



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Detección y estudio de resistencias antibióticas en aguas  
del lago de La Albufera y su entorno.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Vilar Jiménez, Rafael

Tutor/a: Castillo López, María Ángeles

Cotutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

Cotutor/a externo: García Ferrús, Miguel

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

## **Detección y estudio de resistencias antibióticas en aguas del lago de La Albufera y su entorno.**

### **Resumen**

El Parque Natural de la Albufera, situado en la costa mediterránea, es un ecosistema lagunar de gran importancia tanto ecológica como socioeconómica. Sin embargo, en la actualidad enfrenta una amenaza creciente debido a la alta presencia de bacterias multirresistentes a los antibióticos en sus acequias. Este fenómeno ha captado la atención internacional, especialmente de organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS), identificando a las bacterias multirresistentes como una de las principales amenazas para la salud global. Esta problemática compromete la eficacia de los tratamientos antimicrobianos y plantea graves riesgos para la salud pública y la seguridad alimentaria, especialmente debido al aumento de estas bacterias en las aguas de riego, fenómeno que ha favorecido la diseminación de genes de resistencia, creando un entorno propicio para la proliferación de bacterias resistentes y la transmisión de estos genes. La situación no solo afecta la salud de los ecosistemas acuáticos locales, sino que también tiene un impacto negativo en las comunidades humanas, debido al consumo de productos agrícolas regados con aguas contaminadas. En este estudio se analizaron siete muestras de agua, seis de las cuales provenían de la red de acequias que desembocan en la Albufera. Se evaluó la calidad higiénico-sanitaria del agua de riego, abordando varios aspectos, como el recuento de coliformes y *E. coli*, la detección de *Salmonella* spp., y el aislamiento de bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas y carbapenemasas. Posteriormente, se realizó una identificación bioquímica mediante tiras API y una segunda identificación a través de la secuenciación del gen 16S del ARNr. Además, se llevó a cabo un ensayo de susceptibilidad antimicrobiana de todas las cepas contra ocho grupos diferentes de antibióticos y, finalmente, se identificó la presencia de genes de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, carbapenémicos y quinolonas. Los resultados mostraron que la calidad higiénico-sanitaria de estas aguas es adecuada para riego, ya que presentaron bajos niveles de coliformes y ausencia de *Salmonella* spp.. No obstante, de los 75 aislados totales, el 84% presentó resistencia a alguno de los antibióticos probados identificándose 20 perfiles de resistencia 10 de los cuales se podrían clasificar como multirresistentes. Por otro lado, el 71% de las cepas contenían al menos uno de los genes de resistencia estudiados, con un 52% de cepas con algún gen de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, un 24% a carbapenémicos y un 40% a quinolonas. En total, se identificaron 31 perfiles genéticos distintos, de los cuales 4 podrían clasificarse como perfiles de multirresistencia, al presentar al menos un gen de cada una de las familias de resistencia estudiadas. Este análisis evidencia la preocupante presencia y diversidad de bacterias multirresistentes en el agua de riego del Parque Natural de la Albufera, subrayando la necesidad urgente de controlar y mitigar la propagación de genes de resistencia para proteger tanto la salud pública como la integridad ecológica del área.

Este trabajo está vinculado con los siguientes objetivos de desarrollo sostenible: ODS 1 Fin de la pobreza; ODS 2 Hambre cero; ODS 3 Salud y bienestar; ODS 6 Agua limpia y saneamiento y ODS 12 Producción y consumo responsables.

**Palabras clave:** genes de resistencia;  $\beta$ -lactámicos; carbapenémicos; coliformes; *salmonella* spp.; multirresistencia.

## **Detecció i estudi de resistències antibiòtiques en aigües del llac de L'Albufera i el seu entorn.**

### **Resum**

El Parc Natural de l'Albufera, situat a la costa mediterrània, és un ecosistema llacunar de gran importància tant ecològica com socioeconòmica. No obstant això, actualment s'enfronta a una amenaça creixent a causa de la alta presència de bacteris multiresistents als antibiòtics en les seues séquies. Aquest fenomen ha captat l'atenció internacional, especialment d'organismes com l'Organització Mundial de la Salut (OMS), identificant els bacteris multiresistents com una de les principals amenaces per a la salut global. Aquesta problemàtica compromet l'eficàcia dels tractaments antimicrobians i planteja greus riscos per a la salut pública i la seguretat alimentària, especialment a causa de l'augment d'aquestes bacteris en les aigües de reg, fenomen que ha afavorit la disseminació de gens de resistència, creant un entorn propici per a la proliferació de bacteris resistents i la transmissió d'aquests gens. La situació no només afecta la salut dels ecosistemes aquàtics locals, sinó que també té un impacte negatiu en les comunitats humanes, a causa del consum de productes agrícoles regats amb aigües contaminades. En aquest estudi es van analitzar set mostres d'aigua, sis de les quals provenien de la xarxa de séquies que desemboquen a l'Albufera. Es va avaluar la qualitat higienicosanitària de l'aigua de reg, abordant diversos aspectes, com el recompte de coliformes i *E. coli*, la detecció de *Salmonella* spp., i l'aïllament de bacteris productors de  $\beta$ -lactamases i carbapenemases. Posteriorment, es va realitzar una identificació bioquímica mitjançant tires API i una segona identificació a través de la seqüenciació del gen 16S de l'ARNr. A més, es va dur a terme un assaig de susceptibilitat antimicrobiana de totes les soques contra vuit grups diferents d'antibiòtics i, finalment, es va identificar la presència de gens de resistència a antibiòtics  $\beta$ -lactàmics, carbapenèmics i quinolones. Els resultats van mostrar que la qualitat higienicosanitària d'aquestes aigües és adequada per a reg, ja que van presentar baixos nivells de coliformes i absència de *Salmonella* spp.. No obstant això, dels 75 aïllats totals, el 84% va presentar resistència a algun dels antibiòtics provats, identificant-se 20 perfils de resistència a antibiòtics i destacant la resistència a penicil·lines i cefalosporines. D'altra banda, el 71% de les soques contenien almenys un dels gens de resistència estudiats, amb un 52% de soques amb algun gen de resistència a antibiòtics  $\beta$ -lactàmics, un 24% a carbapenèmics i un 40% a quinolones. En total, es van identificar 31 perfils genètics diferents, dels quals 4 podrien classificar-se com a perfils de multiresistència, en presentar almenys un gen de cada una de les famílies de resistència estudiades. Aquesta anàlisi evidencia la preocupant presència i diversitat de bacteris multiresistents en l'aigua de reg del Parc Natural de l'Albufera, subratllant la necessitat urgent de controlar i mitigar la propagació de gens de resistència per a protegir tant la salut pública com la integritat ecològica de l'àrea.

Aquest treball està vinculat amb els següents objectius de desenvolupament sostenible: ODS 1 Fi de la pobresa; ODS 2 Fam zero; ODS 3 Salut i benestar; ODS 6 Aigua neta i sanejament i ODS 12 Producció i consum responsables.

**Paraules clau:** gens de resistència;  $\beta$ -lactàmics, carbapenèmics; coliformes; *salmonella* spp.; multiresistència.

## **Detection and study of antibiotic resistance in the waters of the Albufera lake and its surroundings.**

### **Abstract**

The Albufera Natural Park, located on the Mediterranean coast, is a lagoon ecosystem of great ecological and socioeconomic importance. However, it currently faces a growing threat due to the high presence of multidrug-resistant bacteria in its irrigation ditches. This phenomenon has garnered international attention, especially from organizations such as the World Health Organization (WHO), identifying multidrug-resistant bacteria as one of the main threats to global health. This issue compromises the effectiveness of antimicrobial treatments and poses serious risks to public health and food security, especially due to the increase of these bacteria in irrigation waters, a phenomenon that has favored the dissemination of resistance genes, creating a conducive environment for the proliferation of resistant bacteria and the transmission of these genes. The situation not only affects the health of local aquatic ecosystems but also has a negative impact on human communities due to the consumption of agricultural products irrigated with contaminated water. In this study, seven water samples were analyzed, six of which came from the network of ditches that flow into the Albufera. The hygienic-sanitary quality of the irrigation water was evaluated, addressing several aspects such as the count of coliforms and *E. coli*, the detection of *Salmonella* spp., and the isolation of  $\beta$ -lactamase and carbapenemase-producing bacteria. Subsequently, a biochemical identification was performed using API strips and a second identification through 16S rRNA gene sequencing. Additionally, an antimicrobial susceptibility test was conducted on all strains against eight different groups of antibiotics, and finally, the presence of resistance genes to  $\beta$ -lactam, carbapenem, and quinolone antibiotics was identified. The results showed that the hygienic-sanitary quality of these waters is suitable for irrigation, as they presented low levels of coliforms and no presence of *Salmonella* spp.. However, of the 75 total isolates, 84% showed resistance to at least one of the tested antibiotics, identifying 20 antibiotic resistance profiles, with a notable resistance to penicillins and cephalosporins. On the other hand, 71% of the strains contained at least one of the studied resistance genes, with 52% of strains carrying a resistance gene to  $\beta$ -lactam antibiotics, 24% to carbapenems, and 40% to quinolones. In total, 31 different genetic profiles were identified, four of which could be classified as multidrug-resistant profiles, as they contained at least one gene from each of the studied resistance families. This analysis highlights the concerning presence and diversity of multidrug-resistant bacteria in the irrigation water of the Albufera Natural Park, emphasizing the urgent need to control and mitigate the spread of resistance genes to protect both public health and the ecological integrity of the area.

This work is linked to the following Sustainable Development Goals (SDGs): SDG 1 No Poverty; SDG 2 Zero Hunger; SDG 3 Good Health and Well-being; SDG 6 Clean Water and Sanitation; and SDG 12 Responsible Consumption and Production.

**Keywords:** resistance genes;  $\beta$ -lactams; carbapenems; coliforms; *Salmonella* spp.; multidrug resistance.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutoras, Ana y M<sup>a</sup> Ángeles, por confiar en mí y guiarme en la elaboración de este trabajo. Gracias por vuestra paciencia y apoyo; sin duda, cada uno de mis futuros escritos llevará una parte de vosotras.

A Nancy y Miguel, que han trabajado incansablemente para que todo en el laboratorio estuviera en orden y funcionara a la perfección cada día.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por las risas y los momentos compartidos, que lograron sacarme una sonrisa incluso en los días más difíciles.

A mi grupo de amigos, gracias por soportarme y darme fuerzas para seguir adelante a pesar de las dificultades, pronto me deberéis llamar Doctor R. Vilar.

A mi grupo del Juniors, ser monitor ha sido lo mejor que me ha pasado en la vida, y es gracias a vosotros que puedo continuar trabajando a pesar del hambre y el sueño.

