



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos
(FoodUPV)

Estudio de la presencia de bacterias multi-resistentes en
lodos y aguas de uso agrícola de la Comunidad Valenciana
en el contexto de la seguridad alimentaria.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Gestión de la Seguridad y Calidad
Alimentaria

AUTOR/A: Fernandez de Peñaranda Alejandro, Antonio

Tutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

Cotutor/a: Castillo López, María Ángeles

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE BACTERIAS MULTI-RESISTENTES EN LODOS Y AGUAS DE USO AGRÍCOLA DE LA COMUNIDAD VALENCIANA EN EL CONTEXTO DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA.

Antonio Fernández de Peñaranda Alejandro, Ana Isabel Jiménez Belenguer, María Ángeles Castillo López

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que la resistencia a los antimicrobianos constituye una de las diez principales amenazas para la salud pública a nivel global. La presencia de bacterias resistentes a los antibióticos representa un desafío de salud y seguridad mundial. Cada año, se identifican un número creciente de bacterias resistentes a los antibióticos presentes en los alimentos, las cuales exhiben una alta resistencia a los antibióticos de uso común en la práctica clínica.

En este estudio, se investigaron cepas bacterianas de diversas fuentes tanto de agua de acequia como de aguas residuales y lodos de depuradora, y se analizó su resistencia frente a diversas familias de antibióticos, además de explorar la existencia de cepas multirresistentes. Se llevaron a cabo varias PCR multiplex para detectar los genes de resistencia (a antibióticos β -lactámicos, carbapenémicos o a quinolinas) a partir del ADN extraído tanto de las cepas aisladas como directamente de las muestras, revelando que las muestras con la mayor prevalencia de estos genes corresponden al agua de las acequias de riego adyacentes al campus de la Universitat Politècnica de València.

En términos generales, este trabajo evidencia la existencia de bacterias con resistencia a antibióticos tanto en las aguas de riego de uso agrícola como en los lodos empleados como fertilizantes. Esta constatación subraya la necesidad de ampliar el alcance de la investigación y de intensificar las medidas higiénico-sanitarias aplicadas durante la utilización de los lodos y aguas estudiados.

Palabras clave: bacterias; antibióticos; identificar; resistentes, PCR, lodos, aguas.

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) has proclaimed that antimicrobial resistance constitutes one of the top ten major threats to global public health. The presence of antibiotic-resistant bacteria poses a challenge to global health and security. Each year, an increasing number of antibiotic-resistant bacteria are identified in food, which exhibit a high level of resistance to antibiotics commonly used in clinical practice.

In this study, bacterial strains from various sources were investigated, and their resistance to different antibiotic families was analyzed, in addition to

exploring the existence of multidrug-resistant strains. Several multiplex PCR assays were conducted to detect resistance genes (to beta-lactam, carbapenem, or quinolone antibiotics) from extracted DNA of isolated strains as well as directly from samples. These assays revealed that samples with the highest prevalence of these genes corresponded to water from irrigation canals adjacent to the campus of Universitat Politècnica de València.

Overall, this work highlights the presence of bacteria with antibiotic resistance in agricultural irrigation waters and in sludge used as fertilizers. This finding underscores the need to expand the scope of the research and to enhance the hygienic and sanitary measures implemented during the utilization of the studied sludge and water samples.

Keywords: bacteria; antibiotics; identify; resistant; PCR; sludge; water.

RESUM

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) ha proclamat que la resistència als antimicrobians constitueix una de les deu principals amenaces per a la salut pública a nivell global. La presència de bacteris resistents als antibiòtics representa un desafiament de salut i seguretat mundial. Cada any, s'identifiquen un nombre creixent de bacteris resistents als antibiòtics presents en els aliments, les quals exhibeixen una alta resistència als antibiòtics d'ús comú en la pràctica clínica.

En aquest estudi, es van investigar ceps bacterians de diverses fonts i es va analitzar la seua resistència enfront de diverses famílies d'antibiòtics, a més d'explorar l'existència de ceps multiresistents. Es van dur a terme diverses PCR multiplex per a detectar els gens de resistència (a antibiòtics β -lactàmicos, carbapenèmicos o a quinolinas) a partir de l'ADN extret tant dels ceps aïllats com directament de les mostres, revelant que les mostres amb la major prevalença d'aquests gens corresponen a l'aigua de les séquies de reg adjacents al campus de la Universitat Politècnica de València.

En termes generals, aquest treball evidencia l'existència de bacteris amb resistència a antibiòtics tant en les aigües de reg d'ús agrícola com en els llots emprats com a fertilitzants. Aquesta constatació subratlla la necessitat d'ampliar l'abast de la investigació i d'intensificar les mesures higienicosanitàries aplicades durant la utilització dels llots i aigües estudiats.

Paraules clau: bacteris; antibiòtics; identificar; resistents, PCR, llots, aigües.

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que la resistencia a los antimicrobianos es una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad. La presencia de bacterias resistentes a antibióticos es un problema de salud y seguridad mundial, cada año se identifican cada vez más bacterias resistentes a antibióticos presentes en alimentos, las cuales ofrecen una alta resistencia a los antibióticos de uso común en clínica (Ballesté-Delpierre, s. f.).

Según la ECDC, la proliferación de cepas bacterianas resistentes a múltiples grupos antimicrobianos en Europa representa una seria amenaza tanto para la salud pública como para la salud animal. Este aumento en la resistencia bacteriana conlleva un incremento en los gastos de atención médica y el fracaso en el tratamiento de los pacientes. En un informe del año 2009, la ECDC calculó que estas infecciones causadas por bacterias resistentes son responsables de aproximadamente 25000 muertes anuales en Europa. (Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2015, 2017)

El aumento y propagación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos se debe principalmente a dos factores clave. En primer lugar, el uso de agentes antimicrobianos ejerce presión sobre las bacterias, lo que contribuye a la aparición y selección de cepas resistentes (Esperbent & Migliorati, 2017). En segundo lugar, la transmisión de microorganismos resistentes se ve favorecida por prácticas deficientes de prevención y control de infecciones, así como por condiciones sanitarias inadecuadas. Esta transmisión puede ocurrir tanto entre seres humanos como entre animales, y también entre animales y seres humanos. (Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2015, 2017).

La resistencia a los antimicrobianos en las bacterias es una característica común debido a la presencia de genes propios que les brindan protección. Esta resistencia puede surgir a través de mutaciones genéticas o adquiriendo nuevos genes por transferencia horizontal. Los mecanismos bioquímicos de resistencia incluyen cambios en la permeabilidad, modificación del antimicrobiano, protección de la molécula objetivo, expulsión activa y alteraciones metabólicas. (Martínez-Martínez & Calvo, 2010).

En el presente trabajo nos centramos en la resistencia a antibióticos carbapenémicos y β -lactámicos en enterobacterias lo cual representa una amenaza para la salud pública (Ashbolt et al., 2013). Las Enterobacterias, presentes en la microbiota intestinal humana, son responsables de infecciones comunitarias y han desarrollado resistencia a través de la producción de betalactamasas de espectro extendido, capaces de hidrolizar la mayoría de los antibióticos β -lactámicos (Nordmann et al., 2012).

