibir el efecto de los antibióticos. Los genes de resistencia son transferidos entre bacterias mediante transferencia horizontal. Considerar únicamente estudios de bacterias a nivel fenotípico ignora el riesgo de adquirir la resistencia posteriormente, por eso también es necesario aplicar técnicas moleculares como la PCR.

En este trabajo de final de grado se va a estudiar las resistencias a antibióticos en muestras de efluentes de EDAR, tanto a nivel microbiológico como molecular. Se realizaron recuentos de colonias, determinaciones de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de aislados mediante el sistema Sensititre™ y detección mediante PCR de los genes *bla*TEM, *ermB*, *qnrS*, *sulI* y *tetW*.

Los datos obtenidos indican que existen bacterias resistentes a antibióticos y genes de resistencia en todas las muestras analizadas, a excepción del gen *ermB* que no se detecta en 8 muestras. Estos resultados demuestran que las EDARs suponen un agente de dispersión de bacterias resistentes a antibióticos y genes de resistencia al medio, además los tratamientos presentes en las EDARs no consiguen eliminar los genes de resistencia.

Palabras clave

Antibiótico, genes de resistencia a antibióticos, EDAR, CMI, *E. coli*.

Resum

Els antibiòtics són un dels fàrmacs de major ús, s'utilitzen tant en humans com en animals; aquest elevat consum està relacionat amb l'increment en l'aparició de colònies resistents a aquests. Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), l'augment de bacteries resistents a antibiòtics representa un dels tres majors perills per a la salut pública del segle XXI. Gran part dels antibiòtics acaben en les Estacions Depuradores de Aigües Residuals (EDAR) degut a una mala gestió en la seua eliminació i a una estructura química que els permet ser actius durant llargs períodes de temps. Les EDARs acaben per constituir un ecosistema d'acumulació i dispersió al medi de bacteries resistents. Un altre factor que cal tenir en compte són els gens de resistència, aquests són els responsables d'inhibir l'efecte dels antibiòtics. Els gens de resistència són transferits entre bacteries mitjançant transferència horitzontal. Considerar únicament estudis de bacteries a nivell fenotípic ignora el risc d'adquirir a resistència posteriorment, és per això que també és necessari aplicar tècniques moleculars com la PCR.

En aquest treball de final de grau va a estudiar-se les resistències a antibiòtics en mostres d'efluents d'EDAR tant a nivell microbiològic com molecular. El recompte de colònies de *E. coli*, determinació de les concentracions mínimes inhibidores (CMI) d'aïllats mitjançant el sistema Sensititre™ i detecció mitjançant PCR dels gens *bla*TEM, *ermB*, *qnrS*, *sulI* y *tetW*.

Les dades obtingudes indiquen que existeixen bacteries resistents a antibiòtics i gens de resistència en totes les mostres analitzades, a excepció del gen *ermB* que no es detecta en 8 mostres. Aquests resultats demostren que les EDARs suposen un agent de dispersió de bacteries resistents a antibiòtics i gens de resistència al medi, a més els tractaments en les EDARs no aconsegueixen eliminar els gens de resistència.

Paraules clau

Antibiòtic, gens de resistència a antibiòtics, EDAR, CMI, *E. coli*.

Abstract

Antibiotics are one of the most consumed drugs, they are used for both humans and animals; this elevated consumption is related to the increase in the emergence of antibiotic resistant bacteria. According to the World Health Organisation (WHO), the emergence of antibiotic resistant bacteria constitute one of the three biggest threats to the public health in the 21st century. A big quantity of antibiotics end up in Waste Water Treatment Plant due to the bad management. Furthermore, their chemical structure enable them to be active for long time. WWTP constitute an ecosystem for the accumulation and spread to environment of antibiotic resistant bacteria. Another important factor to take into account is the occurrence of antibiotic resistance genes that are responsible of the antibiotic inactivation. Antibiotic resistance genes are transferred across bacteria by horizontal transfer. Phenotypic bacteria studies does not consider the risk of acquiring resistance, because of that molecular technics such as PCR are needed.

In this research work, antibiotic resistance are going to be studied on WWTP effluent samples by microbiological and molecular analysis. Counting colonies of *E.coli*, minimal inhibition concentration (MIC) determination by Sensititre™ system and *bla*TEM, *ermB*, *qnrS*, *sulI* and *tetW* gene detection by PCR were developed.

Obtained data show presence of both bacteria and antibiotic resistance genes in all samples analysed with the exception of the *ermB* gene that is not detected in 8 samples. These results demonstrate that WWTP spread antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes to the environment; furthermore, the treatments applied in WWTP do not eliminate antibiotic resistance genes.

Key words

Antibiotic, antibiotic resistance gene, WWTP, MIC, *E. coli*.

AGRADECIMIENTOS

En primer lloc, moltes gràcies M^a Ángeles i Ana, la vostra dedicació m'ha permès arribar a aquest moment tant important. No sols m'heu ensenyat com realitzar aquest treball, gràcies a vosaltres aquests últims mesos també he estat aprenent molt en el laboratori, això us ho agrairé en el futur.

Gràcies al grup d'amics que he fet en la carrera, recolzant-nos uns als altres hem aconseguit avançar fins aquí, hem compartit molts moments que ha fet que es forjara una gran relació, encara que s'acaba aquesta etapa se que l'amistat continua. Moltes gràcies al grup d'amics de tota la vida, se que sempre es pot en vosaltres, feu que algun moment complicat s'esborre amb riures, aconseguiu que desconnecte i em relaxe quan quedem.

Finalment, moltes gràcies als meus pares i la meua germana, sempre heu estat al meu costat, no heu deixat mai que em rendira, sempre s'heu preocupat de la meua educació però també m'heu fet entendre que la vida va molt més enllà que una carrera.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La problemática de la escasez de agua	1
1.2. La reutilización del agua como solución	1
1.3. Los contaminantes presentes en aguas residuales.....	3
1.4. Los antibióticos.....	3
1.4.1. ¿Cómo acaban los antibióticos en las aguas residuales?.....	5
1.4.2. Resistencias a antibióticos	5
1.4.3. Bacterias resistentes a antibióticos	6
1.4.4. Genes de resistencia a antibióticos	7
1.4.5. Mecanismos de acción de los antibióticos	8
II. OBJETIVOS	10
III. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1. Origen y toma de las muestras.....	11
3.2. Aislamiento y detección de bacterias resistentes a antibióticos	12
3.2.1. Aislamiento de cepas de <i>E. coli</i> resistentes	12
3.2.2. Detección de resistencias a antibióticos en los aislados	14
3.3. Detección de genes de resistencia a antibióticos	16
3.3.1. Procesado de la muestra.....	16
3.3.2. Extracción de la muestra.....	16
3.3.3. PCR para la detección de genes de resistencia.....	16
3.3.4. Visualización de resultados mediante gel de electroforesis.....	17
3.4. Análisis estadístico	17
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. Recuentos de bacterias resistentes a antibióticos.....	18
4.2. Aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos.....	23
4.3. Determinación de la CMI en aislados.....	24
4.4. Detección de genes de resistencia mediante PCR	31
4.5. Estudio de la relación entre presencia de bacterias resistentes y genes de resistencia	34
V. CONCLUSIONES	36
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caudales, poblaciones y tratamientos de las EDARs seleccionadas	11
Tabla 2. Fechas de toma de muestras para su análisis	12
Tabla 3. Concentración de antibióticos añadidas al medio de cultivo.....	12
Tabla 4. Concentración de reactivos para el mix de PCR	16
Tabla 5. Cebadores y amplicón de cada gen.....	17
Tabla 6. Programa de temperaturas en los genes estudiados.....	17
Tabla 7. Recuentos de colonias de <i>E. coli</i> en las muestras de salida del tratamiento secundario en medio cromógeno con y sin antibiótico.....	18
Tabla 8. Recuentos de colonias de <i>E. coli</i> por 100 mL de muestras salida del tratamiento terciario en medio cromógeno con y sin antibiótico	19
Tabla 9. Resultados ANOVA multifactorial de los recuentos de <i>E. coli</i> de la salida del tratamiento secundario	20
Tabla 10. Resultados ANOVA multifactorial de los recuentos de <i>E. coli</i> de la salida del tratamiento terciario.....	22
Tabla 11. Aislados obtenidos según EDAR, día de la toma de muestra, salida del tratamiento y antibiótico empleado en el medio	24
Tabla 12. Resultados de la prueba de χ^2 entre las variables EDAR y resistencia a trimetoprima en aislados de aguas de salida del secundario.....	25
Tabla 13. Resultados de la prueba de χ^2 entre las variables EDAR y resistencia a ampicilina en aislados de aguas de salida del terciario.....	25
Tabla 14. Resultados de la prueba de χ^2 entre las variables EDAR y resistencia a ciprofloxacino en aislados de aguas de salida del terciario.....	26
Tabla 15. Resultados de la prueba de χ^2 entre las variables EDAR y resistencia a ácido nalidíxico en aislados de aguas de salida del terciario.....	26
Tabla 16. CMI (mg/L) de los antibióticos obtenidas mediante Sistema Sensititre (placa EUVESC1) para los aislados de la salida del secundario.....	27
Tabla 17. CMI (mg/L) de los antibióticos obtenidas mediante Sistema Sensititre (placa EUVESC1) para los aislados de la salida del terciario.....	29
Tabla 18. CMI (mg/L) de los antibióticos obtenidas mediante Sistema Sensititre (placa EUVESC2).....	30
Tabla 19. Comparación de la presencia de bacterias resistentes y genes de resistencia en las muestras de salida del tratamiento secundario	34
Tabla 20. Comparación de la presencia de bacterias resistentes y genes de resistencia en las muestras de salida del tratamiento terciario.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del uso de aguas residuales tratadas y no tratadas en agricultura	2
Figura 2. Diagrama de los procedimientos seguidos en este ensayo	14
Figura 3. Distribución de antibióticos en las placas EUVSEC y EUVSEC2. En la parte derecha de la figura se muestra una leyenda con el código del antibiótico y su nombre. Debajo de el código del antibiótico se indica su correspondiente concentración	15
Figura 4. Grupos homogéneos resultados del análisis LSD de Fisher en muestras de salida del tratamiento secundario según A) antibiótico añadido al medio de cultivo, B) muestreo, C) origen de la muestra	20
Figura 5. Resultados de la influencia de la interacción entre antibiótico presente en el medio de cultivo y muestra de salida del tratamiento secundario de las EDARs estudiadas, en el recuento de colonias de <i>E. coli</i>	21
Figura 6. Grupos homogéneos resultados del análisis LSD de Fisher en muestras de salida del tratamiento terciario según A) antibiótico añadido al medio de cultivo, B) muestreo, C) origen de la muestra.....	22
Figura 7. Resultados de la influencia de la interacción entre antibiótico presente en el medio de cultivo y muestra de salida del tratamiento terciario de las EDARs estudiadas, en el recuento de colonias de <i>E. coli</i>	23
Figura 8. Amplificación de un fragmento del gen <i>bla</i> TEM.....	31
Figura 9. Amplificación de un fragmento del gen <i>ermB</i>	32
Figura 10. Amplificación de un fragmento del gen <i>qnrS</i>	32
Figura 11. Amplificación de un fragmento del gen <i>sull</i>	33
Figura 12. Amplificación de un fragmento del gen <i>tetW</i>	33

INTRODUCCIÓN

1.1. La problemática de la escasez del agua

En los últimos años existe una preocupación creciente sobre el problema del abastecimiento de agua, así lo demuestran los informes de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo que se han ido publicando durante la última década. A nivel social se lanzan campañas de concienciación para hacer un uso razonable de este recurso. Sin embargo, no solamente es el uso personal del agua el que representa un peligro, existen otras actividades humanas que suponen una mayor necesidad de agua, entre ellas podemos encontrar la agricultura y la industria.

El agua es un componente de vital importancia entre los sectores socio-económicos de mayor relevancia, participando ésta de distinta forma. En la agricultura se requieren grandes cantidades de agua para el riego y ésta debe cumplir con unos valores de calidad adecuados. El proceso de obtención de energía necesita de agua para impulsar turbinas en plantas hidroeléctricas, refrigerar las plantas termales y nucleares y, finalmente, también producir biocombustibles. Además, el agua proporciona unos ecosistemas sanos que al mismo tiempo significa disponibilidad de recursos naturales (UNESCO, 2012).

La principal razón para el problema de la escasez de agua es el crecimiento poblacional. Los cálculos indican que se sumarían unos 3 billones de personas a la población actual para mitad de siglo XXI, principalmente en países pobres y con pocos recursos hídricos (Jury y Vaux, 2007). Actualmente, la influencia que ejerce la humanidad sobre los recursos hídricos es a nivel global, luego ocupa un papel importante en el ciclo hidrológico. El consumo de agua per cápita aumenta, principalmente, debido a la mejora de los niveles de vida. Si se suma a lo anterior las variaciones en tiempo y lugar de la disponibilidad de agua, se podría decir que la cantidad existente de agua está empezando a escasear y eso nos lleva a una crisis del agua (UNESCO, 2003).

Existe una importante inequidad en cuanto al acceso y control de los recursos hídricos. El concepto de escasez no se entiende a nivel universal (Mehta, 2000). Existen regiones áridas en el mundo donde la gente llega a consumir solamente 10 L de agua al día (Mehta, 1998), por el contrario, un americano mediano sobrepasa los 700 litros al día (Gleick, 1993).

Hoy en día, las estimaciones de los efectos del cambio climático en los recursos hídricos y los procesos hidrológicos han permitido que hasta la actualidad se haya podido contar con recursos hídricos suficientes. A pesar de todo, las presiones sobre el sistema hidrológico continental aumentan a medida que aumenta la población y su desarrollo económico, esto plantea graves retos frente a la falta progresiva de agua y a su contaminación (UNESCO, 2003).

1.2. La reutilización del agua como solución

Existen distintas maneras de afrontar el problema de la escasez de agua, entre ellas encontramos la reutilización. Sin embargo, dependiendo del uso que se le va a dar posteriormente al agua, ésta debe cumplir unos estándares de calidad. En el caso de que el agua a reutilizar no fuera saneada de forma correcta podría suponer un riesgo para la salud humana.

Un ejemplo de reutilización del agua es el uso de los efluentes de las aguas residuales para el riego en agricultura. En países en vías de desarrollo, aproximadamente un 10% del agua destinada a riego es agua residual depurada. Los agricultores se benefician de esta reutilización en regiones donde el agua es escasa y, de este modo, mejoran la fertilidad del suelo y se reduce la contaminación de las aguas receptoras. El agua residual necesita de un buen tratamiento en las depuradoras para minimizar el riesgo, tanto para agricultores como consumidores, a una exposición a bacterias, parásitos amebidos, metales pesados y contaminantes orgánicos (UNESCO, 2003). En la Figura 1 se muestran los beneficios de regar cultivos con aguas residuales depuradas y los perjuicios causados por regar con las mismas aguas no tratadas.

