

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERIA AGRONÓMICA Y  
DEL MEDIO NATURAL



## Determinación de bacterias y genes de resistencia a antibióticos en aguas destinadas al riego de la Huerta Valenciana

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: **Michela Amato**

TUTORAS: **M<sup>a</sup> Ángeles Castillo López**  
**Ana González Pellicer**

*Curso Académico: 2017-2018*

Valencia, julio de 2018

Alumna:	Michela Amato	
Título del TFG:	Determinación de bacterias y genes de resistencia a antibióticos en aguas destinadas al riego de la Huerta Valenciana	
Lugar de realización:	Departamento de Biotecnología	
Titulación:	Grado en Biotecnología	Fecha de lectura: julio 2018
Especialidad:	Microbiología	
Directora:	M <sup>a</sup> Ángeles Castillo López Ana González Pellicer	

## RESUMEN

El incremento en el uso de antibióticos, tanto para humanos como para animales, está siendo uno de los mayores problemas medio ambientales y de salud pública, hoy en día. En primer lugar, los antibióticos podrían provocar efectos tóxicos en organismos no diana; además, la presencia de estos compuestos en el ambiente genera la activación de genes de resistencia en muchos microorganismos, como las bacterias. Estos genes de resistencia se pueden pasar entre bacterias por transferencia horizontal, promoviendo el incremento de bacterias resistentes en el medio y en consecuencia un aumento del riesgo de infecciones por bacterias súper resistentes.

En este trabajo se analizan las aguas procedentes de cinco puntos situados en la Huerta de Valencia con el fin de detectar genes de resistencia a antibióticos en aislados de *Escherichia coli*, tanto a nivel microbiológico como molecular. Los puntos seleccionados para la recogida de las aguas son: Río Turia (Quart de Poblet), Acequia Real de Moncada (Paterna), Barranco del Carraixet (Alboraya), Acequia de Vera (Valencia) y Acequia de Rascanya (Alboraya-Almàssera). Se llevan a cabo recuentos de coliformes, aislamiento de *E. coli*, así como extracciones de DNA, tanto de los aislados como directamente de las aguas, para analizar mediante PCR, y posterior electroforesis, la presencia de 5 genes de resistencia: *bla*TEM, *qnrS*, *tetW*, *sulI* y *ermB*.

Los resultados obtenidos muestran la presencia de bacterias resistentes y genes de resistencias en las muestras analizadas. Se observa una elevada presencia de bacterias resistentes a eritromicina y sulfametoxazol; el gen de resistencia que más aparece en los aislados de *E. coli* es el *bla*TEM, el cual confiere resistencia a  $\beta$ -lactámicos, mientras que en las muestras de aguas hay una alta frecuencia del gen *tetW*, uno de los principales responsables de la resistencia a tetraciclinas.

**Palabras clave:** antibióticos, genes de resistencia, aguas, *E. coli*, riego, acequias, PCR

# Determination of bacteria and antibiotic resistance genes present in irrigation channels in the Huerta Valenciana

## ABSTRACT

The increase in the use of antibiotics for humans and animals is one of the major environmental and health problems nowadays. In the first place, antibiotics could provoke toxic effects in non-target organisms; furthermore, the presence of these compounds in the environment generates the activation of resistance genes in microorganisms, like bacteria. These resistance genes can pass between bacteria by horizontal transfer, promoting the increase of resistant bacteria in the medium and, consequently, the risk of super-resistant bacterial infections.

In this work, water samples from five locations around the Huerta de Valencia are going to be studied with the main purpose of detecting antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolates, by microbiological and molecular analysis. The collection points for the water samples are: the Turia river (Quart de Poblet), the Moncada (Paterna), Rascanya (Alboraya-Almàssera) and Vera (Valencia) irrigation ditches, and the Carraixet gorge (Alboraya). Counting colonies of coliforms, isolation of *E. coli* and DNA extraction from the direct water samples and from the isolates, was carried out to analyse the presence of five resistance genes by PCR and electrophoresis: *bla*TEM, *qnr*S, *tet*W, *sul*I and *erm*B.

Obtained data show the presence of resistant bacteria and resistance genes in the analysed samples. There is an elevated presence of bacteria resistant to erythromycin and sulfamethoxazole; the resistance gene found most in *E. coli* isolates is the *bla*TEM, which confers resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics, whereas in the water samples there is an elevated frequency of the *tet*W gene, one of the genes responsible for tetracycline resistance.

**Key words:** antibiotics, resistance genes, water, *E. coli*, irrigation, irrigation ditches, PCR.

# Determinazione di batteri e geni di resistenza nelle acque destinate all'irrigazione della Huerta Valenciana

## RIASSUNTO

L'incremento nell'uso di antibiotici, sia per umani che per animali, è uno dei maggiori problemi medio ambientali e di salute pubblica oggi giorno. Prima di tutto, gli antibiotici potrebbero provocare effetti tossici in organismi non bersaglio; inoltre, la presenza di questi composti nell'ambiente genera l'attivazione di geni di resistenza in molti organismi, come i batteri. Questi geni di resistenza si possono trasferire tra i batteri per trasferimento orizzontale, promuovendo l'incremento di batteri resistenti e di conseguenza un aumento del pericolo di infezioni per batteri super resistenti.

In questo lavoro si analizzano le acque provenienti da cinque punti della Huerta de Valencia con il fine di individuare geni di resistenza a antibiotico in isolati di *Escherichia coli*, tanto a livello microbiologico come a livello molecolare. I punti selezionati per la raccolta delle acque sono: fiume Turia (Quart de Poblet), Roggia Reale di Moncada (Paterna), Barranco del Carraixet (Alboraya), Roggia di Vera (Valencia) e Roggia di Rascanya (Alboraya-Almàssera). Si effettuano conteggi di coliformi, isolamento di *E. coli* ed estrazione di DNA, tanto degli isolati quanto delle acque dirette, per analizzare per PCR, e successiva elettroforesi, la presenza di cinque geni di resistenza: *bla*TEM, *qnr*S, *tet*W, *sul*I e *erm*B.

I risultati ottenuti mostrano la presenza di batteri e geni di resistenza nei campioni analizzati. Si osserva una elevata presenza di batteri resistenti a eritromicina e sulfametossazolo; il gene che più appare negli isolati di *E. coli* è il *bla*TEM, il quale conferisce resistenza a  $\beta$ -lattamici, mentre per i campioni di acqua si osserva una alta frequenza del gene *tet*W, uno dei principali responsabili della resistenza a tetracicline.

**Parole chiave:** antibiotici, geni di resistenza, acque, *E. coli*, irrigazione, rogge, PCR.

## AGRADECIMIENTOS/RINGRAZIAMENTI

Muchas gracias a M<sup>a</sup> Ángeles y Ana por haber compartido algo de vuestra experiencia conmigo, tanto en el laboratorio como en la realización de un trabajo profesional. Me habéis apoyado en todo momento y lo que he aprendido en estos meses lo llevaré conmigo para siempre. Un gracias también a todas las personas que he conocido en el departamento, alumnos, profesores y técnicos, por haberme hecho sentir como en familia y haberme animado cuando las cosas en el laboratorio no iban muy bien. Ha sido un placer compartir estos meses con vosotros.

Gracias a mis amigos y a mis compañeras de piso por haber estado siempre presentes, por aguantarme y por sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles. A los amigos de siempre, que desde la distancia han conseguido animarme y estar a mi lado de todas formas.

Un gracias especial a mi novio. Has estado a mi lado en todo momento, me has ayudado a no rendirme y a seguir adelante. Eres el hombro sobre el cual he estado llorando y donde he encontrado confort cuando más lo necesitaba. Has cuidado de mí y has soportado mis agobios y depresiones sin quejarte nunca. Gracias por tu ayuda en la realización de este trabajo, por acompañarme en las recogidas de agua y echarme una mano en la traducción.

Grazie mille ai miei genitori per avermi permesso di arrivare fin qui. Con il cuore in mano mi avete lasciato volare fino in Spagna per realizzare i miei sogni. Avete sempre creduto in me, incoraggiandomi ad andare avanti nei momenti difficili. Senza il vostro aiuto e la vostra comprensione non avrei mai potuto raggiungere questa meta. Grazie a mia zia, per aver partecipato nella mia educazione e per essermi stata sempre vicina. Grazie anche a mio fratello e alle mie sorelle, siete riusciti a ridurre la distanza che ci separa, mi avete accompagnata in questo percorso e non mi avete fatto sentire mai sola.

“Nuestra mayor gloria no está en no caer nunca, sino en levantarnos cada vez que caemos”. – **Confucio**

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Historia de la Huerta de Valencia .....	1
1.2. El problema de la escasez del agua .....	1
1.3. Contaminación de aguas dulces .....	2
1.4. Antibióticos.....	3
1.4.1. Mecanismos de acción de los antibióticos .....	4
1.4.2. Bacterias resistentes a antibióticos .....	5
1.4.3. Genes de resistencia a antibióticos .....	7
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
3.1. Origen y toma de muestras .....	11
3.2. Antibióticos y medios de cultivo .....	11
3.3. Filtración y siembra .....	12
3.4. Aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos.....	13
3.5. Detección de genes de resistencia a antibióticos .....	13
3.5.1. Extracción de DNA .....	13
3.5.2. Amplificación de DNA por PCR .....	14
3.5.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	15
3.5.4. Análisis estadístico.....	16
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>17</b>
4.1. Detección de <i>E. coli</i> y otros coliformes resistentes a antibióticos.....	17
4.2. Detección de genes de resistencia a antibiótico .....	21
4.2.1. Detección de genes de resistencia en las muestras de agua .....	21
4.2.2. Detección de genes de resistencia en aislados de <i>E. coli</i> .....	22
4.2.3. Estudio comparativo de genes de resistencia .....	23
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>28</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>29</b>

<b>ANEXOS .....</b>	<b>34</b>
<b>Anexo I. Puntos de muestreo.....</b>	<b>34</b>
<b>Anexo II. Muestras recuento Acequia de Vera .....</b>	<b>36</b>
<b>Anexo III. Resultados PCR en las muestras de agua .....</b>	<b>37</b>
<b>Anexo IV. Resultados PCR en los aislados de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>38</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Plano de las principales acequias de la Huerta de Valencia.....</b>	<b>2</b>
<b>Figura 2. Esquema del procedimiento llevado a cabo y el procesado de las muestras.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 3. Gráficos de medias y grupos homogéneos .....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 4. Gráfico de interacciones entre factores.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 5. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen <i>bla</i>TEM .....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 6. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen <i>tetW</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 7. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen <i>ermB</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 8. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen <i>sull</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 9. Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen <i>qnrS</i> .....</b>	<b>26</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Puntos y fechas de muestreo de aguas .....</b>	<b>11</b>
<b>Tabla 2. Antibióticos utilizados y concentraciones añadidas al medio.....</b>	<b>12</b>
<b>Tabla 3. Cebadores específicos y tamaño de amplicón .....</b>	<b>14</b>
<b>Tabla 4. Reactivos del mix de amplificación y sus concentraciones .....</b>	<b>14</b>
<b>Tabla 5. Ciclos y temperaturas para amplificación de cada gen estudiado.....</b>	<b>15</b>
<b>Tabla 6. Recuento de <i>E. coli</i> en las muestras de agua analizadas.....</b>	<b>17</b>
<b>Tabla 7. Análisis de varianza para el recuento de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>Tabla 8. Porcentajes de muestras de agua positivas para la presencia de genes de resistencia a antibióticos según punto de muestreo .....</b>	<b>21</b>
<b>Tabla 9. Porcentajes de muestras de agua positivas para la presencia de genes de resistencia a antibióticos según tiempo de muestreo .....</b>	<b>22</b>
<b>Tabla 10. Porcentajes de aislados de <i>E. coli</i> positivos para la presencia de genes de resistencia a antibióticos según origen del aislado .....</b>	<b>23</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Historia de la Huerta de Valencia

La Huerta Valenciana es una comarca histórica situada en el entorno de la ciudad de Valencia, que se originó en la época medieval hace unos 1200 años. Los musulmanes fueron los responsables de la construcción del sistema de regadío que a día de hoy sigue abasteciendo, con el agua del río Turia, los campos valencianos (Guinot, 2008). La primera fase constructiva del regadío de la Huerta parece estar asociada a pequeñas captaciones de aguas subterráneas vinculadas a las alquerías, las principales unidades de población rural establecidas tras la conquista y colonización islámica (UPV, 2012).

El territorio actual comprende las acequias del Tribunal de las Aguas de Valencia (Mestalla, Rascanya, Tormos, Quart, Mislata, Favara y Rovella), la Real Acequia de Moncada y los extremales y marjales que llegan hasta a la Albufera. La estructura del sistema de riego se basa en tres elementos básicos: el punto de captación del agua, formado por los azudes del río Turia; un canal de circulación (acequia madre), que transporta el agua desde el azud hasta a los brazos destinados a riego; y un último elemento que comprende los brazos, “files” y regadoras que distribuyen el agua de la acequia a las parcelas circundantes (Guinot, 2008). El perímetro de riego empieza en La Presa (en l’Horta Oest), sigue por el azud de la Acequia de Moncada, que se divide en dos tramos para regar l’Horta Nord, pasando por Paterna, Burjassot, Godella, Rocafort, Massarrojos, Moncada y Benimàmet, hasta llegar a Puçol. El Suroeste de la huerta recibe el agua de la Acequia de Quart y otras cuatro acequias menores (Manises, Aldaia, Bennàger y Faitanar), regando los municipios homónimos, además de Paiporta y Alaquàs. La acequia de Tormos riega la zona Noroeste, pasando por Beniferri y Benicalap, mientras que la parte Este de la Vega recibe el agua de las acequias de Favara, Mestalla, Rascanya y del Barranco del Carraixet. Finalmente, el Parque Natural del Albufera y el Pinedo acogen el agua del Canal del Turia, que provienen del azud de Repartiment (UPV, 2012).