Para llegar a una solución la OMS lleva a cabo el programa "One Health". Este consiste en un planteamiento de diseño y aplicación de programas, políticas, legislación e investigación en el que múltiples sectores se comunican y colaboran para lograr mejores resultados en salud pública. (*El grupo tripartito y el PNUMA respaldan la definición de «Una sola salud» proporcionada por el Cuadro de Expertos de Alto Nivel para el Enfoque de «Una sola salud», s. f.*)

El concepto de "One Health" se refiere a un enfoque integrado que reconoce la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental. En el contexto de la seguridad alimentaria, el enfoque "One Health" implica abordar los desafíos relacionados con la producción, distribución y consumo de alimentos

de manera holística. Esto implica considerar no solo los riesgos para la salud humana asociados con la contaminación y la presencia de agentes patógenos en los alimentos, sino también los impactos en la salud animal y la salud del ecosistema en general (*One Health*, s. f.).

La transmisión de bacterias multirresistentes a través de cultivos y aguas es un problema importante para la seguridad alimentaria y la salud pública, ya que puede llevar a la ingestión de bacterias resistentes a través de alimentos contaminados. Una de las principales formas de transmisión de estos microorganismos resistentes a los antimicrobianos es la transmisión horizontal, cuya contaminación puede darse desde los inicios del cultivo ya que estos microorganismos pueden estar presentes en lodos o aguas de uso agrícola.

En el contexto del trabajo estudiamos la huerta valenciana como posible fuente de contaminación y dispersión de bacterias portadoras de resistencias antimicrobianas. Uno de los grandes problemas que presenta, a día de hoy, la huerta valenciana son los causados debido por el riego y la contaminación ya sea por la ineficiencia del sistema de riego histórico, la baja calidad de las aguas, interferencias de las nuevas infraestructuras con la funcionalidad de la red de riego o por la carencia de cartografía actualizada de la red de riego existente (Botànic, 2015).

Por otro lado, un estudio de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) y el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) alerta de la posible contaminación de aguas subterráneas por el uso excesivo en los cultivos de gallinaza como fertilizante, una práctica habitual en la huerta valenciana (Jaramillo González, 2016).

Los lodos de depuradora contienen una cantidad significativa de materia orgánica y nutrientes que pueden ser utilizados para enriquecer la fertilidad de los suelos (González & Pomares, 2008). Sin embargo, es importante controlar cuidadosamente su composición y manejo, ya que también pueden contener componentes no deseados que pudieran representar un riesgo para el medio ambiente, la salud humana y animal. En resumen, si se aplican los controles adecuados, estos lodos pueden ser beneficiosos para mejorar la fertilidad del suelo sin causar problemas ambientales. La nueva Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio se regula la información que deben proporcionar a todo transporte de lodos destinados a la actividad agraria. (Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario, 2013)

Actualmente, una parte muy significativa de los lodos que se aplican en la agricultura se hace de forma directa, es decir, como lodo deshidratado. Existe amplia bibliografía sobre las numerosas ventajas del uso de lodos en agricultura como que aporta dosis importantes de nitrógeno, fósforo y materia orgánica y puede sustituir a importantes cantidades de abonos minerales, con el consiguiente ahorro de recursos como el fósforo, cuyas reservas son limitadas, o el N limitando el lavado y las emisiones de CO₂ derivadas de su fabricación y que mejora la fertilidad del suelo con el aporte de materia orgánica, al incrementar la actividad microbiana, la retención de agua y mejorar la estructura (Irañeta et al., s. f.).

Este trabajo presenta una vinculación directa con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), en concreto contribuye a los siguientes: ODS 2 (Hambre cero) que pretende poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible («Hambre y seguridad alimentaria», s. f.). ODS 3 (Salud y bienestar) cuyo objetivo es

garantizar una vida sana y promover el bienestar de todos a todas las edades («Salud», s. f.). ODS 6 (Agua limpia y saneamiento) para garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento para todos. (Moran, s. f.-a) ODS 12 (Producción y consumos responsables) Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles. (Moran, s. f.-c) ODS 13 (Acción por el clima) Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos («Cambio climático», s. f.) y por último, ODS 15 (Vida de ecosistemas terrestres) que busca gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad. (Moran, s. f.-b)

2 MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Las muestras utilizadas para el presente estudio tienen orígenes diferentes, como se puede observar en las Tablas 1 y 2. En primer lugar, tanto las correspondientes a lodo fresco como pasteurizado pertenecen a la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de Torrevieja (Alicante, España); dichas muestras fueron proporcionadas por el Departamento de Producción Vegetal en frascos asépticos y se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización. Por otra parte, se recogieron directamente las muestras de lodo fresco y agua de efluente terciario final de la EDAR de la Universitat Politècnica de València (UPV). En este caso se procedió a coger 1L de agua del efluente terciario y unos 200g de lodo en condiciones de asepsia y se refrigeró hasta su procesado en el laboratorio de Microbiología de la UPV.

Por último, las muestras de agua de las acequias de agua de riego anexas al Campus de Vera de la UPV fueron cogidas en recipientes estériles y de forma aséptica en las siguientes coordenadas: Acequia de Vera 39°29'08.6"N 0°20'16.8"W y Acequia El Palmar 39°29'15.9"N 0°20'03.8"W y se trasladaron hasta el laboratorio de Microbiología donde se procedió a su análisis.

TABLA 1. Origen y uso de las muestras de lodos.

| | Origen | Tipo | Uso |
|------------------|------------------------|--------------|------------|
| Lodo (LF) | Urbano (Torrevieja) | Fresco | Agrícola |
| Lodo (LP) | Urbano (Torrevieja) | Pasteurizado | Agrícola |
| Lodo (LE) | EDAR (UPV) | EDAR | Agrícola |

LF Lodo Fresco. LP Lodo pasteurizado. LE Lodo de la EDAR.

TABLA 2. Origen y uso de las muestras de aguas.

| | Origen | Coordenadas | Uso |
|-------------------|-------------------|-----------------------------|------------|
| Agua (AEP) | Acequia El Palmar | 39°29'15.9"N 0°20'03.8"W | Riego |
| Agua (AV) | Acequia Vera | 39°29'08.6"N 0°20'16.8"W | Riego |
| Agua (AE) | EDAR | EDAR | No riego* |

AEP Acequia El Palmar. AV Acequia de Vera. AE Agua EDAR. *se emite directamente al emisario submarino

Estudio de indicadores de calidad microbiológica

Para llevar a cabo los análisis en primer lugar se realizó una determinación de la presencia de *Salmonella* y la calidad higiénico-sanitaria de las aguas y lodos, mediante el recuento de coliformes y *E. coli* como organismo indicador de contaminación fecal, según UNE-EN ISO 9308-1:2014/A1:2017.

Para el recuento de coliformes, las muestras de agua siguieron el método de filtración por membrana, las cuales se depositan en placas Petri con medio de cultivo Coliforme Chromogenic agar (CC) (Scharlau, Barcelona). Para los lodos se procedió a siembra por extensión de diluciones de la muestra original utilizando el mismo medio de cultivo.

Aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos

Seguidamente, y a partir de agua de peptona en el caso de los lodos o a partir del agua misma, se procedió al cultivo de las muestras en medios de cultivo selectivo y específicos para el aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos, en concreto medio de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) (ChroMagar®, Francia) y medio SuperCarba (SC) (*Chromagar*®, Francia). Una vez obtenidas colonias que según las indicaciones del fabricante fueron sospechosas de pertenecer a la familia Enterobacteriaceae o al género *Acinetobacter*, se procedió a realizar un pase a medio Plate Count Agar (PC) (*Scharlau, Barcelona*) hasta su purificación y obtención de cultivo axénico. Posteriormente se llevó a cabo la identificación de las mismas mediante tiras API 20E (BioMérieux, Madrid, España), consistente en una serie de pruebas bioquímicas miniaturizadas. Los resultados siguiendo las instrucciones del fabricante se consultaron en la base de datos APIWEB (<https://apiweb.biomerieux.com/>), obteniendo, de este modo, la identificación de la cepa aislada.

Finalmente, para las cepas identificadas como del género *Acinetobacter* (existe amplia bibliografía que indica que el género *Acinetobacter* muestra problemas a la hora de la identificación bioquímica (Fernández-Cuenca et al., 2019)) o aquellas que tras la identificación mediante tiras API® obtuvieron un valor inferior al 90% de fiabilidad se procedió a la secuenciación del gen 16S ARN para lo cual se realizó la amplificación de dicho gen mediante dos PCRs específicas para las distintas cepas a estudiar.

Para llevar a cabo la PCR de secuenciación, se tomaron 8 µL de ADN y se agregaron a un volumen final de 50 µL, mientras que los 42 µL restantes correspondieron al mix de reactivos. Se utilizaron las siguientes concentraciones: 1x NH₄ Reaction Buffer (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Biotline), dNTP (dNTP

Mix 100mM, Bioline) 25mM, 2,5mM MgCl₂ (BIOTAQTM DNA Polxmerase, Bioline), 5U/ µL enzima Taq polimerasa (BIOTAQTM DNA Polvmerase, Bioline). Además, se incluyeron tanto controles positivos internos como controles negativos, que consistieron en agua estéril MiliQ. La concentración de los primers utilizados para ambos casos fue de 0,2 µM. Las condiciones de la PCR se especifican en las tablas número 3 y 4.

TABLA 3. Condiciones para las cepas identificadas como *Acinetobacter*

| Primer | Secuencia | Condiciones | Ref. |
|--------------|----------------------------|---|-------------------------------|
| 27F | 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' | 95 °C 2 min; 94 °C 30 seg, 65 °C 30 seg, 72 °C 2 min; 72 °C 10min | (Orhan-Yanikan et al., 2019). |
| 1525R | 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' | | |

TABLA 4. Condiciones para las cepas de la familia *Enterobacteriaceae* con valor inferior al 90%

| Primer | Secuencia | Condiciones | Ref. |
|--------------|----------------------------|---|-------------------------------|
| 27F | 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' | 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min; 72 °C 10min | (Orhan-Yanikan et al., 2019). |
| 1492R | 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' | | |

Una vez comprobado mediante gel de agarosa la presencia del amplicón de 1200bp, se llevó a cabo la purificación mediante el kit “GenElute™ PCR Clean-Up Kit” (*Sigma-Aldrich, EEUU*) siguiendo las instrucciones del fabricante para, por último, enviarlas al servicio de secuenciación del IBMCP en la UPV y obtener los archivos con la secuencia completa para confirmar el género y especie de la cepa con el software BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Basic Local Alignment Search Tool).

BLAST se utiliza habitualmente para comparar una secuencia dada contra toda una base de datos de millones de secuencias. Producen alineamientos locales entre cada pareja de secuencias. Además, generan un valor se significación estadística para cada alineamiento (Korf et al., 2003).

Estudio de resistencia antimicrobiana mediante antibiogramas (método disco-placa)

La determinación de las resistencias antimicrobianas se realizó mediante el método de difusión de disco en placa (CLSI, 2014) en medio Müller-Hinton Agar (*Scharlau, Barcelona*). Para ello a partir de una paca de cultivo en PC de 24 horas, seleccionamos múltiples colonias utilizando un asa bacteriológica y ajustamos la concentración del inóculo hasta lograr una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland, utilizando suero fisiológico. Este inóculo se agita en el vortex durante un lapso de 15 a 20 segundos.

Dentro de un plazo de 15 minutos, se emplea un bastoncillo para distribuir uniformemente el inóculo en la placa en movimientos verticales, horizontales y oblicuos, cubriendo la superficie de toda la placa. Debido a la variación de antibióticos en las placas, se realizan dos placas de agar Mueller-Hinton (MH) para cada cepa. Es crucial garantizar una distribución completa, sin dejar áreas

sin cubrir, con el objetivo de permitir la correcta observación de los halos de inhibición posteriormente. Tras esta etapa, se permite que las placas se sequen de 3 a 5 minutos antes de proceder a colocar los discos de antibiótico.

La disposición de los discos es esencial para evitar la superposición de los halos de inhibición. Las placas se incuban en posición invertida a una temperatura de 37 °C durante un período de 24 horas.

Después de un período de incubación de 18 horas, se procede a medir el diámetro de las zonas de completa inhibición en milímetros, y considerando que el disco de antibiótico tiene un diámetro de 6mm, utilizando una regla o un pie de rey, que permitirá una lectura precisa de los resultados.

El control de calidad de dicha metodología consiste en la cepa *E. coli* ATCC 25922, cuyos límites aceptables en los diámetros de las zonas de inhibición están establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014). Para ello se utilizaron 12 antimicrobianos dependiendo de la identificación realizada mediante las tiras API®, ya que algunos presentaban resistencias intrínsecas a determinados antibióticos a los que no era necesario hacer.

Los antibióticos (Thermo Scientific™, EEUU) utilizados para las cepas identificadas dentro de la familia *Enterobacteriaceae* y para aquellas identificadas dentro del género *Acinetobacter* se muestran en la Tabla 13 en el apartado de resultados.

Detección molecular de genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs)

Se llevaron a cabo varias PCR multiplex para detectar los genes de resistencia a partir del ADN extraído tanto de las cepas aisladas como directamente de las muestras. En primer lugar, se realizó la extracción de ADN bacteriano a partir de las cepas y aguas, para ello se utilizó el kit “High Pure PCR Template Preparation Kit” (*Roche, Suiza*) siguiendo las instrucciones del fabricante partiendo de cultivo de 24 h suspendido en 1 ml de TE. Por otro lado, para las muestras de lodo se utilizó el kit “Real Pure Spin Food-Stool kit” (*REAL, España*) ya que al presentar mayor cantidad de materia orgánica se utiliza para evitar los posibles inhibidores en las PCRs posteriores.

En la realización de la PCR multiplex, se tomaron 2,5 µL de ADN y se agregaron a un volumen final de 25 µL, mientras que los 22,5 µL restantes correspondieron al mix de reactivos. Para todas las PCR se utilizaron las siguientes concentraciones: 1x NH₄ Reaction Buffer (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline), 25 mM de dNTP (DNTP Mix 100mM, Bioline), 2,5mM de MgCl₂ (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline), 5U/ µL enzima Taq polimerasa (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline). Además, se incluyeron tanto controles positivos internos como controles negativos, que consistieron en agua estéril MiliQ.