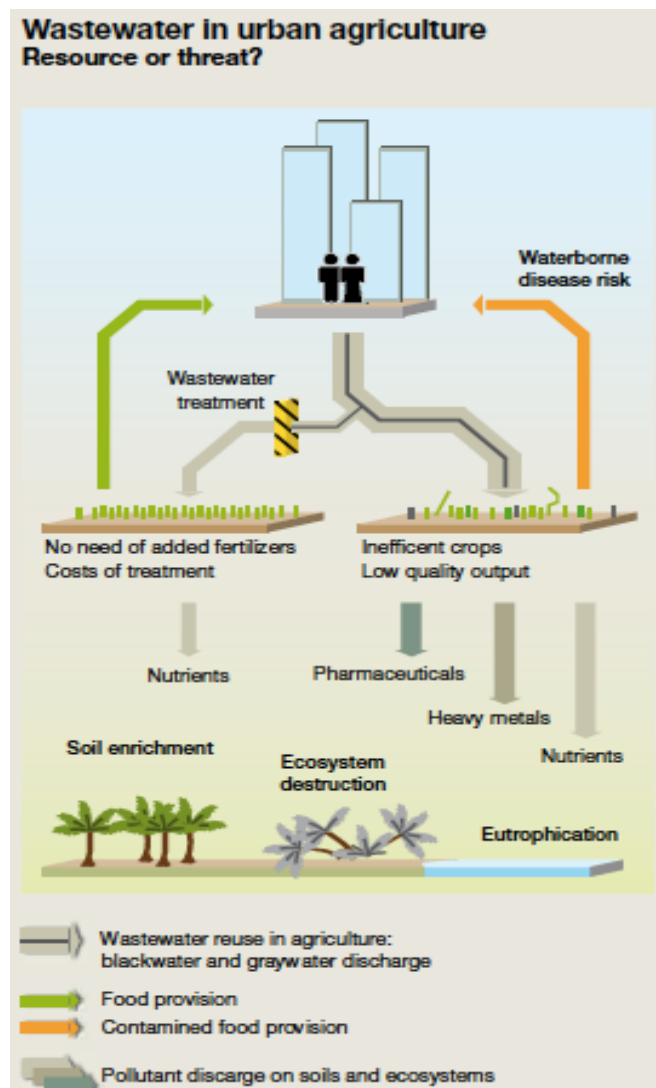


Figura 1. Esquema del uso de aguas residuales tratadas y no tratadas en agricultura (Corcoran et al., 2010).

La reutilización de agua residual sin el tratamiento adecuado empeoraría la situación actual. Al menos 1,8 millones de niños menores de 5 años mueren por enfermedades relacionadas con el agua, esto supone un 17% de las muertes en esta franja de edad. Alrededor del mundo unos 2,2 millones de personas mueren cada año a causa de enfermedades diarreicas. Las malas condiciones de higiene y el mal saneamiento del agua están relacionado con un 88% de las enfermedades diarreicas (Corcoran et al., 2010).

1.3. Los contaminantes presentes en aguas residuales

La calidad del agua se ve perjudicada en gran parte por contaminación química como metales pesados, tintes, plaguicidas, etc. Estos compuestos químicos entran en el ciclo del agua ya sea de forma directa como los vertidos industriales o los efluentes de depuradoras. También pueden entrar de forma indirecta como fertilizantes y agroquímicos usados en la agricultura debido a la escorrentía. Cuanto mayor sea la solubilidad del compuesto químico, mayor será la distribución y persistencia en el ciclo del agua (Oller et al., 2011).

Otros contaminantes que aparecen cada vez con más frecuencia son los relacionados con las industrias farmacéuticas. Estos compuestos, hasta ahora ignorados, están despertando el interés ya que las técnicas de detección actual permiten determinar su presencia fácilmente.

Fármacos como los antibióticos son usados en cantidades similares a microcontaminantes y plaguicidas pero los efectos a nivel ambiental no se han tenido en cuenta (Jones et al., 2001).

Muchos fármacos están diseñados para mantener su estructura química activa en el tiempo y como su consumo es continuo, persisten en el agua por largos períodos de tiempo (Ternes, 2000). Algunos estudios apuntan a que los procesos de transformación de compuestos activos dependen de las condiciones climáticas, diseño y operación del tratamiento del agua residual y también de la composición del agua.

Algunos medicamentos una vez consumidos no se degradan, de esta forma continúan siendo activos, otros se administran de forma que no entran en el cuerpo o no se absorben completamente, como las cremas, y así, cuando son expulsados terminan en aguas residuales (Ternes et al., 2001; Miao et al., 2002; Heberer, 2002).

Existen muchos fármacos que no se eliminan de forma completa en los tratamientos que realizan las EDARs (Estación Depuradora de Aguas Residuales), de esta forma acaban en los efluentes de depuradoras, y, consecuentemente en ríos, lagos y de forma menos frecuente en aguas subterráneas (Roberts y Thomas, 2005).

1.4. Los antibióticos

Los antibióticos son sustancias que se obtienen de forma natural a partir de cultivos de microorganismos o mediante síntesis química total o parcial, modificando partes de la estructura del antibiótico obteniendo así los llamados antibióticos semisintéticos (Errecalde, 2004).

Existen grandes diferencias entre células procariotas, en las que se encuentran las bacterias, y las células eucariotas. Las distintas estructuras que poseen hacen que las dianas de

los antibióticos sean distintas y así se logra una acción selectiva frente a las bacterias de manera que las células eucariotas del hospedador no se ven afectadas de la misma manera (Errecalde, 2004).

Dentro de los antibióticos se puede diferenciar entre bactericidas y bacteriostáticos. La acción de los bactericidas es letal, se consigue una lisis bacteriana, por el contrario, los bacteriostáticos con las concentraciones que alcanzan en los tejidos o sueros, impiden la división celular pero no se llega a eliminar las bacterias, incluso si se deja de administrar el antibiótico, el microorganismo puede empezar a dividirse de nuevo. (Seija y Vignoli, 2006)

Existen dos valores importantes para la farmacodinámica en antibióticos. Uno es la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima de antibiótico que impide un crecimiento visible del microorganismo tras su incubación durante 18 o 24 horas. Supone una medida intrínseca de la actividad antimicrobiana del antibiótico. La CMI es un valor absoluto, no existe comparación con un estándar, por ello es muy importante estandarizar su determinación: condiciones experimentales, cepa, medio e inóculo empleado, así se evita que estas variables puedan afectar al resultado. El otro valor es la concentración mínima bactericida (CMB), que corresponde a la concentración mínima de antibiótico que inhibe el crecimiento en un 99,9% de las bacterias. La CMB se calcula a partir del estudio de la CMI, y corresponde a la concentración de antibiótico del cultivo en caldo, que al sembrar en placa no se observa crecimiento (Wang et al., 2011).

Existen distintos grupos de antibióticos según la estructura química que poseen, esto determina en parte su mecanismo de acción. Los grupos existentes en la actualidad son: aminoglucósidos, β -lactámicos, lincosamidas, macrólidos y pleuromutilinas, nitrofuranos, nitroimidazoles, fenicoles, ionóforos, polipéptidos, glicopéptidos y estreptograminas, fosfoglicolípidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas.

Desde su introducción a la medicina en 1940, los antibióticos han resultado ser un pilar básico en la sanidad moderna. Su papel se ha extendido de tratar pacientes con infecciones, proteger de ciertos cánceres e inmunodepresión, así como prevenir enfermedades del ganado y aumentar su crecimiento (Gelband et al., 2015). El consumo de antibióticos se incrementa tanto en países industrializados como en países en vía de desarrollo, de ahí que sea fácil su detección en aguas superficiales, sedimentos y biota a lo largo de todo el mundo (Radjenović et al., 2009; Rosal et al., 2010; Zhou et al., 2011).

Los mayores consumidores de antibióticos en 2010 fueron India, China y Estados Unidos con un consumo de 13, 10 y 7 billones de unidades estándar (es una medida en volumen, basada en la dosis más pequeña administrable a un paciente y depende de su forma farmacéutica, como podría ser una pastilla, cápsula o ampolla), respectivamente. Sin embargo, si se compara el consumo per cápita, el país con un mayor consumo es Estados Unidos con 22 unidades estándar, seguido de India con 11 unidades estándar y finalmente China con 7 unidades estándar (Van Boeckel et al., 2014).

1.4.1. ¿Cómo acaban los antibióticos en las aguas residuales?

Como ya se ha comentado anteriormente, el uso de antibióticos está muy extendido, no sólo se administran para infecciones humanas, sino que también se emplean en veterinaria, ganadería, agricultura y acuicultura. Además, su estructura química hace que mantenga su actividad largos periodos de tiempo y sea difícil de degradar.

Las EDARs recolectan agua de distintos orígenes, urbano, industrial, pero son los efluentes de hospitales los que suponen un peligro especial debido a sus características de toxicidad e infectividad, además de ser una fuente de antibióticos y bacterias multirresistentes a los mismos (Chagas et al., 2011). Grupos de antibióticos como sulfonamidas, macrólidos, cefalosporinas o fluoroquinolonas se encuentran en concentraciones potencialmente activas en los fangos activos de las EDARs. La cantidad de antibióticos encontrada en estos fangos es variable y está relacionada con el consumo que tienen a lo largo del año, siendo éste mayor en invierno (Göbel et al., 2005). Las concentraciones más altas de antibióticos se suelen encontrar en áreas de mayor actividad humana, por el contrario, las regiones más inhabitadas suelen contener concentraciones más bajas de antibióticos (Martínez, 2009).

El tratamiento de aguas residuales y, en general, el de todos los residuos contaminados con antibióticos (gallinaza, purines, etc.) debería ser obligatorio antes de su liberación al medio o ser empleado como fertilizante en agricultura (Dolliver y Gupta, 2008). Las EDARs precisan determinados tratamientos para poder degradar determinados grupos de antibióticos ya que son más resistentes a la biodegradación. La cloración del agua consigue degradar antibióticos pertenecientes a los β -lactámicos (Dodd and Huang, 2007; Li et al., 2008). Otras técnicas como la coagulación, ultra-filtración, ozonización y radiación UV consiguen eliminar de forma más efectiva los antibióticos (Choi et al., 2008).

1.4.2. Resistencias a antibióticos

El uso global y descontrolado de antibióticos está provocando que cada vez existan más microorganismos resistentes a ellos, lo que a su vez causa más muertes relacionadas con infecciones de patógenos resistentes a antibióticos.

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos calcula que la resistencia a antibióticos es responsable de más de 2 millones de infecciones y 23.000 muertes cada año en Estados Unidos, esto conlleva unos costes de 2 billones de dólares (CDC, 2013). Según la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y el Centro Europeo para el Control y la Prevención de Enfermedades (ECDC), aproximadamente 25.000 personas mueren por infecciones causadas por bacterias que han desarrollado resistencia a antibióticos (Borg, 2011). Además, se calcula que más del 70% de las bacterias que causan estas muertes son resistentes a más de un antibiótico que se usa comúnmente para tratarlas (Muto, 2005).

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) la resistencia a antibióticos de patógenos humanos supone una especial preocupación, no sólo por el hecho de las resistencias a las propias enfermedades infecciosas, sino también por otras patologías en las que se administran antibióticos para tratar infecciones asociadas (WHO, 2000). Dicha

organización ha clasificado el problema de la aparición y dispersión de bacterias resistentes a antibióticos como uno de los tres mayores peligros del siglo XXI para la salud pública.

El gran incremento de las concentraciones de antibióticos presentes en los ecosistemas ha supuesto un cambio negativo sobre el efecto antimicrobiano de los antibióticos en hospitales y granjas (Martínez, 2008). Este cambio podría implicar la selección de bacterias resistentes a los antibióticos y, en consecuencia, un cambio en la microbiota, incluso cambios a nivel fisiológico en las bacterias (Martínez, 2009).

En los últimos años, antibióticos antiguos que habían caído en desuso, se han vuelto a usar para tratar infecciones multirresistentes, principalmente en aquellas causadas por bacterias Gram-negativas. Uno de los principales ejemplos de antibiótico que está volviéndose a usar es la colistina que se empleaba entre los años 1950 y 1970 y cayó en desuso a partir del 2000 (Gelband et al., 2015).

El peligro de la resistencia a antibióticos no sólo se debe enfocar hacia la búsqueda de bacterias resistentes a antibióticos, sino también hacia la detección de los genes que codifican dichas resistencias ya que éstos pueden ser transferidos de unos microorganismos a otros.

1.4.3. Bacterias resistentes a antibióticos

El aumento en la diversidad y existencia de bacterias resistentes a antibióticos que está teniendo lugar en estos últimos años está provocada en parte por el incremento en el uso en humanos y animales. La presión selectiva a la que se somete a la microbiota con estos agentes antimicrobianos produce una pérdida de variabilidad.

Los estudios publicados por la OMS en estos últimos años indican que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* son los tres primeros en la lista de agentes que preocupan en cuanto a infecciones, asociadas tanto a hospitales como comunitarias. *E. coli*, presenta valores de resistencia superior al 50% para fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación. *K. pneumoniae*, presenta valores de resistencia superiores al 30% a cefalosporinas de tercera generación e incluso supera el 60% en algunas regiones (WHO, 2014).

Las β -lactamasas de amplio espectro es una familia de enzimas producidas por bacterias Gram-negativas. Estas enzimas confieren resistencia a las penicilinas y cefalosporinas, incluido las de tercera generación. En 17 de 22 países de Europa, del 85 al 100% de aislados de *E. coli* presentaban actividad β -lactamasa de amplio espectro. Los mismos porcentajes de resistencia existían en aislados de *K. pneumoniae* en 13 de 21 países de Europa. (EARS-Net, 2014).

Existen cuatro mecanismos de resistencia a antibióticos en las bacterias:

- **Modificación del objetivo molecular del antibiótico.** En ocasiones algunas mutaciones producen una disminución de la afinidad entre el antibiótico y su receptor. Un ejemplo de este caso son las proteínas de unión a penicilinas (PBPs), mediante modificaciones estructurales de enzimas presentes en la pared celular de cepas resistentes se consigue superar el efecto del antibiótico. Las alteraciones estructurales de las PBPs son codificadas en el cromosoma bacteriano y se deben principalmente a mutaciones,

luego son adquiridas (Walsh, 2000). Mutaciones en la ADN girasa confiere resistencia a las quinolonas ya que presentan menos afinidad por estas enzimas (Errecalde, 2004).

- **Alteración de la estructura de los antibióticos mediante enzimas.** Este mecanismo causa una pérdida de la función del antibiótico. Uno de los ejemplos más comunes son las β -lactamasas que hidrolizan los anillos β -lactámicos y dejan como productos moléculas que no tienen un efecto nocivo sobre la bacteria (Flórez, 2007). Otro ejemplo es la glutatión-S-transferasa que al añadir un grupo glutatión a la fosfomicina lo inactiva (Suárez y Mendoza, 1991).
- **Impermeabilidad de la membrana o pared celular.** La membrana externa de las bacterias Gram-negativas impide el paso de grandes moléculas polares como algunos antibióticos. Muchos antibióticos se introducen en la célula gracias a una serie de proteínas presentes en la membrana denominadas porinas. Cambios en la estructura de esta proteína o una disminución de su cantidad reduce las posibilidades de entrada y así la concentración en el interior de la célula donde llevan a cabo su función (Wang et al., 2011).
- **Transporte inespecífico al exterior de la bacteria.** Los sistemas de resistencia múltiple a drogas (MDR) permiten expulsar distintas sustancias tóxicas, son proteínas de membrana y actúan como un transportador dependiente de ATP (Brunton et al., 2006). Los MDR se encuentran en las células de todos los seres vivos y son capaces de expulsar antibióticos entre otros (Thanassi et al., 1995).