Y, por último, a mi familia, que siempre me apoya y me quiere, gracias de todo corazón, os quiero.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
1.1 LA ALBUFERA .....	11
1.2 CONTAMINACIÓN MICROBIANA DE AGUA DULCE .....	11
1.2.1 Género <i>Enterobacter</i> .....	11
1.2.2 <i>Escherichia coli</i> .....	12
1.2.3 Género <i>Salmonella</i> .....	12
1.3 BACTERIAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS.....	13
1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.....	13
1.4.1 Inhibidores de la síntesis pared celular .....	14
1.4.2 Inhibidores de la síntesis de proteínas.....	15
1.4.3 Inhibidores de la replicación del ADN.....	16
1.4.4 Inhibidores del metabolismo del ácido fólico .....	16
1.5 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	16
1.5.1 Limitar la absorción del medicamento .....	18
1.5.2 Modificar el objetivo del medicamento .....	18
1.5.3 Inactivación de fármacos.....	18
1.5.4 Expulsión activa del medicamento .....	18
1.6 GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS .....	19
1.7 PROGRAMA ONE HEALTH .....	20
1.8 ODS RELACIONADOS .....	20
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1. MUESTRAS DE AGUA.....	22
3.2 ESTUDIO DE LA CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA .....	23
3.2.1 Recuento de coliformes y <i>Escherichia coli</i> .....	23
3.2.2 Aislamiento de <i>E. coli</i> .....	23
3.2.3 Detección de <i>Salmonella</i> .....	24
3.3 DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE $\beta$ - LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO.....	24
3.4 DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS RESISTENTES A CARBAPENEMES .....	25
3.5 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	25
3.5.1 Pruebas preliminares .....	25
3.5.2 Identificación mediante sistema API 20E.....	26
3.5.3 Identificación molecular .....	26
3.6 ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS AISLADOS BACTERIANOS.....	27
3.7 ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	28

3.7.1 Extracción de ADN .....	28
3.7.2 PCR multiplex (mPCR) de genes de resistencia a $\beta$ -lactámicos, carbapenémicos y quinolonas .....	29
3.7.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	29
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
4.1 ANÁLISIS DE CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LAS AGUAS.....	31
4.1.1 Recuento de coliformes y <i>Escherichia coli</i> .....	31
4.1.2 Aislamiento de <i>E. coli</i> .....	32
4.1.3 Análisis de la presencia de <i>Salmonella</i> spp .....	32
4.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A $\beta$ -LACTAMICOSY CARBAPENÉMICOS A PARTIR DE MEDIOS SELECTIVOS .....	33
4.3 PREVALENCIA DE CEPAS AISLADAS DE LOS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS....	35
4.4 ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS AISLADOS.....	36
4.4.1 Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados identificados como <i>E. coli</i> .....	37
4.4.2 Aislados procedentes del análisis de <i>Salmonella</i> .....	38
4.4.3 Susceptibilidad antimicrobiana de cepas procedentes de medios con antibióticos..	39
4.4.4 Perfiles de resistencia antibiótica del total de los aislados.....	42
4.5. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	45
4.6 PERFILES GENÉTICOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	46
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>A. Relación del trabajo con los ODS de la agenda 2030 .....</b>	<b>59</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Organismos patógenos prioritarios de 2024</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> <i>Mecanismos generales de resistencia a antibióticos</i> .....	17
<b>Figura 3.</b> <i>Procedencia de las muestras de agua de La Albufera</i> .....	22
<b>Figura 4.</b> <i>Cepas aisladas medio ESBL</i> .....	35
<b>Figura 5.</b> <i>Cepas aisladas medio SC</i> .....	35
<b>Figura 6.</b> <i>Identificación y distribución de especies aisladas por los 3 procedimientos de aislamiento</i> .....	36
<b>Figura 7.</b> <i>Resistencia antimicrobiana de las cepas de E. coli</i> .....	38
<b>Figura 8.</b> <i>Resistencias de cepas procedentes del análisis de Salmonella spp</i> .....	39
<b>Figura 9.</b> <i>Resistencias de cepas aisladas del medio ESBL</i> .....	40
<b>Figura 10.</b> <i>Resistencias de cepas aisladas de medio SuperCARBA</i> .....	41



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Puntos y fechas de muestreo de aguas.....	22
<b>Tabla 2.</b> Secuencia de los primers de PCR de secuenciación .....	27
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de reacción PCR de secuenciación.....	27
<b>Tabla 4.</b> Antibióticos ensayados: concentración y rango de inhibición.....	28
<b>Tabla 5.</b> Genes de resistencia a antibióticos y primers utilizados para su detección.....	30
<b>Tabla 6.</b> Recuento de coliformes y <i>E. coli</i> en las muestras de agua (UFC/100 mL) .....	31
<b>Tabla 7.</b> Identificación mediante API20E de cepas procedentes del análisis de <i>Salmonella spp.</i> .....	32
<b>Tabla 8.</b> Identificación mediante API20E y por secuenciación de cepas aisladas de ESBL y SC .....	34
<b>Tabla 9.</b> Patrones de resistencia de cepas aisladas del análisis de <i>Salmonella</i> .....	38
<b>Tabla 10.</b> Incidencia de resistencias a antibióticos en las cepas, agrupadas por género .....	44
<b>Tabla 11.</b> Perfiles de resistencia de las cepas. ....	45
<b>Tabla 12.</b> Incidencia de genes de resistencia en las cepas aisladas. ....	47
<b>Tabla 13.</b> Incidencia de genes de resistencia por familias de antibióticos.....	47
<b>Tabla 14.</b> Perfiles de genes de resistencia en las cepas estudiadas .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP: ampicilina
- AMC: amoxicilina con clavulánico
- ARGs: Genes de Resistencia a Antibióticos
- APT: Agua de Peptona Tamponada
- BPPL: Bacterial Pathogen Priority List (Lista de Patógenos Bacterianos Prioritarios)
- CAZ: ceftazidima
- CAL: ceftazidima con clavulánico
- C: cloranfenicol
- CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
- CN: gentamicina
- CRE: resistencia a carbapenemes
- 3GCRE: resistencia a cefalosporinas de tercera generación
- CIP: ciprofloxacino
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio)
- CRO: ceftriaxona
- CTL: cefotaxima con clavulánico
- CTX: cefotaxima
- DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
- ESBL:  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido
- FDP: Agua de Peptona Tamponada
- FEP: cefepima
- FEL: cefepima
- IPM: imipenem
- LEV: levofloxacino
- LIC: Lugar de Importancia Comunitaria
- LSD: Least Significant Difference (Diferencia mínima significativa)

- MKTTn: Medio de Müller-Kauffmann Tetrionato-Novobiocina
- MEM: meropenem
- mPCR: Multiplex Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa multiplex)
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible
- P: punto de muestreo
- PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
- RAM: Resistencia a Antimicrobianos
- RV: Rappaport Vasiliadis
- SC: Medio de aislamiento SuperCARBA
- TE: Tampón Tris-EDTA
- TE: tetraciclina
- TBX: Triptona-Bilis-X-glucurónido
- TSI: Triple Sugar Iron
- UFC: Unidades Formadoras de Colonias
- VMA: Valor Máximo Admisible
- WHO: World Health Organization
- XLD: Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato
- ZEPA: Zona de Especial Protección para las Aves

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 LA ALBUFERA

El Parque Natural de La Albufera abarca 21.120 hectáreas y representa uno de los humedales más destacados de la Comunidad Valenciana y la cuenca mediterránea. Tiene su origen en un antiguo golfo marino aislado y parcialmente rellenado por sedimentación entre los ríos Túria y Xúquer, formando una laguna salobre rodeada de marjales. A partir del siglo XV, con la implantación del cultivo de arroz, se inició un proceso de dulcificación del sistema palustre y una aceleración del relleno de los marjales para aumentar la superficie cultivable. Fue declarado Parque Natural en 1986, y en 1989 recibió el reconocimiento internacional como "Humedal de Importancia Internacional" según la Convención de Ramsar de 1971 [1].

Desde 1990, el Parque Natural de La Albufera forma parte de la Red Natura 2000 como Zona de Especial Protección para las Aves (ZEPA) y fue designado Lugar de Importancia Comunitaria (LIC) en 2006. Este espacio alberga una rica biodiversidad y actualmente se practican tres actividades tradicionales: la pesca, la caza y la agricultura, destacándose especialmente el cultivo de arroz, fundamental tanto desde el punto de vista económico como ambiental [1].

En las últimas décadas, La Albufera ha experimentado cambios significativos tanto en el clima como en la gestión del agua, desencadenando una situación preocupante. La reducción drástica de los flujos hídricos, especialmente del río Júcar, ha desequilibrado profundamente su ecología. Este fenómeno se atribuye en parte a la modernización de los sistemas de riego, que, si bien han mejorado la eficiencia, también han aumentado la demanda de agua en las regiones altas de la cuenca. Este incremento en la presión hídrica, exacerbado por el crecimiento de necesidades agrícolas y urbanas, presenta una amenaza crítica para la sostenibilidad de la laguna [2].

La gestión del agua se enfrenta a desafíos críticos para mantener niveles adecuados de inundación que benefician tanto al cultivo de arroz como al ecosistema acuático. Además, la laguna se enfrenta a un dilema estructural: su creciente dependencia de aguas depuradas y retornos de riego de la Acequia Real del Júcar, que han sido vitales para suplir hasta un 80% de sus recursos hídricos. La temporalidad de los aportes hídricos se ha vuelto impredecible, con un flujo estacional que varía significativamente entre estíos secos e inviernos más húmedos, desafiando el régimen hidrológico habitual de las zonas húmedas mediterráneas [2].

## 1.2 CONTAMINACIÓN MICROBIANA DE AGUA DULCE

### 1.2.1 Género *Enterobacter*

*Enterobacter* spp. son patógenos oportunistas que pueden causar diversas infecciones en personas de todas las edades. Entre las enfermedades causadas por estas bacterias se incluyen bacteriemia, sepsis, meningitis, neumonía asociada a ventiladores, e infecciones de piel y tejidos blandos como celulitis, fascitis, miositis, abscesos, quemaduras y lesiones por aplastamiento [3].

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae* identificamos 26 géneros y más de 60 especies ampliamente distribuidas en plantas, frutas, verduras, animales, suelo, y agua [4].

### **1.2.2 *Escherichia coli***

Las bacterias coliformes, son un grupo de bacterias gramnegativas perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que suelen ser inocuas y forman parte de la microbiota natural de los animales de sangre caliente, incluidos los humanos. Estos han sido durante mucho tiempo una manera simple y confiable para evaluar la contaminación por patógenos en diferentes medios. Esto se debe a su alta concentración en aguas y a su facilidad de cultivo. En un contexto en el que los métodos convencionales de detección de patógenos entéricos son costosos, laboriosos y a menudo insensibles, el uso de bacterias indicadoras fecales sigue siendo una herramienta muy valiosa para evaluar la calidad del agua [5].

Entre los coliformes utilizados comúnmente para evaluar la contaminación fecal, destaca *Escherichia coli*, un microorganismo Gramnegativo anaerobio facultativo que se encuentra en el tracto gastrointestinal de personas y animales, y que también puede crecer en hábitats como lagos, playas y plantas. La presencia de *E. coli* indica la posible existencia de bacterias dañinas que pueden causar enfermedades y proporciona información sobre la extensión y la naturaleza de los contaminantes. Este microorganismo puede sobrevivir en el agua durante un período de 4 a 12 semanas. Su utilidad se debe a que existen técnicas de detección simples, asequibles, rápidas, sensibles y precisas [6].