En primer lugar, se realizó una PCR multiplex para la detección de resistencia a antibióticos β-lactámicos: concretamente los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY-2}, cuyos cebadores, secuencias, condiciones de la PCR y tamaños de amplicón esperados se muestran en la Tabla 5. Como control positivo se utilizaron las cepas propias 6021b V2, Mec 8 y 35218 siendo la primera positiva para *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}, la segunda para *bla*_{CMY-2} y la tercera para *bla*_{TEM}. La concentración de los primers fue de 0,2 µM para TEMf, TEMr, CMY-2f y CMY-2r. Para SHVf y SHVr fue de 0,4 µM.

TABLA 5. Primers y condiciones de la PCR para los genes de resistencia a β -lactámicos empleados en el estudio

| Gen | Tamaño (pb) | Secuencia | Condiciones | Ref. |
|---------------------------|-------------|--|-------------------------------|----------------------|
| <i>bla</i> _{TEM} | 247 | 5-TTAACTGGCGAACTACTTAC-3 5-GTCTATTTTCGTTTCATCCATA-3 | 94 °C 15 min; 94 °C 1 min, | (Kozak et al., 2009) |
| <i>bla</i> _{SHV} | 393 | 5-AGGATTGACTGCCTTTTTG-3 5-ATTTGCTGATTTTCGCTCG-30 | 55 °C 1 min, 72 °C 1 min | |
| <i>bla</i> _{CMY} | 1000 | 5-GACAGCCTCTTTCTCCACA-3 5-TGGACACGAAGGCTACGTA-3 | (x30); 72 °C 10min | |

En segundo lugar, se realizó una PCR multiplex para la detección de resistencia a antibióticos Carbapenémicos: concretamente los genes *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA}, *bla*_{VIM} y *bla*_{IMP} cuyos cebadores, secuencias, condiciones de la PCR y tamaños de amplicón esperados se muestran en la Tabla 6. Como controles positivos, se utilizaron *K. pneumoniae* NCTC 13442, *K. pneumoniae* NCTC 13438, *K. pneumoniae* NCTC 13440, y *E. coli* NCTC 13476 para *bla*_{OXA}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, y *bla*_{IMP}, respectivamente. La concentración para todos los primers utilizada fue de 0,4 μ M.

TABLA 6. Primers y condiciones de la PCR para los genes de resistencia a Carbapenemes empleados en el estudio

| Gen | Tamaño (pb) | Secuencia | Condiciones | Ref. |
|---------------------------|-------------|--|--------------------------------|-----------------------|
| <i>bla</i> _{OXA} | 438 | 5-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3 5-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3 | 94 °C 10 min; 94 °C 30 seg, | (Poirel et al., 2011) |
| <i>bla</i> _{KPC} | 798 | 5-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3 5-CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-3 | 52 °C 40 seg, 72 °C 50 seg | |
| <i>bla</i> _{VIM} | 390 | 5-GATGGTGTTTGGTCGCATA-3 5-CGAATGCGCAGCACCAG-3 | (x36); 72 °C 5min | |
| <i>bla</i> _{IMP} | 232 | 5-GAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3 5-GGTTTAAAYAAAACAACCACC-3 | | |

En tercer lugar, se realizó una PCR multiplex para la detección de resistencia a Quinolonas: concretamente los genes *qnrA*, *QnrB* y *QnrS* cuyos cebadores, secuencias, condiciones de la PCR y tamaños de amplicón esperados se muestran en la Tabla 7. Como control positivo se utilizaron las cepas propias ET1, ET2 y 1939, siendo ET1 y 1939 positiva para *QnrS* y ET2 para *QnrB*. La concentración para todos los primers utilizada fue de 0,2 μ M.

TABLA 7. Primers y condiciones de la PCR para los genes de resistencia a Quinolonas empleados en el estudio

| Gen | Tamaño (pb) | Secuencia | Condiciones | Ref. |
|-------------|-------------|---|-------------------------------|------------------|
| QnrA | 580 | 5-AGAGGATTTCTCACGCCAGG-3 5-TGCCAGGCACAGATCTTGAC-3 | 95 °C 10 min; 95 °C 1 min, | (Catto ir |
| QnrB | 264 | 5-GGMATHGAAATTCGCCACTG-3 5-TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA-30 | 54 °C 1 min, 72 °C 1 min | et al., 2007) |
| QnrS | 428 | 5-GCAAGTTCATTGAACAGGGT-3 5-TCTAAACCGTCGAGTTCGGG-3 | (x35); 72 °C 10min | |

Por último, se llevaron a cabo electroforesis con el objetivo de visualizar los productos de cada PCR. Para ello, se preparó un gel de agarosa 1,2% (*Conda, España*) con solución TAE 1X, en tampón TAE 1x con RedSafe (iNtRON biotechnology) al 5% para poder visualizar el ADN. Una vez cargados los geles con los productos de la PCR se ajustó el voltaje a 90 y se dejó correr durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo, se visualizan bajo luz ultravioleta.

3 RESULTADOS

Estudio de indicadores de calidad microbiológica

En España, a pesar de que sí existe legislación sobre los valores máximos permisibles de microorganismos patógenos o indicadores en productos fertilizantes, agrupada en el Real Decreto 824/2005 sobre productos fertilizantes, esta excluye específicamente a los lodos de depuradora y no existe una legislación que indique valores máximos admitidos de microorganismos indicadores en ellos, a diferencia de otros países como los Estados Unidos de América, en el que la Agencia Nacional de Protección al Medio Ambiente (USEPA), indica que el nivel máximo permitido de coliformes fecales presentes en los lodos digeridos anaerómicamente puede llegar hasta un máximo de 6×10^6 unidades formadoras de colonia (UFC) por cada 100 mL.

Aunque en la Unión Europea no existe una normativa común, también se ha propuesto a *Salmonella* y *E. coli* como microorganismos indicadores para comprobar la reducción de posibles microorganismos patógenos de tal manera que el lodo producido no debe contener *Salmonella* en 50 g (materia fresca) y el tratamiento debe producir una reducción de la población de *E. coli* que sea menor de 5×10^2 UFC/g de producto final.

Podemos observar en la Tabla 8, los resultados obtenidos de las distintas fuentes de lodos, así como verificar la ausencia de *Salmonella* en la EDAR de la UPV ya que las dos muestras se obtuvieron con un mes de diferencia. Por otro lado, se observa que la presencia de *E. coli* es superior tanto en la EDAR de Torre vieja como en la de la UPV a la propuesta por la Unión Europea. En cuanto al recuento de coliformes, en el lodo pasteurizado es inferior al límite de detección y para esta muestra vemos que no hay presencia de *E. coli* ni *Salmonella* ya que es tipo de lodo es más seguro, debido al tratamiento térmico que elimina gran parte de los microorganismos, sobre todo los más sensibles a la temperatura.

TABLA 8. Niveles de microorganismos indicadores de calidad en las muestras de lodos.

| | COLIFORME (UFC/mL) | <i>E. coli</i> (UFC/100MI) | <i>Salmonella</i> |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------|
| LODO FRESCO EDAR T (LF) | 1,27E+06 | 1,97E+05 | Presencia |
| LODO PASTEURIZADO EDAR T (LP) | <1,00E+02 | 0,00E+00 | Ausencia |
| LODO EDAR UPV1 (LE1) | 1,85E+04 | 0,00E+00 | Ausencia |
| LODO EDAR UPV2 (LE2) | 1,14E+08 | 8,300E+07 | Ausencia |

LE1 Lodo de la EDAR Día 1. LE2 Lodo de la EDAR Día 30.