1.4.4. Genes de resistencia a antibióticos

Los genes de resistencia se encargan de codificar las enzimas responsables de inhibir el efecto del antibiótico. Según la función de cada gen, el mecanismo de resistencia sobre el antibiótico será distinto. Estos elementos se encuentran tanto en ambientes en los que el antibiótico ejerce una presión de selección como en aquellos ecosistemas naturales en los que no se encuentran antibióticos de origen antropológico.

Debido a que los genes de resistencia a antibióticos se encuentran de forma natural en los cromosomas de las bacterias en ambientes sin presión de selección, solamente se considera como contaminantes genuinos a aquellos elementos transferibles que bajo la presión de selección de los antibióticos son capaces de transferirse a otros microorganismos (Martínez, 2009).

Los elementos de resistencia adquiridos por transferencia horizontal son capaces de autorreplicarse, de esta forma son capaces de mantenerse en las poblaciones microbianas a no ser que supusieran un gran sobre coste para la bacteria mantener estos elementos. Algunos estudios apuntan a que, reduciendo la presencia de antibióticos en el ambiente, se consigue reducir la contaminación de genes de resistencia; esto da a entender que la resistencia a antibióticos se eliminaría una vez desaparece la presión de selección con antibióticos. Sin embargo, los genes presentes en patógenos humanos ya se han observado en bacterias cuyos ambientes no han entrado en contacto con antibióticos de origen antropológico, esto indica que los genes de resistencia a antibiótico se mantienen incluso en ausencia de presión de selección (Martínez, 2009).

Existen distintas formas de mantener los genes de resistencia en las poblaciones microbianas, una de ellas es mediante plásmidos que contienen sistemas toxina-antitoxina lo que hace que no se pueda perder el plásmido (Hayes, 2003). Otro sistema son los integrones, en los cuales el gen de resistencia a antibióticos se encuentra con otros elementos beneficiosos para la bacteria, así también se transfieren las multiresistencias (Martínez, 2009). La resistencia a antibióticos conjuntamente a metales pesados es otra forma de mantener la resistencia, así, aunque no haya presencia de antibióticos en el medio, pero sí de metales pesados es posible mantener esta resistencia (Hernandez et al., 1998; Stepanauskas et al., 2006).

La transferencia horizontal de genes es la forma que tienen las bacterias de compartir las resistencias a antibióticos. Esta transferencia de genes ocurre entre microorganismos de la misma especie, entre bacterias patógenas y no patógenas e incluso entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Pruden et al., 2006). Dentro de la transferencia horizontal de genes encontramos tres formas de adquirir la resistencia:

- Transformación. Este método permite integrar ADN libre en el medio, pero solamente las células competentes serían capaces de transformarse.
- Conjugación. Los genes de resistencia a antibióticos se pueden transferir por plásmidos que es la forma más común, como rara vez se integran en el genoma de la bacteria, es necesario que aporten una ventaja suficiente para superar inactivaciones por mutación o eliminación por segregación. Los elementos transponibles son otra forma de transferir las resistencias. Finalmente, los integrones son otra forma de transferencia horizontal de genes, la construcción consiste en un sitio de unión donde se unirá la integrasa que permitirá introducir la secuencia de interés, un gen que sintetiza la integrasa y finalmente un promotor que permitirá la expresión del gen de interés (Ochman et al., 2000).
- Transfección. Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias. Existen bacteriófagos que contienen genes de resistencia a antibióticos en su genoma. En el ciclo lisogénico, los bacteriófagos integran su genoma en el de la bacteria hospedadora. Según los resultados de Colomer-Lluch et al. (2011), es posible transfectar células de *E. coli* sensibles a ampicilina con bacteriófagos que poseen genes de resistencia a β -lactámicos.

1.4.5. Mecanismos de acción de los antibióticos

Según el modo de acción de los antibióticos, éstos se pueden clasificar en cinco grupos que se describen a continuación.

- **Sustancias que inhiben la síntesis de la pared celular.** Actúan en distintas fases de la síntesis del peptidoglicano, pueden interferir intracelularmente como la fosfomicina y la D-cicloserina. A nivel extracelular actúan los β -lactámicos que interactúan con enzimas responsables del ensamblaje del peptidoglicano. Finalmente se produce la muerte de la célula. (Flórez, 2007).

- **Agentes que afectan a la permeabilidad de la membrana celular.** Este aumento en la permeabilidad tipo detergente, como la Polixina E, causa una liberación de compuestos intracelulares (Brunton, et al., 2006).
- **Agentes que inhiben la síntesis proteica.** Interfieren en las subunidades ribosómicas, pueden ser bacteriostáticos o bactericidas (Brunton, et al., 2006).
- **Agentes que interfieren en el metabolismo de ácidos nucleicos.** Este grupo de antibióticos impiden la función de algunos de los componentes responsables de la síntesis de ácidos nucleicos. Las quinolonas inhiben la función de las topoisomerasas II y IV que desenrollan y superenrollan el ADN. La rifampicina es responsable de la inhibición de la ARN polimerasa, de esta forma se evita la formación de nuevo ADN. (Flórez, 2007).
- **Sustancias conocidas como antimetabolitos.** Dentro de este grupo encontramos a las sulfonamidas y trimetoprim. Son análogos estructurales del ácido paraminobenzoico, inhiben de forma completa la síntesis de ácido fólico al unirse a la enzima dihidropteroato sintasa. Los organismos sensibles a estos antibióticos son microorganismos que sintetizan su propio ácido fólico no como las células eucariotas de mamíferos que lo toman directamente del medio preformado. La reducción en la cantidad de ácido produce a su vez una disminución de la cantidad de ácido tetrahidrofólico que es necesario para la síntesis de ADN. Todo este proceso conlleva una serie de efectos perjudiciales para la bacteria, se produce una supresión de la síntesis de proteínas, inhibición del crecimiento celular y desacoplamiento del metabolismo (Wang et al., 2011).

OBJETIVOS

El empleo de una sola técnica para detectar resistencias a antibióticos no es suficiente. La combinación de técnicas moleculares como, la PCR, y técnicas microbiológicas, como el cultivo de microorganismos resistentes a antibióticos, permite análisis de la resistencia más precisos. Existen microorganismos que no son capaces de crecer con las técnicas de siembra actuales, pero sí poseen genes de resistencia, además suponen un riesgo ya que son capaces de transferir los genes de resistencia a microorganismos patógenos por transferencia horizontal. Por el contrario, existen microorganismos que son capaces de crecer en presencia de antibiótico, pero al realizar el ensayo con un solo gen que aporta resistencia a la familia del antibiótico empleado, puede ser que no se obtenga producto de amplificación, esto es debido a que el mecanismo de resistencia está determinado por varios genes.

Las EDARs constituyen un medio en el que se acumulan contaminantes de afluentes de distintos orígenes, tanto urbanos como industriales y hospitalarios. El elevado uso de antibióticos, tanto para consumo humano como para ganado, hace que éstos finalicen en el agua de las EDARs, y modifiquen las poblaciones microbianas, ejerciendo una presión de selección.

En este estudio, el objetivo principal es determinar si existen microorganismos resistentes a distintos antibióticos en los efluentes de los tratamientos terciario y secundario de EDARs. El microorganismo empleado para este estudio es *E. coli*, organismo modelo que se emplea como indicador de la contaminación de aguas residuales y además es un organismo que, según informes de la ECDC (2014), muestra resistencias a una amplia variedad de familias de antibióticos.

Los objetivos propuestos para este trabajo son:

1. Determinar el efecto de distintos antibióticos, en muestras de agua de salida del tratamiento secundario y terciario, mediante cultivo y recuento en placa.
2. Aislar colonias de *E. coli* resistentes a los antibióticos ensayados.
3. Determinar las CMI de distintos aislados de *E. coli*, obtenidos a partir de las muestras de agua, mediante el sistema semiautomatizado Sensititre™.
4. Identificar genes de resistencia a distintas familias de antibióticos, en muestras de salida del tratamiento secundario y terciario, mediante PCR cualitativa.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el siguiente apartado se indican y describen los materiales y metodología empleados para desarrollar el presente trabajo de investigación. Todos los trabajos de experimentación que forman parte del estudio se han realizado en los laboratorios de Microbiología del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia y en los laboratorios de Microbiología de la Dirección General de Salud Pública de la Generalitat Valenciana.

3.1. Origen y toma de las muestras

Las muestras de agua analizadas proceden de tres estaciones depuradoras de aguas residuales, en adelante, EDAR, pertenecientes al área metropolitana de València. Las características de cada una de las EDARs quedan reflejadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Caudales, poblaciones y tratamientos de las EDARs seleccionadas.

	EDAR 1	EDAR 2	EDAR 3
Caudal (m³/día)	10323	94979	35360
Población servida (he)	52541	339241	131050
Rendimiento Sólidos Sedimentables (%)	99	94	96
Rendimiento DBO₅ (%)	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
LÍNEA DE FANGO			
Espesador	Mecánico	Gravedad; Flotación	Gravedad; Flotación
Estabilizador	Anaerobia; Estabilización con cal	Anaerobia	Anaerobia
Deshidratación	Centrífuga	Centrífuga	Centrífuga

Se toman de cada una de las EDARs una muestra de la salida del tratamiento secundario y una muestra de la salida tratamiento terciario. Las muestras se recogen en botellas de plástico estériles, de 2 L de capacidad y se transportan al laboratorio en refrigeración. Tras su llegada, se conservan en frío y se procesan en un plazo inferior a dos horas.

El procedimiento de toma de muestra se repite tres veces en tres fechas diferentes, según la disponibilidad de la planta, como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Fechas de toma de muestras para su análisis.

	Fecha		
	M1	M2	M3
EDAR 1	22/03/2017	09/05/2017	24/05/2017
EDAR 2	03/05/2017	16/05/2017	24/05/2017
EDAR 3	29/03/2017	03/05/2017	16/05/2017

M1, M2 y M3 representan la primera, segunda y tercera toma de muestra respectivamente.

Cada muestra es sometida a análisis de resistencias a antibióticos, el cual se lleva a cabo de dos formas distintas:

- mediante el aislamiento y detección de bacterias resistentes a antibióticos.
- mediante la detección de genes de resistencia directamente en el agua.

3.2. Aislamiento y detección de bacterias resistentes a antibióticos

3.2.1. Aislamiento de cepas de *E. coli* resistentes

Un primer procesado de las muestras de agua implica su filtración y siembra posterior en un medio de cultivo selectivo y diferencial para aislamiento y detección de coliformes y de la especie *Escherichia coli*. Asimismo, con el fin de dirigir la búsqueda de aislados resistentes a antibióticos, éstos son añadidos al medio de cultivo.

Antibióticos

Los antibióticos estudiados han sido ampicilina (Sigma-Aldrich, ref. A-9393), ciprofloxacino (Sigma-Aldrich, ref. 17850-5G-F), oxitetraciclina (Sigma-Aldrich, ref. O-5875), eritromicina (Sigma-Aldrich, ref. E5389-1G) y sulfametoxazol (Sigma-Aldrich, ref. S7507-10G). En la Tabla 3 se listan las cantidades de antibiótico añadidas al medio de cultivo en base a las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) clínicas.

Tabla 3. Concentración de antibióticos añadidas al medio de cultivo.

Antibiótico	Concentración (mg/L)
Ampicilina	32
Ciprofloxacino	4
Oxitetraciclina	4,5
Eritromicina	18,1
Sulfametoxazol	32

Medios de cultivo

Microinstant® AGAR BASE CROMOGÉNICO COLIFORMES (Scharlau, ref. 01-695-500). Se trata de un medio de cultivo cromogénico selectivo y diferencial para la detección de coliformes totales y *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 pesan 29,45 g del medio deshidratado por litro de agua destilada y se esteriliza por ebullición. Una vez estéril, se le

añade el Suplemento Selectivo CV para Coliformes (Scharlau, ref. 06-140-LYO), siguiendo las instrucciones del comerciante. A continuación, se añaden las cantidades previamente pesadas de los antibióticos y se reparte en placas Petri. Paralelamente, se prepara medio de cultivo sin antibiótico como control para comprobar el efecto del antibiótico en la población bacteriana total.

Agar de Recuento en Placa (PCA) (Scharlau, ref. 01-161-500). Para la preparación de este medio se añaden 23,5 g en 1 L de agua destilada y se esteriliza en autoclave (121°C, 15 min). Cuando finaliza su esterilización se reparte en placas Petri.

Microinstant® A. GLUCURÓNICO TRIPTONA Y BILIS (AGAR TBX) (Scharlau, ref. 01-619-500). Para la preparación de este medio se añaden 36,5 g en 1 L de agua destilada y se esteriliza en autoclave (121°C, 15 min). Cuando finaliza su esterilización se reparte en placas Petri.

Procesado de las muestras

Un esquema del procedimiento empleado se indica en la Figura 2.

Las muestras de agua procedentes de la salida del tratamiento secundario son filtradas en volúmenes de 1 mL y 5 mL, pero el sistema de filtración necesita un volumen mínimo de 20 mL, debido a esto, previamente se deposita un volumen de lecho de agua destilada estéril adecuado a la cantidad de muestra que se va a filtrar. Se procede de igual forma para las muestras procedentes del tratamiento terciario aumentando los volúmenes de filtración a 50 mL y 100 mL, al ser volúmenes superiores a los 20 mL no se añade el lecho de agua. Antes de dispensar la muestra, tanto en el tratamiento secundario como en el terciario, es recomendable homogeneizarla. Todo el proceso de filtración se lleva a cabo por duplicado y para cada uno de los 5 antibióticos seleccionados, así como para el control.

El equipo de filtración consta de una rampa con 3 puestos de 47 mm de diámetro (Merck, ref. XX2504735) más una bomba de vacío, modelo D-95 (Dinko, ref. 1.9515.00) y filtros S-PAK (Merck, ref. HAWG047S6) de ésteres mixtos de celulosa, de 0,45 µm de diámetro de poro.

Tras la filtración, las membranas se colocan sobre la superficie del medio de cultivo contenido en las placas, las cuales son incubadas a 37 °C, durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se procede al recuento de colonias características de coliformes y de *E. coli*, continuando con el aislamiento de estas últimas. Una vez aisladas son cultivadas para su congelación a -20 °C en crioviales Microbank™-Blue (Pro-Lab Diagnostics, ref. PL.170/B) y también se conservan en tampón TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8).