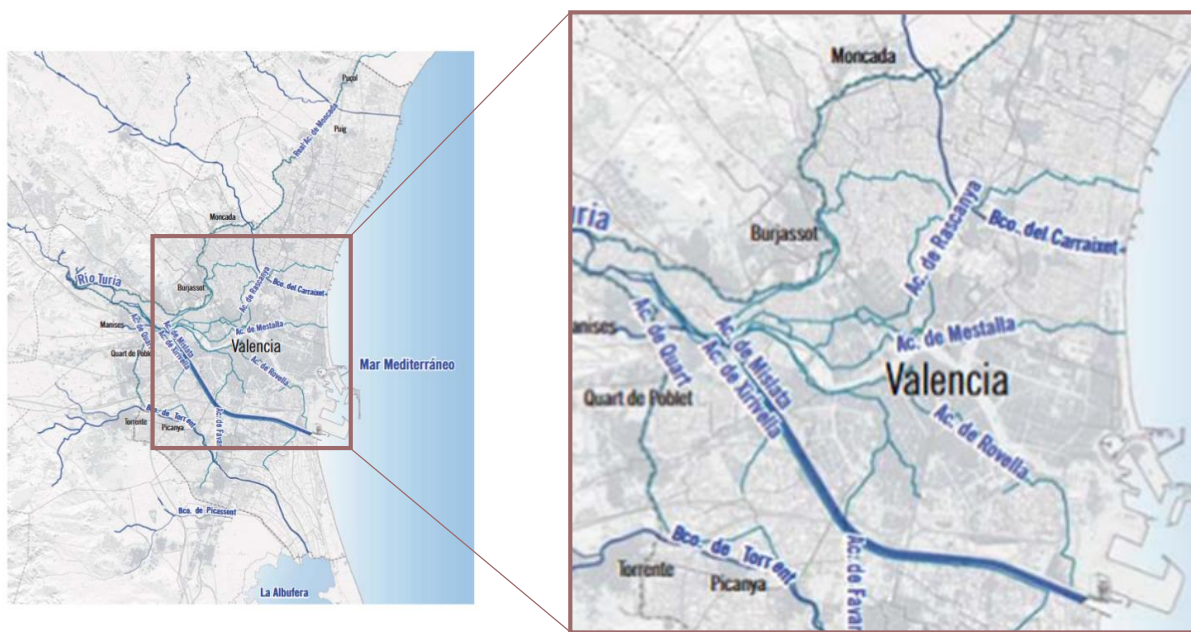
La Huerta de Valencia “es uno de los paisajes agrarios más relevantes del Mediterráneo, con gran valor productivo, ambiental, cultural e histórico” (BOE, 06/03/18); por lo que es muy importante preservarlo y protegerlo. Debido a la actividad urbanística y al abandono de la actividad agraria, la superficie de la Vega de Valencia ha ido disminuyendo a lo largo de los años y en algunos casos, como las acequias de Mestalla, Mislata y Rovella, se han perdido casi por completo (UPV, 2012). A principios del siglo XX esta superficie abarcaba unas 13.200 Ha, además de las 4.700 de los antiguos marjales; pero hoy en día se ha reducido a unos dos tercios (Guinot, 2008). En la Figura 1 se muestra un plano de las principales acequias de la Huerta de Valencia.

### 1.2. El problema de la escasez del agua

El 70% de nuestro planeta está recubierto de agua, pero desafortunadamente solo el 3% de ésta es agua dulce, aprovechable en la agricultura y en la industria o para uso personal; por tanto, se trata de un recurso muy escaso (World Wildlife Fund, 2017). La demanda global de agua va incrementándose cada vez más, debido al continuo aumento de la población mundial, las mejoras de los estándares de vida, los cambios en la alimentación y la expansión de la agricultura de regadío. Todo esto supone una disminución de la disponibilidad y calidad del agua, que podría generar problemas graves de seguridad



alimentaria y sostenibilidad medio ambiental (Ercin y Hoekstra, 2014). Con la actividad agraria se consume más del 70% del agua disponible (más que en otras actividades), pero debido a la ineficiencia de los sistemas de irrigación y a los cultivos, que no siempre son los adecuados para el ambiente en el que crecen, la mayoría de esta agua se pierde. Por consiguiente, muchos de los lagos, ríos y acuíferos subterráneos se están quedando secos, además el cambio climático está alterando los patrones del clima y del agua alrededor del mundo, causando escasez y sequías en algunas áreas e inundaciones en otras (WWF, 2017).



**Figura 1.** Plano de las principales acequias de la Huerta de Valencia. Fuente: Plan de Acción Territorial de Protección de la Huerta de Valencia (UPV, 2012)

No hay una solución concreta para solventar el problema de la escasez del agua, pero se debería concienciar para que el uso de este recurso sea responsable, además de fomentar su reutilización. Las aguas residuales, por ejemplo, se pueden reutilizar para el riego y fertilización de las tierras cultivadas, como puede ser el caso de la acequia de Favara, que recoge el agua de la depuradora de Pinedo para regar las huertas cercanas (UPV, 2012). Sin embargo, para la reutilización, se necesita que el agua esté depurada y saneada, para cumplir con los estándares de calidad requeridos y no suponer riesgo para la salud.

### 1.3. Contaminación de aguas dulces

Debido al incremento de la población humana y a su actividad, los lagos, ríos y acuíferos están quedándose sin agua o ésta está demasiado contaminada para ser utilizada (WWF, 2017). Según Gilbert (2015) lo que más afecta a la calidad del agua es la contaminación producida por la agricultura y la urbanización, provocando una gran pérdida de biodiversidad en la mayoría de los ecosistemas acuáticos europeos.

La principal fuente de contaminación se debe a los vertidos de aguas residuales, que pueden contener contaminantes químicos como metales pesados, plaguicidas y fertilizantes (provenientes de la actividad agraria), además de contaminantes biológicos que proceden de residuos humanos y estiércol (Gilbert, 2015; NATIONAL GEOGRAPHIC, s.f.). Estos compuestos pueden entrar en el ciclo del agua y llegar hasta a nosotros por la cadena trófica, provocando serios problemas tanto a nivel medio ambiental como a nivel de salud.

Otra fuente de contaminación, que solo en la actualidad está siendo posible detectar, es la derivada de los productos farmacéuticos. Sus efectos contaminantes se deben a que su estructura química se mantiene activa durante largos periodos de tiempo; una vez el compuesto ha sido metabolizado en nuestro cuerpo, una parte es excretada por las heces y la orina en su forma original o como metabolito. De aquí pasan a las aguas residuales, hasta llegar a las plantas depuradoras, donde deberían ser eliminados (Iglesias *et al.*, 2013). El problema es que no siempre se consigue eliminarlos por completo, por lo que muchos de estos compuestos pasan por los filtros de depuración y llegan hasta a las aguas dulces, destinadas al riego o consumo humano. En cuanto a los medicamentos para uso veterinario, éstos llegan directamente al ambiente, sobre todo debido al uso de fertilizantes, procedentes de los residuos que generan los animales.

Dentro de los productos farmacéuticos más utilizados y, por lo tanto, más frecuentemente encontrados en el ambiente, encontramos beta-bloqueantes, antidepresivos, estrógenos, productos para el cuidado personal y antibióticos. Estas sustancias se pueden encontrar en aguas a concentraciones comprendidas entre ng/L y µg/L (Ternes *et al.*, 2004).

#### 1.4. Antibióticos

Un antibiótico puede ser cualquier sustancia que presente actividad biológica contra organismos vivos; en otros términos, según Kümmerer (2009), los antibióticos son compuestos quimioterapéuticos destinados a inhibir o abolir el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos y protozoos. Pueden obtenerse de forma natural, por cultivo de microorganismos, o de forma semisintética modificando químicamente la sustancia natural (Paredes y Roca, 2004). Se utilizan para tratar infecciones y, en algunos casos, para prevenir enfermedades en animales y humanos. Además de administrarse a nivel médico y veterinario, también se utilizan en acuicultura, agricultura y para producción de ganado, por lo que su presencia en el medio está en continuo aumento, representando un grave problema para el ambiente y la salud.

En agricultura, son de uso habitual estreptomycin y oxitetraciclina, para controlar enfermedades bacterianas en plantas ornamentales o de fruto. Para que los antibióticos actúen deben estar activos en la planta, tolerar la oxidación, los rayos UV, la lluvia y altas temperaturas; estas propiedades permiten una presencia continua y duradera de los antibióticos en el ambiente (Kümmerer, 2009). Además, algunos antibióticos pueden ser absorbidos por las plantas (zanahorias, maíz o lechugas, entre otros), implicando un mayor riesgo para nuestra salud, ya que podríamos asimilarlos al comer verduras crudas (Grote *et al.*, 2007).

En los Estados Unidos, más del 70% de los antibióticos empleados para la salud humana es utilizado también para el ganado (O'Neill, 2015), y en el resto de países las cifras son muy parecidas. En muchas ocasiones los residuos de estos animales acaban en las aguas residuales o son utilizados

para fertilizar los campos, llevando consigo restos de antibióticos y bacterias resistentes a los mismos. Esto podría fomentar la aparición de resistencias cruzadas en bacterias que podrían representar un riesgo para la salud humana. Además, hay que tener en cuenta el efecto negativo que presentan estas sustancias en los ecosistemas acuáticos, ya que pueden impedir el desarrollo de muchos procesos y asociaciones llevados a cabo por los microorganismos, que son esenciales para el ecosistema (Constanzo *et al.*, 2005). De todos los antibióticos aprobados por la FDA para producción de ganado, más de la mitad son empleados para uso médico (O'Neill, 2015), incrementando, posteriormente, el riesgo de infecciones superresistentes. Tampoco hay que dejar de lado los residuos de antibiótico generados por los humanos, tanto a nivel doméstico como a hospitalario e industrial, que juegan un papel igual de importante en la presencia de estos productos en el ambiente.

Polaridad, hidrofobicidad y solubilidad en agua son propiedades físico-químicas de los antibióticos que los hacen peligrosos para el ambiente, ya que les permiten actuar sobre procesos de transformación (bióticos y abióticos), y afectar a la microbiota del suelo (Christou *et al.*, 2017). Los antibióticos disueltos en las aguas pueden ser retenidos en el suelo debido a su asociación con el ácido húmico, retrasando así su biodegradación. Como el ácido húmico también forma complejos con los metales pesados, es posible encontrar, en un mismo suelo, antibióticos y metales pesados asociados, generando un ulterior problema de contaminación (Baquero *et al.*, 2008).

#### 1.4.1. Mecanismos de acción de los antibióticos

Dependiendo de la estructura química de los antibióticos, su mecanismo de acción y otros factores como su concentración en el medio, la fase de crecimiento de la bacteria y el tiempo de acción, podemos hacer una primera clasificación de estas sustancias en:

- Antibióticos bacteriostáticos, que impiden la división celular inhibiendo el crecimiento de las bacterias, pero sin matarlas; por lo que al desaparecer el antibiótico las bacterias pueden volver a proliferar. De este grupo forman parte los macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol, entre otros (Paredes y Roca, 2004).
- Antibióticos bactericidas, que provocan la lisis celular y por lo tanto la muerte de la bacteria. Ejemplos de antibióticos bactericidas son los  $\beta$ -lactámicos, los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas (Paredes y Roca, 2004).

Para conocer la concentración mínima de antibiótico necesaria para impedir el crecimiento de las bacterias después de 18-24 h de incubación, se hace referencia al valor absoluto CMI (concentración mínima inhibitoria), que representa una medida intrínseca de la acción antimicrobiana del antibiótico. A partir de la CMI se puede calcular otro valor útil, la CMB (concentración mínima bactericida), que indica la concentración mínima de antibiótico que permite la inhibición del crecimiento en un 99,9% de las bacterias (Wang *et al.*, 2011).

Si nos centramos en el mecanismo de acción de los antibióticos, éste debe ser específico y selectivo para el organismo que ha causado la infección, sin perjudicar al organismo huésped (Bhattacharjee, 2016). Podemos distinguir cinco mecanismos diferentes, relacionados con la afinidad del fármaco por algunas proteínas esenciales presentes en los microorganismos.

- 1 Inhibición de la síntesis proteica.** Actúan sobre las subunidades de los ribosomas, interfiriendo en las etapas de síntesis de proteínas (iniciación, elongación y terminación). Los que se unen a la subunidad 30S (tetraciclinas y estreptomina entre otros) provocan la síntesis de proteínas no funcionales, ya que no permiten una interacción estable entre el tRNA y el codón de inicio. En la subunidad 50S pueden actuar el cloranfenicol y la clindamicina, inhibiendo la peptidil-transferasa, enzima responsable de la formación del enlace peptídico. Los macrólidos también inhiben la formación del enlace peptídico, pero de forma indirecta, bloqueando la fase de elongación y por consiguiente la traducción (Wilson, 2014). Estos fármacos no tienen efecto sobre los ribosomas humanos, puesto que en los microorganismos la unidad funcional (70S) está dividida en dos subunidades (30S y 50S) pero en mamíferos solo encontramos una única unidad, la 80S.
- 2 Alteración de la membrana citoplasmática.** En las bacterias Gram-negativas, algunos antibióticos pueden dañar la membrana externa o eliminar iones  $Mg^{2+}$ , alterando su estructura. Esto induce a un cambio en la permeabilidad de la membrana, que resulta tóxico para la bacteria. Otros antibióticos actúan sobre la membrana citoplasmática de bacterias Gram-negativas y positivas, modificando las propiedades estructurales de la membrana o interactuando específicamente con los fosfolípidos de la bicapa, desestabilizándola. También pueden inhibir enzimas responsables de la síntesis de los lípidos de membrana (Epanand *et al.*, 2016).
- 3 Inhibición de la síntesis del ácido fólico.** Algunos antibióticos, como las sulfamidas, presentan una estructura similar al PABA (ácido para aminobenzóico), precursor del ácido fólico. El antibiótico compite por el sitio activo del enzima que cataliza la reacción de síntesis, impidiendo la unión del PABA e inhibiendo la reacción. Al no formarse el ácido fólico, se suprime la síntesis de algunas proteínas esenciales y además la bacteria no es capaz de sintetizar timina, por lo que tampoco podrá replicarse (Bhattacharjee, 2016).
- 4 Modificación de la síntesis de ácidos nucleicos.** Puede ocurrir a nivel de replicación o de transcripción del DNA. En la replicación hay dos enzimas responsables de cortar y enrollar la doble hélice: la DNA girasa y la topoisomerasa IV. Los antibióticos de la familia de las quinolonas son capaces de unirse al sitio activo del complejo enzima-DNA, impidiendo que se cierren los extremos; de esta forma los enzimas continuarán fragmentando el genoma hasta llevar a la muerte de la bacteria (Aldred *et al.*, 2014). Otros tipos de antibióticos, como la rifampicina, actúan a nivel transcripcional, inhibiendo la formación de la RNA polimerasa o del complejo de transcripción (Paredes y Roca, 2004).
- 5 Inhibición de la síntesis de la pared celular.** Actúan sobre los lípidos y/o las enzimas precursoras de la síntesis de la pared celular. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, por ejemplo, interactúan con las enzimas precursoras de los peptidoglicanos, permeabilizando la pared (Epanand *et al.*, 2016).

#### 1.4.2. Bacterias resistentes a antibióticos

La continua presencia de antibióticos en el ambiente hace que éstos sean menos efectivos en aquellos microorganismos que, gracias a la presión de selección, han sabido adaptarse al fármaco y

generar resistencia frente a ello. Antibióticos como tetraciclinas y macrólidos son utilizados para tratar infecciones tanto en humanos como en animales; actúan de forma similar contra los patógenos de ambos organismos, con lo que pueden causar resistencia cruzada y representar una amenaza para nuestra salud (O'Neill, 2015).