Sin embargo, es crucial identificar correctamente las diferentes cepas de *E. coli*, ya que algunas, como las cepas diarreogénicas, son una de las principales causas de diarrea en personas, especialmente en países de bajos ingresos donde los recursos para manejar adecuadamente estas enfermedades son limitados [7]. Pese a que normalmente son bacterias comensales inocuas algunas cepas han desarrollado capacidad patogénica pudiendo clasificarse algunas como patógenos primarios, estos pueden dar lugar a gastroenteritis y diarrea sangrienta además de enfermedades como colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico como se muestra en la Tabla 1 [8]. Mediante la metodología seguida nos es imposible identificar aquellas cepas patógenas de las inocuas, no obstante, continúan siendo un importante identificador de contaminación fecal presente en las aguas y una fuente importante de genes de resistencia a diferentes clases de antibióticos [9].

### **1.2.3 Género *Salmonella***

*Salmonella* es un género de bacterias patógenas que causa enfermedades intestinales y sistémicas, como la fiebre tifoidea y paratifoidea. En países desarrollados, aunque rara vez se reportan brotes de *Salmonella* transmitidos por agua, se encuentran con frecuencia en aguas superficiales, incluidas las de riego. La contaminación continua de estas aguas de riego ha demostrado ser una ruta común para la contaminación de cultivos y brotes de *Salmonella spp.* en alimentos. Además, se han detectado cepas multirresistentes (MDR) en estas aguas, lo que presenta un riesgo para la salud pública debido a la propagación de resistencias a medicamentos [10].

### 1.3 BACTERIAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

La resistencia a antimicrobianos (RAM) se da cuando las bacterias, virus, hongos y parásitos no responden a los medicamentos, en consecuencia, estos se vuelven ineficaces y las infecciones se vuelven difíciles o imposibles de tratar, aumentando el riesgo de propagación, discapacidad o muerte [11]. En este contexto las bacterias resistentes a diversas clases de antibiótico han destacado como una de las principales amenazas hacia la salud humana y la macroeconomía en términos de mortalidad y morbilidad [12]. Se estima que la resistencia microbiana a antibióticos fue causante en 2019 de más de 1,27 millones de muertes globales y contribuyeron a 4,95 millones de muertes, además se calcula la RAM podría suponer un costo adicional de 1 billón de dólares destinados a la atención médica para 2050, además de una pérdida de producto interior bruto de 1 billón a 3,4 billones de dólares por año para 2030 [13].

En este contexto destaca la reciente aparición de microorganismos multirresistentes a antibióticos (MDR), microorganismos (principalmente bacterias) que son resistentes a uno o más agentes antimicrobianos [14]. La aparición de este tipo de patógenos viene determinada por diversos factores como el desarrollo extensivo, la sobreexplotación de los antibióticos, la aplicación excesiva de medicamentos de amplio espectro, la escasez de medicamentos antimicrobianos dirigidos y el bajo número de agentes antimicrobianos efectivos. Se estima que, si no se consiguen desarrollar nuevos medicamentos para 2050, todos los antibióticos actuales quedarán inservibles para este tipo de patógenos multirresistentes [15].

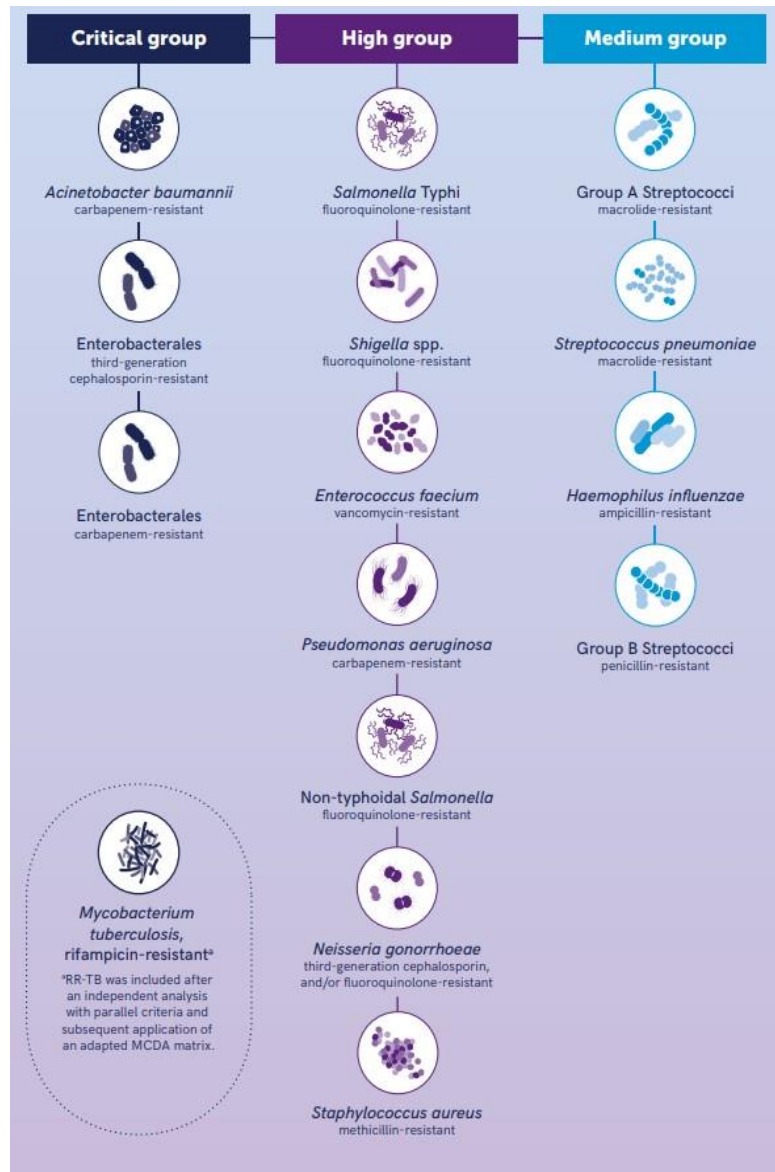
Tal es la preocupación frente a estos agentes resistentes que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha renovado la lista de Patógenos Bacterianos Prioritarios (BPPL) para 2024, incluyendo 15 familias de bacterias resistentes a antibióticos agrupados en prioridad crítica, alta y media como se muestra en la Figura 1. Dentro del grupo crítico se encuentra *Acinetobacter baumannii* y Enterobacteriales resistentes a antibióticos cefalosporínicos y carbapenémicos. Bacterias que suponen una amenaza global al presentar capacidad innata para encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y de transferir material genético a bacterias de su entorno [16].

Un aspecto crucial en el problema de los microorganismos multirresistentes es su vínculo con la contaminación del agua, pues las bacterias resistentes a los antimicrobianos y los genes de resistencia son altamente prevalentes en aguas y lodos. [17, 18]

### 1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

El término “antibiótico” proviene de la palabra “antibiosis”, que significa “contra la vida”. Inicialmente, se definía como un compuesto orgánico producido por un microorganismo que tenía efectos tóxicos sobre otros microorganismos. No obstante, esta definición se ha ampliado para incluir también antimicrobianos de origen sintético. Actualmente, el término abarca compuestos que pueden ser bactericidas, es decir, que matan bacterias, y bacteriostáticos, que inhiben su crecimiento. Además, se incluyen en esta definición los antifúngicos y antivirales, cada uno específico para combatir distintos tipos de microorganismos [19]. Se pueden clasificar los antibióticos en base a su mecanismo de acción en inhibidores de la síntesis de pared celular, inhibidores de las

biosíntesis de proteínas, inhibidores de la replicación de DNA e inhibidores del metabolismo del ácido fólico [20]. A continuación, se destacan sus principales características y tipos.



**Figura 1.** Organismos patógenos prioritarios de 2024. (Fuente: Organización Mundial de la Salud. (2024). Lista de organismos patógenos prioritarios)

### 1.4.1 Inhibidores de la síntesis pared celular

Las células bacterianas están rodeadas por una pared celular compuesta de peptidoglicano, un polímero de azúcares largos. Este peptidoglicano se entrecruza mediante la acción de transglucosidasas, formando enlaces cruzados entre las cadenas de glicano. Las cadenas de péptidos, que se extienden desde los azúcares en el polímero, se enlazan entre sí, reforzando la estructura de la pared celular. Este proceso de entrecruzamiento fortalece la pared celular. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y los glicopéptidos actúan inhibiendo la síntesis de esta pared [20].

### 1.4.1.1 $\beta$ -lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son la clase de antibióticos más comúnmente prescrita, habiendo un gasto anual de aproximadamente 15 mil millones de dólares y representando el 65% del mercado de los antibióticos [21, 22].

La característica común de estos medicamentos es la presencia de anillo  $\beta$ -lactámico, un anillo de 3 carbonos y 1 nitrógeno altamente reactivo. Dentro de este grupo encontramos a su vez 5 clases de antibióticos:

- **Penicilinas.** Contienen un núcleo de ácido 6-aminopenicilánico y otras cadenas laterales. El grupo incluye penicilinas naturales, agentes resistentes a  $\beta$ -lactamasas, aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas.
- **Cefalosporinas.** Contienen un núcleo de ácido 7-aminocefalosporánico y una cadena lateral con anillos de 3,6-dihidro-2H-1,3-tiazano. Se dividen en cinco generaciones, siendo la cuarta generación especialmente dirigida a bacterias gramnegativas resistentes a productoras de  $\beta$ -lactamasas [21].
- **Carbapenémicos.** Su estructura consiste en un carbapenem unido a un anillo  $\beta$ -lactámico que confiere protección contra la mayoría de las  $\beta$ -lactamasas. Estos poseen un espectro de actividad más amplio y una mayor actividad que el resto de los grupos, empleándose como “agente de última línea” cuando las infecciones se vuelven graves o se sospecha de multirresistencia [23]. Aunque la resistencia a estos compuestos se ha tornado un problema significativo al haber patógenos gramnegativos que producen diferentes clases de  $\beta$ -lactamasas denominadas carbapenemasas  $\beta$ -lactamasas con capacidades hidrolíticas versátiles contra penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos [24].
- **Monobactámicos.** El anillo  $\beta$ -lactámico está solo y no está fusionado con otro anillo.
- **Inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.** Actúan principalmente inactivando las  $\beta$ -lactamasas de serina, que son enzimas que hidrolizan e inactivan el anillo  $\beta$ -lactámico. Incluyen los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas de primera generación como el ácido clavulánico y los más nuevos avibactam y vaborbactam, que son activos contra carbapenemasas [25].

### 1.4.1.2 No $\beta$ -lactámicos

- **Glicopéptidos:** Actúan uniéndose a los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana en formación, interfiriendo en la síntesis de la pared celular [26].

## 1.4.2 Inhibidores de la síntesis de proteínas

El ribosoma bacteriano 70S está compuesto por dos subunidades ribonucleoproteicas, las subunidades 30S y 50S. Los antimicrobianos inhiben la biosíntesis de proteínas al dirigirse a la subunidad 30S o 50S del ribosoma bacteriano [27].