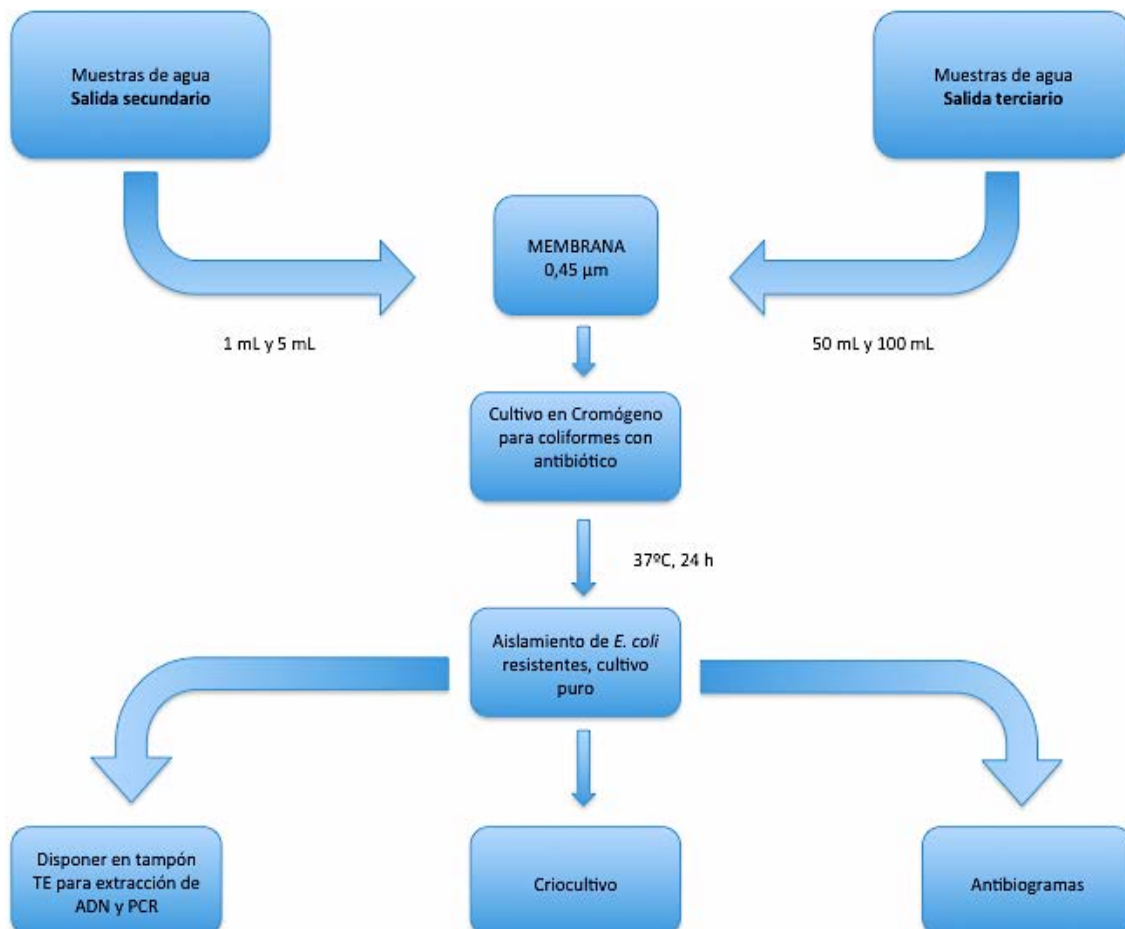


Figura 2. Diagrama de los procedimientos seguidos en este ensayo.

3.2.2. Detección de resistencias a antibióticos en los aislados de *E. coli*

La detección de resistencias a antibióticos de cepas de *E. coli* aisladas de las aguas residuales se ha llevado a cabo mediante el sistema Sensititre (Thermo Fisher, ref. V3000-VZ) que nos permite conocer la CMI de diferentes compuestos antimicrobianos con gran rapidez y reproducibilidad, por un método de microdilución en caldo.

A partir de cultivos de 24 horas, se resuspenden de 3 a 4 colonias en un tubo con 5 mL de agua destilada estéril (Thermo Fisher, ref. T3339), con el fin de alcanzar un valor de 0,5 en la escala de McFarland que equivale a un inóculo de $1 - 2 \times 10^8$ ufc/mL. Esta medida se realiza en un Nefelómetro (Thermo Fisher, ref. V3011) previamente calibrado; 10 µL de esta suspensión se añaden a un tubo con 11 mL de caldo Mueller-Hinton (Thermo Fisher, ref. T3462), alcanzando así una concentración de $1 - 2 \times 10^6$ ufc/mL. El tubo se agita y se le coloca el tapón (Thermo Fisher, ref. E3010) que permite dispensar la muestra, lo cual se lleva a cabo en el sistema de dosificación de inóculo automatizado Thermo Scientific Sensititre AIM (Thermo Fisher, ref. V3020). Esta operación tiene lugar sobre una placa multipocillo EUVSEC que contiene 14 compuestos antimicrobianos a diferentes concentraciones. La cantidad a inocular es de 50 µL. Una vez dispensada la suspensión, se cubre la placa con una lámina

adhesiva plástica (Thermo Fisher, ref. G520N) para impedir la evaporación del contenido de los pocillos y posibles contaminaciones. La placa se incubó a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 24 horas.

Para confirmar que el inóculo realizado en Mueller-Hinton no está contaminado con otro microorganismo se realiza un control de pureza. Para ello se siembra en placas con medio TBX de modo que, tras 24 horas de incubación, se comprueba que no existen otras colonias con coloración diferente a *E. coli* (azul).

Finalmente, tras 24 horas de incubación se procede a la lectura de la placa multipocillo mediante el sistema digital de visualización CIM Thermo Scientific Sensititre Vizion (Thermo Fisher, ref. V2020) El resultado de la visualización se observa a través de un ordenador dotado del software VIZION-SWIN (Thermo Fisher, ref. SW4000). En aquellos pocillos que existe crecimiento se observa un botón de sedimentación indicando la resistencia del microorganismo a la concentración de antibiótico contenida en el pocillo. La determinación de la CMI corresponde a la menor de las concentraciones en las que no se observa crecimiento.

Las cepas de *E. coli* que muestren resistencia a los antibióticos cefotaxima, ceftazidima o meropenem deben procesarse de nuevo usando, en este caso, placas EUVSEC2 con una distribución de antibióticos distinta a EUVSEC. En la Figura 3 se representa la concentración y distribución de los antibióticos en dichas placas.

Placa: EUVSEC													ANTIMICROBICS	
	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	SMX	Sulfamethoxazole
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	TMP	Trimethoprim
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	CIP	Ciprofloxacin
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	TET	Tetracycline
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	MERO	Meropenem
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	AZI	Azithromycin
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	NAL	Nalidixic Acid
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 CON	POS CON	FOT	Cefotaxime
													CHL	Chloramphenicol
													TGC	Tigecycline
													TAZ	Ceftazidime
													COL	Colistin
													AMP	Ampicillin
													POS	Positive Control
													GEN	Gentamicin

Placa: EUVSEC2													ANTIMICROBICS	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	FOX 0.5	FOX 1	FOX 2	FOX 4	FOX 8	FOX 16	FOX 32	FOX 64	FOT 0.25	FOT 0.5	FOT 1	TRM 128	FOX	Defoxitin
B	ETP 0.015	ETP 0.03	ETP 0.06	ETP 0.12	ETP 0.25	ETP 0.5	ETP 1	ETP 2	FOT 2	FOT 4	FOT 8	TRM 64	ETP	Ertapenem
C	IMI 0.12	IMI 0.25	IMI 0.5	IMI 1	IMI 2	IMI 4	IMI 8	IMI 16	FOT 16	FOT 32	FOT 64	TRM 32	IMI	Imipenem
D	MERO 0.03	MERO 0.06	MERO 0.12	MERO 0.25	MERO 0.5	MERO 1	MERO 2	MERO 4	MERO 8	MERO 16	TRM 2	TRM 16	MERO	Meropenem
E	TAZ 0.25	TAZ 0.5	TAZ 1	TAZ 2	TAZ 4	TAZ 8	TAZ 16	TAZ 32	TAZ 64	TAZ 128	TRM 1	TRM 8	TAZ	Ceftazidime
F	FEP 0.06	FEP 0.12	FEP 0.25	FEP 0.5	FEP 1	FEP 2	FEP 4	FEP 8	FEP 16	FEP 32	TRM 0.5	TRM 4	FEP	Cefepime
G	F/C 0.004	F/C 0.124	F/C 0.254	F/C 0.54	F/C 14	F/C 24	F/C 44	F/C 84	F/C 164	F/C 324	F/C 644	POS CON	F/C	Cefotaxime / clavulanic acid
H	T/C 0.124	T/C 0.254	T/C 0.54	T/C 14	T/C 24	T/C 44	T/C 84	T/C 164	T/C 324	T/C 644	T/C 1284	POS CON	T/C	Ceftazidime / clavulanic acid
													FOT	Cefotaxime
													TRM	Temocillin
													POS	Positive Control

Figura 3. Distribución de antibióticos en las placas EUVSEC y EUVSEC2. En la parte derecha de la figura se muestra una leyenda con el código del antibiótico y su nombre. Debajo de el código del antibiótico se indica su correspondiente concentración.

3.3. Detección de genes de resistencia a antibióticos

3.3.1. Procesado de la muestra

Para la detección de los genes de resistencia directamente en las muestras de agua, se filtran 250 mL de cada una de ellas. Los filtros se depositan sobre placas Petri estériles y se cortan con la ayuda de pinzas y bisturís, previamente flameados. A continuación, los filtros fragmentados se depositan en eppendorfs de 1,5 mL (UNIVERSITY OF TOLEDO, 2004).

3.3.2. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN genómico de las muestras se utiliza el GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, ref. NA2110). Se parte de los fragmentos de los filtros a los que se adiciona 500 µL de tampón de lisis T (Sigma-Aldrich, ref. B6678), incluido en el kit de extracción, y 80 mg de cuentas de plástico (Sigma-Aldrich, ref. G8772-10G) para favorecer la rotura mecánica de la pared celular. Tras 20 min de agitación a 3000 rpm en el Disruptor Gene (USA Scientific, ref. 7403-2380), se siguen las instrucciones del fabricante del kit, para la extracción de ADN de bacterias Gram negativas.

3.3.3. PCR para la detección de genes de resistencia

Mediante el uso de cebadores específicos (TIB MOLBIOL) se procede a la amplificación de regiones de genes que confieren resistencia a determinadas familias de antibióticos. El volumen final de la reacción de amplificación es 50 µL, 45 µL del mix de reactivos a la concentración indicada en la Tabla 4, y 5 µL de ADN extraído anteriormente de la muestra de agua. Para comprobar que no existen contaminaciones con otro ADN se utiliza un control negativo en el cual se añade agua miliQ en lugar de ADN de las muestras. Del mismo modo, para comprobar que la reacción de la PCR es correcta, se utiliza un control positivo, en éste se cambia el volumen de la muestra filtrada por el ADN extraído de un aislado que ha mostrado resistencia a antibióticos de la placa EUVSEC, ésta resistencia está asociada a los genes estudiados.

Tabla 4. Concentración de reactivos para el mix de PCR.

Reactivos	Concentración
Tampón	1x
dNTPs	0,2mM/cada
MgCl ₂	1,5 mM
Cebadores	0,25 µM/cada
Taq polimerasa	2,5 U

En este estudio se van a identificar 5 genes distintos: *bla*TEM, *qnr*S, *erm*B, *sull* y *tet*W, cada uno está relacionado con la resistencia a una familia de antibióticos, β-lactámicos, quinolonas, macrólidos, sulfonamidas y tetraciclinas respectivamente. Todas las PCR se realizan en un termociclador modelo Mastercycler®Pro (Eppendorf). A continuación, en la Tabla 5 se indican los cebadores y tamaño de amplicón para cada uno de los genes estudiados,

y en la Tabla 6 los ciclos de temperatura necesarios para llevar a cabo el proceso de amplificación.

Tabla 5. Cebadores y amplicón de cada gen.

Gen	Cebadores	Amplicón (pb)	Referencia
<i>bla</i> TEM	5' -GCKGCCAACTTACTTCTGACAACG- 3' 5' -CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA- 3'	247	Xi et al. (2009)
<i>qnrS</i>	5' -GACGTGCTAACTTGCGTGAT- 3' 5' -TGGCATTGTTGGAAACTTG- 3'	240	Rodríguez et al. (2012)
<i>ermB</i>	5' -GATACCGTTTACGAAATTGG- 3' 5' -GAATCGAGACTTGAGTGTGC- 3'	364	Chen et al. (2007)
<i>sull</i>	5' -CGCACCGGAAACATCGCTGCAC- 3' 5' -TGAAGTTCGCCGCAAGGCTCG- 3'	163	Pei et al. (2006)
<i>tetW</i>	5' -GAGAGCCTGCTATATGCCAGC- 3' 5' -CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA- 3'	168	Aminov et al. (2001)

Tabla 6. Programa de temperaturas en los genes estudiados.

Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo	Fase
1	95 °C	3 min	Desnaturalización
40	95 °C	15 seg	Desnaturalización
	<i>ermB</i> (58°C) <i>bla</i> TEM y <i>tetW</i> (60°C) <i>qnrS</i> (62°C) <i>sull</i> (65°C)	20 seg	Unión de iniciadores
	72 °C	1 min	Extensión

3.3.4. Visualización de resultados mediante gel de electroforesis

Los productos generados en la PCR se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa (Conda, ref. 8066) al 3% en tampón TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM), con la adición de 5 µL de RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, ref. 21141) cada 100 mL de gel. Se utilizan 10 µL de producto de PCR, previamente mezclados con tampón de carga 6X (Thermo Fisher, ref. R0611). En cada gel se incluyen dos marcadores de pesos moleculares GeneRuler 100 bp DNA Ladder, 0,5 µg/µL (ThermoFischer, ref. 15628050), cada uno flanqueando los productos de PCR. Finalmente, los fragmentos se visualizan en un transiluminador bajo luz UV.

3.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizan los softwares Statgraphics (Centurion XVI) y el SPSS (versión 16).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Recuentos de bacterias resistentes a antibióticos

El recuento de bacterias resistentes a antibióticos ha permitido identificar colonias de *E. coli* resistentes y determinar si la presencia del antibiótico en el medio cromógeno de coliformes ha afectado al crecimiento respecto al medio sin antibiótico. En la Tabla 7 y Tabla 8 se muestran los resultados de los recuentos obtenidos en los análisis de las aguas de salida del tratamiento secundario y terciario, respectivamente.

Tabla 7. Recuentos de colonias de *E. coli* en las muestras de salida del tratamiento secundario en medio cromógeno con y sin antibiótico.

ufc <i>E. coli</i> /100 mL			
	EDAR 1	EDAR 2	EDAR 3
AMP			
M1	2760,0 ± 600,4	530,0 ± 189,4	3245,0 ± 318,5
M2	3385,0 ± 616,1	1460,0 ± 191,1	29125,0 ± 1001,2
M3	2960,0 ± 373,3	23150,0 ± 3803,1	3112,5 ± 368,4
CIP			
M1	2495,0 ± 599,0	105,0 ± 77,2	1700,0 ± 0,0
M2	1105,0 ± 186,5	390,0 ± 203,0	11400,0 ± 1801,9
M3	830,0 ± 87,2	11225,0 ± 2861,7	10925,0 ± 1268,5
ERY			
M1	7990,0 ± 1525,0	915,0 ± 194,9	6115,0 ± 597,0
M2	9475,0 ± 850,0	3965,0 ± 651,8	28825,0 ± 793,2
M3	7990,0 ± 1525,0	28600,0 ± 678,2	29125,0 ± 573,7
OXI			
M1	2240,0 ± 160,8	25,0 ± 50,0	1377,5 ± 222,8
M2	2095,0 ± 243,0	985,0 ± 127,9	28825,0 ± 793,2
M3	1850,0 ± 240,3	17375,0 ± 3756,2	24350,0 ± 5815,2
SULF			
M1	2955,0 ± 200,2	260,0 ± 181,1	5155,0 ± 365,3
M2	2535,0 ± 470,0	1105,0 ± 204,9	26325,0 ± 1123,6
M3	2935,0 ± 468,3	22950,0 ± 4281,4	22275,0 ± 7245,9
CC			
M1	8500,0 ± 1805,5	1035,0 ± 190,7	9250,0 ± 341,6
M2	11375,0 ± 3122,4	3555,0 ± 200,2	28875,0 ± 1415,1
M3	8500,0 ± 1805,5	28875,0 ± 1415,1	9250,0 ± 341,6

Los valores están expresados como la media ± la desviación estándar. AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacino, ERY: eritromicina, OXI: oxitetraciclina SULF: sulfametoxazol, CC: control. M1, M2, M3: tomas de muestras realizadas en cada EDAR.