Según El País (2018), la presencia de *E. coli* resistentes a antibióticos en pacientes del Vall d'Hebron, ha aumentado en 10 años del 7,5% al 11,5%. Cerca de 12.000 personas han muerto en España, entre 2011 y 2015, en hospitales públicos y privados, tras infectarse con bacterias resistentes a antibióticos, según datos del Ministerio de Sanidad (Gama Cubas y Palumbo Valdivia, 2017). La Organización Mundial de la Salud, estima que las bacterias resistentes pueden provocar unas 700.000 muertes al año en todo el mundo (OMS, 2018).

La misma Organización afirma que enfermedades como tuberculosis, gonorrea y neumonía están siendo cada vez más difíciles de tratar, debido a que los microorganismos se vuelven siempre más resistentes y los antibióticos dejan de tener efecto. Las operaciones quirúrgicas y los trasplantes de órganos se vuelven más peligrosos y además las infecciones perduran en nuestro cuerpo, incrementando el riesgo de contagio hacia otras personas (WHO, 2017).

Según Martínez (2003), más del 90% de las bacterias presentes en el agua, son resistentes a más de un antibiótico y el 20% son resistentes, por lo menos, a cinco de ellos. Entre las bacterias que presentan mayor resistencia y mayor riesgo de infecciones, encontramos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (OMS, 2018).

La resistencia a antibióticos es un proceso complejo, que comprende mutaciones puntuales, conversión de genes, reordenamientos y delecciones/inserciones de DNA foráneo (Wang *et al.*, 2011). Puede ser intrínseca o adquirida: la intrínseca implica que está presente naturalmente en el genoma de la bacteria; la adquirida se debe a la asimilación de nuevo material genético o a mutaciones esporádicas (Singer *et al.*, 2016).

Esta resistencia se expresa mediante varios mecanismos, que pueden ser cambios en la permeabilidad de la membrana, degradación enzimática del fármaco, modificación de las moléculas diana o transporte del antibiótico al exterior de la célula (Wright, 2005).

- **Cambios en la permeabilidad de la membrana.** Las bacterias Gram-negativas son intrínsecamente resistentes a la mayoría de los antibióticos que actúan sobre la pared celular o la membrana, ya que su membrana externa previene la entrada de estas sustancias en la célula. Los antibióticos hidrofílicos pueden entrar en la célula gracias a las porinas, proteínas de membrana; muchas bacterias han cambiado la estructura de estas proteínas o han disminuido su cantidad para reprimir el paso de los fármacos al interior celular (Wilson, 2014).
- **Modificación enzimática del antibiótico.** Las bacterias producen enzimas capaces de alterar la estructura del antibiótico, ya sea de forma química mediante acetilación, adenilación y fosforilación, o hidrolizándolo (Sánchez, 2006). Las  $\beta$ -lactamasas, por ejemplo, son enzimas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico del antibiótico, causando la pérdida de su función (Flórez, 2007).
- **Alteración de las moléculas diana.** Se producen mutaciones en las moléculas diana de la bacteria, que disminuyen la afinidad del antibiótico con sus receptores. Modificaciones en las

transpeptidasas (PBPs), proteínas encargadas de sintetizar los peptidoglicanos de la pared celular, generan resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Sánchez, 2006). Otra mutación que puede ocurrir es en la enzima DNA girasa, que disminuye la afinidad de las quinolonas por su sitio activo, generando resistencia a esa clase de antimicrobianos (Errecalde, 2004). Para protegerse de la acción de antibióticos policatiónicos, que se unen a los lípidos aniónicos expuestos en la superficie de la bacteria, estos microorganismos han reducido la carga negativa de su membrana, uniendo covalentemente sus lípidos aniónicos con residuos de lisina o alanina (Epanand *et al.*, 2016).

- **Transporte del antibiótico al exterior celular.** Para evitar la acción del antibiótico, las bacterias sobreexpresan proteínas de membrana que actúan como bombas de eflujo, expulsando los fármacos de la célula por transporte activo mediado por ATP (Brunton *et al.*, 2011).

### 1.4.3. Genes de resistencia a antibióticos

La contaminación por antibióticos es relevante no solo por la aparición de bacterias resistentes, sino también por la presencia de genes de resistencia (Martínez, 2003). Estos genes pueden persistir en el ambiente o en la población microbiana, incluso cuando ha desaparecido la presión de selección (Pruden *et al.*, 2006), por lo tanto, se consideran contaminantes ambientales. Son los responsables de codificar las enzimas que confieren resistencia a las bacterias y son fácilmente transmisibles entre bacterias pertenecientes a la misma especie o a especies diferentes (Huerta *et al.*, 2013). Debido a que la mayoría de estos genes se encuentran en elementos genéticos transmisibles, como plásmidos, transposones e integrones, es posible que vayan acompañados de otros genes de resistencia, no solo a antibióticos sino también a otros contaminantes químicos como metales pesados y pesticidas, aumentando su peligrosidad (Aminov *et al.*, 2007). La presencia de múltiples genes de resistencia, hace que su transferencia ocurra si otros contaminantes (por ejemplo, metales pesados) están presentes en el ambiente o en sujetos no tratados con antibiótico (Summers *et al.*, 1993).

El mecanismo que utilizan las bacterias para transmitir los genes de resistencia es la transferencia horizontal, que puede ocurrir entre cualquier bacteria, independientemente de si son patógenas, no patógenas, Gram-negativas o Gram-positivas (Pruden *et al.*, 2006). Esta transferencia puede ocurrir por tres formas diferentes:

1. **Transformación.** Las bacterias son capaces de adquirir DNA desnudo, presente de manera libre en el ambiente. Para poder integrarlo, las células deben ser competentes, es decir, deben presentar una pared celular permeable que permita el paso del DNA. Esto puede llevarse a cabo en laboratorio, aunque existen bacterias, como *Streptococcus pneumoniae* y *Bacillus subtilis* que presentan una competencia natural (Gaze *et al.*, 2013).
2. **Conjugación.** Es la transferencia de genes por contacto directo entre dos bacterias y necesita de plásmidos conjugativos para ocurrir. Concentraciones subletales de antibióticos y cambios en la composición de la pared celular (causados por los antibióticos), pueden incrementar la transferencia horizontal por conjugación (Lopatnik *et al.*, 2016).



3. Transducción. Los genes se transfieren de un bacteriófago a una célula bacteriana infectada. En estudios anteriores (Brown-Jaque, 2015; Billard-Pomares *et al.*, 2014; Mazaheri *et al.*, 2011), se ha visto que los fagos pueden transferir genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en *E. coli* y genes de resistencia a tetraciclinas y macrólidos en *Streptococcus* y *Enterococcus*.

Nuestro conocimiento acerca de los antibióticos y del desarrollo de resistencias se expande cada vez más, pero aun así todavía no se ha encontrado una solución para evitar la aparición de bacterias superresistentes. Uno de los motivos es que, generalmente, la resistencia está asociada a varios genes, que pueden presentar diferentes mecanismos de acción, por lo que es muy difícil encontrar una única solución efectiva para todos.

Existen por lo menos 38 genes de resistencia a tetraciclina, algunos con mecanismo de bomba de eflujo, otros que modifican las moléculas diana y otros como *tetM*, O, S, Q y W codifican para proteínas de protección de los ribosomas (Zhang *et al.*, 2009). Según Roberts (2008) más de 60 genes están relacionados con la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogamina; de todos los genes de resistencia a macrólidos, se han encontrado 6 clases de *erm* en muestras de estiércol y aguas residuales, siendo el gen *ermB* el más abundante (Chen *et al.*, 2007). En cuanto a la resistencia a sulfonamidas, se han encontrado 4 tipos de genes *sul*, de los cuales *sulI* y *sulII* son los más detectados en aislados de bacterias provenientes de residuos de granjas y hasta de ríos y aguas aparentemente no contaminadas (Srinivasan *et al.*, 2005). Más de cien genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos (*bla*) codifican para unas 400  $\beta$ -lactamasas diferentes y están presentes frecuentemente en aguas residuales de las depuradoras y en residuos animales (Li *et al.*, 2007). Finalmente, de los genes que confieren resistencia a quinolonas, los más prevalentes son *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* (Strahilevitz *et al.*, 2009).

## 2. OBJETIVOS

El presente trabajo se planteó con un objetivo principal: estudiar la existencia y evolución de la aparición de resistencias a antibióticos en las aguas del Río Turia y en la red de acequias del mismo río, cuyas aguas se destinan principalmente al riego de la Huerta de Valencia.

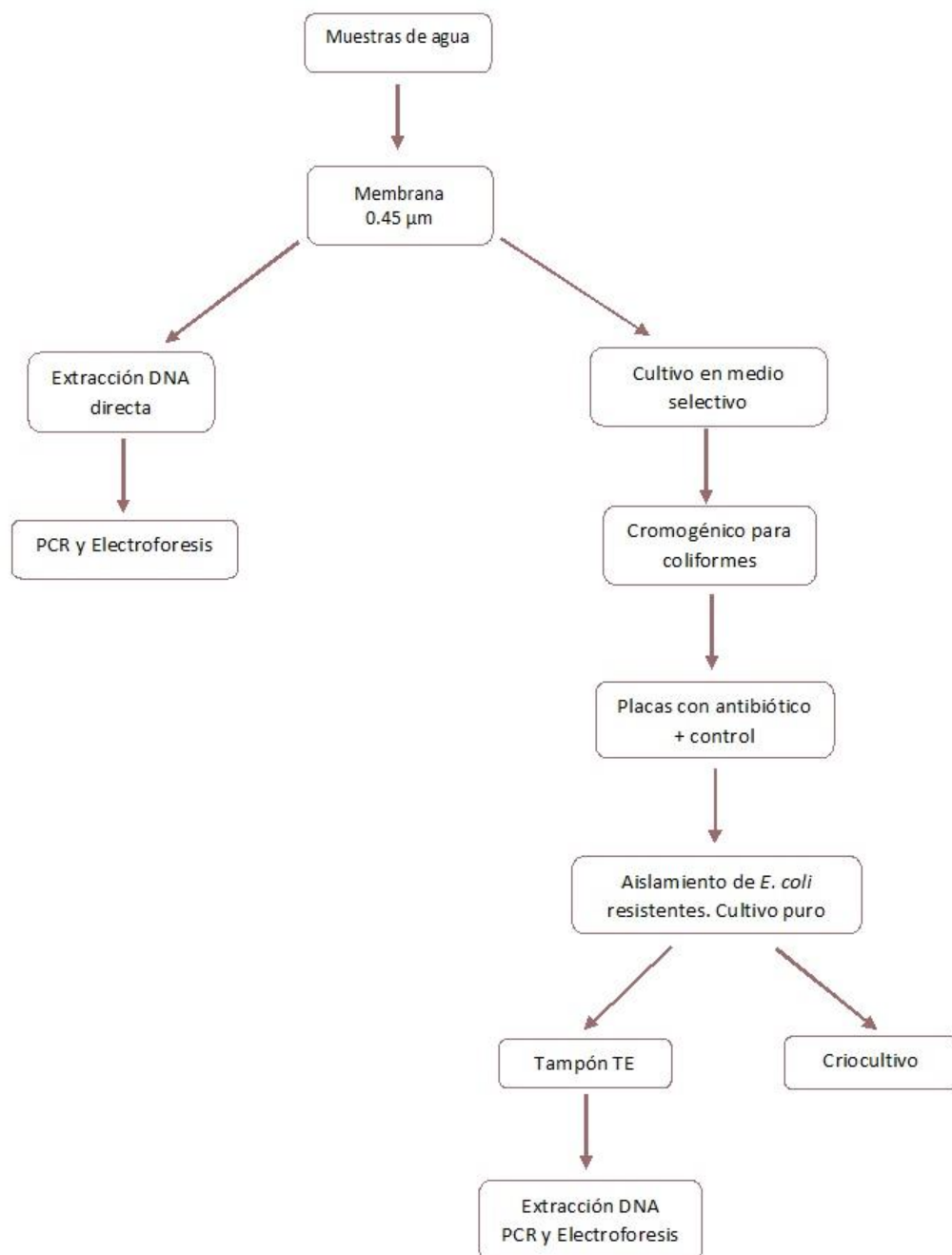
Para ello se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Detectar la existencia de microorganismos indicadores de contaminación (*Escherichia coli* y otros coliformes), con resistencia a antibióticos, en las muestras de agua.
- Comparar la presencia de *E. coli* y otros coliformes, con resistencia a antibióticos, entre los diferentes puntos y tiempos de muestreo.
- Identificar mediante técnicas moleculares 5 genes de resistencia a antibióticos (*bla*TEM, *tetW*, *ermB*, *sulI* y *qnrS*) en las muestras directas de agua.
- Identificar mediante técnicas moleculares 5 genes de resistencia a antibióticos (*bla*TEM, *tetW*, *ermB*, *sulI* y *qnrS*) en aislados de *E. coli*
- Estudiar la relación entre los resultados obtenidos en cada muestra de agua y los aislados de la misma.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo, se han llevado a cabo varias metodologías con el fin de analizar, detectar y comparar la actividad de resistencia a antibióticos de muestras de agua, tanto a nivel fenotípico como genotípico. Todo el estudio se ha realizado en los laboratorios de Microbiología, del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, de la Universidad Politécnica de Valencia. En la Figura 2 se representa un esquema del procesado de las muestras.



**Figura 2.** Esquema del procedimiento llevado a cabo y el procesado de las muestras.

### 3.1. Origen y toma de las muestras

Las muestras de agua analizadas proceden de 5 puntos diferentes, situados en la Vega de Valencia. Se han llevado a cabo 5 muestreos para cada punto, recogiendo el agua en botellas estériles de 2 L y transportándola en refrigeración para su inmediato análisis en laboratorio. En la Tabla 1 se recopilan los puntos de recogida y las fechas de toma de muestra.

**Tabla 1.** Puntos y fechas de muestreo de aguas.

Punto de muestreo	Fechas de toma de muestra				
	1	2	3	4	5
Rio Turia (RT)	07-02-2018	26-02-2018	12-03-2018	16-04-2018	07-05-2018
Acequia Moncada (AM)	07-02-2018	26-02-2018	12-03-2018	16-04-2018	07-05-2018
Acequia Rascanya (AR)	14-02-2018	28-02-2018	21-03-2018	18-04-2018	09-05-2018
Acequia Vera (AV)	28-02-2018	21-03-2018	16-04-2018	18-04-2018	09-05-2018
Barranco Carraixet (BC)	14-02-2018	28-02-2018	21-03-2018	18-04-2018	09-05-2018

Muestra RT: se trata de agua recogida directamente del cauce del río Turia a su paso por el término municipal de Quart de Poblet (Anexo I).