### 1.4.2.1 Inhibidores de la subunidad 30S

- **Aminoglucósidos.** Son estructuras cargadas de manera positiva que atraviesan la membrana en condiciones aeróbicas aprovechando la cadena de transporte electrónica e interactúan con el ARN ribosómico 16S de la



subunidad 30s a través de enlaces de hidrógeno, provocando así una lectura errónea y una terminación prematura de la traducción del ARNm.

- **Tetraciclinas.** Las tetraciclinas, como la tetraciclina y clortetraciclina, actúan sobre las secuencias conservadas del ARN ribosómico 16S de la subunidad ribosomal 30S para evitar la unión del ARN de transferencia (t-ARN) al sitio A, impidiendo el funcionamiento adecuado de la célula siendo incapaz de crecer o replicarse. Este tipo de antibiótico son clasificados como bacteriostáticos [28].

#### **1.4.2.2 Inhibidores de la subunidad 50S**

- **Cloranfenicol.** El cloranfenicol interactúa con las secuencias conservadas de la cavidad de la peptidil transferasa del ARN ribosómico 23S de la subunidad 50S. Inhibiendo la síntesis de proteínas al prevenir la unión del t-ARN al sitio A del ribosoma [27].
- **Macrólidos.** Los macrólidos afectan la etapa temprana de la síntesis de proteínas, al dirigirse a las secuencias conservadas del centro de transferencia peptídica del ARN ribosómico 23S de la subunidad ribosomal 50S. [27] Separando prematuramente las cadenas peptídicas incompletas.

#### **1.4.3 Inhibidores de la replicación del ADN**

Destacan las quinolonas como antibióticos bactericidas que actúan sobre las topoisomerasas bacterianas tipo II, como la ADN girasa y la topoisomerasa IV, inhibiéndolas. Las quinolonas establecen complejos de corte enzima-ADN al inhibir la ligadura del ADN, de esta manera cuando la girasa y la topoisomerasa IV crean rupturas en el cromosoma bacteriano se produce la fragmentación de este [29]. Por otro lado, las fluoroquinolonas son una generación más avanzada de quinolonas que han sido modificadas para mejorar su eficacia y espectro [30].

#### **1.4.4 Inhibidores del metabolismo del ácido fólico**

El ácido fólico es un metabolito perteneciente a la familia de las vitaminas B que actúan como cofactores enzimáticos en diversas funciones metabólicas. El ácido fólico participa en numerosas reacciones biosintéticas que permiten la correcta síntesis de proteínas y ácidos nucleicos encargándose de la síntesis de aminoácidos como metionina, serina, glicina, histidina y glutamato y en la síntesis de bases nitrogenadas purinas y pirimidinas. El mecanismo de acción de los antifolatos depende de la enzima en la que actúan, no obstante, se destaca el papel de las sulfonamidas al interactuar con un enzima exclusivo de las bacterias, la dihidropteroato sintasa (DHPS) [31].

### **1.5 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

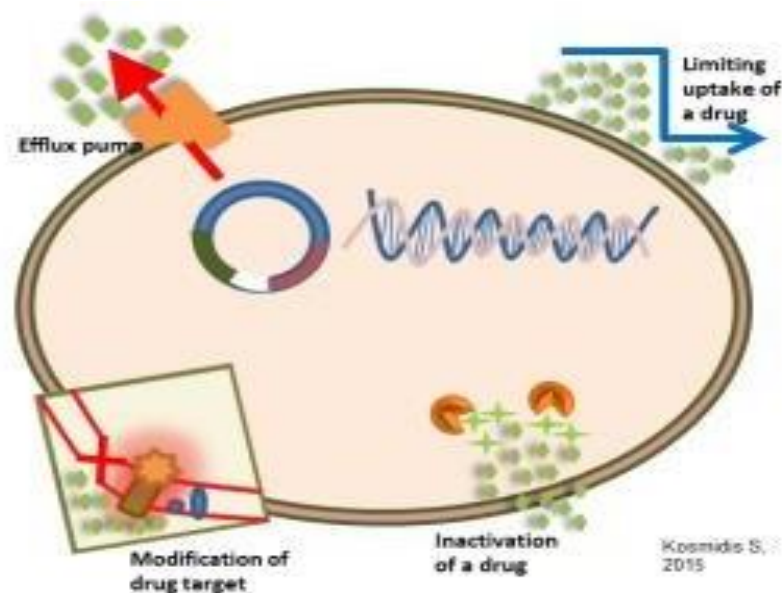
Las bacterias no son uniformemente susceptibles o resistentes a los antimicrobianos, ya que los niveles de resistencia pueden variar significativamente dentro de grupos relacionados. La susceptibilidad se mide comúnmente a través de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la menor concentración de un medicamento capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Si la CMI promedio de una especie se encuentra en el rango de resistencia, se considera que esa especie tiene

resistencia intrínseca al medicamento. Además, las bacterias pueden adquirir genes de resistencia de otras especies, lo que afecta su nivel de resistencia [32].

Existen diferentes tipos de resistencia: natural o adquirida. La resistencia natural puede ser intrínseca (siempre presente en la especie) o inducida (los genes de resistencia se activan después de que la bacteria se expone a niveles suficientes de antibiótico). La resistencia adquirida ocurre cuando una bacteria obtiene material genético mediante alguna de las tres rutas de transferencia horizontal de genes (transformación, transducción o conjugación), siendo la transferencia mediada por plásmidos la más común. Otras rutas menos frecuentes incluyen la transferencia mediada por bacteriófagos o mutaciones genéticas espontáneas o inducidas por factores estresantes como radiación UV, hambre o productos químicos [33].

Los mecanismos de resistencia antimicrobiana se dividen en cuatro categorías principales (Figura 2): limitar la absorción del medicamento, modificar el objetivo del medicamento, inactivar el medicamento y expulsar activamente el medicamento. La resistencia intrínseca puede involucrar la limitación de la absorción, la inactivación y la expulsión del medicamento, mientras que la resistencia adquirida puede incluir la modificación del objetivo del medicamento, la inactivación y la expulsión del medicamento.

Las bacterias gramnegativas utilizan los cuatro mecanismos principales, mientras que las bacterias grampositivas utilizan con menos frecuencia la limitación de la absorción y carecen de capacidad para ciertos tipos de mecanismos de expulsión de medicamentos [33].



**Figura 2.** Mecanismos generales de resistencia a antibióticos. (Fuente: Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria)

### **1.5.1 Limitar la absorción del medicamento**

La capacidad de las bacterias para limitar la absorción de agentes antimicrobianos está determinada en gran parte por la estructura y funciones de la capa de lipopolisacáridos, lo que proporciona resistencia innata a ciertos grupos de agentes antimicrobianos grandes, especialmente en bacterias gramnegativas debido a su membrana externa [34].

### **1.5.2 Modificar el objetivo del medicamento**

Los agentes antimicrobianos atacan diversos componentes de la célula bacteriana, y las bacterias han desarrollado múltiples mecanismos para modificar estos blancos. Entre estos mecanismos se encuentran la alteración de las proteínas a las que se unen los antibióticos, la modificación de la estructura de la membrana celular y los cambios en las enzimas metabólicas.

Por ejemplo, las bacterias pueden modificar las proteínas de unión a penicilina (PBPs), lo que reduce la capacidad de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como la penicilina, para unirse a su blanco y, por ende, disminuye su eficacia. En el caso de los fármacos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos, como las fluoroquinolonas, las bacterias pueden alterar enzimas como la DNA girasa o la topoisomerasa, impidiendo que el fármaco se una a su objetivo. Además, para los fármacos que afectan las vías metabólicas, como las sulfonamidas y el trimetoprim, las bacterias pueden presentar mutaciones en las enzimas clave, modificando el sitio activo y permitiendo que el sustrato natural se una sin ser bloqueado por el fármaco [33].

### **1.5.3 Inactivación de fármacos**

Otra forma de resistencia bacteriana se basa en la degradación del fármaco o en la transferencia de diversos grupos químicos al fármaco, como acetilo, fosforilo o adenililo. En cuanto a la degradación destacan las  $\beta$ -lactamasas, una amplia familia de enzimas que inactivan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos al hidrolizar un sitio específico en el anillo  $\beta$ -lactámico, lo que provoca la apertura del anillo y evita que el fármaco se una a las proteínas de la membrana celular. Este mecanismo es el más común entre las bacterias gramnegativas para resistir los  $\beta$ -lactámicos y es particularmente relevante para la resistencia a penicilinas y cefalosporinas [35].

Recientemente, ha surgido un grupo de  $\beta$ -lactamasas llamadas carbapenemasas, que son efectivas contra los antibióticos carbapenémicos y se encuentran principalmente en *Enterobacteriaceae*. Estas cepas representan un grave riesgo para la salud pública, ya que están asociadas con una mortalidad hospitalaria de hasta el 71% y se encuentran presentes en la lista de patógenos prioritarios de 2024 según la OMS [36].

### **1.5.4 Expulsión activa del medicamento**

Las bacterias presentan genes cromosómicos para bombas de eflujo que eliminan sustancias tóxicas de la célula desde el interior de la célula. Algunas bombas se expresan de forma constante, mientras que otras se inducen o sobre regulan en respuesta a diversos estímulos ambientales o sustratos de diferente tipo. Estas bombas, pueden tener capacidad para eliminar una amplia gama de compuestos, tornándolas en

bombas de eflujo de múltiples fármacos (MDR). La capacidad de resistencia de estas bombas a menudo es dependiente de la fuente de carbono disponible [37].

## 1.6 GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

El uso generalizado de antibióticos tanto en la atención médica como en la ganadería ha generado una presión de selección sobre las bacterias, lo que ha llevado a la proliferación de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en diversos entornos, incluyendo no solo hospitales y granjas, sino también medios menos estudiados como el aire, aguas residuales y entornos marinos. Estos ARGs, que pueden clasificarse en función de la clase de antibióticos a los que confieren resistencia en: tetraciclinas (*tet*), sulfonamidas (*sul*),  $\beta$ -lactámicos (*bla*), macrólidos (*erm*), aminoglucósidos (*aac*), fluoroquinolonas (*fca*), colistina (*mcr*), vancomicina (*van*) y multiresistencia (MDR) [38]. La presencia de ARGs es particularmente preocupante en ambientes acuáticos, donde los genes extracelulares (eARGs) pueden persistir más tiempo al ser adsorbidos por partículas de suelo y sedimentos, contribuyendo significativamente a la diseminación de la resistencia antimicrobiana [39].