Tabla 8. Recuentos de colonias de *E. coli* por 100 mL de muestras salida del tratamiento terciario en medio cromógeno con y sin antibiótico.

ufc <i>E. coli</i> /100mL			
	EDAR 1	EDAR 2	EDAR 3
AMP			
M1	0,8 ± 1,0	8,8 ± 2,2	17,8 ± 1,7
M2	0,0 ± 0,0	110,3 ± 15,4	300,0 ± 0,0
M3	1,0 ± 0,8	11,5 ± 5,1	300,0 ± 0,0
CIP			
M1	0,0 ± 0,0	2,6 ± 1,3	1,5 ± 0,6
M2	0,0 ± 0,0	9,5 ± 2,4	300,0 ± 0,0
M3	1,3 ± 1,5	3,3 ± 2,8	300,0 ± 0,0
ERY			
M1	2,0 ± 1,6	20,0 ± 5,0	61,0 ± 2,6
M2	0,8 ± 1,0	211,0 ± 12,5	300,0 ± 0,0
M3	0,3 ± 0,5	31,0 ± 5,8	300,0 ± 0,0
OXI			
M1	0,3 ± 0,5	2,0 ± 0,8	1,0 ± 0,8
M2	0,0 ± 0,0	85,3 ± 16,8	300,0 ± 0,0
M3	0,8 ± 1,0	4,5 ± 3,1	300,0 ± 0,0
SULF			
M1	1,3 ± 1,9	8,3 ± 2,6	25,5 ± 3,1
M2	0,0 ± 0,0	63,0 ± 10,1	300,0 ± 0,0
M3	1,0 ± 1,4	5,3 ± 3,6	300,0 ± 0,0
CC			
M1	2,5 ± 3,8	21,8 ± 7,0	86,8 ± 3,0
M2	1,0 ± 1,4	193,8 ± 24,3	300,0 ± 0,0
M3	2,5 ± 1,3	35,8 ± 4,4	300,0 ± 0,0

Los valores están expresados como la media ± la desviación estándar. AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacino, ERY: eritromicina, OXI: oxitetraciclina SULF: sulfametoxazol, CC: control. M1, M2, M3: tomas de muestras realizadas en cada EDAR.

Los valores de los recuentos de *E. coli* fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA). El método empleado fue el ANOVA multifactorial, éste permitió determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los recuentos de colonias de *E. coli*. Para este estudio los factores elegidos fueron, el origen de la muestra, antibiótico y muestreo. En la Tabla 9 se indican los valores-*p* de los distintos factores y sus interacciones en las muestras de agua de salida del tratamiento secundario.

Todos los factores probados y las interacciones entre ellos presentaban valores-*p* menores a 0,05, de esta forma se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los recuentos de los distintos factores estudiados, esto significa que el origen de la muestra (EDAR), día de la toma de muestra y los diferentes antibióticos añadidos al medio de cultivo, así como las interacciones entre ellos influye en el recuento de colonias de *E. coli*.

Tabla 9. Resultados ANOVA multifactorial de los recuentos de *E. coli* de la salida del tratamiento secundario.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestreo SS	$4,65 \times 10^9$	2	$2,32 \times 10^9$	697,25	0
B:ATB SS	$1,92 \times 10^9$	5	$3,83 \times 10^8$	114,97	0
C:EDARs	$4,50 \times 10^9$	2	$2,25 \times 10^9$	674,92	0
INTERACCIONES					
AB	$6,86 \times 10^8$	10	$6,86 \times 10^7$	20,59	0
AC	$7,71 \times 10^9$	4	$1,93 \times 10^9$	578,22	0
BC	$6,99 \times 10^8$	10	$6,99 \times 10^7$	20,97	0
ABC	$1,66 \times 10^9$	20	$8,28 \times 10^7$	24,86	0
RESIDUOS	$5,40 \times 10^8$	162	$3,33 \times 10^6$		
TOTAL (CORREGIDO)	$2,23 \times 10^{10}$	215			

Informe de resultados del Statgraphics (Centurion XVI).

Mediante el estudio de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher se consigue obtener grupos homogéneos a nivel de factor. Este método se basa en diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos para saber si son o no independientes. En la Figura 4 se representan los distintos grupos obtenidos por el análisis LSD de Fisher según muestreo, antibiótico y EDAR respectivamente.

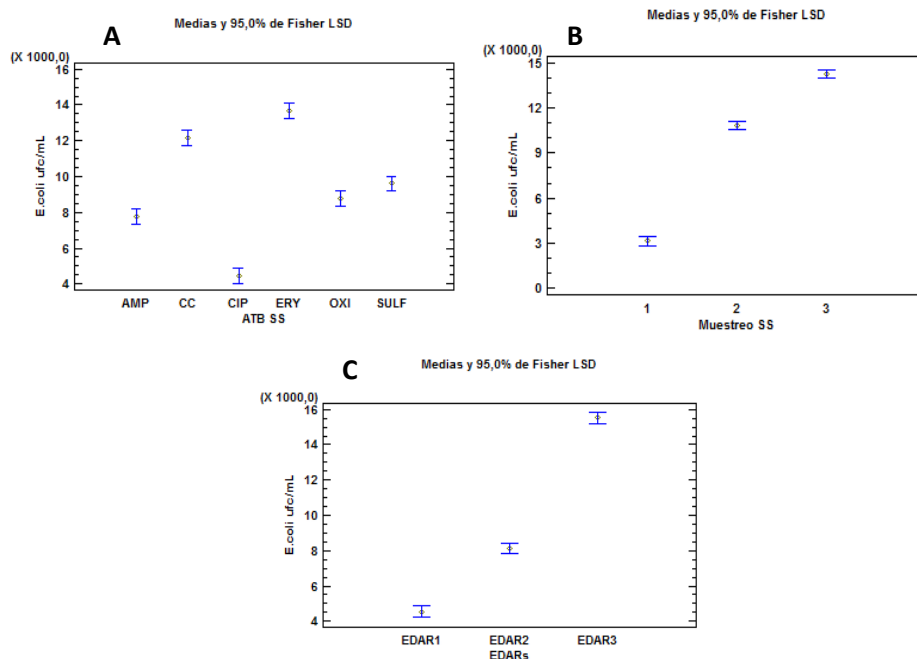


Figura 4. Grupos homogéneos resultados del análisis LSD de Fisher en muestras de salida del tratamiento secundario según A) antibiótico añadido al medio de cultivo, B) muestreo, C) origen de la muestra. Informe de resultados Statgraphics (Centurion XVI).

Tal y como se observa en la Figura 4.B, los recuentos de *E. coli* son significativamente diferentes según muestreo. Lo mismo ocurre en el caso del origen de la muestra (Figura 4.C), aparecen tres grupos, indicando que el factor origen (EDAR) influye significativamente en el recuento de *E. coli*. Con respecto a los antibióticos (Figura 4.A), cada antibiótico influye de forma diferente en el recuento, a excepción de sulfametoxazol y oxitetraciclina entre los que no existen diferencias significativas.

La Figura 5 representa los efectos de las interacciones entre las EDARs y los antibióticos del medio de cultivo para los recuentos de colonias de *E. coli* de muestras de agua de salida del tratamiento secundario. En todas las EDARs se observan comportamientos similares en relación al antibiótico empleado. En este caso, se observa claramente como el ciprofloxacino causa la mayor inhibición de crecimiento en todas las EDARs.

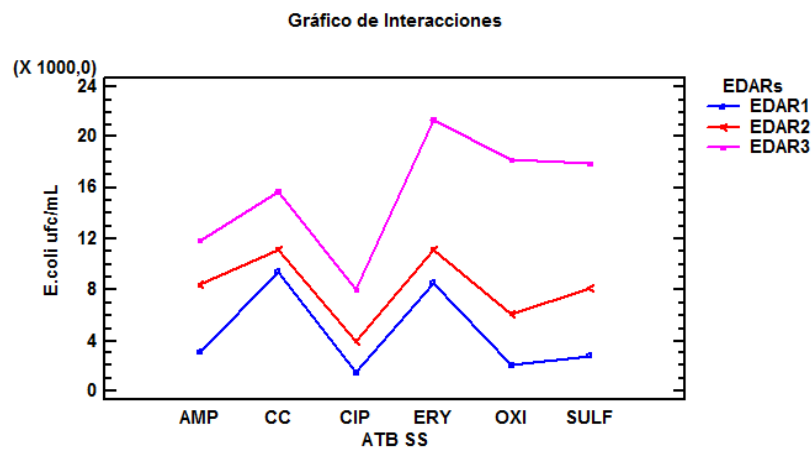


Figura 5. Resultados de la influencia de la interacción entre antibiótico presente en el medio de cultivo y muestra de salida del tratamiento secundario de las EDARs estudiadas, en el recuento de colonias de *E. coli*. AMP: ampicilina, CC: control, CIP: ciprofloxacino, ERY: eritromicina, OXI: oxitetraciclina, SULF: sulfametoxazol. Informe de resultados Statgraphics (Centurion XVI).

El mismo análisis ANOVA es realizado con los datos de los recuentos obtenidos de las muestras de la salida del tratamiento terciario, en la Tabla 10 se pueden observar los valores-*p* y sus interacciones.

Los resultados nos indican que todos los factores estudiados y sus interacciones influyen en el recuento de colonias de *E. coli* para la salida del tratamiento terciario ($p < 0.05$).

Tabla 10. Resultados ANOVA multifactorial de los recuentos de *E. coli* de la salida del tratamiento terciario.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestreo ST	584627	2	292313	9704,84	0
B:ATB ST	39204,6	5	7840,93	260,32	0
C:EDARs ST	1,76 x 10 ⁶	2	879006	29183,1	0
INTERACCIONES					
AB	15644,2	10	1564,42	51,94	0
AC	720296	4	180074	5978,47	0
BC	34446,4	10	3444,64	114,36	0
ABC	60690,5	20	3034,53	100,75	0
RESIDUOS	4879,5	162	30,1204		
TOTAL (CORREGIDO)	3,22 x 10 ⁶	215			

Informe de resultados Statgraphics, (Centurion XVI).

Del mismo modo que en la salida del tratamiento secundario, se realizó un estudio LSD. En la Figuras 6 se representan los resultados de los grupos homogéneos para muestreo, antibiótico y EDAR.

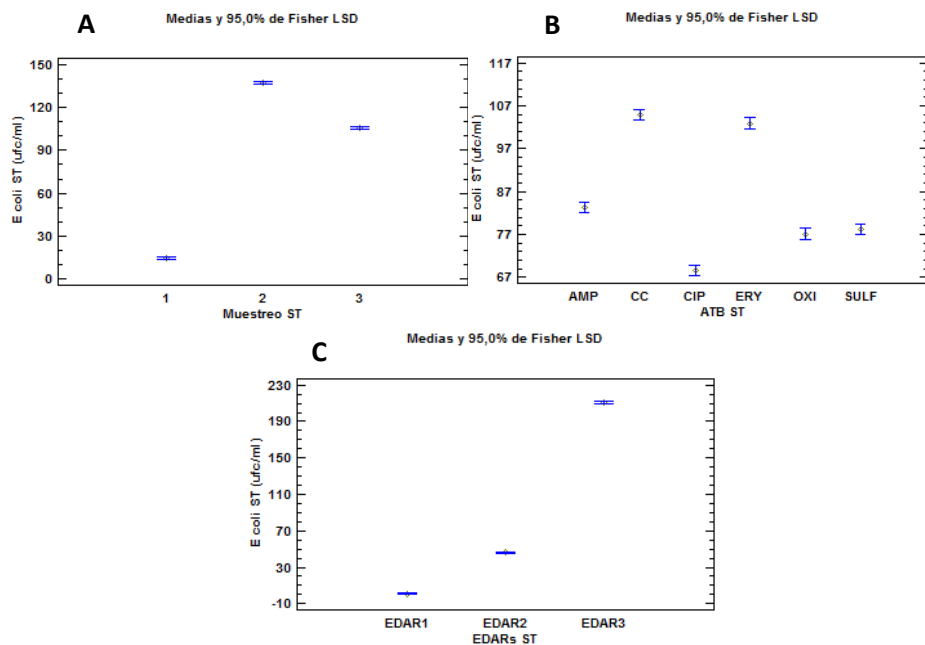


Figura 6. Grupos homogéneos resultados del análisis LSD de Fisher en muestras de salida del tratamiento terciario según A) antibiótico añadido al medio de cultivo, B) muestreo, C) origen de la muestra. Informe de resultados Statgraphics, Centurion XVI.

Cada muestreo (Figura 6.A) aparece en un grupo homogéneo distinto, lo que indica que influye de forma diferente sobre los recuentos de *E. coli*, siendo significativamente mayor para

el muestreo 2. Se comprueba de nuevo que el origen de la muestra (Figura 6.C) influye en los recuentos dado que pertenecen a grupos homogéneos distintos. En el caso de los antibióticos (Figura 6.A) aparecen cuatro grupos homogéneos distintos, resalta la respuesta de la eritromicina cuyo recuento no muestra diferencias con el del control. Esto sugiere que la población de *E. coli* presente en el agua es mayoritariamente resistente a dicho antibiótico.

La Figura 7 indica la influencia de las interacciones entre EDAR y antibiótico presente en el medio de cultivo en los recuentos de colonias de *E. coli* para muestras de agua de salida del tratamiento terciario. Como se puede observar, la EDAR 1 no muestra variación en la cantidad de colonias de *E. coli* para los distintos antibióticos empleados, además los niveles son próximos a 0, esto sugiere que el tratamiento de desinfección en la EDAR 1 es el más efectivo. Por el contrario, la EDAR 3 presenta unos niveles de contaminación muy superiores al resto de EDARs, este hecho insinúa que existe algún fallo en el método de desinfección aplicado. Finalmente, la influencia de los antibióticos en el recuento de colonias de *E. coli* según la EDAR analizada, tiene comportamientos similares a los de muestra de salida del tratamiento secundario.

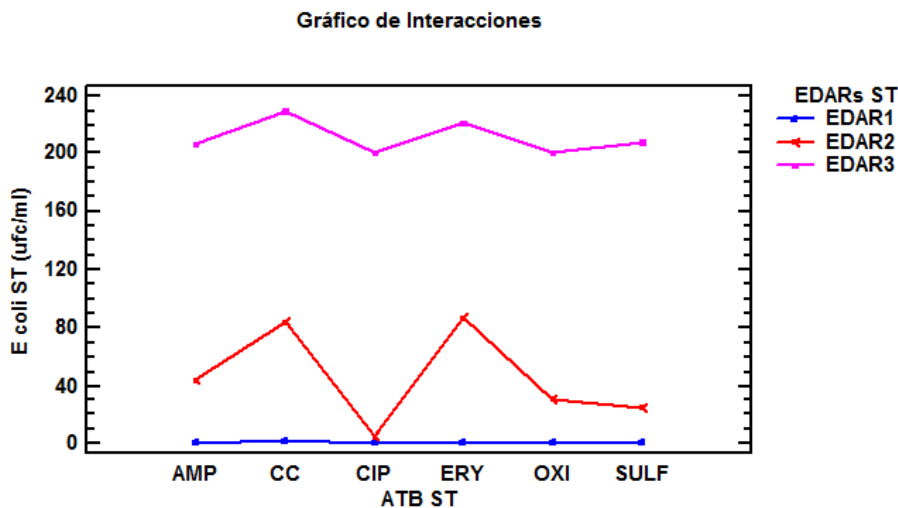


Figura 7. Resultados de la influencia de la interacción entre antibiótico presente en el medio de cultivo y muestra de salida del tratamiento terciario de las EDARs estudiadas, en el recuento de colonias de *E. coli*. AMP: ampicilina, CC: control, CIP: ciprofloxacino, ERY: eritromicina, OXI: oxitetraciclina, SULF: sulfametoxazol. Informe de resultados Statgraphics (Centurion XVI).