En cuanto a los criterios establecidos para el agua, difieren según el tipo de cultivo para el que se emplee. En consecuencia, no existe una regulación microbiológica general que abarque el agua de riego. En su guía "Water quality for agriculture", la FAO solo hace referencia al recuento de coliformes como un parámetro microbiológico para evaluar la calidad del agua de riego (Abusam & Al-Anzi, 2011).

En España, en el caso del uso agrícola de agua depurada y reutilizada, el único parámetro microbiológico que debe ser monitoreado es el recuento de *Escherichia coli* y, en situaciones específicas, también el recuento de *Legionella spp.*, según lo establecido en el RD 1620/2007. Los límites establecidos en España y los aconsejados por la Unión Europea para las aguas de riego, son los valores máximos permitidos entre 100-1.000 UFC/100 mL. Por lo que como podemos observar en la Tabla 9, el uso de estas aguas de riego para el uso agrícola y/o su contacto directo con los alimentos puede suponer un gran riesgo para la salud humana. Al igual que en estudios similares (Amato et al., 2021) se observa que todas las muestras de agua presentaban niveles de contaminación muy elevados de coliformes fecales resistentes.

En la Tabla 9 vemos que hay presencia de *Salmonella* en las muestras obtenidas de la acequia El Palmar, dicha acequia se usa como riego de campos agrícolas anexos por lo que presenta un peligro en cuanto a salud pública el uso de esta agua como modo de riego y se recomienda analizar los productos obtenidos para evaluar en que cantidad llega la salmonela al producto final y valorar si debe de ser tratado antes de su comercialización.

TABLA 9. Niveles de microorganismos indicadores de calidad en las muestras de agua.

| | COLIFORME (UFC/ml) | <i>E coli</i> | <i>Salmonella</i> |
|----------------------------|--------------------|---------------|-------------------|
| AGUA EDAR 1 | 1,60E+04 | 2,25E+04 | Ausencia |
| AGUA EDAR 2 | 3,38E+05 | 4,62E+06 | Ausencia |
| ACEQUIA VERA (/100ml) | 3,28E+05 | 3,68E+04 | Ausencia |
| ACEQUIA EL PALMAR (/100ml) | 1,96E+05 | 1,85E+04 | Presencia |

Agua EDAR 1 Día 1. Aguas EDAR 2 Día 30.

Aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos

Después de evaluar la presencia de patógenos en las muestras, éstas fueron transferidas a los distintos medios de cultivo en presencia de antibióticos carbapenémicos (Estudio de resistencia antimicrobiana mediante antibiogramas

(método disco-placa)) para su crecimiento. Luego, se llevó a cabo una identificación bioquímica utilizando tiras API. Para llegar a este punto, se realizaron pruebas previas de oxidasa y catalasa, en las cuales se seleccionaron las cepas con resultados de oxidasa negativa y catalasa positiva.

Posteriormente, se realizó una tinción de Gram para confirmar que las cepas eran gramnegativas. Como resultado, de las 91 cepas aisladas de los medios de cultivo, finalmente se seleccionaron y se incluyeron en la Tabla 10 un total de 42 cepas. Esto significa que el 46% de las cepas aisladas fueron relevantes para el propósito de este estudio.

TABLA 10. Resultados de la identificación de los aislados mediante tira API 20E

| | CODIFICACIÓN | Id API | % Id API |
|--------------------------|---------------------|----------------------------------|-----------------|
| Lodo Fresco 1 | LF1-1 | <i>Salmonella</i> | 99,3 |
| | LF1-2 | <i>Salmonella</i> | 95,8 |
| Lodo Fresco 2 | LF2-1 | <i>Acinetobacter</i> | 94,7 |
| | LF2-2 | <i>E. coli</i> | 99,9 |
| | LF2-4 | <i>Acinetobacter</i> | 94,8 |
| | LF2-3 | <i>E. coli</i> | 99,9 |
| | LF2-5 | <i>E. coli</i> | 99,5 |
| | LF2-6 | <i>E. coli</i> | 86,2 |
| | LF2-7 | <i>E. coli</i> | 99,5 |
| | LF2-8 | <i>E. coli</i> | 99,9 |
| Lodo Pasteruizado | LP1-1 | <i>Burkholderia cepacia</i> | 80,5 |
| Lodo Fresco 3 | LF3-1 | <i>E.coli</i> | 99,8 |
| | LF3-2 | <i>E.coli</i> | 99,5 |
| | LF3-3 | <i>E.coli</i> | 98,4 |
| | LF3-4 | <i>Citrobacter feundii</i> | 97,2 |
| | LF3-5 | <i>Serratia fonticola</i> | 91,8 |
| | LF3-6 | <i>E. aerogenes</i> | 53,3 |
| Lodo Edar 1 | LE1-1 | <i>Pantoea</i> | 83,8 |
| | LE1-2 | <i>Morganella morganii</i> | 99,9 |
| | LE1-3 | <i>Proteus mirabilis</i> | 99,9 |
| | LE1-4 | <i>Yersinia enterocolitica</i> | 99,3 |
| | LE1-5 | <i>Proteus mirabilis</i> | 99,9 |
| | LE1-6 | <i>Proteus mirabilis</i> | 99,2 |
| Acequia El palmar | AEP-1 | <i>Citrobacter freundii</i> | 82,7 |
| | AEP-2 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 94,8 |
| | AEP-3 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 98,7 |
| | AEP-4 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 94,8 |
| | AEP-5 | <i>Salmonella</i> | 99,9 |
| Acequia Vera | AV-1 | <i>Roultella ornythinolytica</i> | 99,9 |
| | AV-2 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 98,7 |
| | AV-3 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 94,8 |

| | CODIFICACIÓN | Id API | % Id API |
|---------------------|---------------------|----------------------------------|-----------------|
| Acequia Vera | AV-4 | <i>Serrataria odorifera</i> | - |
| | AV-5 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 95,5 |
| | AV-6 | <i>Cloacae/cronobacter</i> | - |
| | AV-7 | <i>E. coli</i> | 99,8 |
| | AV-8 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 81,8 |
| | AV-9 | <i>Serrataria odorifera</i> | 99,4 |
| Lodo Edar 2 | LE2-1 | <i>Pantoea</i> | - |
| | LE2-2 | <i>Providencia alcalifaciens</i> | 97,4 |
| | LE2-3 | <i>E. coli</i> | 99,9 |
| | LE2-4 | <i>Serratia odorifera</i> | - |
| Agua Edar 2 | AE2-1 | <i>Enterobacteria cloacae</i> | 97,7 |

Las cepas con porcentajes de identificación inferior al 90/ y las identificadas como *Acinetobacter* fueron sometidas a secuenciación. Los resultados se muestran en la Tabla 11 y la Tabla 12, respectivamente.