**Genes que codifican  $\beta$ -lactamasas:** normalmente están codificados por plásmidos que pueden ser intercambiados fácilmente entre diferentes especies bacterianas y son producidas más comúnmente por miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente *E. coli* y *Klebsiella* sp. Hasta la fecha, se conocen más de 350 variantes naturales diferentes de ESBL ( $\beta$ -lactamasas de espectro extendido) que han sido clasificadas en nueve familias estructurales y evolutivas distintas, basadas en la comparación de sus secuencias de aminoácidos. Estas familias son: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, BES, TLA y OXA [40]. Además, entre las AmpC  $\beta$ -lactamasas (pAmpC) destaca *bla*<sub>CMY-2</sub> al conferir resistencia de amplio espectro no solo contra antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, sino además contra inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico [41]

**Genes que codifican carbapenemasas:** A nivel global, las cepas resistentes a carbapenemes están especialmente extendidas en países del Mediterráneo y los Balcanes, con altas tasas de resistencia en Grecia e Italia [42]. Las carbapenemasas más comunes son KPC, NDM y OXA-48-like, cada una con diferente distribución geográfica. Por ejemplo, las cepas positivas para *bla*<sub>KPC</sub> se encuentran ampliamente en los Estados Unidos, América Latina, Italia, Grecia, Oriente Medio y China, mientras que las positivas para *bla*<sub>NDM</sub> son comunes en India, Pakistán, Bangladesh y varios países europeos y africanos [44] mientras que la carbapenemasa *bla*<sub>IMP</sub> se encuentra más distribuido en la región de Asia, especialmente en China y Japón [43].

**Genes que codifican resistencia a quinolonas:** Los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* y *qnrVC* codifican proteínas pertenecientes a la familia de repeticiones de pentapéptidos. Estas proteínas protegen tanto a la girasa de ADN como a la topoisomerasa IV de la inhibición por quinolonas. Se cree que los genes *qnr* fueron adquiridos a partir de genes cromosómicos presentes en bacterias acuáticas. Normalmente, estos genes están asociados con elementos móviles o transposones en los plásmidos y, con frecuencia, se incorporan en integrones de tipo *su1* [44].

## 1.7 PROGRAMA ONE HEALTH

El enfoque "Una sola salud" se establece como una estrategia integradora esencial para mejorar la salud global, conectando de manera estrecha la salud humana, animal y ambiental. Este paradigma reconoce que cualquier cambio en uno de estos ámbitos puede tener repercusiones profundas y rápidas en los demás, amplificando el riesgo de brotes y la propagación de enfermedades. Las actividades humanas y los cambios ambientales, como el comercio de animales, la urbanización y el cambio climático, están creando nuevas condiciones que favorecen la aparición de patógenos y la proliferación de enfermedades infecciosas en humanos y animales [45].

Este enfoque aborda una amplia gama de problemas, incluyendo enfermedades zoonóticas emergentes y reemergentes, enfermedades tropicales desatendidas, enfermedades transmitidas por vectores, resistencia antimicrobiana, seguridad alimentaria, contaminación ambiental y cambio climático. Gracias a la colaboración entre profesionales de la salud humana, animal, medioambiental y otras especialidades, se trabaja para prevenir brotes de enfermedades, mejorar la seguridad alimentaria, reducir infecciones resistentes, proteger la salud global y salvaguardar la biodiversidad. Fomentando la cooperación entre todos los sectores, One Health busca lograr los mejores resultados de salud para personas, animales y plantas en nuestro entorno compartido [45].

## 1.8 ODS RELACIONADOS

El presente estudio tiene importantes implicaciones en varios Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) [46]:

**ODS 1: Fin de la pobreza.** Las bacterias resistentes en las aguas afectan directamente a las comunidades agrícolas vulnerables, aumentando el riesgo de enfermedades infecciosas y limitando su capacidad para producir alimentos de manera eficiente.

**ODS 2: Hambre cero.** Las bacterias resistentes a antibióticos pueden estar presentes en los cultivos, disminuyendo la producción agrícola y ganadera. Esto impacta negativamente en la seguridad alimentaria de los consumidores y el sustento de los agricultores.

**ODS 3: Salud y bienestar.** La presencia de bacterias resistentes puede contribuir a la propagación de enfermedades infecciosas difíciles de tratar, aumentando la morbilidad y mortalidad en la población.

**ODS 6: Agua limpia y saneamiento.** Garantizar la calidad del agua es crucial para la agricultura y la salud humana. El monitoreo y tratamiento de las aguas de riego en Valencia para eliminar bacterias resistentes es necesario para cumplir con estos objetivos y asegurar un suministro de agua seguro y sostenible para la agricultura.

**ODS 12: Producción y consumo responsables.** Controlar la contaminación de las aguas de riego con bacterias resistentes ayuda a mantener la integridad de los cultivos y reducir las pérdidas, promoviendo una producción agrícola sostenible y responsable.

## 2. OBJETIVOS

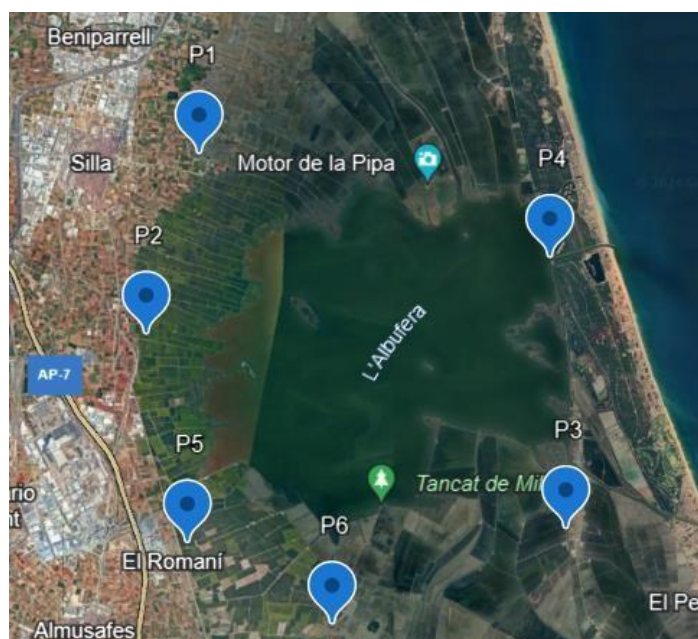
El objetivo general del presente estudio es evaluar la calidad higiénico-sanitaria del agua de riego, la resistencia a antibióticos y la presencia de genes de resistencia en bacterias provenientes de diversas acequias del entorno de la Albufera en Valencia. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Recuento de coliformes y *E. coli* en muestras de agua de riego para comparar con los estándares internacionales de calidad.
2. Aislamiento de *E. coli* en muestras de agua de riego para evaluar la prevalencia y características de resistencia a antibióticos.
3. Aislamiento e identificación de cepas sospechosas de ser *Salmonella spp.*
4. Aislamiento e identificación de bacterias Gramnegativas potencialmente resistentes a antibióticos carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación a partir de medios selectivos.
5. Evaluación de resistencia de las cepas bacterianas aisladas a antibióticos del grupo de penicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, carbapenémicos, quinolonas, aminoglucósidos, fenicoles y tetraciclinas.
6. Detección de genes portadores de resistencias a antibióticos beta-lactámicos (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>), carbapenémicos (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>) y quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) a partir de las cepas aisladas de los objetivos anteriores.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MUESTRAS DE AGUA

Las muestras de aguas estudiadas proceden de 7 puntos diferentes, 6 de ellos pertenecientes a la red de acequias que vierten sus aguas en La Albufera (Figura 3) y uno denominado Sequia de Meliana, situado próximo al municipio de Meliana en la comarca de la Huerta Norte de Valencia. Para cada punto se realizaron 2 muestreos en diferentes fechas. El agua se recoge en contenedores estériles, manteniéndolos en frío hasta su análisis posterior en el laboratorio. En la Tabla 1 se detallan los puntos, las coordenadas y las fechas de la toma de muestras.



**Figura 3.** Procedencia de las muestras de agua de La Albufera

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

Punto de muestreo	Coordenadas	Primera toma de muestra	Segunda toma de muestra
Punto 1 (P1)	39°21'48.4"N 0°23'27.8"W	27/02/2024	22/04/2024
Punto 2 (P2)	39°20'11.3"N 0°24'04.6"W	27/02/2024	22/04/2024
Punto 3 (P3)	39°18'26.6"N 0°19'12.5"W	04/03/2024	06/05/2024
Punto 4 (P4)	39°20'52.6"N 0°19'23.6"W	04/03/2024	06/05/2024
Punto 5 (P5)	39°18'19.1"N 0°23'35.9"W	11/03/2024	29/04/2024
Punto 6 (P6)	39°17'35.2"N 0°21'55.2"W	11/03/2024	29/04/2024
Punto 7 (P7)	39°30'57.4"N 0°19'27.2"W	20/02/2024	13/05/2024

## 3.2 ESTUDIO DE LA CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA

### 3.2.1 Recuento de coliformes y *Escherichia coli*

El estudio de la calidad higiénico-sanitaria del agua se lleva a cabo mediante el recuento de microorganismos coliformes y *E. coli*. Este análisis sirve como indicador de contaminación fecal, lo cual representa un riesgo significativo para la salud pública y el ecosistema.

Las muestras de agua fueron filtradas empleando membranas de nitrato de celulosa con un diámetro de poro de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemania). Tras la filtración, las membranas son transferidas a placas con diferentes medios de cultivo selectivo. La filtración se realiza con una unidad de filtración de tres puestos y 47 mm de diámetro (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) y una bomba de vacío modelo D-95 (Dinko Instruments, Barcelona, España). Tras varias pruebas se determinó el volumen de agua a filtrar en 1 mL, con el fin de hacer posible el recuento de colonias, dada la elevada carga microbiana de las muestras.

Tras la filtración de las muestras, los filtros fueron depositados sobre medio cromógeno CC (Chromogenic Coliforms Agar Base, Scharlau, Microinstant®, Barcelona, España) e incubándolos a 37 °C durante 24 h, según lo descrito en la norma UNE-EN ISO 4833-2:2024.

El medio de cultivo cromogénico para coliformes nos permite identificar las bacterias coliformes y distinguir *E. coli*, gracias a los sustratos cromogénicos Salmon-GAL (6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) y X-glucurónido (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-glucurónido). Las bacterias coliformes procesan Salmon-GAL debido a la presencia de la enzima β-D-galactosidasa, lo que resulta en colonias de coloración rosa-rojo. Por otro lado, *E. coli* también posee la enzima β-D-glucuronidasa, que metaboliza el X-glucurónido, produciendo colonias de color azul-violeta.

Tras 24 horas se procedió al conteo de coliformes empleando el Colony Counter (Digital S, P Selecta), un contador automático que permite una mejor visualización de las placas y de las colonias presentes en el filtro.

Para la evaluación de posibles riesgos para la salud nos basamos en el Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, que establece las condiciones básicas y la calidad mínima que deben cumplir las aguas depuradas según su uso previsto. Para el agua de riego, estos parámetros se determinan a través del recuento de *E. coli*, incluyéndose en la categoría de calidad 2.2: "Riego de productos para consumo humano con sistema de aplicación de agua que no evita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles, pero cuyo consumo no es en fresco, sino con un tratamiento industrial posterior" [47]. Siendo el valor máximo admisible (VMA) para este nivel de calidad de 1000 UFC/100 mL de agua.

### 3.2.2 Aislamiento de *E. coli*

Tras el recuento, se seleccionaron de 3 a 9 colonias características de *E. coli*. Estas colonias se inocularon en medio Triptona-Bilis-X-glucurónido (TBX, Thermo Scientific™ Oxoid™). El medio TBX permite la identificación de *E. coli* mediante la incorporación del cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónido (X-



glucurónido), que provoca una coloración azul/verde tras 24 horas de incubación a 44 °C.