4.2. Aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos

Con el fin de poder realizar posteriores estudios, se procedió al aislamiento de cuatro colonias de *E. coli* por muestra filtrada y antibiótico. Los aislados se muestran en la Tabla 11, en los casos en los que no aparece dato es debido a la ausencia de crecimiento o no fue posible su aislamiento debido a un exceso de crecimiento bacteriano.

Tabla 11. Aislados obtenidos según EDAR, día de la toma de muestra, salida del tratamiento y antibiótico empleado en el medio.

	EDAR 1			EDAR 2			EDAR 3		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
AMP	4 SS	4 SS	1 SS	4 SS	1 SS	2 SS	-	4 SS	4 SS
	4 ST	4 ST	-	4 ST	1 ST	2 ST	-	2 ST	2 ST
CIP	4 SS	4 SS	2 SS	4ST	2 SS	2 SS	-	4 SS	4 SS
	4 ST	-	1 ST	-	2 ST	2 ST	-	-	2 ST
OXI	4 SS	4 SS	1 SS	4 SS	4 SS	2 SS	4 SS	4 SS	2 SS
	4 ST	-	2 ST	4 ST	4 ST	2 ST	-	-	-
ERY	4 ST	2 SS	2 SS	4 SS	4 SS	2 SS	-	4 SS	4 SS
	-	4 ST	-	4 ST	2 ST	2ST	-	-	2 ST
SULF	4 SS	4 SS	2 SS	4 SS	2 SS	2 SS	-	4 SS	4 SS
	-	-	2 ST	-	2ST	2 ST	-	-	-

SS: salida tratamiento secundario; ST: salida tratamiento terciario; M1, M2 y M3: fecha de la toma de muestra; AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacino; OXI: oxitetraciclina; ERY: eritromicina; SULF: sulfametoxazol.

4.3. Determinación de la CMI en aislados de *E. coli*

Los datos obtenidos en este ensayo corresponden al análisis de resistencias de 60 aislados de *E. coli*, 23 procedían de muestras de agua de la EDAR 1, 10 de la EDAR 2 y 27 de la EDAR 3, tanto de la salida del tratamiento secundario como terciario.

De los 14 antibióticos probados, destacan 6 antibióticos frente a los cuales los aislados muestran mayores porcentajes de resistencia: el 75% de los aislados mostraron resistencia frente ampicilina, aproximadamente el 72% al ciprofloxacino y tetraciclina, 58% trimetoprim, 57% al ácido nalidíxico y 55% al sulfametoxazol. Estos resultados están de acuerdo con los referenciados en la bibliografía, del 85 al 100 % de *E. coli* presentan resistencias a antibióticos β -lactámicos de amplio espectro, entre los que se encuentra la ampicilina (Gelband et al., 2015). Por otra parte, el consumo de sulfonamidas y trimetoprim en España es de los más altos desde 2015, lo que justifica que las poblaciones microbianas que viven bajo esta presión de selección desarrollen resistencias a dichos antibióticos (ECDC, 2015). Finalmente, el ácido nalidíxico y el ciprofloxacino se encuentran entre las quinolonas de mayor consumo (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2009) por lo que es normal que aparezcan elevados niveles de resistencias.

Por el contrario, para los antibióticos colistina, meropenem y tigeciclina, ningún aislado de *E. coli* superaba los puntos de corte para ser considerados resistentes. La colistina, en la década de 1970 cayó en desuso, pero a partir del 2000 ha vuelto a administrarse para tratar nuevas infecciones resistentes a antibióticos. El meropenem es un β -lactámico que se encuentra en el grupo de los carbapenémicos, antibióticos que se administran a los pacientes tras mostrar resistencia reiterada a otros antibióticos (Gelband et al., 2015). La tigeciclina es un antibiótico derivado de las tetraciclinas, bacterias gram-negativas multirresistentes presentan sensibilidad a este antibiótico, su eficacia se debe a una mayor afinidad por la subunidad 30S de los ribosomas y a la protección frente a mecanismos de resistencia que

afectan a las tetraciclinas. Todo esto explica la ausencia de aislados de *E. coli* resistentes a cualquiera de estos tres antibióticos.

Para estudiar la relación de dependencia-independencia entre el origen de la muestra y porcentaje de resistencia a los antibióticos entre los aislados, se llevó a cabo la prueba de la χ^2 mediante una tabla de contingencia. En aquellos casos en los que el valor del estadístico χ^2 de Pearson calculado sea mayor que el valor crítico para 2 grados de libertad y una significación del 5%, se rechaza la hipótesis nula, es decir, se considera que las variables son dependientes. En este caso los grados de libertad son 2 ya que fueron estudiadas un total de 3 EDARs; el valor crítico de la χ^2 para este análisis es 5,991. Los resultados obtenidos para las aguas de salida del tratamiento secundario, muestran que solo la resistencia a la trimetoprima depende de la EDAR de la que procede el aislado, tal y como se puede observar en la Tabla 12, el valor de la χ^2 es superior al valor de la χ^2 crítica.

Tabla 12. Resultados de la prueba de χ^2 entre las variables EDAR y resistencia a trimetoprima en aislados de aguas de salida del secundario. (Análisis procedente del fichero. Salida de Resultados Programa SPSS (versión 16.0); gl: grados de libertad).

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,372 ^a	2	,006
Razón de verosimilitudes	13,518	2	,001
Asociación lineal por lineal	2,207	1	,137
N de casos válidos	38		

El análisis llevado a cabo para los aislados de la salida del tratamiento terciario, procedentes únicamente de las EDAR 1 y 2 (grados de libertad = 1, valor crítico $\chi^2 = 3,841$) indica que solamente las resistencias a ampicilina y tetraciclina dependen de la variable EDAR. En las Tablas 13, 14 y 15 se muestran los resultados de los parámetros estadísticos para ampicilina y ciprofloxacino y ácido nalidíxico respectivamente.

Tabla 13. Resultados de la prueba de χ^2 entre las variables EDAR y resistencia a ampicilina en aislados de aguas de salida del terciario. (Análisis procedente del fichero. Salida de Resultados Programa SPSS (versión 16.0); gl: grados de libertad).

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,090 ^a	1	,043		
Corrección por continuidad ^b	2,265	1	,132		
Razón de verosimilitudes	4,166	1	,041		
Estadístico exacto de Fisher				,116	,067
Asociación lineal por lineal	3,904	1	,048		
N de casos válidos	22				

Tabla 14. Resultados de la prueba de χ^2 entre las variables EDAR y resistencia a ciprofloxacino en aislados de aguas de salida del terciario. (Análisis procedente del fichero Salida de Resultados Programa SPSS (versión 16.0); gl: grados de libertad).

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,956 ^a	1	,047		
Corrección por continuidad ^b	2,321	1	,128		
Razón de verosimilitudes	3,994	1	,046		
Estadístico exacto de Fisher				,074	,064
Asociación lineal por lineal	3,776	1	,052		
N de casos válidos	22				

Tabla 15. Resultados de la prueba de χ^2 entre las variables EDAR y resistencia a ácido nalidíxico en aislados de aguas de salida del terciario. (Análisis procedente del fichero Salida de Resultados Programa SPSS (versión 16.0); gl: grados de libertad).

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,180 ^a	1	,041		
Corrección por continuidad ^d	2,571	1	,109		
Razón de verosimilitudes	4,265	1	,039		
Estadístico exacto de Fisher				,079	,054
Asociación lineal por lineal	3,990	1	,046		
N de casos válidos	22				

Esta relación de dependencia puede deberse a la presencia del antibiótico en las aguas, lo que causa una presión de selección en los microorganismos adquiriendo mayor resistencia.

De los 60 aislados ensayados (EUVSEC), 7 fueron resistentes a la ceftazidima y cefotaxima, de forma que, tal y como se menciona en el protocolo, se debe realizar un segundo ensayo con otros antibióticos diferentes, en este caso, dispuestos sobre una placa multipocillo EUVSEC2. Los antibióticos presentes en la placa EUVSEC2 son cefalosporinas (cefepima, cefotaxima, cefotaxima/ácido clavulínico, cefoxitin, ceftazidima y ceftazidima/ácido clavulínico), carbapenémicos (ertapenem, imipenem y meropenem) y la temocilina, una carboxipenicilina. Todos ellos se encuentran dentro de la familia de los β -lactámicos, pero presentan resistencia a las β -lactamasas.

Otro dato importante es el que hace referencia a las multirresistencias. De los 60 aislados ensayados, el 91,7% mostraron resistencias a más de un antibiótico, un 21,7% lo fueron al 50% o más de los antibióticos presentes en la placa EUVSEC. Solo 2 aislados mostraron sensibilidad a todos los antibióticos, lo que representa el 3,33%.

En la Tabla 18 aparecen las CMI de los 7 aislados testados en las placas EUVSEC2, todos presentaron resistencia a la cefotaxima y ceftazidima, destaca un aislado que, además, mostró resistencia al cefoxitin y el ertapenem.

En las Tablas 16, 17 y 18 se recogen las CMI de los aislados de *E. coli* para cada uno de los antibióticos en muestras de salida del tratamiento secundario, terciario y EUVSEC2, respectivamente.

Tabla 16. CMI (mg/L) de los antibióticos obtenidas mediante Sistema Sensititre (placa EUVSEC) para los aislados de la salida del secundario.

Aislado <i>E. coli</i>	EDAR	CMI ANTIBIÓTICO (mg/L)													
		AMP	AZI	FOT	TAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MERO	NAL	SMX	TET	TGC	TMP
1	3	64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,015	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	1024	64	≤ 0,25	32
2	3	> 64	4	> 4	8	≤ 8	0,25	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	8	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
3	1	> 64	8	≤ 0,25	≤ 0,5	> 128	> 8	≤ 1	> 32	≤ 0,03	> 128	> 1024	> 64	0,5	> 32
4	1	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	> 128	> 8	≤ 1	> 32	≤ 0,03	> 128	> 1024	> 64	0,5	> 32
5	1	> 64	4	2	8	≤ 8	≤ 0,015	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
6	2	> 64	≤ 2	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,5	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	8	16	≤ 2	≤ 0,25	≤ 0,25
7	2	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,25	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	16	> 64	≤ 0,25	> 32
8	2	> 64	8	> 4	> 8	≤ 8	0,5	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	16	≤ 2	≤ 0,25	> 32
9	3	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	128	8	≤ 1	> 32	≤ 0,03	> 128	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
10	3	> 64	64	> 4	4	≤ 8	> 8	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
11	1	> 64	64	> 4	> 8	≤ 8	> 8	≤ 1	> 32	≤ 0,03	> 128	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
12	1	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,5	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	8	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
13	1	> 64	8	≤ 0,25	≤ 0,5	32	8	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
14	2	> 64	4	> 4	> 8	≤ 8	> 8	≤ 1	1	≤ 0,03	> 128	16	> 64	≤ 0,25	0,5
15	2	4	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	> 8	≤ 1	1	≤ 0,03	> 128	> 1024	≤ 2	0,5	0,5
16	3	4	8	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	1	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	> 1024	≤ 2	0,5	> 32
17	3	> 64	8	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,015	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	> 1024	> 64	0,5	> 32
18	1	> 64	16	≤ 0,25	≤ 0,5	128	> 8	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
19	1	> 64	32	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,12	≤ 1	> 32	0,06	8	> 1024	> 64	≤ 0,25	≤ 0,25
20	2	> 64	≤ 2	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,25	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	8	≤ 8	> 64	0,5	≤ 0,25
21	2	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,015	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	≤ 8	> 64	0,5	≤ 0,25
22	2	> 64	8	≤ 0,25	≤ 0,5	64	> 8	≤ 1	1	≤ 0,03	> 128	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
23	3	> 64	16	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,015	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	≤ 8	> 64	0,5	> 32

(Continuación Tabla 16).

Aislado <i>E. coli</i>	EDAR	CMI ANTIBIÓTICO (mg/L)													
		AMP	AZI	FOT	TAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MERO	NAL	SMX	TET	TGC	TMP
24	3	> 64	> 64	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	> 8	≤ 1	1	≤ 0,03	> 128	16	> 64	≤ 0,25	> 32
25	1	4	≤ 2	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	1	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	32	≤ 2	≤ 0,25	≤ 0,25
26	1	4	8	≤ 0,25	≤ 0,5	64	> 8	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	> 1024	≤ 2	≤ 0,25	0,5
27	1	4	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	> 8	≤ 1	1	≤ 0,03	> 128	32	≤ 2	≤ 0,25	0,5
28	2	4	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	> 8	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	≤ 8	> 64	≤ 0,25	≤ 0,25
29	2	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,015	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	> 1024	> 64	≤ 0,25	≤ 0,25
30	2	2	8	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,12	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	8	≤ 8	64	≤ 0,25	≤ 0,25
31	3	> 64	≤ 2	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,25	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
32	3	> 64	8	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,12	≤ 1	> 32	≤ 0,03	32	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
33	1	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,5	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	8	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
34	1	2	8	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,25	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	8	≤ 8	64	≤ 0,25	≤ 0,25
35	1	2	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,015	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	16	64	0,5	> 32
36	2	2	8	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	8	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	64	≤ 2	≤ 0,25	0,5
37	2	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,25	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	128	> 1024	64	≤ 0,25	> 32
38	2	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,25	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	128	> 1024	≤ 2	≤ 0,25	> 32

AMP: ampicilina; AZI: Azitromicina; FOT: cefotaxima; TAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MERO: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; SMX: sulfametoxazol; TET: tetraciclina; TGC: tigeciclina; TMP: trimetropim. En rojo: valores de CMI que representan resistencia según valores epidemiológicos.

Tabla 17. CMI (mg/L) de los antibióticos obtenidas mediante Sistema Sensititre (placa EUVSEC) para los aislados de la salida del terciario.