TABLA 11. Resultados de la secuenciación de las cepas muestras con un porcentaje de identificación inferior al 90%.

| CEPA | ESPECIE | IDENTIFICACIÓN | ACCESSION |
|--------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| LF2-6 | <i>E. coli</i> | 97,44 | MT192512.1 |
| LP-1 | <i>Vagococcus humatus</i> | 99,02 | NR_156076.1 |
| LF3-6 | <i>Citrobacter freundii</i> | 98,95 | KT260592.1 |
| LE1-1 | <i>Citrobacter freundii</i> | 98,37 | CP049015.1 |
| AEP-1 | <i>Morganella morganii</i> | 98,03 | KX237941.1 |
| AV-4 | <i>Providencia alcalifaciens</i> | 99,13 | LS483467.1 |
| AV-6 | <i>E. coli</i> | 85,35 | MH793567.1 |
| AV-8 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 92,51 | MK386773.1 |
| LE2-1 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 92,56 | OL413680.1 |
| LE2-4 | <i>E. coli</i> | 94,18 | OP755929.1 |

Gracias al proceso de secuenciación podemos confirmar la identificación por especie de las cepas que obtuvieron una identificación inferior al 90% tras la realización de la prueba de confirmación bioquímica de tira API 20E.

TABLA 12. Resultados de la secuenciación de las cepas identificadas con *Acinetobacter*.

| CEPA | ESPECIE | PER. IDENT | ACCESSION |
|--------------|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|
| LF2-1 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 97,85 | MN709298.1 |
| LF2-4 | <i>Acinetobacter pittii</i> | 98,43 | MT378403.1 |
| AEP-3 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 96,71 | MN889306.1 |
| AEP-4 | <i>Acinetobacter soli</i> | 99,21 | OL830720.1 |
| AV-2 | <i>Acinetobacter oleivorans</i> | 97,0 | KM983423.1 |
| AV-3 | <i>Acinetobacter pittii</i> | 97,15 | MF462934.1 |

Los resultados de la secuenciación confirman la identificación para las cepas del genero *Acinetobacter* otorgándole tambien la identificación por especie. Esta técnica de identificación molecular nos proporciona información precisa y detallada sobre la composición genética o molecular de una muestra. Esto permite una identificación altamente confiable de organismos, genes, mutaciones o secuencias específicas. Aparte permite detectar la variabilidad genética tanto dentro de una especie como entre diferentes especies.

Estudio de resistencia antimicrobiana mediante antibiogramas (Método disco-placa)

En el siguiente paso, se evaluó la resistencia de las 42 cepas a los antibióticos que podemos ver en la Tabla 13 junto a la familia que pertenecen, para luego evaluar tanto el perfil de resistencia como la posibilidad de multi resistencia de alguna cepa.

TABLA 13. Antibióticos utilizados para el estudio según la familia a la que pertenecen

| FAMILIA | ANTIBIÓTICO | |
|------------------------|---------------------|------------------------------|
| PENICILINAS | AMP | Ampicilina |
| | AMC | Amoxicilina |
| CEFALOSPORINAS | CTX | Cefotaxima |
| | CRO | Ceftriaxona |
| | CTL | Cefotaxime+ Ác Clavunálico |
| | CAL | Ceftazidime + Ác Clavunálico |
| | CAZ | Ceftazidima |
| | CARBAPENEMES | IPM |
| QUINOLONAS | NA | Ácido nalidíxico |
| | LEV | Levofloxacino |
| | CIP | Ciprofloxacino |
| AMINOGLUCÓSIDOS | CN | Gentamicina |
| TETRACICLINAS | TE | Tetraciclina |
| ANFENICOLES | C | Cloranfenicol |

En el análisis de sensibilidad a los antibióticos, se registró el número de cepas que mostraron sensibilidad, resistencia o una resistencia intermedia en función del diámetro del halo de inhibición. Como parte del control de calidad de esta metodología, se empleó la cepa *E. coli* ATCC 25922, cuyos criterios de aceptación para los diámetros de las zonas de inhibición están definidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).

Se observó que las cepas exhiben una notable resistencia frente a los antibióticos pertenecientes a la familia de las penicilinas. Por otro lado, se evidenció que las cepas son sensibles a los antibióticos de las familias de las quinolonas y las cefalosporinas (Figura 1).

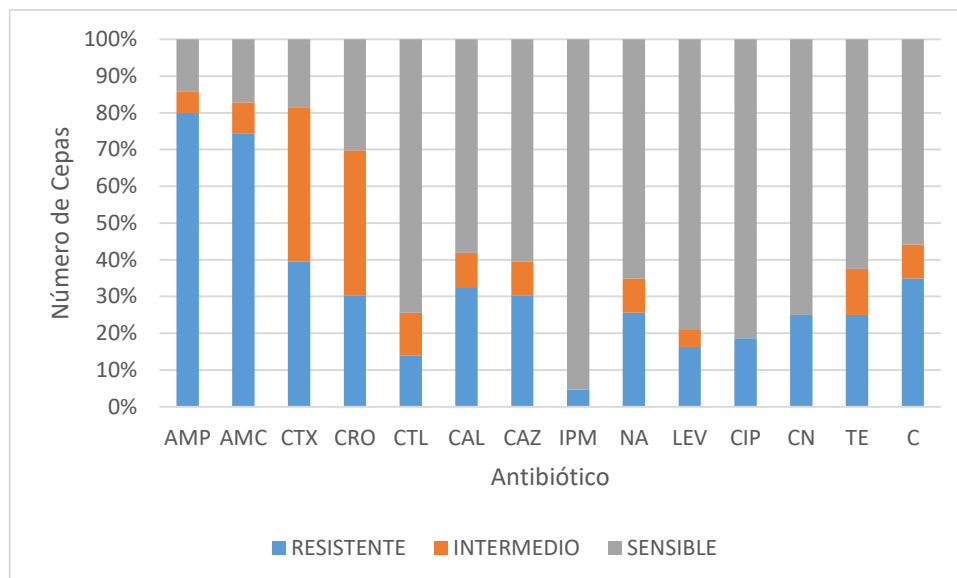


FIGURA 1. Porcentaje de cepas resistentes, sensibles o con resistencia intermedia a cada antibiótico. (AMP Ampicilicina. AMC Amoxicilina. CTX Cefotaxima. CRO Ceftriaxona. CTL Cefotaxime+ Ác Clavunálico. CAL Ceftazidime+ Ác Clavunálico. CAZ Ceftazidime. IPM Imipenem. NA Ác Nalidíxico. LEV Levofloxacino. CIP Ciprofloxacino. CN Gentamicina. TE Tetraciclina. C Cloranfenicol)

En cuanto a los patrones de resistencia, se encontraron 24 tipos distintos. Los más frecuentes se observan en la Tabla 14.

TABLA 14. Patrones de resistencia más frecuentes en las cepas estudiadas.

| PATRONES RESISTENCIA | Nº CEPAS | Código de cepas |
|----------------------|----------|--------------------------|
| AMP, AMC | 4 | LF3-6, AEP-1, AV-4, AV-6 |
| AMP, AMC, C | 3 | LF2-3, LF2-5, AV-1 |
| AMC, AMP, CTX, CRO | 2 | LF2-2, LF2-8 |

AMP Ampicilicina. AMC Amoxicilina. CTX Cefotaxima. CRO Ceftriaxona. C Cloranfenicol.

En la Tabla A1 del Anexo I se muestra el porcentaje de cepas, agrupadas según su origen, con resistencia a los distintos antibióticos objetos de estudio.

Se aprecia que tanto las cepas que provienen de lodo como de agua presentan resistencia a la familia de las penicilinas. Sin embargo, cuando hablamos de cefalosporinas se ve reflejado que las cepas aisladas en los lodos presentan mucha más resistencia que las de aguas, las cuales, en general, no alcanzan el 30% de las cepas provenientes de alguna de las fuentes de agua que sean resistentes a algún antibiótico de dicha familia.