Como método de confirmación adicional, se realizó la prueba del indol. En esta prueba, una colonia aislada se cultiva en un medio de cultivo líquido que contiene triptófano. El cultivo se incubó a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se añade el reactivo de Ehrlich, lo cual provoca la aparición de un anillo rojo en la superficie si la prueba es positiva. La presencia del anillo rojo indica la actividad de la enzima triptofanasa, confirmando la identificación de *E. coli*.

### **3.2.3 Detección de *Salmonella***

El análisis de *Salmonella* en agua se lleva a cabo siguiendo lo indicado en la ISO 6579-1:2017/A1. Se adicionó 5 mL de agua de cada muestra en 50 mL de agua de peptona tamponada (APT) (Scharlau, Barcelona) previamente esterilizada y se incubó a 37 °C durante 18 horas. Pasado el tiempo se llevó a cabo un pre-enriquecimiento sembrando 0,1 mL del agua de peptona incubada en un tubo con 9 mL de medio de cultivo Rappaport Vasiliadis (RV) (Scharlau, Barcelona) y se incubó a 42 °C durante 24 horas. Adicionalmente, se siembra 1 mL de la misma en un tubo con 9 mL de caldo MKTTn (tetrionato-novobiocina de Müller-Kauffmann) (Scharlau, Barcelona) el cual fue incubado a 37 °C durante 24 horas. El siguiente paso consistió en realizar una triple estría a partir de caldo RV en agar XLD (Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato) (Scharlau, Barcelona) y otra en Agar Base Cromógeno de *Salmonella* (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). De igual forma se llevó a cabo una siembra en XLD y en medio cromógeno de *Salmonella* partiendo del tubo de MKTTn. Todas las siembras se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Una vez pasadas las 24 horas se identificaron aquellas cepas sospechosas de ser *Salmonella*, en ambos medios. Para XLD las cepas sospechosas presentan una coloración transparente en un fondo color cereza y con presencia o ausencia de centro negro, mientras que en el medio cromógeno se identifican a través de una coloración violeta o púrpura. Una vez identificadas se sembraron en tubos de agar inclinado de TSI (Triple Sugar Iron) (Scharlau, Barcelona) y se incubaron a 37 °C, 24 h con el fin de valorar la fermentación de azúcares y la producción de SH<sub>2</sub>, típico de *Salmonella*.

Por último, se seleccionaron aquellos tubos de TSI cuyo fondo viró a amarillo indicando que ha habido una fermentación de glucosa y se había acidificado el medio, además de presencia de un precipitado negro por producción de SH<sub>2</sub> y una lengua color cereza mostrando la ausencia de fermentación de la lactosa y sacarosa.

Los aislados se suspendieron en 1 mL de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) en un Eppendorf de 1,5 mL y en crioviales Microbank™-Red (Pro-Lab Diagnostics, Microbank™, Wirral, Reino Unido) para su conservación y posterior identificación a -20 °C.

### **3.3 DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE β-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO**

Tras filtrar 10 mL de agua de cada muestra se depositó el filtro sobre placas Petri estériles con medio cromógeno ESBL (CHROMagar™ TM Orientation, CHROMagar™, Paris, Francia) y se incubaron a 37°C durante 24 h.

Se seleccionaron colonias de diferente aspecto, sembrándose en triple estría en medio Plate Count Agar (PCA, Scharlau, Barcelona, España) y resemebrando las veces necesarias hasta obtener cultivos puros. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h.

El aspecto de la colonia se emplea como indicador para identificar diferentes géneros de bacterias como *E. coli* (color rojizo), *Acinetobacter* (color opaco), *Pseudomonas* (color translúcido) y *Klebsiella* (color azulado) entre otras.

### **3.4 DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS RESISTENTES A CARBAPENEMES**

De manera paralela, se filtraron 10 mL de agua de cada muestra y depositándose el filtro sobre placas Petri con medio mSUPERCARBA (SC, CHROMagar™ mSuperCARBA™, Paris, Francia) incubándose a 37 °C durante 24 h.

Se volvieron a seleccionar colonias de diferente aspecto, sembrándose en triple estría en medio Plate Count Agar (PCA, Scharlau, Barcelona, España) y resemebrando las veces necesarias hasta obtener cultivos puros. Todos los cultivos fueron incubados a 37 °C durante 24 h.

En este medio los aspectos de la colonia nos sirven también como indicador para identificar diferentes géneros de bacterias coincidiendo la relación color-género con la indicada en el caso de ESBL.

### **3.5 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS**

Tras la obtención del cultivo puro se procedió a la realización de diferentes pruebas bioquímicas para su identificación.

#### **3.5.1 Pruebas preliminares**

##### **Prueba de la oxidasa**

Se realizó la prueba de la oxidasa para determinar si los aislados presentaban el sistema citocromo-oxidasa. Para ello se aplicó cada una de las colonias aisladas sobre unas tiras reactivas (Oxidase Strips, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) impregnadas con alfa-naftol, el cual en presencia del enzima citocromo oxidasa (la N,N-dimetilfenilendiamina), cambia a una coloración azul-violeta. En este caso se considera que las colonias testadas son oxidasa-positivas, mientras que las bacterias oxidasa-negativas no producen cambio de coloración. Siendo esta últimas las de interés para el presente trabajo.

##### **Prueba de la catalasa**

Se depositaron las colonias aisladas sobre una gota de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y se observó si se producía burbujeo en menos de 2 minutos. Estas burbujas son producidas debido a la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (causante de las burbujas) debido a la presencia del enzima catalasa, presente

en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas. En este caso pretendemos seleccionar aquellas cepas que presenten el enzima.

### **Tinción Gram**

La técnica de tinción de Gram nos permitió discernir entre bacterias grampositivas y gramnegativas, revelando las distintas estructuras de sus paredes celulares a través de la microscopía. El proceso comienza con la fijación de las bacterias en un portaobjetos de vidrio. Luego, se aplica violeta de genciana durante un minuto, seguido por de lugol durante otro minuto para asegurar la fijación del color. Posteriormente, se realiza la decoloración con alcohol durante 30 segundos, seguido de un lavado con agua destilada. Acto seguido, se aplica la safranina durante 3 minutos para la contra-tinción, antes de un último lavado y el secado al aire. Las bacterias grampositivas presentan un color púrpura intenso, debido a su robusta capa de peptidoglicano, que no permite su decoloración por el alcohol, mientras que en las gramnegativas se decoloran y adquieren un tono rojo o rosado con la safranina. Una vez secas, las muestras se examinaron bajo un microscopio óptico, utilizando un objetivo de 100x tras la aplicación de aceite de inmersión en el portaobjetos.

Todos los aislados con resultado negativo de oxidasa, positivo de catalasa y gramnegativas, fueron seleccionados y conservados en crioviales Microbank™-Red (Pro-Lab Diagnostics, Microbank™, Wirral, Reino Unido) a -20 °C para su posterior identificación. Además, se suspendieron en 1 mL de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) en un Eppendorf de 1,5 mL para el análisis genético.

### **3.5.2 Identificación mediante sistema API 20E**

El sistema de identificación tira API 20E (Tiras API, BioMérieux, Madrid, España) consiste en un sistema miniaturizado que comprende 20 pruebas bioquímicas. A partir de una colonia de un cultivo puro de 24 horas, se obtiene una suspensión en 5 mL en agua estéril con la que se rellenan los 20 microtubos de la galería, llenándose por completo las pruebas indicadas como CIT, VP y GEL y con vaselina las cúpulas de las pruebas ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S y URE generando un ambiente anaerobio. Las tiras se incubaron a 37 °C durante 24h. Tras la incubación y antes de su lectura, se añadieron los reactivos en las pruebas TDA, IND y VP (reactivo TDA, INDO<sub>2</sub>, KOH y NAFTAOL, respectivamente). Seguidamente, se procedió a su lectura, determinando como positivo y negativo las pruebas según las instrucciones del fabricante. Los resultados se introdujeron en la herramienta informática APIWEB (<https://apiweb.biomerieux.com>), obteniéndose así, la identificación de la cepa aislada junto con el porcentaje de fiabilidad.

### **3.5.3 Identificación molecular**

Tras llevar a cabo la identificación por tira API 20E se procedió a la identificación de aquellas cepas dudosas o que no eran enterobacterias mediante amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr de 1500 pb.

Se llevó a cabo la extracción del ADN como se indica en el apartado 3.7.1 y se realizaron 2 PCR de secuenciación. Una se realizó para todas aquellas cepas de la familia *Enterobacteriaceae* empleando el cebador universal de bacterias 27F y el

cebador 1492R mientras que la segunda se aplicó a todas las cepas del género *Acinetobacter* empleando el cebador 27F y 1525R. En las Tablas 2 y 3 se detallan la secuencia de los cebadores y las condiciones de ambas PCR, respectivamente.

**Tabla 2.** Secuencia de los primers de PCR de secuenciación.

	Secuencia Primer Forward	Secuencia Primer Reverse
<i>Enterobacteriaceae</i>	5'AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'	5'GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
<i>Acinetobacter</i>	5'AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'	5'AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

**Tabla 3.** Condiciones de reacción PCR de secuenciación.

	PCR <i>Enterobacteriaceae</i>		PCR <i>Acinetobacter</i>	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Ciclo 1	95	5	95	120
Ciclo 2 a 35	95	1	94	30
	55	1	65	30
	72	1	72	30
Ciclo 36	72	10	72	6000

Posteriormente se llevó a cabo la purificación de los fragmentos amplificados usando el kit de purificación de productos de PCR (GenElute™ PCR Clean-Up Kit, Sigma-Aldrich, Madrid, España), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, con el objetivo de eliminar los residuos del mix. El ADN amplificado y purificado se almacenó a -20°C hasta su secuenciación. Los fragmentos del gen 16S ARNr amplificados se secuenciaron y se eliminaron las regiones iniciales y finales mediante el programa Chromas (Technelysium Pty Ltd), tras el ajuste las secuencias de aproximadamente 1000 pb se compararon con las almacenadas en la base de datos GenBank mediante el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### 3.6 ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

Una vez identificadas las cepas se midió la sensibilidad de cada cepa a diferentes agentes antimicrobianos a través del método antibiograma disco-placa del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014) o método Kirby-Bauer, basado en la difusión del antibiótico a través del agar a partir del disco con la formación de un gradiente de concentración. Se emplearon 17 antibióticos de las familias de  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y anfenicoles como se muestra en la Tabla 4.

Para ello se tomaron colonias de un cultivo puro de 24h y se dispusieron en suero salino al 0,9% hasta alcanzar una turbidez del 0,5 en la escala Mc Farland. Se impregnó un hisopo con esta solución y se inoculó en 3 placas de Mueller-Hinton (MH, Scharlau, Barcelona, España) cubriendo la totalidad de la superficie de la placa. Posteriormente se dispensaron discos con antibióticos (OXOID Antimicrobial Susceptibility Test Disc) mediante un dispensador de discos (Antimicrobial Susceptibility Testing Disc Dispenser)

o bien se colocaron manualmente dejando espacio suficiente entre los discos para que no solapasen los halos.