Aislado <i>E. coli</i>	EDAR	CMI ANTIBIÓTICO (mg/L)													
		AMP	AZI	FOT	TAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MERO	NAL	SMX	TET	TGC	TMP
39	1	64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,015	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	1024	64	≤ 0,25	32
40	1	> 64	8	> 4	> 8	≤ 8	0,5	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	16	≤ 2	≤ 0,25	> 32
41	2	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,25	≤ 1	1	≤ 0,03	≤ 4	16	> 64	≤ 0,25	> 32
42	2	> 64	64	> 4	4	≤ 8	> 8	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
43	1	> 64	4	> 4	1	≤ 8	> 8	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	> 1024	≤ 2	0,5	≤ 0,25
44	1	> 64	≤ 2	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	8	≤ 1	1	≤ 0,03	> 128	> 1024	64	≤ 0,25	> 32
45	2	4	8	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	1	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	> 1024	≤ 2	0,5	> 32
46	2	> 64	16	≤ 0,25	≤ 0,5	128	> 8	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
47	2	> 64	8	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,12	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	≤ 8	≤ 2	≤ 0,25	≤ 0,25
48	1	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,015	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	≤ 8	> 64	0,5	≤ 0,25
49	1	> 64	8	≤ 0,25	≤ 0,5	64	> 8	≤ 1	1	≤ 0,03	> 128	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
50	2	> 64	> 64	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	1	≤ 1	> 32	≤ 0,03	> 128	> 1024	> 64	0,5	> 32
51	2	> 64	16	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,015	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	≤ 8	> 64	0,5	> 32
52	2	4	≤ 2	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	1	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	32	≤ 2	≤ 0,25	≤ 0,25
53	1	4	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	> 8	≤ 1	1	≤ 0,03	> 128	32	≤ 2	≤ 0,25	0,5
54	1	4	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	> 8	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	> 128	≤ 8	> 64	≤ 0,25	≤ 0,25
55	2	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	32	0,12	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	64	> 1024	≤ 2	≤ 0,25	> 32
56	2	2	8	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,12	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	8	≤ 8	64	≤ 0,25	≤ 0,25
57	2	> 64	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,5	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	8	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32
58	1	2	8	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,25	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	8	≤ 8	64	≤ 0,25	≤ 0,25
59	2	4	4	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,015	≤ 1	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 4	32	≤ 2	≤ 0,25	0,5
60	2	> 64	32	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 8	0,25	≤ 1	1	≤ 0,03	8	> 1024	> 64	≤ 0,25	> 32

AMP: ampicilina; AZI: Azitromicina; FOT: cefotaxima; TAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL; colistina; GEN: gentamicina; MERO: meropenem; NAL: ácido nalidixico; SMX: sulfametoxazol; TET: tetraciclina; TGC: tigeciclina; TMP: trimetropim. En rojo: valores de CMI que representan resistencia según valores epidemiológicas

Tabla 18. CMI (mg/L) de los antibióticos obtenidas mediante Sistema Sensititre (placa EUVESC2).

Aislado <i>E. coli</i>	EDAR	CMI ANTIBIÓTICO (mg/L)									
		FEP	FOT	F/C	FOX	TAZ	T/C	ETP	IMI	MERO	TRM
10	3	16	> 64	≤ 0,06	2	32	0,25	0,03	≤ 0,12	≤ 0,03	8
15	2	4	64	≤ 0,06	8	1	≤ 0,12	0,03	≤ 0,12	≤ 0,03	4
22	2	8	64	≤ 0,06	4	8	≤ 0,12	≤ 0,015	≤ 0,12	≤ 0,03	8
31	3	0,25	2	≤ 0,06	4	16	≤ 0,12	≤ 0,015	0,25	0,06	4
32	3	16	> 64	≤ 0,06	4	32	0,25	0,03	≤ 0,12	≤ 0,03	8
40	2	0,25	64	32	> 64	64	64	0,12	0,5	≤ 0,03	8
42	2	2	32	≤ 0,06	8	4	0,25	≤ 0,015	0,25	≤ 0,03	8

FEP: cefepime; FOT: cefotaxima; F/C: cefotaxima/ácido clavulánico; FOX: ceftaxitin; TAZ: ceftazidima; T/C: ceftazidima/ácido clavulánico; ETP: ertapene; IMI: imipenem; MERO: meropenem; TRM: termocilin. En rojo: valores de CMI que representan resistencia según valores epidemiológicas.

4.4. Detección de genes de resistencia mediante PCR

Los estudios que analizan la resistencia a antibióticos basándose exclusivamente en aislados obtenidos de muestras, no están teniendo en cuenta que en la población microbiana de la muestra existen bacterias que pueden ser no cultivables, sin embargo, sí que pueden poseer genes de resistencia a antibióticos (Heritage, 2001). La presencia de estos genes en las muestras indica un peligro potencial de resistencia a antibióticos, ya que las bacterias los pueden adquirir por transferencia horizontal de genes. Debido a esto, la extracción de ADN se realiza sobre el filtro en el que se procesa la muestra de agua.

La identificación de genes de resistencia se estableció mediante amplificación por PCR de fragmentos contenidos en éstos. Se analizaron 5 genes: *bla*TEM, *erm*B, *qnr*S, *sull* y *tet*W. A continuación, se muestran los resultados obtenidos en los geles de electroforesis.

Como se puede observar en la Figura 8, se detectó la banda de 247 pb correspondiente al gen *bla*TEM en todas las muestras analizadas. El gen *bla*TEM sintetiza una β -lactamasa que se encarga de hidrolizar el anillo β -lactámico.

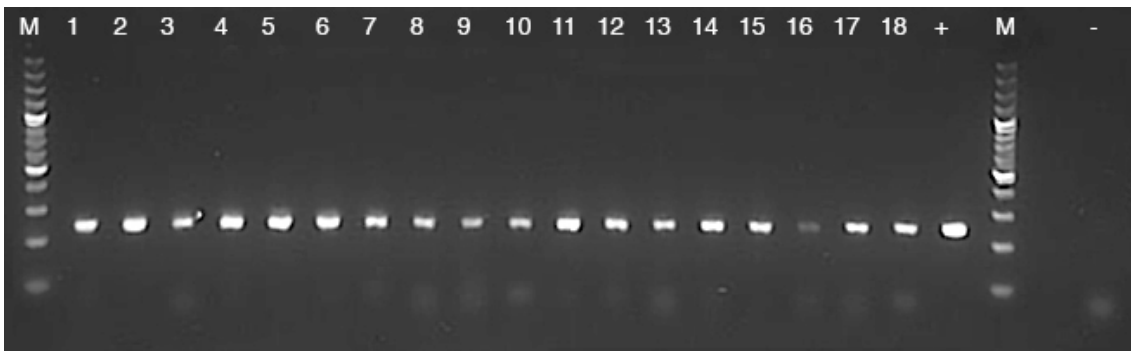


Figura 8. Amplificación de un fragmento del gen *bla*TEM. M: marcador 100 pb ; 1: EDAR 3 SS M1; 2: EDAR 3 ST M1; 3: EDAR 3 SS M2; 4: EDAR 3 ST M2; 5: EDAR 3 SS M3; 6: EDAR 3 ST M3; 7: EDAR 2 SS M1; 8: EDAR 2 ST M1; 9: EDAR 2 SS M2; 10: EDAR 2 ST M2; 11: EDAR 2 SS M3; 12: EDAR 2 ST M3; 13: EDAR 1 SS M1; 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.

La Figura 9 representa los resultados obtenidos en la PCR para el gen de la *erm*B; sólo las muestras 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 14, 15 y 17 presentaban la banda de 364 pb correspondiente a este gen. El gen *erm*B codifica una metilasa para la protección de los ribosomas.

Los resultados de esta PCR no indican ningún patrón en la presencia del gen en cuanto a tipo de tratamiento de la EDAR, día de la toma de muestra u origen.

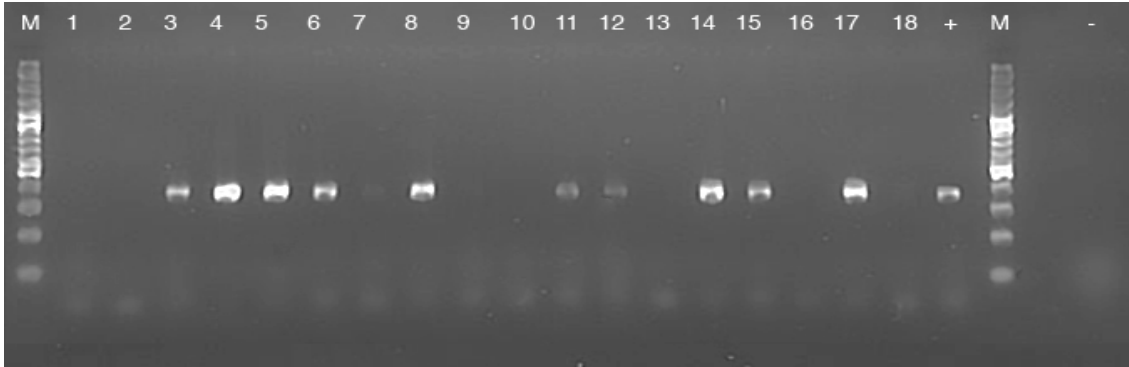


Figura 9. Amplificación de un fragmento del gen *ermB*. M: marcador 100 pb ; 1: EDAR 3 SS M1; 2: EDAR 3 ST M1; 3: EDAR 3 SS M2; 4: EDAR 3 ST M2; 5: EDAR 3 SS M3; 6: EDAR 3 ST M3; 7: EDAR 2 SS M1; 8: EDAR 2 ST M1; 9: EDAR 2 SS M2; 10: EDAR 2 ST M2; 11: EDAR 2 SS M3; 12: EDAR 2 ST M3; 13: EDAR 1 SS M1; 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.

La Figura 10 corresponde al gel de electroforesis del gen *qnrS*, como se puede observar se detectó la banda de 118 pb correspondiente al gen *qnrS* en todas las muestras. El gen *qnrS* se encarga de sintetizar un pentapéptido que protege a la ADN girasa (ARDB, 2017).

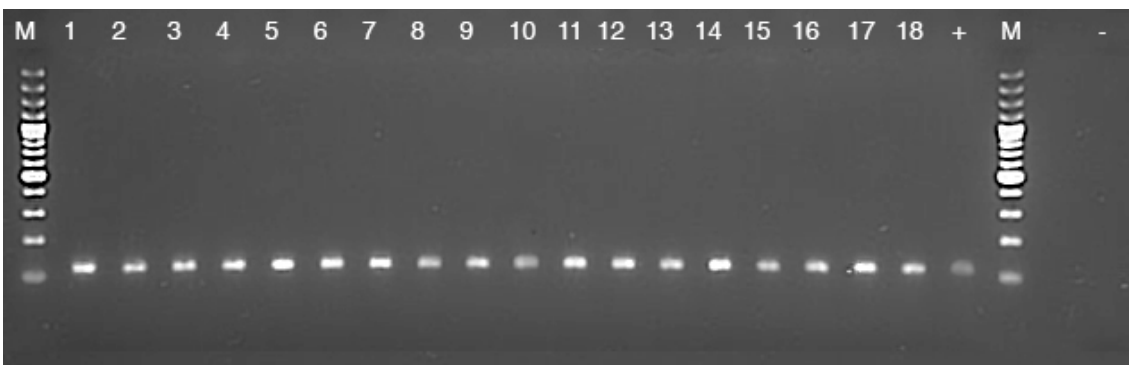


Figura 10. Amplificación de un fragmento del gen *qnrS*. M: marcador 100 pb ; 1: EDAR 3 SS M1; 2: EDAR 3 ST M1; 3: EDAR 3 SS M2; 4: EDAR 3 ST M2; 5: EDAR 3 SS M3; 6: EDAR 3 ST M3; 7: EDAR 2 SS M1; 8: EDAR 2 ST M1; 9: EDAR 2 SS M2; 10: EDAR 2 ST M2; 11: EDAR 2 SS M3; 12: EDAR 2 ST M3; 13: EDAR 1 SS M1; 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.

Los cebadores utilizados fueron los indicados por Rodríguez et al. (2015). En su estudio indican que el tamaño de amplicón es de 240 pb, sin embargo, los resultados obtenidos presentan banda a 118 pb, además se han testado los cebadores contra la secuencia del gen *qnrS* en el Sequence Manipulation Suite y el tamaño teórico de amplicón calculado es de 118 pb.

La presencia del gen *sull* viene definida por el amplicón de 163 pb. Como se indica en la Figura 11 se consiguió obtener la banda a 163 pb correspondiente al gen *sull* en todas las muestras. El gen *sull* aporta resistencia a las sulfonamidas, mediante la síntesis de la dihidropteroato sintasa resistente, que permite continuar la producción de ácido fólico necesario para la bacteria (ARDB, 2017).

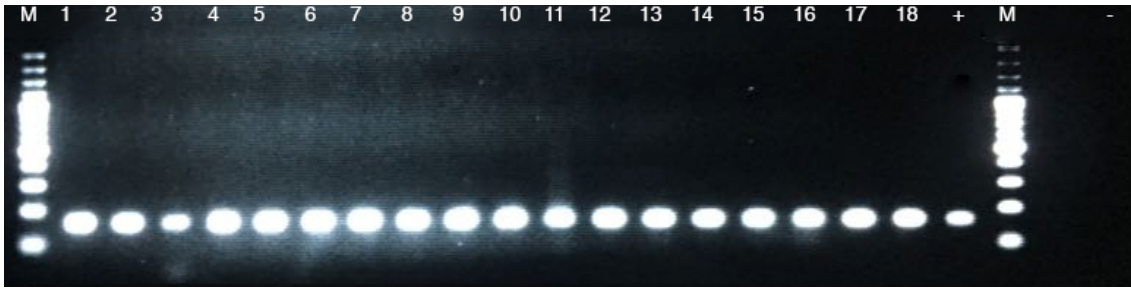


Figura 11. Amplificación de un fragmento del gen *sulI*. M: marcador 100 pb ; 1: EDAR 3 SS M1; 2: EDAR 3 ST M1; 3: EDAR 3 SS M2; 4: EDAR 3 ST M2; 5: EDAR 3 SS M3; 6: EDAR 3 ST M3; 7: EDAR 2 SS M1; 8: EDAR 2 ST M1; 9: EDAR 2 SS M2; 10: EDAR 2 ST M2; 11: EDAR 2 SS M3; 12: EDAR 2 ST M3; 13: EDAR 1 SS M1; 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.

El gen *tetW* confiere resistencia a las tetraciclinas al proteger los ribosomas de la acción de éstas. Como se puede observar en la Figura 12, todas las muestras de agua residual mostraban banda a 168 pb correspondiente al gen *tetW*.

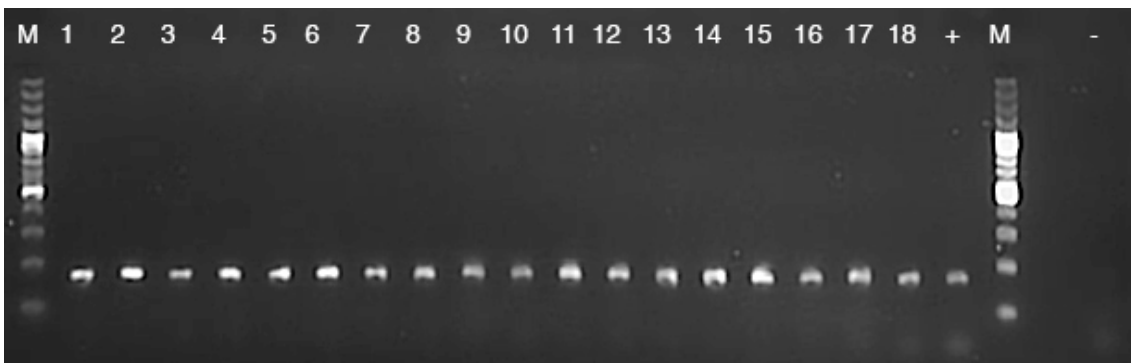


Figura 12. Amplificación de un fragmento del gen *tetW*. M: marcador 100 pb ; 1: EDAR 3 SS M1; 2: EDAR 3 ST M1; 3: EDAR 3 SS M2; 4: EDAR 3 ST M2; 5: EDAR 3 SS M3; 6: EDAR 3 ST M3; 7: EDAR 2 SS M1; 8: EDAR 2 ST M1; 9: EDAR 2 SS M2; 10: EDAR 2 ST M2; 11: EDAR 2 SS M3; 12: EDAR 2 ST M3; 13: EDAR 1 SS M1; 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.