Detección molecular de genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs)

En la Tabla A2 del Anexo II, se listan los resultados obtenidos de la presencia de los genes investigados en las cepas, agrupadas según la muestra origen. La acequia de El Palmar como la acequia de Vera, ambas anexas al Campus de Vera de la Universitat Politècnica de València son las que presentan, en comparación con los lodos, el mayor porcentaje de presencia de genes de

resistencia en cualquiera de sus cepas. Además, en estudios similares sobre aguas, se detectaron presencia de distintos genes que presentaron frecuencias no superiores al 50%, al igual que en la acequia de Vera, la fuente con más presencia de genes de resistencia del presente estudio (Amato et al., 2021). Por otro lado, cabe destacar que, a la vista de la baja presencia de genes, en las cepas provenientes de lodos de la EDAR, podríamos decir que las excretas de los animales que vierten sus efluentes en la EDAR no están expuestas a carbapenemes.

En cuanto a los patrones de genes de resistencia, en primer lugar, se estudió desde muestras directas de las fuentes de las cepas.

TABLA 15. Patrones de resistencia en las fuentes de las muestras

| Patrones | Nº muestras | Código de muestras |
|---|-------------|--------------------|
| <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{KPC} , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> | 2 | AEP, AV |
| <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{KPC} , | 2 | AE2 |
| <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{KPC} | 1 | LE1, AE1 |
| <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{KPC} | 1 | LE2 |

AEP Acequia El Palmar. AV Acequia de Vera. AE2 Agua EDAR Día 30. LE1 Lodo EDAR Día 1. AE1 Agua EDAR Día 1. LE2 Lodo EDAR Día 30.

En segundo lugar, se estudiaron los patrones de resistencia de las distintas muestras, donde se pudo demostrar que hay un gran número de patrones de resistencia diferentes ya que como podemos observar en la Tabla 16 solo algunas cepas de lodos comparten patrones de resistencia.

TABLA 16. Patrones de resistencia en común de las cepas objeto de estudio

| Patrones | Nº cepas | Código de cepas |
|---|----------|---------------------|
| <i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV} | 2 | LF2-1, LF2-3 |
| <i>qnrB</i> <i>qnrS</i> | 3 | LF2-8, LF3-1, AEP-5 |

4 CONCLUSIONES

Los microorganismos presentes en bajas cantidades y que poseen potencial patógeno podrían mostrar resistencia, aun cuando no se aíslen en medios específicos destinados a evaluar resistencias, ya que su detección puede requerir medios selectivos.

El presente estudio revela una significativa prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos tanto en lodos como en aguas. De las cepas investigadas, un 24% exhiben resistencia a múltiples fármacos. Es relevante señalar que se encontró una mayor diversidad de cepas y una mayor presencia de genes de resistencia en las muestras provenientes de las acequias adyacentes al campus de Vera. La detección de *Salmonella* en muestras recogidas de la acequia El Palmar es motivo de preocupación, ya que esta acequia se utiliza para el riego de campos agrícolas cercanos. Por lo tanto, se recomienda un análisis exhaustivo de estas aguas antes de su reutilización en riego, debido al potencial riesgo de salud pública asociado con la contaminación

cruzada o el consumo de productos agrícolas regados con estas aguas y que puedan ser consumidos crudos o con un lavado insuficiente.

Las cepas aisladas de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR), tanto en lodo como en el agua de salida, brindan información valiosa. Por un lado, la baja presencia de genes de resistencia en los lodos sugiere que los animales no están expuestos a carbapenemes. Por otro lado, la ausencia de cepas aisladas en el agua de salida terciaria indica que la planta de depuración opera de manera adecuada y filtra el agua de forma efectiva.

Tanto las cepas halladas en el lodo como en el agua presentan resistencia a penicilinas y sensibilidad tanto a quinolonas como a cefalosporinas.

Este estudio marca el inicio de una investigación más profunda sobre bacterias resistentes en lodos y aguas de uso agrícola en la Comunidad Valenciana. Por lo tanto, es imperativo continuar con la recopilación de muestras a los 6 meses y al año desde la obtención de las primeras muestras, tanto en lodos como en aguas, con el fin de obtener una visión más precisa de la presencia de bacterias multirresistentes. Esta ampliación permitirá un análisis estadístico más sólido gracias a una mayor cantidad de cepas disponibles.

En conclusión, este estudio resalta la urgencia de abordar la problemática de la resistencia a los antibióticos, tanto en términos de investigación como de aplicación de medidas preventivas, a fin de salvaguardar la salud pública y la seguridad alimentaria.

5 REFERENCIAS

- Abusam, A., & Al-Anzi, B. (2011). Comparison between the irrigation qualities of conventional tertiary and UF + RO advanced treated wastewaters. *Agricultural Sciences*, 02(04), 526-532. <https://doi.org/10.4236/as.2011.24068>
- Amato, M., Dasí, D., González, A., Ferrús, M. A., & Castillo, M. Á. (2021). Occurrence of antibiotic resistant bacteria and resistance genes in agricultural irrigation waters from Valencia city (Spain). *Agricultural Water Management*, 256, 107097. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.107097>
- Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015*. (2017, enero 30). <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2015>
- Ashbolt, N. J., Amézquita, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K. K., Collignon, P., Coors, A., Finley, R., Gaze, W. H., Heberer, T., Lawrence, J. R., Larsson, D. G. J., McEwen, S. A., Ryan, J. J., Schönfeld, J., Silley, P., Snape, J. R., Van den Eede, C., & Topp, E. (2013). Human Health Risk Assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), 993-1001. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206316>
- Ballesté-Delpierre, C. (s. f.). *SUPERBACTERIAS EN TIEMPOS DE COVID-19*.
- Botànic, E. L. veu del. (2015, febrero 5). LA HUERTA VALENCIANA EN PELIGRO DE EXTINCIÓN. *Espores*. <https://espores.org/es/es-conservacion/la-huerta-valenciana-en-peligro-de-extincion/>
- Cambio climático. (s. f.). *Desarrollo Sostenible*. Recuperado 11 de julio de 2023, de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/climate-change-2/>
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.-J., & Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(2), 394-397. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm204>
- El grupo tripartito y el PNUMA respaldan la definición de «Una sola salud» proporcionada por el Cuadro de Expertos de Alto Nivel para el Enfoque de «Una sola salud»*. (s. f.). Recuperado 11 de julio de 2023, de <https://www.who.int/es/news/item/01-12-2021-tripartite-and-unep-support-ohhlep-s-definition-of-one-health>
- Esperbent, C., & Migliorati, M. (2017). Bacterias multirresistentes: Una amenaza oculta que crece: El incremento en la aparición de cepas resistentes a los antibióticos plantea un