Para comprobar la eficacia de los discos antibióticos se empleó la cepa *E. coli* ATCC 25922 como control positivo, siendo los límites aceptables de los diámetros de las zonas de inhibición los establecidos por el CLSI.

Una vez dispensados los antibióticos se incubaron las placas a 37 °C durante 24h. Tras el período de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición en milímetros y se clasificaron las cepas en resistente (R), intermedia (I) y sensible (S), según las normas establecidas por el CLSI en 2021.

**Tabla 4.** Antibióticos ensayados: concentración y rango de inhibición.

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

\*Antibióticos que incorporan ácido clavulánico; R: resistente; I: susceptibilidad intermedia; S: susceptible

### 3.7 ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

El estudio de genes de resistencia se llevó a cabo en las bacterias aisladas de los distintos medios de cultivo utilizados (conservadas en tampón TE 1X) e identificadas previamente

#### 3.7.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó empleando el kit de extracción comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Rochem Mannheim, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante para las bacterias gramnegativas. Para comprobar que la extracción se ha realizado de manera exitosa se carga el producto obtenido en un gel de agarosa como se detalla en el punto 3.7.3.

### 3.7.2 PCR multiplex (mPCR) de genes de resistencia a $\beta$ -lactámicos, carbapenémicos y quinolonas

Se realizaron cuatro mPCR para detectar genes que otorgan resistencia  $\beta$ -lactámicos, carbapenémicos y quinolonas como se indica en la Tabla 5.

En una primera mPCR para identificar los genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>CMY</sub>* se empleó el mix de reactivos que incluía 2  $\mu$ L de ADN; 1,25  $\mu$ L de  $MgCl_2$  a 2,5 mM; 2,5  $\mu$ L de tampón de PCR 1X; 0,2  $\mu$ L de dNTPs a 0,2 mM; 0,5  $\mu$ L de cada cebador a 0,4  $\mu$ M para *bla<sub>SHV</sub>*, y 0,25  $\mu$ L para *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>CMY-2</sub>* a 0,2  $\mu$ M; 5 U de Taq polimerasa, y agua MiliQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 25  $\mu$ L. Las condiciones del termociclador fueron: 15 min a 94 °C, 30 ciclos de amplificación de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C, con 10 min para la extensión final a 72 °C. Se emplearon controles positivos propios y como control negativo agua MiliQ estéril.

La siguiente mPCR nos permitió identificar los genes de resistencia a carbapenémicos *bla<sub>IMP</sub>* y *bla<sub>OXA</sub>*, el mix empleado contenía 2,5  $\mu$ L de ADN extraído; 0,75  $\mu$ L de  $MgCl_2$  1,5 mM; 2,5  $\mu$ L de tampón de PCR 1X; 0,125  $\mu$ L de dNTPs a 0,125mM; 0,5  $\mu$ L de cada cebador a 0,4  $\mu$ M; 0,4  $\mu$ L de Taq polimerasa (2 U), y agua MiliQ estéril hasta alcanzar un volumen de reacción final de 25  $\mu$ L. La amplificación se llevó a cabo siguiendo las condiciones: 10 min a 94 °C y 36 ciclos de amplificación compuestos por 30 s a 94 °C, 40 s a 55 °C y 50 s a 72 °C, finalizando con la extensión final de 5 min a 72 °C. Se utilizaron controles positivos propios y agua MiliQ estéril como control negativo. Para la detección de los genes *bla<sub>VIM</sub>* y *bla<sub>KPC</sub>* se emplearon las mismas condiciones, pero se tuvo que llevar a cabo por separado debido a que el tamaño de amplicón de *bla<sub>VIM</sub>* y *bla<sub>OXA</sub>* son muy similares y, por tanto, indistinguible en un gel de agarosa.

Para la realización de la mPCR que permite detectar genes de resistencia a quinolonas (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*) se empleó un mix que constaba de 2,5  $\mu$ L de ADN; 1,25  $\mu$ L de  $MgCl_2$  a 1,25 mM; 2,5  $\mu$ L de tampón de PCR 1X; 0,2  $\mu$ L de cada dNTP a 0,2 mM; 0,25  $\mu$ L de cada cebador a 0,25 mM; 0,25  $\mu$ L de Taq polimerasa (2,5 U), y agua MiliQ estéril hasta obtener un volumen final de la reacción del mix de 25  $\mu$ L. Las condiciones de amplificación fueron: 10 min a 95 °C, 35 ciclos de amplificación de 1 min a 95 °C, 1 min a 54 19 °C y 1 min a 72 °C, con 10 min para la extensión final a 72 °C. Se emplearon controles positivos propios y como control negativo, agua MiliQ estéril.

### 3.7.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los amplicones y la comprobación de la extracción de DNA se empleó un gel de agarosa 3E (Condalab) al 1,5% en 100 mL de tampón TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, acetato 20 mM, EDTA 1 mM). El gel se lleva a ebullición 3 veces y tras un periodo de atemperamiento se adicionan 5  $\mu$ L de RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Washington, USA) o 7,5  $\mu$ L de Novel Green Plus (20000X, Bio-Helix) según disponibilidad del revelador. En cada carril se cargan de 5 -10  $\mu$ L de producto de PCR junto con 2,5  $\mu$ L de tampón de carga ADN TriTrack (6X) (Thermo Scientific) y se cargan 10  $\mu$ L de marcador de pesos moleculares (GeneRuler 100 bp, Thermo Scientific) en el primer y último carril. Las condiciones empleadas fueron 90-100 V durante 50-60 minutos y se llevó a cabo la visualización en un transiluminador (TransilluminatorVilber, Lourmat, France) con luz UV.

**Tabla 5.** Genes de resistencia a antibióticos y primers utilizados para su detección.

Gen	Tamaño amplicón (pb)	Secuencia	Referencia
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	247	F 5' TTAAGTGGCGAACTACTTAC-3' R 5'-GTCTATTTTCGTTTCATCCATA-3	Kozak et al. (2009) [48]
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	393	F 5'-AGGATTGACTGCCTTTTTG-3' R 5'-ATTTGCTGATTTTCGCTCG-3'	
<i>bla</i> <sub>CMY</sub>	1000	F 5'-GACAGCCTCTTTCTCCACA-3' R 5'-TGGACACGAAGGCTACGTA-3'	
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	232	F 5'-GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC-3' R 5'-GGTTTAAAYAAAACAACCACC-3	Poirel et al. (2011) [49]
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	438	F5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' R 5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'	
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	390	F 5'-GATGGTGTGGTTCGCATA-3' R 5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'	
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	798	F 5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3' R 5'-CTTGTCATCCTTGTAGGCG-3'	
<i>qnrA</i>	580	F 5'-AGAGGATTTCTCACGCCAGG-3' R 5'-TGCCAGGCACAGATCTTGAC-3'	Cattoir et al. (2007) [50]
<i>qnrB</i>	264	F 5'-GGMATHGAAATTCGCCACTG-3' R 5'-TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA-3'	
<i>qnrS</i>	428	F 5'-GCAAGTTCATTGAACAGGGT-3' R 5'-TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG-3'	

### 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ANÁLISIS DE CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LAS AGUAS

#### 4.1.1 Recuento de coliformes y *Escherichia coli*

Los resultados de los recuentos de Coliformes y *E. coli* se recogen en la Tabla 6. De todas las muestras analizadas solamente la muestra del punto 7 (P7), recogida en febrero presenta niveles de *E. coli* superiores a los establecidos en el Real Decreto 1620/2007, de 6 de diciembre, por tanto, determinamos que el resto de las muestras presentaron una calidad higiénico-sanitaria suficiente para regadío [47].

**Tabla 6.** Recuento de coliformes y *E. coli* en las muestras de agua (UFC/100 mL).

Punto	Muestreo	<i>E. coli</i>	Coliformes
P1	1	$9,5 \times 10^2$	$3,96 \times 10^4$
	2	$7,0 \times 10^2$	$2,49 \times 10^4$
P2	1	$3,5 \times 10^2$	$4,85 \times 10^3$
	2	$2,0 \times 10^2$	$2,56 \times 10^4$
P3	1	$1,5 \times 10^2$	$1,99 \times 10^4$
	2	$6,5 \times 10^2$	$1,62 \times 10^4$
P4	1	$0,0 \times 10^1$	$1,85 \times 10^4$
	2	$2,5 \times 10^2$	$1,51 \times 10^4$
P5	1	$1,5 \times 10^2$	$7,85 \times 10^3$
	2	$1,5 \times 10^2$	$3,56 \times 10^4$
P6	1	$1,5 \times 10^2$	$2,30 \times 10^3$
	2	$3,5 \times 10^2$	$1,20 \times 10^4$
P7	1	$1,55 \times 10^4$	$>1,00 \times 10^6$
	2	$3,20 \times 10^3$	$7,80 \times 10^3$

Pese a que la normativa española no da indicaciones sobre los niveles de coliformes totales presentes en el agua de riego, en Estados Unidos hay una serie de estrictas directrices evaluadas por La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) para el empleo de agua reutilizada. En estas directrices se detalla que, para productos de consumo, que no se consuman en crudo, se permiten la presencia de hasta 4200 coliformes fecales/100 mL pudiendo variar significativamente dependiendo del Estado [51,52]. En nuestro caso, si siguiéramos estas directrices el agua analizada podría ser empleada para el riego a excepción nuevamente de la muestra P7 recogida en febrero. En un estudio previo sobre las aguas de riego en Valencia de 2018, se encontraron recuentos de coliformes muy similares a los observados en nuestras muestras [53]. Además, otro estudio sobre patógenos en aguas de regadío de 2020 reportó niveles de *E. coli* del mismo orden de magnitud de nuestras muestras presentes en agua de río, reciclada y subterránea [54]. Estos hallazgos respaldan que el nivel general de calidad de las aguas de riego en Valencia es adecuado para su uso en la agricultura. No obstante, los niveles de *E. coli* pueden llegar a ser muy fluctuantes a lo largo del tiempo, en ríos y lagos se han determinado variaciones de 2-5 órdenes de magnitud en varios años [55] mostrando que el riesgo para la salud humana



puede variar significativamente a lo largo del tiempo y que es necesaria una constante evaluación de estos parámetros en intervalos regulares.

El motivo por el cual difiere tanto la muestra P7 recogida en febrero puede ser debido a una contaminación externa próxima a la zona de recogida o bien al propio ciclo de cultivo del Arroz en Valencia donde desde enero y hasta finales de febrero se emplea un nivel bajo de agua que comienza a “Fanguear”, mezclando y arando la paja del año anterior con el barro para que se pudra y sirvan como recursos para el siguiente ciclo de cultivo [56].