Muestra AM: agua tomada de la Acequia Real de Moncada, en concreto en el punto situado en el Molino Real de Paterna (Anexo I). Se trata de la más grande, con una longitud de 32,8 kilómetros y una capacidad de 5 m<sup>3</sup>/s, que permite regar unas 5.000 Ha de superficie.

Muestra AR: La Acequia de Rascanya toma el agua por el azud de Repartiment y recorre 13 kilómetros antes de desembocar en el mar. Su caudal es de 1,42 m<sup>3</sup>/s y riega una superficie de 840 Ha. La toma de muestra se lleva a cabo en uno de los brazos de esta acequia, a la altura de Alboraya (Anexo I).

Muestra AV: el agua pertenece a la acequia de Vera (Anexo I), uno de los brazos principales de la Acequia de Rascanya y que, a la altura de la Universidad Politécnica de Valencia, punto donde se toma la muestra, lleva también aguas que provienen de la Acequia de Mestalla. La Acequia de Mestalla empieza en el azud de Mestalla, entre Manises y Paterna. Presenta caudal es de 2,2 m<sup>3</sup>/s, una longitud de 2 kilómetros y abastece unas 116 Ha de superficie.

Muestra BC: el agua es tomada en la zona final del Barranco del Carraixet (Anexo I), que separa Valencia de Port Saplaya (Alboraya).

### 3.2. Antibióticos y medios de cultivo

#### Antibióticos

En este estudio se trabaja con cinco antibióticos diferentes, suministrados todos por Sigma-Aldrich: ampicilina, oxitetraciclina, eritromicina, sulfametoxazol y ciprofloxacino. Estos antibióticos han sido elegidos por ser comúnmente utilizados para tratar infecciones tanto en humanos como en

animales, siendo los mayores responsables de la aparición de resistencias e infecciones de difícil curación.

En la Tabla 2 se muestran las concentraciones utilizadas para cada antibiótico, calculadas en base a las concentraciones mínimas inhibitorias clínicas (CMI) y añadidas al medio de cultivo cromogénico.

**Tabla 2.** Antibióticos utilizados y concentraciones añadidas al medio.

Antibiótico	Concentración (µg/mL)
Ampicilina	32
Oxitetraciclina	45,55
Eritromicina	8
Ciprofloxacino	4
Sulfametoxazol	16

#### **Microinstant® Agar Base Cromogénico Coliformes (Scharlau)**

Es un medio selectivo, especialmente adecuado para muestras de agua, que permite detectar *E. coli* y otros coliformes, diferenciándolos por color. El medio de cultivo presenta dos indicadores de actividad enzimática: la  $\beta$ -glucuronidasa, para la detección de *E. coli*, dando a sus colonias una coloración azul-púrpura y la  $\beta$ -galactosidasa, para la detección de otros coliformes, generando colonias rosas, amarillas/naranja, rojas o blancas.

Por cada litro de agua destilada, se pesan 29,45 g del medio en polvo y se esteriliza por ebullición. Se deja atemperar y se le añade el Suplemento Selectivo CV para coliformes (Scharlau), que inhibe el crecimiento de *Pseudomonas* spp. y *Enterococos* spp., siguiendo las instrucciones del comerciante. Una parte del medio preparado se usa como control, repartiéndolo en placas Petri sin añadir antibióticos, mientras que el resto se divide para añadir los diferentes antibióticos, previamente seleccionados. Seguidamente se vierte en placas Petri.

#### **Agar de Recuento en Placa (PCA) (Scharlau)**

Se prepara pesando 23,5 g de medio por cada litro de agua destilada y se esteriliza en autoclave, durante 15 minutos a 121° C. Una vez estéril, se atempera en baño y se reparte en placas Petri.

### **3.3. Filtración y siembra**

Una vez en el laboratorio, las muestras son filtradas a través de membranas de ésteres mixtos de celulosa, de 0,45 µm de diámetro de poro (Merck), las cuales son transferidas asépticamente a placas Petri que contienen medio de cultivo selectivo.

La filtración se lleva a cabo mediante una rampa con tres puestos de 47 mm de diámetro (Merck) y una bomba de vacío, modelo D-95 (Dinko). Los volúmenes de agua problema filtrados varían de 50 a 1 mL, dependiendo de la procedencia de la muestra y del antibiótico ensayado, ajustándolos finalmente, de modo que fuera posible el recuento de colonias. Teniendo en cuenta que el volumen

mínimo de filtración es de 20 mL, se añade la cantidad necesaria de agua destilada estéril a aquellas filtraciones que lo requieran.

La filtración se lleva a cabo por cuadruplicado para cada uno de los cinco antibióticos, así como para los controles (medio de cultivo sin antibiótico).

Todas las placas son incubadas a 37 °C durante 24 h, tras las cuales se lleva a cabo el recuento de colonias características de coliformes y *E. coli*.

### 3.4. Aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos

A partir de las placas incubadas con las membranas de filtración, se seleccionan colonias típicas de *E. coli* y se aíslan mediante sucesivas resiembras.

Una vez aisladas, se toma una colonia y se siembra en medio PCA para obtener más cantidad de bacterias. Tras 24 h de incubación, se resuspende una fracción de las colonias en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), para posterior extracción de DNA; otra fracción se resuspende en crioviales Microbank™-Blue (Pro-Lab Diagnostics) y se guarda a -20 °C para su conservación y almacenamiento.

### 3.5. Detección de genes de resistencia a antibióticos

La detección de los genes de resistencia a antibiótico se lleva a cabo directamente desde las muestras de agua y a partir de los aislados de *E. coli*. Para las muestras de agua, se filtran 300 mL y se deposita el filtro en una placa Petri estéril. Se fragmenta la membrana con pinzas y bisturí, previamente flameados, y se introducen en tubos eppendorf de 2 mL.

#### 3.5.1. Extracción de DNA

Tanto para las aguas como para los aislados, se utiliza el GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich) para extraer el DNA genómico. Para favorecer la rotura de la pared celular de las bacterias, se añade, a las membranas fragmentadas anteriormente, una cucharadita de bolitas glass beads (Sigma-Aldrich) y 500 µL de tampón de lisis T (Sigma-Aldrich). Se deja en agitación 20 minutos a 3000 rpm en el Disruptor Gene (USA Scientific) y a partir de aquí se siguen las instrucciones del fabricante. En cuanto a los aislados de *E. coli* en tampón TE, se sigue directamente el protocolo del kit para bacterias Gram negativas.

### 3.5.2. Amplificación de DNA por PCR

Una vez extraído el DNA, es necesario amplificar mediante PCR para poder observar, posteriormente, la presencia de genes de resistencia a antibiótico. Se utilizan cebadores específicos (TIB MOLBIOL) para 5 genes de resistencia relacionados con 5 familias de antibióticos: *bla*TEM ( $\beta$ -lactámicos), *tetW* (tetraciclinas), *ermB* (macrólidos), *sull* (sulfonamidas) y *qnrS* (quinolonas). En la Tabla 3 se muestran los cebadores utilizados para amplificar los genes en estudio y el tamaño del amplicón esperado.

**Tabla 3.** Cebadores específicos y tamaño de amplicón.

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

Para la reacción de PCR se prepara un volumen final de 25  $\mu$ L, mezclando 22,5  $\mu$ L del mix de reactivos y 2,5  $\mu$ L de DNA extraído. Se añade un control positivo (DNA con gen de resistencia) para asegurarse de que la reacción ocurre correctamente, y un control negativo (agua MiliQ) para comprobar que no hay contaminación por otros DNA. El mix de reactivos y sus respectivas concentraciones, se indican en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Reactivos del mix de amplificación y sus concentraciones.

Reactivos	Concentraciones
Tampón	1X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM/cada
Cebadores	0,25 $\mu$ M/cada
Taq polimerasa	2,5 U

Las reacciones de PCR se llevan a cabo en un Termociclador modelo Mastercycler®Pro (Eppendorf), eligiendo un programa específico para la amplificación de cada gen (Tabla 5).

**Tabla 5.** Ciclos y temperaturas para amplificación de cada gen estudiado.

Gen	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Fase
<i>blaTEM</i>	1	95	3 min	Desnaturalización
	40	95	15 s	Desnaturalización
		60	20 s	Unión de cebadores
		72	1 min	Extensión
	1	72	1 min	Extensión
<i>ermB</i>	1	94	4 min	Desnaturalización
	30	94	30 s	Desnaturalización
		58	30 s	Unión de cebadores
		72	45 s	Extensión
	1	72	7 min	Extensión
<i>qnrS</i>	1	95	3 min	Desnaturalización
	40	95	15 s	Desnaturalización
		62	20 s	Unión de cebadores
		72	1 min	Extensión
	1	72	1 min	Extensión
<i>tetW</i>	1	95	3 min	Desnaturalización
	40	95	15 s	Desnaturalización
		60	20 s	Unión de cebadores
		72	1 min	Extensión
	1	72	1 min	Extensión
<i>sulI</i>	1	95	3 min	Desnaturalización
	40	95	15 s	Desnaturalización
		65	20 s	Unión de cebadores
		72	1 min	Extensión
	1	72	1 min	Extensión

### 3.5.3. Electroforesis en gel de agarosa

Tras la amplificación, se visualizan los resultados por electroforesis en gel de agarosa (Conda) al 1,3%, en tampón TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM). Para la correcta visualización de las bandas, se añaden 5 µL de RedSafe™ (iNtRON Biotechnology) por cada 100 mL de gel preparados. Se cargan en el primero y en el último pocillo del gel, 7 µL de marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder, 0,5 µg/µL (Thermo Fisher). De cada producto de PCR, se pipetea 10 µL y se mezclan con una gota de tampón de carga 6X (Thermo Fisher), antes de introducirlos en el gel. Una vez finalizada la electroforesis, se visualizan las bandas, correspondientes a los fragmentos amplificados, en un transiluminador con luz UV.

### 3.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se ha utilizado el software Statgraphics (Centurion XVII). Para comparar los resultados de los recuentos de *E. coli* en las muestras, se ha utilizado el Método de la diferencia mínima significativa (LSD) y se ha llevado a cabo un Análisis de Varianza Multifactorial. La detección de los genes de resistencia se ha analizado mediante la prueba  $\chi^2$ , a partir de tablas de contingencia.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Detección de *E. coli* y otros coliformes resistentes a antibióticos

Tal y como se menciona en el apartado de Material y Métodos, las muestras de agua fueron filtradas y las correspondientes membranas fueron inoculadas sobre medio de cultivo que contenía antibióticos. Todos los puntos de muestreo fueron muestreados cinco veces, a lo largo de los meses de febrero a mayo.

El recuento de coliformes solo se ha podido llevar a cabo en las placas que contenían los antibióticos oxitetraciclina y ciprofloxacino para todos los puntos y tiempos de muestreo, excepto en las muestras procedentes de la Acequia de Vera (AV). Las medias de los logaritmos de los recuentos (ufc/100 mL) para todos los puntos y tiempos de muestreo variaron entre 1,42 y 1,79 para la oxitetraciclina y entre 1,28 y 1,96 para el ciprofloxacino. Estos resultados muestran que ambos antibióticos son selectivos y presentan un efecto inhibitorio similar sobre el crecimiento de coliformes.

Los recuentos de *E. coli*, expresados como la media del log (ufc/100 mL) de los cinco tiempos de muestreo por cada punto de toma de muestra y antibiótico presente en el medio de cultivo, se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Recuento de *E. coli* en las muestras de agua analizadas.

	Puntos de muestreo				
	RT	AM	AR	AV	BC
Control	3,43 ± 0,15 <sup>a</sup>	3,26 ± 0,36 <sup>a</sup>	3,43 ± 0,94 <sup>a</sup>	-*	3,72 ± 0,38 <sup>a</sup>
AMP	3,02 ± 0,09 <sup>c</sup>	2,73 ± 0,37 <sup>b</sup>	3,65 ± 1,03 <sup>a</sup>	-	3,32 ± 0,30 <sup>b</sup>
OXI	2,41 ± 0,19 <sup>e</sup>	2,29 ± 0,43 <sup>c</sup>	3,08 ± 0,67 <sup>a</sup>	3,42 ± 0,25	2,91 ± 0,32 <sup>c</sup>
SUL	3,22 ± 0,12 <sup>b</sup>	3,09 ± 0,35 <sup>a</sup>	3,58 ± 0,93 <sup>a</sup>	-	3,55 ± 0,27 <sup>ab</sup>
ERI	3,44 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,29 ± 0,36 <sup>a</sup>	3,60 ± 0,98 <sup>a</sup>	-	3,75 ± 0,27 <sup>a</sup>
CIP	2,57 ± 0,09 <sup>d</sup>	2,21 ± 0,41 <sup>c</sup>	2,22 ± 1,09 <sup>b</sup>	-	2,92 ± 0,36 <sup>c</sup>

Los valores se expresan como la media de los log (ufc/100 mL) calculados para cada muestreo, ± la desviación estándar. CC: Control (sin antibiótico); AMP: ampicilina; OXI: oxitetraciclina; ERI: eritromicina; SUL: sulfametoxazol; CIP: ciprofloxacino. RT: Rio Turia; AM: Acequia Moncada; AR: Acequia Rascanya; BC: Barranco Carraixet; AV: Acequia Vera. Las diferencias significativas (p<0,05) se expresan con superíndices diferentes. \*: resultados incontables

El análisis estadístico realizado (Método de la diferencia mínima significativa -LSD) nos permite comprobar si la presencia de antibiótico en el medio ejerce un efecto significativo con respecto al control, así como si existen diferencias significativas entre los diferentes antibióticos utilizados, para cada punto de muestreo.

Con respecto a las aguas analizadas del Rio Turia (RT), se observa que todos los antibióticos ejercen un efecto significativo sobre el crecimiento de *E. coli*, excepto eritromicina, con niveles de recuento semejantes al control; el antibiótico que presentó mayor selectividad fue oxitetraciclina.



En las aguas procedentes de la Acequia de Moncada (AM), no se observan diferencias significativas entre los recuentos del control, eritromicina y sulfametoxazol. Ciprofloxacino y oxitetraciclina fueron los antibióticos con mayor sensibilidad.

Las colonias de *E. coli* detectadas en las aguas de la Acequia de Rascanya (AR) son resistentes a todos los antibióticos, a excepción del ciprofloxacino que presenta significativamente menor recuento.

La elevada contaminación de las aguas procedentes de la Acequia de Vera (AV) (Anexo II), ha hecho imposible el recuento de *E. coli*, a excepción de las bacterias crecidas en oxitetraciclina. Por lo que se puede afirmar que, para esta muestra, la oxitetraciclina es el antibiótico más selectivo.