- serio reto a la comunidad científica. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que, para 2050, esto podría tener importantes consecuencias tanto para la salud pública como para las actividades agropecuarias. El abuso y la mala administración de antibióticos en sistemas agropecuarios de producción intensiva aparecen entre las principales causas. Especialistas argentinos recomiendan buenas prácticas de manejo sanitario para minimizar los riesgos. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 43(1), 6-10.
- Fernández-Cuenca, F., Tomás, M., Tormo, N., Gimeno, C., Bou, G., & Pascual, Á. (2019). Reporting identification of *Acinetobacter* spp genomic species: A nationwide proficiency study in Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(2), 89-92. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.02.004>
- Gama de galerías API® ID. (s. f.). BioMérieux España. Recuperado 11 de julio de 2023, de <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/gama-de-galerias-apir-id>
- González, V., & Pomares, F. (2008). LA FERTILIZACIÓN Y EL BALANCE DE NUTRIENTES EN SISTEMAS AGROECOLÓGICOS.
- Hambre y seguridad alimentaria. (s. f.). *Desarrollo Sostenible*. Recuperado 11 de julio de 2023, de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/hunger/>
- Irañeta, J., Amorena, A., & Blázquez, S. (s. f.). USO DE LODOS DE DEPURADORA COMO FERTILIZANTES.
- Jaramillo Gonzalez, C. X. (2016). *Mineralización de la gallinaza y de los restos de cosecha en el suelo. Aplicación al cultivo de la coliflor en la huerta de Valencia*. [Universitat Politècnica de València]. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/62862>
- Korf, I., Yandell, M., & Bedell, J. (2003). BLAST. O'Reilly Media, Inc.
- Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., & Jardine, C. (2009). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Swine and Wild Small Mammals in the Proximity of Swine Farms and in Natural Environments in Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 559-566. <https://doi.org/10.1128/AEM.01821-08>
- Martínez-Martínez, L., & Calvo, J. (2010). Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: Causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 4-9. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70035-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70035-5)
- Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario, Pub. L. No. Orden AAA/1072/2013, BOE-A-2013-6414 44966 (2013). <https://www.boe.es/eli/es/o/2013/06/07/aaa1072>
- Moran, M. (s. f.-a). Agua y saneamiento. *Desarrollo Sostenible*. Recuperado 11 de julio de 2023, de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/water-and-sanitation/>
- Moran, M. (s. f.-b). Bosques, desertificación y diversidad biológica. *Desarrollo Sostenible*. Recuperado 11 de julio de 2023, de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/biodiversity/>
- Moran, M. (s. f.-c). Consumo y producción sostenibles. *Desarrollo Sostenible*. Recuperado 11 de julio de 2023, de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-consumption-production/>
- Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, 18(5), 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>
- One Health. (s. f.). Recuperado 12 de julio de 2023, de <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/one-health>
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119-123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- Salud. (s. f.). *Desarrollo Sostenible*. Recuperado 11 de julio de 2023, de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/health/>

ANEXOS

Anexo I

TABLA A1. Porcentaje de cepas, con resistencia a los antibióticos ensayados.

| Fuente | Nº Cepas | AMP | AMC | CTX | CRO | CAZ | IPM | NA | LEV | CIP | CN | CAL | TE | CTL | C |
|--------------------------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Lodo Fresco 1 | 2 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| Lodo Fresco 2 | 8 | 75% | 75% | 50% | 38% | 0% | 0% | 25% | 0% | 13% | 0% | 0% | 0% | 0% | 63% |
| Lodo Pasteurizado | 1 | 0% | 0% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Lodo Fresco 3 | 6 | 100% | 100% | 67% | 67% | 17% | 0% | 83% | 50% | 67% | 0% | 0% | 0% | 0% | 17% |
| Lodo Edar 1 | 6 | 50% | 0% | 17% | 0% | 50% | 0% | 17% | 0% | 0% | 0% | 67% | 0% | 17% | 0% |
| Acequia El Palmar | 5 | 60% | 40% | 20% | 0% | 20% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 20% | 0% | 0% | 20% |
| Acequia Vera | 9 | 78% | 78% | 22% | 22% | 22% | 0% | 11% | 22% | 11% | 0% | 22% | 0% | 11% | 67% |
| Lodo Edar 2 | 4 | 50% | 100% | 75% | 50% | 100% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 100% | 0% | 50% | 0% |
| Agua Edar 2 | 1 | 100% | 100% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 100% | 0% | 0% | 0% |

AMP Ampicilicina. AMC Amoxicilina. CTX Cefotaxima. CRO Ceftriaxona. CTL Cefotaxime+ Ác Clavunálico. CAL Ceftazidime+ Ác Clavunálico. CAZ Ceftazidime. IPM Imipenem. NA Ác Nalidíxico. LEV Levofloxacino. CIP Ciprofloxacino. CN Gentamicina. TE Tetraciclina. C Cloranfenicol

Anexo II

TABLA A2. Porcentaje de cepas que presentan genes de resistencia a β -lactámicos, carbapenémicos y/o quinolonas.

| Fuente | Nº Cepas | <i>bla</i> _{TEM} | <i>bla</i> _{SHV} | <i>bla</i> _{CMY-2} | <i>bla</i> _{IMP} | <i>bla</i> _{OXA} | <i>bla</i> _{VIM} | <i>bla</i> _{KPC} | QnrA | QnrB | QnrS |
|-------------------|----------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------|------|------|
| Lodo Fresco 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100% | 0 | 0 |
| Lodo Fresco 2 | 8 | 25% | 38% | 0% | 0% | 13% | 0% | 13% | 0% | 50% | 13% |
| Lodo Pasteurizado | 1 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 100% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| Lodo Fresco 3 | 6 | 50% | 0% | 0% | 0% | 0% | 17% | 0% | 0% | 50% | 17% |
| Lodo Edar 1 | 6 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| Acequia El Palmar | 5 | 20% | 0% | 0% | 20% | 0% | 0% | 0% | 0% | 40% | 20% |
| Acequia Vera | 9 | 11% | 22% | 33% | 11% | 11% | 11% | 11% | 0% | 33% | 11% |
| Lodo EDAR 2 | 4 | 50% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| Agua Edar 2 | 1 | 100% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| Directos | 6 | 83% | 0% | 0% | 83% | 0% | 0% | 100% | 0% | 33% | 33% |

Anexo III

Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030.

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

| Objetivos de Desarrollo Sostenibles | Alto | Medio | Bajo | No Procede |
|---|------|-------|------|------------|
| ODS 1. Fin de la pobreza. | | | | X |
| ODS 2. Hambre cero. | X | | | |
| ODS 3. Salud y bienestar. | X | | | |
| ODS 4. Educación de calidad. | | | | X |
| ODS 5. Igualdad de género. | | | | X |
| ODS 6. Agua limpia y saneamiento. | X | | | |
| ODS 7. Energía asequible y no contaminante. | | | | X |
| ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico. | | | | X |
| ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras. | | | | X |
| ODS 10. Reducción de las desigualdades. | | | | X |
| ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles. | | | | X |
| ODS 12. Producción y consumo responsables. | X | | | |
| ODS 13. Acción por el clima. | X | | | |
| ODS 14. Vida submarina. | | | | X |
| ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres. | X | | | |
| ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas. | | | | X |
| ODS 17. Alianzas para lograr objetivos. | | | | X |

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

ODS 3. Salud y Bienestar. Garantizando que los alimentos que llegan a la cadena alimentaria presentan un valor nutricional óptimo y son microbiológicamente seguros.

ODS 6. Agua limpia y saneamiento. Estudiar la presencia de bacterias multi resistentes en aguas de riego de la huerta valenciana.

ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres. Analizar las cepas presentes en lodos con fin de uso agrícola.