Estudios relacionados con la presencia de genes de resistencia a antibióticos en muestras de agua de salida de EDARs como los de Rodríguez et al. (2014) y Huerta et al. (2013), consiguen detectar en todas las muestras los mismos genes que en este estudio, sin embargo, ellos los detectan mediante PCR cuantitativa. En este trabajo el único gen que no se detecta en alguna de las muestras es el *ermB*. Por el contrario, en los estudios anteriores aparece en todas, esto podría deberse a diferencias en los orígenes de las muestras.

4.5. Estudio de la relación entre presencia de bacterias resistentes y genes de resistencia a antibióticos

En la Tabla 19 y 20 se puede observar los resultados generales de presencia de resistencias a antibióticos en las muestras de salida del tratamiento secundario y terciario respectivamente, de esta forma, se tiene una visión global de la resistencia a antibióticos en bacterias, presencia de genes de resistencia y su posible relación.

Tabla 19. Comparación de la presencia de bacterias resistentes y genes de resistencia en las muestras de salida del tratamiento secundario.

		AMP		CIP		ERY		OXI		SULF	
		BRA	GRA	BRA	GRA	BRA	GRA	BRA	GRA	BRA	GRA
EDAR 1	M1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	M2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	M3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EDAR 2	M1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	M2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	M3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EDAR 3	M1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	M2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	M3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: presencia; -: ausencia. BRA: bacterias resistentes a antibióticos, GRA: genes de resistencia a antibióticos, AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacino, ERY: eritromicina, OXI: oxitetraciclina, SULF: sulfametoxazol.

Tabla 20. Comparación de la presencia de bacterias resistentes y genes de resistencia en las muestras de salida del tratamiento terciario.

		AMP		CIP		ERY		OXI		SULF	
		BRA	GRA	BRA	GRA	BRA	GRA	BRA	GRA	BRA	GRA
EDAR 1	M1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	M2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	M3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
EDAR 2	M1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	M2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	M3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EDAR 3	M1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	M2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	M3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: presencia; -: ausencia. BRA: bacterias resistentes a antibióticos, GRA: genes de resistencia a antibióticos, AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacino, ERY: eritromicina, OXI: oxitetraciclina, SULF: sulfametoxazol.

En todos los casos, a excepción de los relacionados con el antibiótico eritromicina, existe una relación directa entre presencia de bacterias resistentes a antibióticos y la detección de los genes que la confieren. Sin embargo, la presencia del gen de resistencia no tiene por qué

indicar, necesariamente, la detección de bacterias resistentes al antibiótico. La expresión del gen de resistencia depende del promotor, variaciones en la secuencia consenso del promotor van a producir una variación en la expresión del gen (Bayley et al., 2000). Además, estudios como los de Enne et al. (2006) indican que existen procesos de silenciamiento génico reversible, sin embargo, los mecanismos de silenciamiento aún son desconocidos. Por el contrario, en el caso de que no se observara crecimiento de *E. coli* en medio con antibiótico, pero si se detectara el gen de resistencia, podría indicar que el gen está presente en otras bacterias no analizadas o en los bacteriófagos presentes en estas muestras.

En cuanto a la eritromicina, a simple vista podemos decir que existe una discordancia entre la presencia de bacterias y la presencia de los genes en ocho de las muestras. Tal y como está documentado, la resistencia a los macrólidos se debe a una metilación de la adenina en la posición 2058 de la subunidad 50S del gen 23S ARNr (ARDB, 2017) y además, existen hasta diecinueve clases de erm metilasas de ARNr. En vista de los resultados, podemos decir que la resistencia a eritromicina en nuestros aislados podría deberse a cualquiera de los 18 restantes.

Estudios como el de Rodríguez et al. (2015) muestran una correlación entre la concentración de los antibióticos analizados y la cantidad de sus respectivos genes de resistencia. Por el contrario, genes que aportan resistencia a sulfonamidas y la concentración de esta familia de antibiótico no mostraban correlación (Xu et al., 2015). Estas diferencias en los resultados indican que es necesario aumentar los tipos de antibiótico y genes de resistencia en los estudios, de esta forma se consigue una mejor comprensión de la relación entre genes de resistencia y concentración de antibiótico.

CONCLUSIONES

1. Los métodos de desinfección del tratamiento terciario consiguen reducir la cantidad de *E. coli* respecto al tratamiento secundario, excepto en la segunda y tercera toma de muestra de la EDAR 3, lo cual podría deberse a un fallo en el mecanismo de desinfección o en el proceso de toma de muestra.
2. Los niveles de resistencia detectados entre las poblaciones de *E. coli* son significativamente más elevados para la eritromicina. Por el contrario, el ciprofloxacino es el antibiótico que inhibe en mayor medida el crecimiento de *E. coli*.
3. El 96,7% de los aislados analizados mediante el sistema Sensititre™, presenta resistencia al menos a uno de los antibióticos ensayados.
4. Existe una correlación entre la resistencia a antibióticos detectada mediante recuento en placa y la presencia del correspondiente gen, excepto en el caso de la eritromicina.
5. La resistencia a la eritromicina no depende únicamente de la presencia del gen *ermB* ya que, aunque existen colonias resistentes en todas las muestras, no se identifica el gen en ocho de ellas.
6. Las técnicas empleadas en los tratamientos terciarios de las EDARs analizadas, no permiten eliminar los genes de resistencia a antibióticos.

Estudios posteriores empleando PCR cuantitativa y análisis de la concentración de los antibióticos presentes en muestras de EDAR permitirían entender mejor la correlación entre los genes de resistencia y los antibióticos a los que confieren resistencia. Estudios metagenómicos de las aguas de EDAR conseguirían estudios más completos de la composición de la población microbiana en éstas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMINOV, R. I., GARRIGUES-JEANJEAN, N., & MACKIE, R. I. (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.
- ANDERSSON, D. I., & LEVIN, B. R. (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Current opinion in Microbiology*, 2(5), 489-493.
- ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES DATABASE (ARDB).(2017) visto el 5 de Julio de 2017. <https://arbd.cbcb.umd.edu/cgi/ssquery.cgi?db=T&gn=Sul1>
- ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES DATABASE (ARDB).(2017) visto el 5 de Julio de 2017. <https://arbd.cbcb.umd.edu/cgi/ssquery.cgi?db=T&gn=ErnB>
- ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES DATABASE (ARDB).(2017) visto el 5 de Julio de 2017. <https://arbd.cbcb.umd.edu/cgi/search.cgi?db=T&and0=O&term=QNRS&field=af&>
- BAYLEY, D. P., ROCHA, E. R., & SMITH, C. J. (2000). Analysis of cepA and other Bacteroides fragilis genes reveals a unique promoter structure. *FEMS Microbiology letters*, 193(1), 149-154.
- BORG, M. A. (2011). National cultural dimensions as drivers of inappropriate ambulatory care consumption of antibiotics in Europe and their relevance to awareness campaigns. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(3), 763-767.
- BRUNTON, L. L., LAZO, J. S., & PARKER, K. L. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). (2015). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Atlanta: CDC; 2013.
- CHAGAS, T. P. G., SEKI, L. M., DA SILVA, D. M., & ASENSI, M. D. (2011). Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. *Journal of hospital infection*, 77(3), 281.
- CHEN, J., YU, Z., MICHEL, F. C., WITTUM, T., & 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.
- CHOI, K. J., KIM, S. G., & KIM, S. H. (2008). Removal of antibiotics by coagulation and granular activated carbon filtration. *Journal of hazardous materials*, 151(1), 38-43.
- COLOMER-LLUCH, M., JOFRE, J., & MUNIESA, M. (2011). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PloS one*, 6(3), e17549.
- CORCORAN, E., C. NELLEMAN, E. BAKER, R. BOS, D. OSBORN, H. SAVELLI (eds). 2010. Sick Water? The central role of wastewater management in sustainable development. A Rapid Response Assessment. United Nations Environment Programme, UN-HABITAT, GRID-Arendal. Ed. Birkeland Trykkeri AS. Birkeland. 85 pp.
- DODD, M. C., & HUANG, C. H. (2007). Aqueous chlorination of the antibacterial agent trimethoprim: reaction kinetics and pathways. *Water Research*, 41(3), 647-655.
- DOLLIVER, H., & GUPTA, S. (2008). Antibiotic losses in leaching and surface runoff from manure-amended agricultural land. *Journal of environmental quality*, 37(3), 1227-1237.
- ENNE, V. I., DELSOL, A. A., ROE, J. M., & BENNETT, P. M. (2006). Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(9), 3003-3010.
- ERRECALDE, J. O. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo: Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública. FAO. Roma. 66 pp.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). 2014. EARS-Net Report, Quarters 1-4. Dublin.

- FLÓREZ, A. B. (2007). Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. 191 pp.
- GELBAND, H., MILLER-PETRIE, M., PANT, S., GANDRA, S., LEVINSON, J., & BARTER, D. (2015). The state of the world's antibiotics, 2015. Washington: Center for Disease Dynamics, *Economics & Policy*. CDDEP. Washington, D.C. 79 pp.
- GELBAND, H., MILLER-PETRIE, M., PANT, S., GANDRA, S., LEVINSON, J., & BARTER, D. (2015). The state of the world's antibiotics, 2015. Washington: Center for Disease Dynamics. *Economics & Policy*.
- GLEICK, P. H. (1993). Water in crisis: a guide to the world's fresh water resources. Ed. Oxford University Press, New York, 473 p.
- GÖBEL, A., THOMSEN, A., MCARDELL, C. S., JOSS, A., & GIGER, W. (2005). Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environmental science & technology*, 39(11), 3981-3989.
- HAYES, F. (2003). Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science*, 301(5639), 1496-1499.
- HEBERER, T. (2002). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*, 266(3), 175-189.
- HERITAGE, J., RANSOME, N., CHAMBERS, P. A., & WILCOX, M. H. (2001). A comparison of culture and PCR to determine the prevalence of ampicillin-resistant bacteria in the faecal flora of general practice patients. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48(2), 287-289.
- HERNÁNDEZ, A., MELLADO, R. P., & MARTÍNEZ, J. L. (1998). Metal Accumulation and Vanadium-Induced Multidrug Resistance by Environmental Isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4317-4320.
- JONES, O. A. H., VOULVOULIS, N., & LESTER, J. N. (2001). Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review. *Environmental technology*, 22(12), 1383-1394.
- JURY, W. A., & VAUX, H. J. (2007). The emerging global water crisis: managing scarcity and conflict between water users. *Advances in agronomy*, 95, 1-76.
- LEVY, S. B., FITZGERALD, G. B., & MACONE, A. B. (1976). Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature*, 260(5546), 40-42.
- LI, D., YANG, M., HU, J., ZHANG, Y., CHANG, H., & JIN, F. (2008). Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Research*, 42(1), 307-317.
- MARTI, E., & BALCÁZAR, 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.
- MARTÍNEZ, J. L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 321(5887), 365-367.
- MARTINEZ, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution*, 157(11), 2893-2902.
- MEHTA, L. (1998). *Contexts of scarcity: the political ecology of water in Kutch, India* (Doctoral dissertation, University of Sussex).
- MEHTA, L. (2000). Water for the twenty-first century: challenges and misconceptions.
- MIAO, X. S., KOENIG, B. G., & METCALFE, C. D. (2002). Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry.

- Journal of chromatography A*, 952(1), 139-147.
- MUTO, C. A. (2005). Why Are Antibiotic-Resistant Nosocomial Infections Spiraling Out of Control? *Infection control and hospital epidemiology*, 26(1), 10-12.
- OCHMAN, H., LAWRENCE, J. G., & GROISMAN, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), 299-304.
- OCHMAN, H., LAWRENCE, J. G., & GROISMAN, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), 299-304.
- OLLER, I., MALATO, S., & SÁNCHEZ-PÉREZ, J. (2011). Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination—a review. *Science of the total environment*, 409(20), 4141-4166.
- PEI, R., KIM, S. C., CARLSON, K. H., & 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.
- RADJENOVIĆ, J., PETROVIĆ, M., & BARCELÓ, D. (2009). Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water research*, 43(3), 831-841.
- REEVES, P. T. (2012). Antibiotics: Groups and properties. *Chemical analysis of antibiotic residues in food*. New Jersey (USA): Wiley Publishing, 30-31.
- ROBERTS, P. H., & THOMAS, K. V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment*, 356(1), 143-153.
- ROSAL, R., RODRÍGUEZ, A., PERDIGÓN-MELÓN, J. A., PETRE, A., GARCÍA-CALVO, E., GÓMEZ, M. J., ... & FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water research*, 44(2), 578-588.
- ROSE, W. E., & RYBAK, M. J. (2006). Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 26(8), 1099-1110.
- SEIJA, V., & VIGNOLI, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. En: *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 631-647.
- STEPANAUSKAS, R., GLENN, T. C., JAGOE, C. H., TUCKFIELD, R. C., LINDELL, A. H., KING, C. J., & MCARTHUR, J. V. (2006). Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environmental Microbiology*, 8(9), 1510-1514.
- SUÁREZ, J. E., & MENDOZA, M. C. (1991). Plasmid-encoded fosfomycin resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(5), 791.
- TERNES, T. A. (2000). Pharmaceuticals: occurrence in rivers, groundwater and drinking water. *Proceedings of International Seminar on Pharmaceuticals in the Environment March 9th*.
- TERNES, T., BONERZ, M., & SCHMIDT, T. (2001). Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 938(1), 175-185.
- THANASSI, D. G., SUH, G. S., & NIKAIIDO, H. (1995). Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 177(4), 998-1007.
- UNESCO-WWAP (World Water Assessment Programme). (2003). WATER FOR PEOPLE, WATER FOR LIFE Executive Summary of the UN World Water Development Report. UNESCO publishing Paris. 34 pp.
- UNESCO-WWAP (World Water Assessment Programme). (2012). The United Nations World Water Development Report 4: Managing Water under Uncertainty and Risk. UNESCO publishing. Paris. 380 pp.

UNIVERSITY OF TOLEDO (2004). Visto el 3 de Marzo de 2017. http://www.eeescience.utoledo.edu/Faculty/Sigler/Von_Sigler/LEPR_Protocols_files/DNA%20extraction%20-%20water.pdf

VAN BOECKEL, T. P., GANDRA, S., ASHOK, A., CAUDRON, Q., GRENFELL, B. T., LEVIN, S. A., & LAXMINARAYAN, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742-750.

WALSH, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797), 775-781.

WANG, J., MACNEIL, J. D., & KAY, J. F. (Eds.). (2011). Antibiotics: groups and properties, en: *Chemical analysis of antibiotic residues in food* (Vol. 38). John Wiley & Sons.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2000). Overcoming Antibiotic Resistance, World Health Organization Report in Infectious Diseases. WHO Press. Geneva. 67 pp.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2014). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. WHO Press. Geneva. 232 pp.

XI, C., ZHANG, Y., MARRS, C. F., YE, W., SIMON, C., FOXMAN, B., & NRIAGU, J. (2009). Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Applied and environmental microbiology*, 75(17), 5714-5718.

XU, J., XU, Y., WANG, H., GUO, C., QIU, H., HE, 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.

ZHOU, L. J., YING, G. G., ZHAO, J. L., YANG, J. F., WANG, L., YANG, B., & LIU, S. (2011). Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China. *Environmental Pollution*, 159(7), 1877-1885.