Por último, con respecto a los resultados hallados en los análisis de las aguas del Barranco del Carraixet (BC), se observa mayor resistencia frente a eritromicina y sulfametoxazol, no habiendo diferencias significativas con respecto al control. Las bacterias presentan mayor sensibilidad a los antibióticos ciprofloxacino y oxitetraciclina.

Para un análisis más completo de los resultados, se ha llevado a cabo un Análisis de la Varianza Multifactorial para determinar si la presencia de antibiótico, el origen de la muestra (punto de muestreo) y el tiempo de muestreo ejercen algún tipo de efecto sobre los recuentos de *E. coli*. La muestra AV no ha sido incluida en el análisis ya que no se tienen suficientes datos debido a la elevada contaminación por *E. coli* resistentes.

En la Tabla 7 se indican los resultados del análisis de varianza para el recuento de *E. coli* con sus respectivos valores-*p*. Todos los factores y las interacciones entre ellos presentan valores de *p* menores a 0,05 es decir, todos los factores considerados ejercen un efecto estadísticamente significativo sobre el recuento de *E. coli*.

**Tabla 7.** Análisis de varianza para el recuento de *E. coli*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Tiempo de muestreo	5,50706E10	4	1,37676E10	83,19	0,0000
B:Punto de muestreo	1,42381E11	3	4,74603E10	286,78	0,0000
C:ATB (presencia de antibiótico)	2,3279E10	5	4,6558E9	28,13	0,0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	1,45402E11	12	1,21168E10	73,22	0,0000
AC	1,2579E10	20	6,28951E8	3,80	0,0000
BC	1,05916E10	15	7,06105E8	4,27	0,0000
ABC	3,98153E10	60	6,63588E8	4,01	0,0000
RESIDUOS	5,95784E10	360	1,65496E8		
TOTAL (CORREGIDO)	4,88697E11	479			

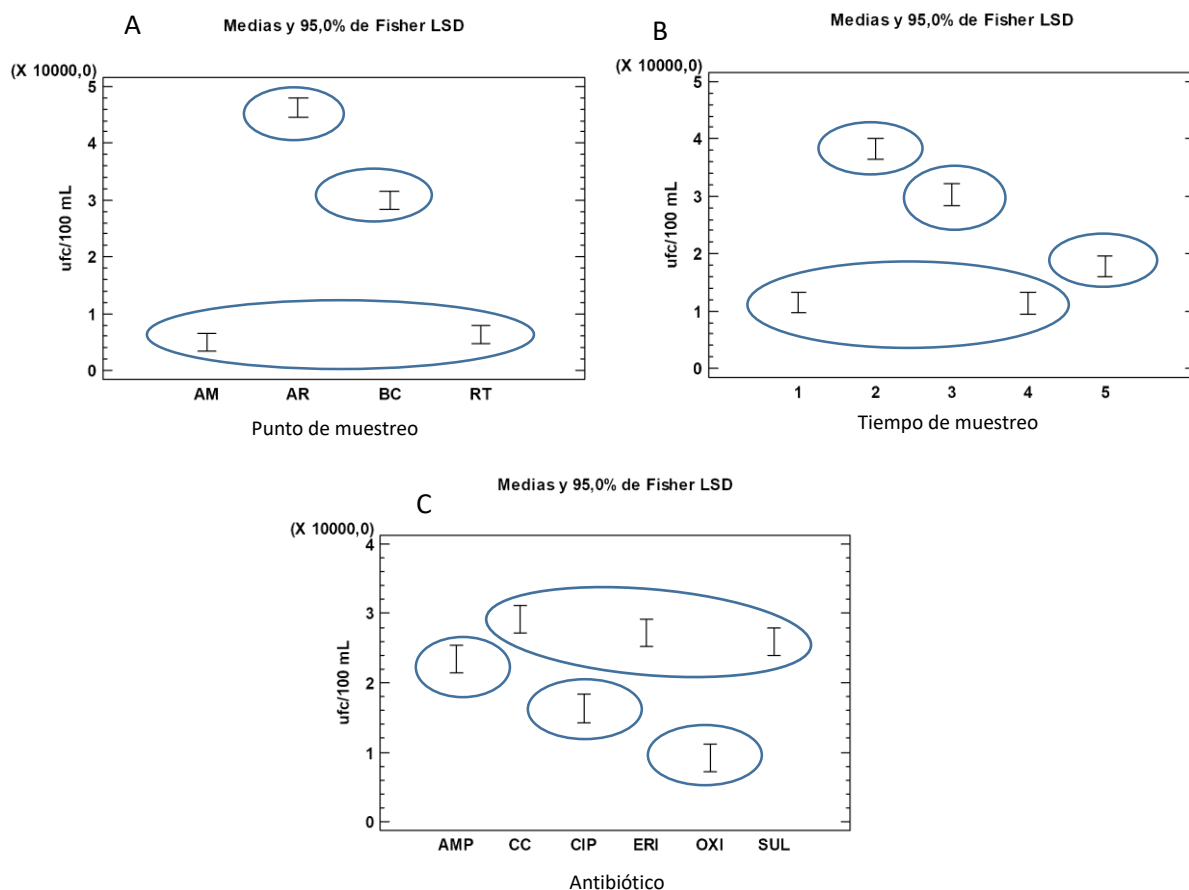
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. Informe de resultados del Statgraphics (Centurion XVII).

Mediante la prueba de comparación múltiple y el método de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, se han obtenido grupos homogéneos con el fin de identificar si los recuentos son independientes de los factores. En la Figura 4 se muestran los gráficos correspondientes a las medias e intervalos al 95% para “punto de muestreo”, “tiempo de muestreo” y “antibiótico”.

Según “punto de muestreo” (Figura 3A), se identifican 3 grupos homogéneos; no existen diferencias significativas entre las muestras AM y RT, siendo éstas las que presentan una concentración menor de bacterias resistentes. Por el contrario, AR es la muestra con mayor número de ufc/100 mL.

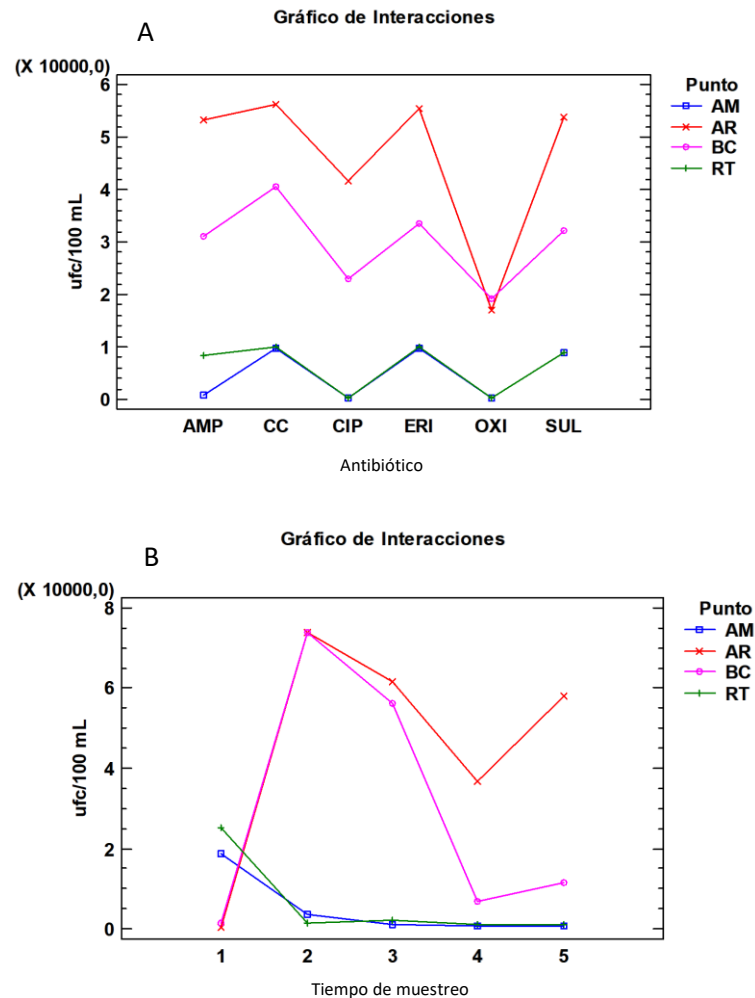
Según “tiempo de muestreo” (Figura 3B), se observa que para los tiempos 1 y 4 se han obtenido recuentos similares, siendo significativamente menores que el resto; en tiempo de muestreo 2 el recuento es significativamente mayor que el resto. Hay que señalar que para dicho tiempo los recuentos de colonias de las muestras AR, BC y AV fueron incontables. Esto podría ser debido a que el día anterior a la recogida hubo mucha lluvia, provocando el arrastre de microorganismos desde el suelo circundante y/o resuspensión de bacterias sedimentadas en el fondo de las acequias.

Finalmente, según “antibiótico” se pueden establecer 4 grupos homogéneos (Figura 3C); no hay diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos en presencia de eritromicina y control (ausencia de antibiótico), así como presencia de sulfametoxazol y control. Los antibióticos más selectivos fueron ciprofloxacino y oxitetraciclina, con recuentos significativamente diferentes al control.



**Figura 3.** Gráficos de medias y grupos homogéneos. A: según “punto de muestreo”; B: según “tiempo de muestreo”; C: según “antibiótico”. Los valores del recuento de *E. coli* se expresan como ufc/100 mL. AM: Acequia Moncada; AR: Acequia Rascanya; BC: Barranco Carraixet; RT: Rio Turia. CC: Control (sin antibiótico); AMP: ampicilina; OXI: oxitetraciclina; ERI: eritromicina; SUL: sulfametoxazol; CIP: ciprofloxacino. Informe de resultados Statgraphics (Centurion XVII).

La Figura 4 indica la influencia de las interacciones entre diferentes factores. Como se puede observar, existen claramente dos tipos de comportamiento entre los puntos de muestreo. Por un lado, los puntos AM y RT, cuyas aguas presentan niveles de *E. coli* más bajos para todos los antibióticos y tiempos de muestreo. Y por el otro, las aguas procedentes de AR y BC, cuyos niveles de *E. coli* son más altos para todos los antibióticos y tiempos de muestreo, excepto para el tiempo de muestreo 1.



**Figura 4.** Gráfico de interacciones entre factores. A: “antibiótico” y “punto de muestreo” B: “tiempo de muestreo” y “punto de muestreo” con respecto a los valores de recuentos de *E. coli* (ufc/100 mL). Informe de resultados Statgraphics (Centurion XVII).

Todo ello nos indica que, las aguas de la Acequia de Moncada y del Río Turia poseen menor contaminación por *E. coli* y menor tasa de resistencia a antibióticos. Sin embargo, las aguas procedentes de la Acequia de Rascanya y del Barranco del Carraixet, son aguas más contaminadas y con mayor tasa de resistencia a antibióticos. Aunque no se dispone de análisis estadístico de los datos de la Acequia de Vera, ésta presenta un nivel muy elevado de contaminación. Se trata, todas ellas, de aguas que han atravesado la ciudad de Valencia y la Huerta, llevando consigo bacterias procedentes de aguas residuales, hospitales y suelos fertilizados con estiércol. Además, pueden estar contaminadas por material fecal, de procedencia humana o animal, presente en los alrededores de los canales de irrigación. Todo esto coincide con los resultados obtenidos en trabajos anteriores (Czekalski, 2012;

Udikovic-Kolic *et al.*, 2014; Berendonk *et al.*, 2015), donde se ha observado un incremento en la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en aguas superficiales y subterráneas, cuando éstas son sujetas a efluentes de aguas residuales, estiércol animal y actividad agrícola en áreas urbanas.

## 4.2. Detección de genes de resistencia a antibiótico

La detección de los genes de resistencia se ha llevado a cabo mediante PCR, amplificando fragmentos específicos de cada uno de los genes. Hay que tener en cuenta que no todas las bacterias que presentan genes de resistencia son cultivables, por lo que, si solo se analizan los aislados obtenidos de las muestras, se pierde información. Por ese motivo se decide llevar a cabo la detección de los genes de resistencia también en las muestras de agua. Los genes estudiados han sido: *bla*TEM, *tet*W, *erm*B, *sul*I y *qnr*S.

### 4.2.1. Detección de genes de resistencia en las muestras de agua

Aunque la presencia de los genes en las muestras varía entre cada muestreo, se han detectado los cinco genes de resistencia en todas las muestras de agua analizadas (Anexo III).

En las Tablas 8 y 9 se indican los porcentajes de presencia de genes en las aguas para cada punto y tiempo de muestreo, respectivamente.

El análisis estadístico de los resultados permite establecer el grado de dependencia entre “presencia del gen” y “punto de muestreo” (Tabla 8) por una parte y, entre “presencia de gen” y “tiempo de muestreo” por otra (Tabla 9). El valor del estadístico  $\chi^2$  permite determinar si se rechaza, o no, la hipótesis nula ( $H_0$ ) que establece que los factores estudiados son independientes. Se han analizado aguas procedentes de cinco puntos diferentes, y en cinco tiempos de muestreo, por lo que los grados de libertad ( $gl$ ) para ambos análisis estadísticos son 4. Si el valor estadístico de la  $\chi^2$  es mayor al valor crítico para  $gl = 4$ , y una significación del 5% ( $p < 0,05$ ), se puede rechazar la hipótesis nula.

**Tabla 8.** Porcentajes de muestras de agua positivas para la presencia de genes de resistencia a antibióticos según punto de muestreo.

Puntos de muestreo	<i>bla</i> TEM	<i>tet</i> W	<i>erm</i> B	<i>sul</i> I	<i>qnr</i> S
AM	100%	100%	40%	80%	60%
RT	100%	100%	60%	60%	60%
AR	80%	100%	40%	80%	60%
BC	100%	100%	80%	80%	80%
AV	100%	100%	80%	100%	100%
Media	96%	100%	60%	80%	72%
$\chi^2$	4,167	-*	3,333	2,5	3,175
$p$	0,3839	-*	0,5037	0,6446	0,529

\*: no se puede calcular. AM: Acequia de Moncada; RT: Rio Turia; AR: Acequia de Rascanya; BC: Barranco del Carraixet; AV: Acequia de Vera. Informe de Statgraphics (Centurion XVII).

El gen *tetW* ha sido detectado en la totalidad de las muestras de agua. Le sigue en frecuencia el gen *blaTEM* (96%), el cual, a su vez, no se detecta en el 20% de las muestras de AR. El gen *sull* (80%) ha sido detectado con menor frecuencia en el agua procedente de RT (60%), mientras que el 100% de las muestras de AV fueron positivas para este gen. Para los genes *qnrS* y *ermB* se observa una mayor variabilidad entre las muestras (40% a 100%), siendo el porcentaje medio de presencia del gen *qnrS* del 72% y del gen *ermB* del 60%. Los valores de  $\chi^2$  indican que no se puede rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ) de que la presencia del gen es independiente del punto de toma de muestra ( $p > 0,05$ ) en todos los casos. Esto quiere decir que la presencia de los genes no depende de la procedencia de la muestra.

En la Tabla 9 se muestran los valores de porcentaje de detección de cada gen según tiempo de muestreo, siendo los porcentajes medios iguales a los obtenidos por punto de muestreo. Los valores de los estadísticos indican que los dos factores analizados, “presencia de gen” y “tiempo de muestreo”, son independientes.

**Tabla 9.** Porcentajes de muestras de agua positivas para la presencia de genes de resistencia a antibióticos según tiempo de muestreo.

Tiempo de muestreo	<i>blaTEM</i>	<i>tetW</i>	<i>ermB</i>	<i>sull</i>	<i>qnrS</i>
1	100%	100%	60%	80%	60%
2	100%	100%	40%	80%	40%
3	80%	100%	80%	80%	60%
4	100%	100%	60%	80%	100%
5	100%	100%	60%	80%	100%
Media	96%	100%	60%	80%	72%
$\chi^2$	4,167	-*	1,667	0	7,143
$p$	0,3839	-*	0,7968	1	0,1285

\*: no se puede calcular. Informe de Statgraphics (Centurion XVII).

Los resultados obtenidos confirman una elevada presencia de genes de resistencias en las muestras de agua analizadas, siendo *blaTEM* y *tetW* los genes más frecuentemente encontrados. Esto se debe a que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas son los más utilizados en veterinaria y acuicultura, por lo que se encuentran cantidades elevadas de éstos en las aguas, incrementando la presión de selección y facilitando la transferencia de resistencias (Henriques *et al.*, 2006; Baquero *et al.*, 2008). Por otro lado, hay que tener en cuenta que los genes *bla* y *tet* son los más comúnmente utilizados como marcador de selección en ingeniería genética y la liberación al ambiente, de bacterias modificadas genéticamente, puede tener un gran impacto sobre la dinámica de población de las bacterias y sus genes de resistencia (Martínez, 2009).

#### 4.2.2. Detección de genes de resistencia en aislados de *E. coli*

Se ha estudiado la presencia de los cinco genes de resistencia en un total de 125 aislados de *E. coli*, seleccionados representativamente a partir de cada una de las muestras y antibióticos ensayados. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

El gen *bla*TEM ha sido detectado en un 96% de los aislados. Por el contrario, el gen *ermB* fue detectado en un único aislado (0,8%). Dado que este último dato no está en concordancia con la resistencia a ampicilina detectada previamente en el aislado de *E. coli* (Anexo IV), se plantea la necesidad de llevar a cabo un estudio que analice la relación entre presencia del gen de resistencia y la resistencia selectiva del aislado. Los resultados se indican en la Tabla 10 mediante los valores estadísticos  $\chi^2$  y  $p$ , los cuales indican que ambos factores son independientes, es decir, que un aislado sea positivo para la presencia de un gen concreto no depende de la resistencia selectiva al antibiótico del mismo aislado.

**Tabla 10.** Porcentajes de aislados de *E. coli* positivos para la presencia de genes de resistencia a antibióticos según origen del aislado

	<i>bla</i> TEM	<i>tetW</i>	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>qnrS</i>
AMP-r	96%	12%	4%	44%	20%
OXI-r	100%	16%	0%	64%	16%
ERI-r	92%	8%	0%	32%	24%
SUL-r	96%	28%	0%	52%	24%
CIP-r	92%	24%	0%	52%	24%
Media	95,2%	17,6%	0,8%	48,8%	21,6%
$\chi^2$	2,451	4,744	4,032	5,571	0,756
$p$	0,6534	0,3146	0,4017	0,2335	0,9443

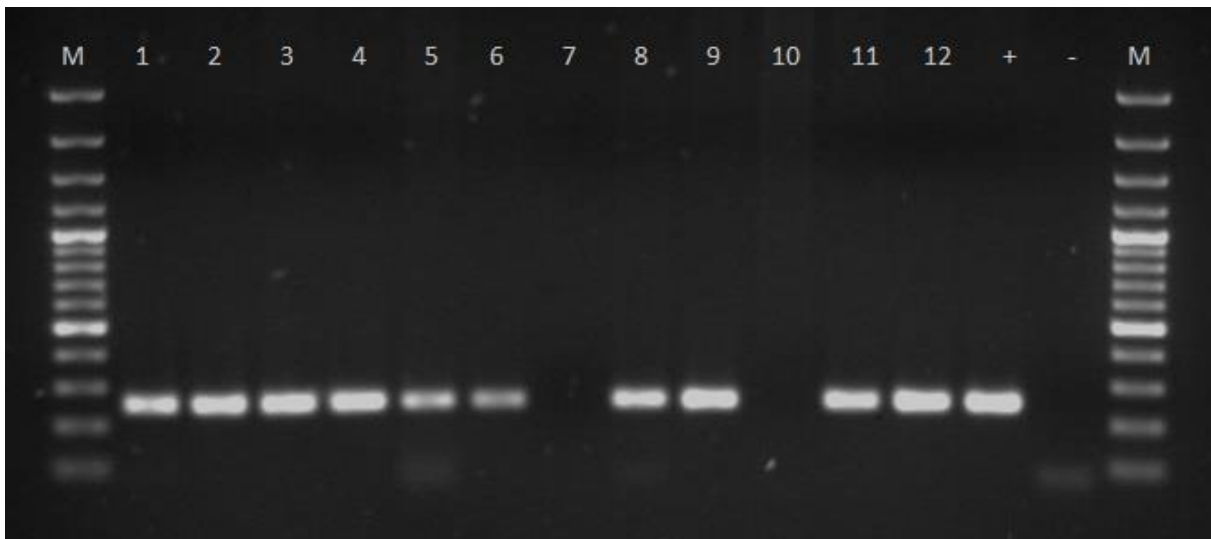
Informe de Statgraphics (Centurion XVII). AMP-r: aislados resistentes a ampicilina; OXI-r: aislados resistentes a oxitetraciclina; ERI-r: aislados resistentes a eritromicina; SUL-r: aislados resistentes a sulfametoxazol; CIP-r: aislados resistentes a ciprofloxacino.

En base a los resultados obtenidos se puede afirmar que el gen más frecuentemente detectado, en las colonias de *E. coli* analizadas, es el *bla*TEM. Las frecuencias del resto de genes no superan el 50% de positivos, sugiriendo una menor presencia de bacterias resistentes. Sin embargo, la ausencia del gen buscado, no implica la ausencia de resistencia en las bacterias. Dicha propiedad puede deberse a la activación de otros genes, que pueden actuar en solitario o en conjunto. En estudios anteriores, se han detectado estos mismos genes en muestras de agua procedentes de ríos, estaciones depuradoras y acequias (Pruden *et al.*, 2006; Stoll *et al.*, 2012).

#### 4.2.3. Estudio comparativo de genes de resistencia

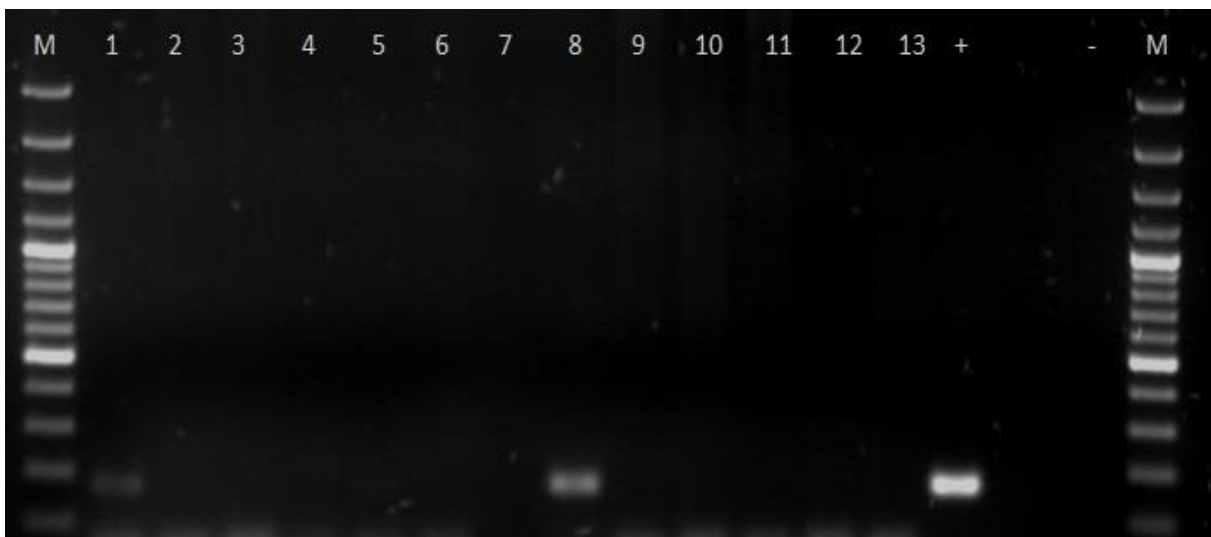
Las reacciones de PCR, para las muestras de agua y sus respectivos aislados de *E. coli*, se han realizado a la vez, con el fin de poder comparar los resultados. En las Figuras 5-9 se representa una selección de los resultados obtenidos.

En la Figura 5, se observan las amplificaciones para el gen *bla*TEM de las muestras de agua de las acequias de Vera (AV) y Rascanya (AR), y sus aislados. Se observa claramente la banda de 247 pb, correspondiente al gen de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, en la muestra de agua AV y sus aislados. Sin embargo, no se detectó el gen en la muestra de agua AR y en uno de sus aislados (AR-AMP).



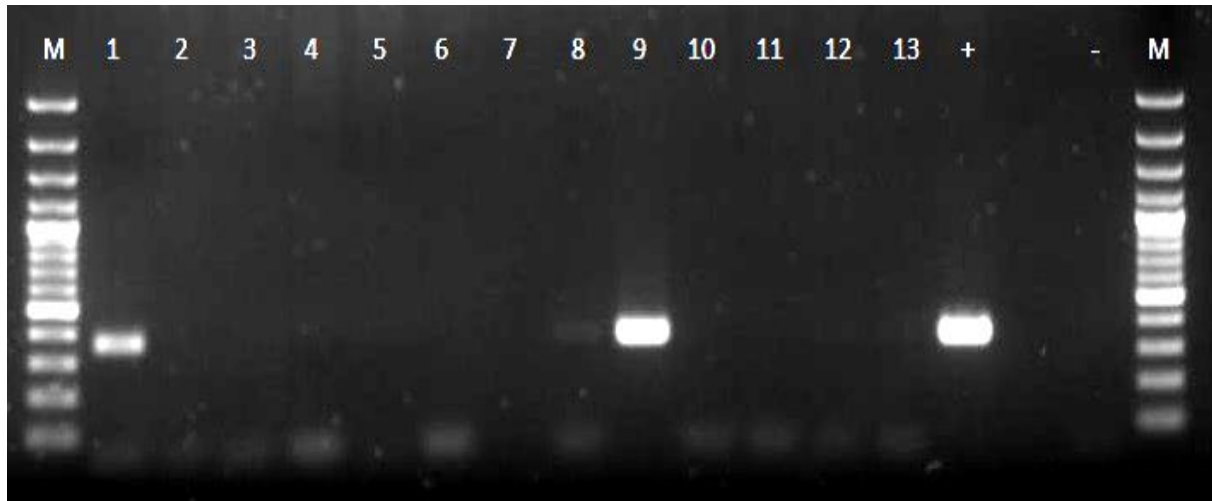
**Figura 5.** Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen *bla*<sub>TEM</sub> en aguas y aislados de *E. coli*. M: marcador 100 pb; 1: AV-agua; 2: aislado AV-CIP; 3: aislado AV-SUL; 4: aislado AV-AMP; 5: aislado AV-ERI; 6: aislado AV-OXI; 7: AR-agua; 8: aislado AR-ERI; 9: aislado AR-CIP; 10: aislado AR-AMP; 11: aislado AR-SUL; 12: aislado AR-OXI; +: control positivo; -: control negativo.

En la Figura 6 se muestran los resultados de la detección del gen *tetW* (168pb) para las muestras de agua de Acequia de Rascanya (AR) y de Barranco del Carraixet (BC). En este caso las dos muestras de agua fueron positivas mientras que ninguno de los aislados presentó el gen.



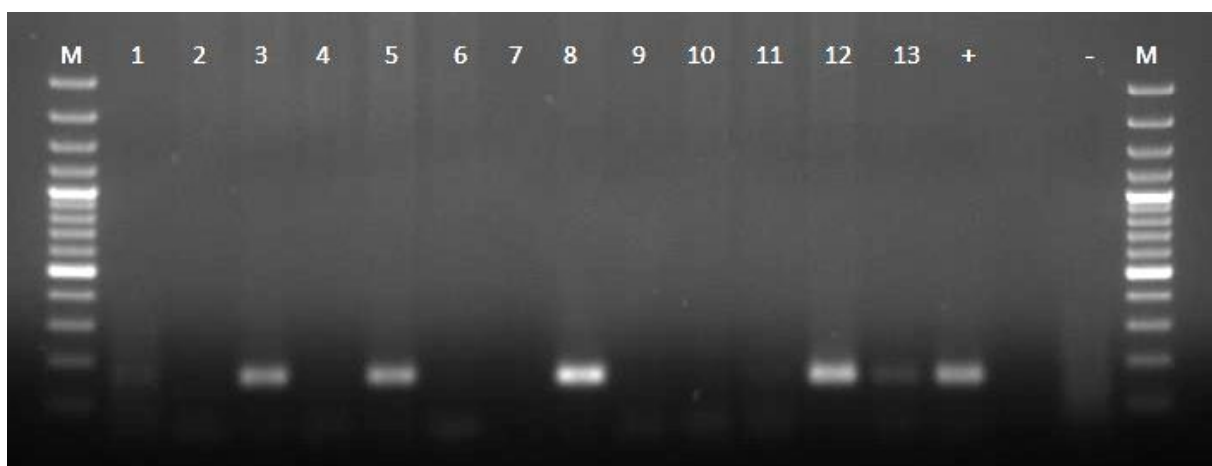
**Figura 6.** Gel de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen *tetW* en aguas y aislados de *E. coli*. M: marcador 100 pb; 1: AR-agua; 2: aislado AR-AMP; 3: aislado AR-OXI; 4: aislado AR-ERI; 5: aislado AR-SUL; 6: aislado AR-CIP; 7: vacío; 8: BC-agua; 9: aislado BC-AMP; 10: aislado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

La Figura 7 corresponde a la amplificación del gen *ermB* para las muestras de agua procedentes de la Acequia de Vera (AV) y del río Turia (RT), con sus correspondientes aislados de *E. coli*. Ambas muestras de agua y solo un aislado de RT presentan el amplicón de 364 pb, representativo del gen *ermB*.



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

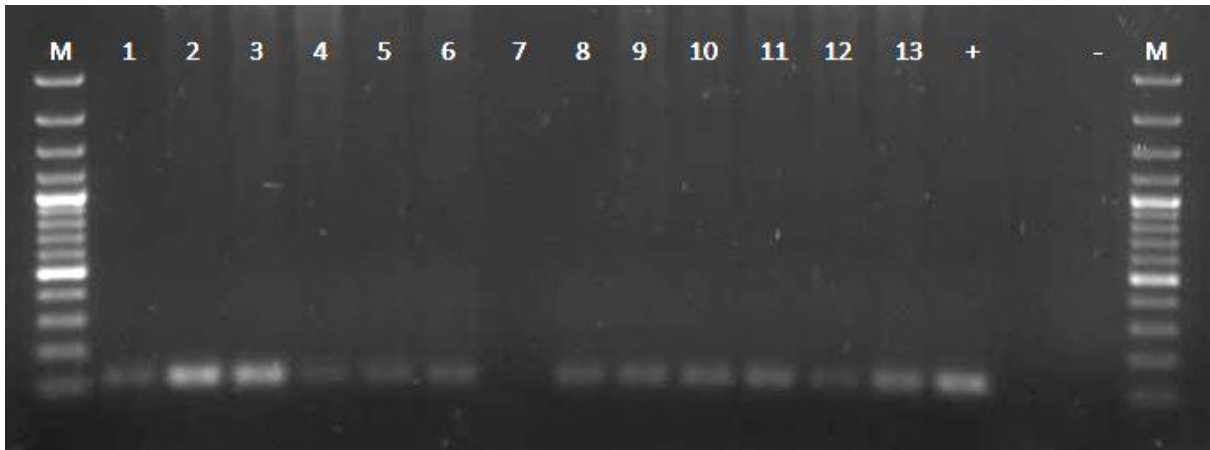
En cuanto a la amplificación del gen *sulI* se espera un tamaño de amplicón de 163 pb. En la Figura 8 se representan los resultados obtenidos para las muestras de agua procedentes del Barranco del Carraixet (BC) y de la Acequia de Vera (AV), así como para los *E. coli* aislados de las mismas. Ambas muestras de agua y cuatro de los nueve aislados estudiados presentan el gen amplificado.



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



Finalmente, la presencia del gen *qnrS* se define por la banda de 118 pb. En la Figura 9 se muestra el gel de electroforesis obtenido al analizar las muestras de agua, y sus aislados, procedentes de la Acequia de Moncada (AM) y del río Turia (RT). En este caso todas las reacciones de amplificación han resultado positivas para el gen *qnrS*.



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

Si comparamos la detección de genes de resistencia en aguas con la de sus aislados, se observa que no hay una relación directa entre ellos. Para todos los genes, excepto para *bla*TEM, hay una clara diferencia entre los porcentajes de detección directa en muestra (Tabla 8) y la identificación del gen en los aislados (Tabla 10). El gen *tetW* pasa de estar presente en el 100% de las muestras de agua, a detectarse exclusivamente en un 17,6% en los aislados de *E. coli*. La presencia del gen *qnrS*, que en las muestras de agua superaba el 70%, se ve reducida a menos de la mitad en los aislados. Para el gen *sull* ocurre lo mismo, observándose un porcentaje de presencia del gen mucho menor en los aislados (48,8%) que en las muestras de agua (80%). Sin embargo, el gen que más destaca por sus diferencias, es *ermB*, estando presente en el 60% de las muestras de agua y en un único aislado de *E. coli* (0,8%). Es decir, una muestra de agua que presente un gen determinado no implica que este mismo gen sea detectado en sus aislados. Lo mismo sucede al contrario, es decir, la detección de genes en un aislado concreto no implica su detección en el agua de procedencia. Ello puede deberse a diferentes razones: que los genes de resistencia los contengan bacterias no cultivables (Heritage, 2001), que las bacterias pertenezcan a familias y géneros diferentes a los analizados en este trabajo o, incluso, a la presencia de DNA desnudo en el medio (Nielsen *et al.*, 2007; Gaze *et al.*, 2013).

Son muchos los estudios relacionados con la detección de resistencias a antibióticos en aguas y/o microorganismos aislados de las mismas. El origen de las aguas varía desde aguas residuales, aguas de mar, aguas superficiales (ríos y lagos) e incluso aguas de recreo y de consumo humano (Xi *et al.*, 2009; Stoll *et al.*, 2012; Huerta *et al.*, 2013; Hatossy y Martiny, 2015; Proia *et al.*, 2016; Christou *et al.*, 2017). Los genes de resistencia más estudiados coinciden con los elegidos en el presente TFG. En un

estudio comparativo entre Alemania y Australia (Stoll *et al.*, 2012), se afirma que el gen más detectado en aguas superficiales en ambos países es *sull*, mientras que *ermB* es más prevalente en Alemania (68%) que en Australia (18%). Sin embargo, en el presente estudio, los genes más detectados en aguas han sido *tetW* y *blaTEM*.

En otro estudio llevado a cabo en aguas de estuario en Portugal, cerca del 80% de las Enterobacterias aisladas presentaron el gen *blaTEM*, y más del 50% presentaron el gen de resistencia a tetraciclinas (Henriques *et al.*, 2006), resultados que concuerdan más con los presentados en este trabajo.

En el presente estudio, la mayor detección de resistencias, tanto a nivel de microorganismos cultivables como presencia de genes, se observan en las aguas de las acequias de Vera y Rascanya, y en las del Barranco de Carraixet, lo cual puede atribuirse a un mayor impacto antropogénico. Se trata de aguas que tienen un mayor recorrido y, por lo tanto, mayor influencia del medio, como el uso de fertilizantes en los campos agrícolas (O'Neill, 2015), sistemas de tratamiento de residuos animales (Pruden *et al.*, 2006), así como descargas desde estaciones depuradoras de aguas residuales y de hospitales (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2015). También podrían verse afectadas por la presencia de metales pesados en el suelo, puesto que éstos intensifican la presión de selección, incrementando la tasa de recombinación en las bacterias y, en consecuencia, la transferencia horizontal de los genes de resistencia a antibiótico (Beaber *et al.*, 2004). Según Gu y Karthikeyan (2005), las fluoroquinolonas forman complejos con algunos óxidos de hierro y la adsorción de las tetraciclinas en los sedimentos depende fuertemente del pH y de la presencia de metales pesados en el suelo (Zhang *et al.*, 2011).

La liberación de antibióticos en el medio ambiente no solo provoca la aparición de resistencias en microorganismos de importancia clínica, sino que puede afectar de forma diferente a microorganismos saprofitos y otros seres vivos. En plantas, se han identificado receptores para varios antibióticos que afectan la replicación de los cloroplastos (fluoroquinolonas), las etapas de transcripción y traducción (tetraciclinas, macrólidos, etc.), la biosíntesis de folatos (sulfonamidas, etc.) y la síntesis de ácidos grasos y esteroides (Brain *et al.*, 2006).

Debido a la persistencia de los antibióticos en el medio, éstos son considerados contaminantes ambientales produciendo diversos efectos en microorganismos y fauna del suelo, alterando la calidad y función ecológica del mismo (Becerra-Castro *et al.*, 2015). De hecho, pueden actuar, a muy bajas concentraciones, como agentes de señalización (hormonas) en los microorganismos (Fajardo y Martínez, 2008); además, se ha comprobado que nematodos (*Caenorhabditis elegans*) expuestos a concentraciones variables de sulfametoxazol, presentaron alteraciones en su crecimiento y comportamiento (Yu *et al.*, 2011).

## 5. CONCLUSIONES

1. El análisis microbiológico de las aguas demuestra que todas las muestras recogidas, en los distintos puntos y tiempos de muestreo, tienen contaminación de origen fecal, con niveles de *E. coli* por encima de los niveles máximos dictados para un agua de regadío (100 ufc/100 mL) (R.D. 1620/2007). Las aguas procedentes de la Acequia de Vera, Acequia de Rascanya y Barranco del Carraixet, son las que presentan mayor contaminación.
2. Las poblaciones de *E. coli* presentan mayor resistencia a los antibióticos eritromicina y sulfametoxazol, mientras que han sido más sensibles frente a ciprofloxacino y oxitetraciclina. De nuevo, las aguas con mayores niveles de resistencia antibiótica fueron las de la Acequia de Vera, Acequia de Rascanya y Barranco del Carraixet.
3. La contaminación microbiológica, así como la resistencia a antibióticos, aumenta a medida que las aguas entran en contacto con el medio urbano y agrícola. Éste es el caso de las acequias de Rascanya y Vera que recorren una parte de la ciudad de Valencia y su huerta. Y del Barranco del Carraixet que, además de recoger aguas pluviales y de escorrentías, atraviesa otras áreas urbanas y agrícolas.
4. Existen diferencias entre los porcentajes de resistencias detectadas en los aislados de eritromicina y sulfametoxazol analizados por PCR y la presencia de resistencias en los medios de cultivo en placa. Esto podría sugerir que la adquisición de una resistencia concreta no se debe a la activación de un único gen, sino que pueden estar implicados otros.
5. Los cinco genes estudiados han sido detectados en al menos un muestreo, en todas las aguas analizadas, siendo los más frecuentes *bla*TEM y *tet*W. Las aguas con mayor tasa de resistencia pertenecen a la Acequia de Vera y Barranco del Carraixet.
6. La presencia de genes de resistencia en el agua es mayor que la registrada en los aislados. Este hecho podría indicar que el fenómeno de la resistencia no se limita a los *E. coli* resistentes, sino también a otras bacterias presentes en el agua o a DNA desnudo.
7. En general, se puede concluir que las aguas con mayor influencia de carácter antropogénico son las de mayor contaminación por bacterias, bacterias resistentes y genes de resistencia a antibióticos.

Para evitar un ulterior incremento de las resistencias a antibióticos se debería, en primer lugar, reducir el uso indiscriminado y no responsable de antibióticos, no sólo en humanos sino principalmente en agricultura y producción de ganado, fomentando el uso de vacunas y mejorando el diagnóstico veterinario. Se hace necesario 1) desarrollar métodos más eficientes de desinfección y eliminación de antibióticos y resistencias en aguas, 2) políticas para evitar el uso de los mismos antibióticos en animales y humanos, 3) mayor número de estudios que nos permitan localizar las principales fuentes y reservorios tanto de bacterias resistentes como de genes de resistencia.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ALDRED, K. J., KERNS, R. J. & OSHEROFF, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, *53*, 1565–1574.
- 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.
- AMINOV, R. I. & MACKIE, R. I. (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *Federation of European Microbiological Societies*, *271*, 147-161.
- BAQUERO, F., MARTÍNEZ, J. L. & CANTÓN, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*, 260–265.
- BEABER, J. W., HOCCHUT, B. & WALDOR, M. K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, *427*, 72-74.
- BECERRA-CASTRO, C., LOPES, A. R., VAZ-MOREIRA, I., SILVA, E. F., MANAIA, C. M. & NUNES, O. C. (2015). Wastewater reuse in irrigation: a microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. *Environmental International*, *75*, 117-135.
- BERENDONK, T. U., MANAIA, C. M., MERLIN, C., FATTA-KASSINOS, D., CYTRYN, E., WALSH, F., BÜRGMANN, H., SØRUM, H., NORSTRÖM, M., PONS, M. N., KREUZINGER, N., HUOVINEN, P., STEFANI, S., SCHWARTZ, T., KISAND, V., BAQUERO, F. & MARTINEZ, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, *13*, 310–317.
- BHATTACHARJEE M. K. (2016). Antimetabolites: Antibiotics that inhibit nucleotide synthesis. In: Chemistry of Antibiotics and Related Drugs. *Springer Cham*.
- BILLARD-POMARES, T., FOUTEAU, S., JACQUET, M. E., ROCHE, D., BARBE, V., CASTELLANOS, M., BOUET, J.Y., CRUVEILLER, S., MÉDIGUE, C., BLANCO, M. J., CLERMONT, O., DENAMAUR, E., & BRANGER, C. (2014). Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from an *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*, 6550–6557.
- BOE-A-2007-21092. Real decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Visto el 20 de junio 2018.  
<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2007-21092>
- BOE 96/2018. Ley 5/2018, de 6 de marzo, de la Huerta de València. Visto el 15 de junio 2018.  
<https://www.boe.es/buscar/pdf/2018/BOE-A-2018-5394-consolidado.pdf>
- BRAIN, R. A., HANSON, M. L., SOLOMON, K. R. & BROOKS, B. W. (2006). Aquatic plants exposed to pharmaceuticals: effects and risks. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *192*, 67-115.
- BROWN-JAQUE, M., CALERO-CACERES, W. & MUNIESA, M. (2015). Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid*, *79*, 1-7.
- BRUNTON, L. L., CHABNER, B. A. & KNOLLMANN, B. C. (2011). Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 12<sup>th</sup> edition. *Mc Graw Hill Medical*.

- CHEN J., YU Z. T., MICHEL F. C. JR, 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, 4407–4416.
- CHRISTOU, A., AGÜERA, A., BAYONA, J. M., CYTRYN, E., FOTOPOULOS, V., LAMBROPOULOU, D., MANAIA, C. M., MICHAEL, C., REVITT, M., SCHRÖDER, P. & FATTA-KASSINOS, D. (2017). The potential implications of reclaimed wastewater reuse for irrigation on the agricultural environment: The knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistance genes – A review. *Water Research*, 123, 448-467.
- CONSTANZO, S. D., MURBY, J. & BATES, J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*, 51, 218–223.
- CZEKALSKI, N., BERTHOLD, T., CAUCCI, S., EGLI, A. & BURGMANN, H. (2012). Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Frontiers in Microbiology*, 3, Article 106; doi: 10.3389/fmicb.2012.00106.
- EPAND, R. M., WALKER, C., EPAND, R. F. & MAGARVEY, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1858(5), 980-987.
- ERCIN, A. E. & HOEKSTRA, A. Y. (2014). Water footprint scenarios for 2050: A global analysis. *Environment International*, 64, 71-82.
- ERRECALDE, J. O. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo: Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública. FAO. Roma. 66 pp.
- FAJARDO, A. & MARTÍNEZ, J. L. (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), 161-167.
- FLÓREZ, A. B. (2007). Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bífido-bacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, 191 pp.
- GAMA CUBAS, M. & PALUMBO VALDIVIA, O. (16 de agosto de 2017). Una de cada diez muertes por resistencia a antibióticos en la UE ocurre en España. El Mundo. Visto el día 22 de junio 2018. <http://www.elmundo.es/salud/2017/08/16/598b1cade5fdea03678b45cc.html>
- GAZE, W. H., KRONE, S. M., LARSSON, D. G. J., LI, X.-Z., ROBINSON, J. A., SIMONET, P., SMALLA, K., TIMINOUNI, M., TOPP, E., WELLINGTON, E. M., WRIGHT, G. D. & ZHU, Y. G. (2013). Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. *Emerging Infectious Diseases*, 19(7). Online Report. doi: 10.3201/eid1907.120871.
- GILBERT, N. (2 de marzo de 2015). Europe sounds alarm over freshwater pollution Environment agency review also charts gloomy news on biodiversity. *Nature*. Visto el día 12 de junio 2018. <https://www.nature.com/news/europe-sounds-alarm-over-freshwater-pollution-1.17021>
- GROTE, M., SCHWAKE-ANDUSCHUS, C., MICHEL, R., STEVENS, H., HEYSER, W., LANGENKÄMPER, G., BETSCHE, T. & FREITAG, M. (2007). Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil. *Federal Agricultural Research* 57, 25–32.
- GU, C. & KARTHIKEYAN, K. G. (2005). Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminum and iron hydrous oxides. *Environmental Science & Technology*, 39(23), 9166–9173.

- GUINOT RODRÍGUEZ, E. (2008). El paisaje de la Huerta de Valencia. Elementos de interpretación de su morfología espacial de origen medieval. *Universidad de Valencia*.
- HATOSY, S. M. & MARTINY, A. C. (2015). The ocean as a global reservoir of antibiotic resistance genes. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 81(21), 7593-7599.
- HENRIQUES, I. S., FONSECA, F., ALVES, A., SAAVEDRA, M. J. & CORREIA, A. (2006). Occurrence and diversity of integrons and  $\beta$ -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Research in Microbiology*, 157, 938-947.
- 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.
- HUERTA, B., MARTI, E., GROS, M., LÓPEZ, P., POMPÊO, M. & ARMENGOL, J., BARCELÓ, D., BALCÁZAR, J. L., RODRÍGUEZ-MOZAZ, S. Y MARCÉ, R. (2013). Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. *Science of the Total Environment* 456-457, 161-170.
- IGLESIAS, A., NEBOT, C., MIRANDA, J. M., VÁZQUEZ, B. I., FRANCO ABUÍN, C. M. & CEPEDA, A. (2013). Determination of the Presence of Three Antimicrobials in Surface Water Collected from Urban and Rural Areas. *Antibiotics*, 2, 46-57.
- KÜMMERER, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75, 417-434.
- LI, X. Z., MEHROTRA, M., GHIMIRE, S. & ADEWOYE, L. (2007).  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology* 121, 197-214.
- LOPATKIN, A. J., HUANG, S., SMITH, R. P., SRIMANI, J. K., SYSOEVA T. A., BEWICK, S., KARIG, D. K. & YOU, L. (2016). Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. *Nature Microbiology* (1), Article number 16044
- MARTÍ, 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.
- MARTINEZ, J. L. (2003). Recent advances on antibiotic resistance genes. In Recent Advances in Marine Biotechnology. Molecular Genetics of Marine Organisms, 10, 13-32. Edited by Fingerman, Nagabhushanam.
- MARTÍNEZ, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157, 2893-2902.
- MAZAHARI NEZHAD FARD, R., BARTON, M.D. & HEUZENROEDER, M.W. (2011). Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Letters of Applied Microbiology* 52, 559-564.
- MOUZO QUINTÁNS, J. (9 de junio de 2018). Las 'superbacterias' se disparan en los hospitales catalanes en 10 años. *El País*. Visto el día 22 de Junio 2018. [https://elpais.com/ccaa/2018/06/08/catalunya/1528479070\\_270202.html](https://elpais.com/ccaa/2018/06/08/catalunya/1528479070_270202.html)
- NIELSEN, K. M., JOHNSEN, P. J., BENSASSON, D. & DAFFONCHIO, D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research*, 6, 37-53.



- O'NEILL, J. (2015). Antimicrobial in agriculture and the environment: Reducing unnecessary use and waste. *Review on Antimicrobial Resistance*. 8 December 2015. Visto el día 25 de junio 2018. <https://amr-review.org/Publications.html>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). (2018). Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. Comunicado de prensa Bangkok. Visto el día 22 de junio 2018. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>
- PAREDES, F. & ROCA, J. J. (2004). Acción de los antibióticos: Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm*, 23(3), 116-124.
- 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.
- PROIA, L., VON SCHILLER, D., SÁNCHEZ-MELSIÓ, A., SABATER, S., BORREGO, C. M., RODRÍGUEZ-MOZAZ, S. & BALCÁZAR, J.L. (2016). Occurrence and persistence of antibiotic resistance genes in river biofilms after wastewater input in small rivers. *Environmental Pollution*, 210, 121-128.
- PRUDEN, A., PEI, R., STORTEBOOM, H. & CARLSON, K. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado. *Environmental Science and Technology*, 40, 7445-7450.
- ROBERTS, M. C., (2008). Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 282, 147–159.
- RODRÍGUEZ-MOZAZ, S., CHAMORRO, S., MARTÍ, E., HUERTA, B., GROS, M., SÁNCHEZ-MELSIÓ, A., BORREGO, C. M., BARCELÓ, D. & BALCÁZAR, J. L. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234-242.
- SÁNCHEZ, J. S. (2006). Resistencia a antibióticos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48 (2), 105-112.
- SINGER, A. C., SHAW, H., RHODES, V. & HART, A. (2016). Review of antimicrobial Resistance in the Environment and its relevance to environmental regulators. *Frontiers in Microbiology*, 7, Article 1728. doi: [10.3389/fmicb.2016.01728](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01728)
- SRINIVASAN, V., NAM, H. M., NGUYEN, L. T., TAMILSELVAM, B., MURINDA, S. E. & OLIVER, S. P. (2005). Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathogens and Disease* 2, 201-211.
- STOLL, C., SIDHU, J. P. S., TIEHM, A. & TOZE, S. (2012). Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environmental Science & Technology*, 46, 9716-9726.
- STRAHILEVITZ, J., JACOBY, G. A., HOOPER, D. C. & ROBICSEK, A. (2009). Plasmid mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews* 22, 664–689.
- SUMMERS, A. O., WIREMAN, J., VIMY, M. J., LORSCHIEDER, F. L., MARSHALL, B., LEVY, S. B., BENNETT, S. & BILLARD, L. (1993). Mercury released from dental 'silver' fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 825–834.
- TERNES, T. A., JANEX-HABIBI, M. L., KNACKER, T., KREUZINGER, N. & SIEGRIST, H. (2004). Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking

Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse. *POSEIDON* project detailed report. EU Contract No EUK1-CT-2000-00047. Visto el día 8 de mayo 2018, [https://cordis.europa.eu/result/rcn/26856\\_en.html](https://cordis.europa.eu/result/rcn/26856_en.html)

UDIKOVIC-KOLIC, N., WICHMANN, F., BRODERICK, N. A. & HANDELSMAN, J. (2014). Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 111, 15202–15207.

UPV (2012). Plan de acción territorial de protección de la Huerta de Valencia. Memoria informativa. Estudio hidrológico e hidráulico. *Generalitat Valenciana*, visto el día 25 de mayo 2018. <http://www.upv.es/contenidos/CAMUNISO/info/U0684522.pdf>

NATIONAL GEOGRAPHIC (s.f.). Water Pollution. Visto el día 12 de junio de 2018. <https://www.nationalgeographic.com/environment/freshwater/pollution/>

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.

WILSON, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 35-48.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2017). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. *WHO, Geneva*. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WORLD WILDLIFE FUND (WWF). (2017). Water scarcity. Visto el día 04 de junio de 2018. <https://www.worldwildlife.org/threats/water-scarcity>

WRIGHT, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1451-1470.

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.

YU, Z., JIANG, L. & YIN, D., (2011). Behaviour toxicity to *Caenorhabditis elegans* transferred to the progeny after exposure to sulfamethoxazole at environmentally relevant concentrations. *Journal of Environmental Science*, 23 (2), 294-300.

ZHANG, X. X., ZHANG, T. & FANG, H. H. P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 397–414.

ZHANG, Z., SUN, K., GAO, B., ZHANG, G., LIU, X. & ZHAO, Y. (2011). Adsorption of tetracycline on soil and sediment: effects of pH and the presence of Cu (II). *Journal of Hazardous Materials*, 190(1-3), 856–862.



## ANEXOS

### Anexo I. Puntos de muestreo



Río Turia



Acequia Real de Moncada





Acequia de Rascanya

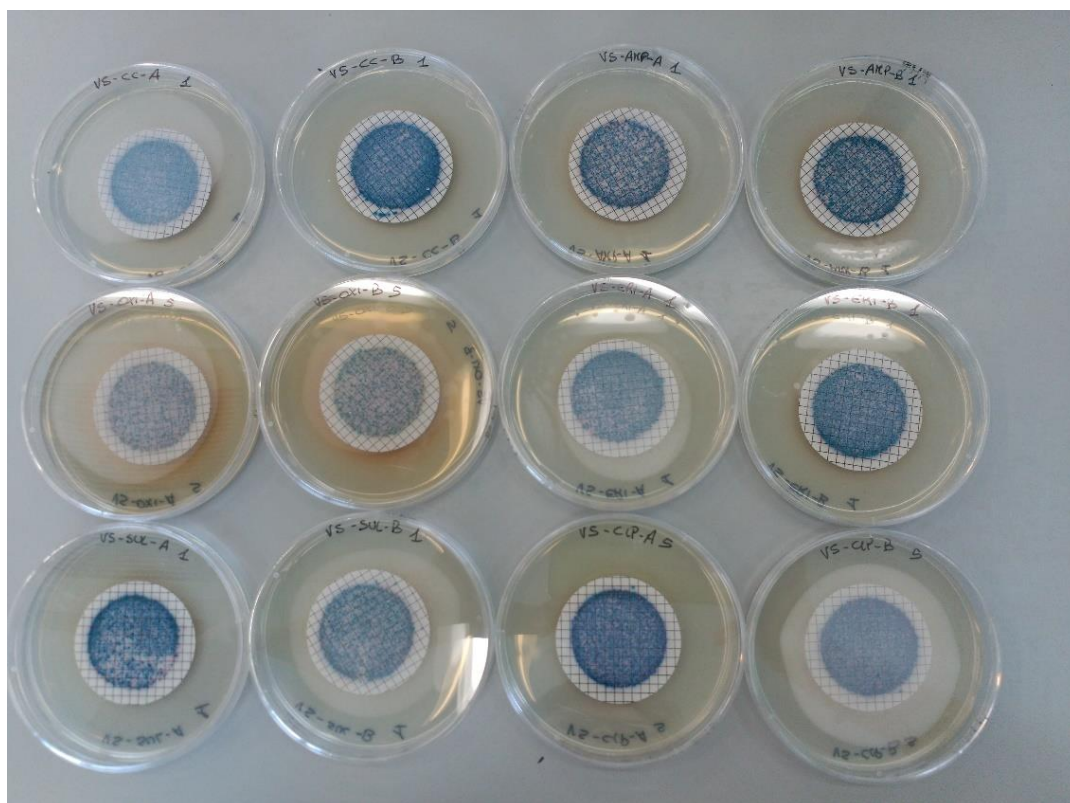
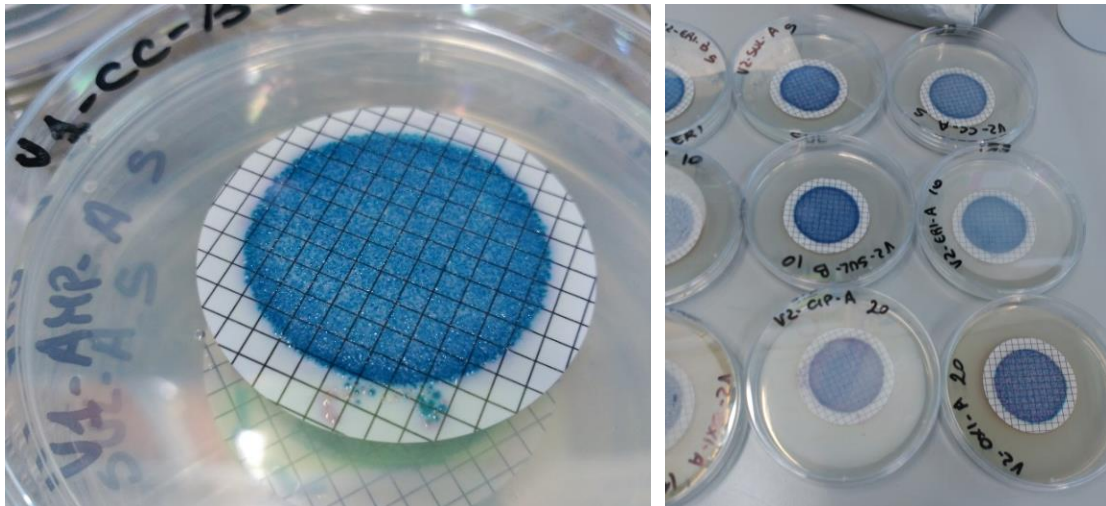


Acequia de Vera



Barranco del Carraixet

## Anexo II. Muestras recuento Acequia de Vera



### Anexo III. Resultados PCR en las muestras de agua

Punto de muestreo		Tiempo de muestreo				
		1	2	3	4	5
<i>blaTEM</i>	AM	+	+	+	+	+
	RT	+	+	+	+	+
	AR	+	-	+	+	+
	BC	+	+	+	+	+
	AV	+	+	+	+	+
<i>tetW</i>	AM	+	+	+	+	+
	RT	+	+	+	+	+
	AR	+	+	+	+	+
	BC	+	+	+	+	+
	AV	+	+	+	+	+
<i>ermB</i>	AM	+	-	+	-	-
	RT	+	-	+	+	-
	AR	-	-	+	-	+
	BC	-	+	+	+	+
	AV	+	+	-	+	+
<i>sulI</i>	AM	+	+	-	+	+
	RT	-	+	+	-	+
	AR	+	-	+	+	+
	BC	+	+	+	+	-
	AV	+	+	+	+	+
<i>qnrS</i>	AM	-	-	+	+	+
	RT	-	-	+	+	+
	AR	+	-	-	+	+
	BC	+	+	-	+	+
	AV	+	+	+	+	+

Anexo IV. Resultados PCR en los aislados de *E. coli*

		amp-r					oxi-r					eri-r					sul-r					cip-r									
Tiempo de muestreo		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5					
Puntos de muestreo																															
<i>blaTEM</i>	AM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	AR	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	BC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	AV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetW</i>	AM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	RT	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	AR	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
	BC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
	AV	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>ermB</i>	AM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>sulI</i>	AM	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
	RT	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	AR	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	BC	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
	AV	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>qnrS</i>	AM	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
	RT	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	AR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BC	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AV	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-