Todas las muestras analizadas presentaron presencia de *E. coli*. Sin embargo, los resultados varían significativamente entre diferentes estudios. En un estudio realizado en Ecuador en 2021, solo el 29% de las 38 muestras de agua de riego analizadas dieron positivo para *E. coli* [57]. En contraste, otro estudio en México encontró que el 54.5% de las 11 muestras analizadas contenían *E. coli* [58]. Además, un análisis en Etiopía de 2023 mostró que el 88% de las muestras de agua de riego contaminada y el 77% de las muestras de suelo regado resultaron positivas para *E. coli* [59]. En comparación con los otros estudios nuestros datos indican una presencia universal de *E. coli* en todas las muestras analizadas. Esto sugiere que, en nuestra región, la presencia de *E. coli* es considerablemente más alta, lo que subraya la necesidad de elaborar medidas de gestión para asegurar la calidad del agua.

#### 4.1.2 Aislamiento de *E. coli*

A partir de los cultivos en medio CC y tras comprobar el crecimiento en medio TBX y ser positivas para la prueba del Indol se consiguieron aislar un total de 47 cepas de *E. coli*. Además, se consiguieron aislar 2 cepas que en TBX dieron una coloración diferente que se identificaron posteriormente a través de tira API20E como *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*.

#### 4.1.3 Análisis de la presencia de *Salmonella* spp.

En ninguna de las muestras de agua se detectó la presencia de *Salmonella* spp., no obstante, aquellas cepas que mostraban en la prueba TSI un perfil de asimilación de azúcares similar a *Salmonella* spp. y daban negativo en la prueba de la oxidasa fueron identificadas mediante tira API20E. Los resultados de la identificación se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Identificación mediante API20E de cepas procedentes del análisis de *Salmonella* spp.

Código	Identificación tira API20E	%ID
P1-1S6	<i>Pantoea</i> spp.	99,70%
P2-2S6	<i>Citrobacter youngae</i>	99,80%
P3-2S7	<i>Enterobacter cloacae</i>	87,40%
P5-2S3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	96,00%
P7-1S4	<i>Providencia rettgeri</i>	99,90%
P7 -2S10	<i>Providencia rettgeri</i>	99,90%

Este dato nos permite relacionar de manera directa el bajo nivel de indicadores de contaminación fecal (coliformes y *E. coli*) con la ausencia de este género. No obstante, se deben tener en cuenta otros factores ambientales como el clima cálido y las horas de sol que presentan un impacto negativo en el aislamiento de *Salmonella* spp. [59, 60]. La ausencia de lluvias también presenta un impacto negativo debido a la limitada cantidad de escorrentías, el factor predominante en el transporte de bacterias de *Salmonella* spp. desde el punto de origen [60] Otro factor que se debe tener en cuenta es que *Salmonella* spp. puede no estar presente en el agua, pero sí en los sedimentos depositados, donde se ha demostrado que presenta una mayor tasa de supervivencia [61].

Por otro lado, la metodología permitió el aislamiento de posibles patógenos relevantes: *Providencia rettgeri*, *Pantoea* spp., *Citrobacter youngae*, *Enterobacter cloacae* y *Acinetobacter baumannii*. Estas bacterias pueden suponer una amenaza para la salud humana, siendo un riesgo para pacientes inmunodeprimidos, niños y personas de la tercera edad, causándoles enfermedades como bacteriemia, meningitis, neumonía, colangitis, enfermedades del tracto urinario y del torrente sanguíneo [62].

#### **4.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A $\beta$ -LACTÁMICOS Y CARBAPENÉMICOS A PARTIR DE MEDIOS SELECTIVOS**

Se aislaron un total de 126 cepas de las cuales 20 dieron resultado negativo para la prueba de la oxidasa, positivo en la prueba de la catalasa y fueron gramnegativas. Los 106 aislados restantes dieron positivo para la prueba de la oxidasa siendo descartadas para el análisis al no formar parte del grupo crítico en la lista actualizada de bacterias patógenas prioritarias (BPPL) por la OMS [16].

De estas 20 cepas 12 fueron aisladas de medio ESBL mostrando posible resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos mientras que las 8 restantes fueron aisladas de medio SC indicando posible resistencia a antibióticos carbapenémicos. La identificación fue llevada a cabo mediante tira API20E y por secuenciación del gen 16SrRNA para aquellas cepas dudosas. Los resultados de la identificación se muestran en la Tabla 8.

Del medio ESBL se aislaron aquellas cepas con posible resistencia a  $\beta$ -lactámicos. Pese a que primeramente se consiguieron aislar 62 cepas solamente 12 cumplieron las pruebas bioquímicas (negativo oxidasa, positivo catalasa y gramnegativas). De los 12 aislados 4 se identificaron como *E. coli*, 4 como *Stenotrophomonas maltophilia* 2 como *Serratia fonticola*, 1 como *Enterobacter cloacae* y 1 como *E. aerogenes*. Todos los aislados corresponden a la familia *Enterobacteriaceae* a excepción de *S. maltophilia* que pertenece a la familia de *Xanthomonadaceae*. Se aislaron 5 cepas del punto P7, 5 del punto P1 y 2 del punto P2, pudiendo relacionar de manera directa el número de *E. coli* de cada punto con el de aislados del medio ESBL. En otros estudios se ha demostrado el papel del agua como medio para la diseminación y transmisión de genes de resistencia, especialmente en la transmisión de genes de resistencia a  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, destacando *E. coli* como una de las especies más prevalentes entre los aislados con respecto a otras enterobacterias [65]. No obstante, se destaca en nuestro estudio la ausencia de géneros bacterianos de interés por su patogenicidad como *Klebsiella* sp., *Shigella* sp., *Citrobacter* sp. o *Chromobacterium* sp., géneros

observados en otros estudios de manera habitual y que representan de igual manera un riesgo para la salud humana. [66, 67]

**Tabla 8.** Identificación mediante API20E y por secuenciación de cepas aisladas de ESBL y SC

Código	API20E		Secuenciación	
	Especie	%ID	Especie	% ID
P1-1C7	<i>Serratia fonticola</i>	99,3	<i>S. fonticola</i>	99,4
P1-2C4	<i>S. maltophilia</i>	99,3		
P1-2C5	<i>E. aerogenes</i>	87		
P1-2C6	<i>S. maltophilia</i>	99,3		
P1-2C7	<i>S. fonticola</i>	91,8		
P2-2C4	<i>S. maltophilia</i>	99,3		
P2-2C5	<i>S. maltophilia</i>	99,3		
P3-1SC2	<i>Enterobacter asburiae</i>	67,4	<i>E. asburiae</i>	100
P3-1SC3	<i>E. asburiae</i>	67,4	<i>E. asburiae</i>	100
P3-1SC4	<i>E. asburiae</i>	67,4	<i>E. mori</i>	99
P3-2SC8	<i>E. cloacae</i>	93,5		
P3-2SC9	<i>E. cloacae</i>	93,5		
P4-1SC1	<i>E. asburiae</i>	67,4	<i>K. aerogenes</i>	100
P4-1SC2	<i>E. asburiae</i>	99,4	<i>Enterobacter</i> sp.	100
P4-1SC3	<i>E. asburiae</i>	95	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	100
P7-1C5	<i>E. coli</i>	94,6		
P7-1C6	<i>E. coli</i>	63,1		
P7-1C7	<i>E. coli</i>	63,1		
P7-2C11	<i>E. cloacae</i>	81,5		
P7-2C12	<i>E. coli</i>	81,4		

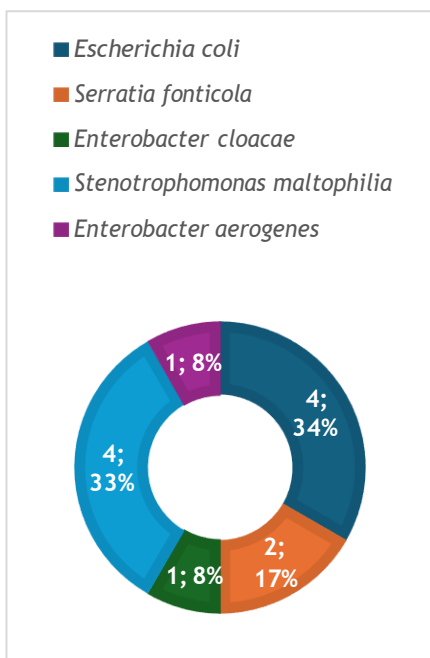
Las siglas en los códigos de las cepas significan P: punto de muestreo, C: Medio de asilamiento ESBL, SC: Medio de aislamiento SuperCARBA

Del medio SC se aislaron aquellas cepas resistentes a carbapenemes, de igual manera se consiguieron aislar 64 cepas de las cuales solamente 8 cumplieron las pruebas bioquímicas para seleccionarlas. De los 8 aislados 2 se identificaron con *Enterobacter asburiae*, 2 como *E. cloacae*, 1 como *E. mori*, 1 como *Klebsiella aerogenes*, 1 como *Enterobacter* spp. y 1 como *Leclercia adecarboxylata*, todas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. En cuanto al origen, 5 de las cepas provenían del punto P3 mientras que las 3 restantes del punto P4. En España, se ha visto en diferentes estudios que entre los productores de carbapenemasas más comunes en aguas de riego se encuentran *E. coli*, *E. cloacae* y diversas especies del género *Klebsiella* [68,69], lo cual concuerda con los hallazgos de este estudio. Sin embargo, destaca la ausencia de otros géneros en los que es frecuente encontrar cepas

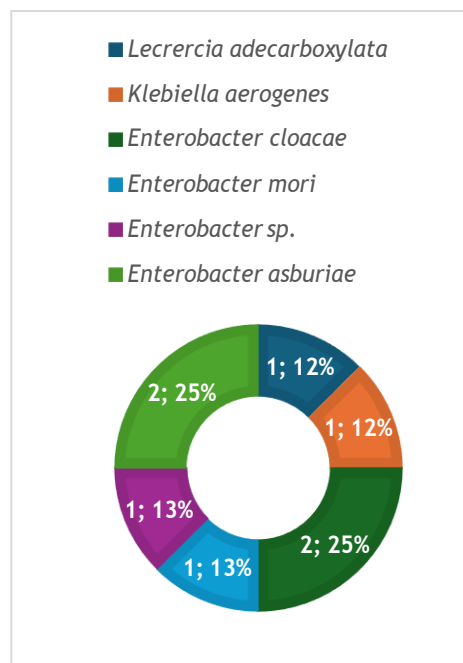
productoras de carbapenemasas, como *Citrobacter* y *Acinetobacter*, géneros ampliamente distribuidos en las aguas de Europa Occidental [68].

La ausencia de más géneros de interés en ambos medios podría estar relacionada con el origen del agua analizada. Estos géneros mencionados son más comúnmente encontrados en aguas no aptas para riego, como las provenientes de plantas de tratamiento y aguas contaminadas, las cuales han demostrado ser puntos críticos para la diseminación y crecimiento de bacterias resistentes [70, 71, 72, 73]. De todas las bacterias mencionadas solamente *E. coli* en algunos pocos casos puede llegar a ser patógena primaria, mientras que el resto son patógenos oportunistas que causan infecciones respiratorias y del tracto urinario a pacientes hospitalizados o inmunodeprimidos principalmente [74, 75, 76].

En las Figuras 4 y 5 se muestra la distribución de especies según medio de cultivo utilizado para su aislamiento.



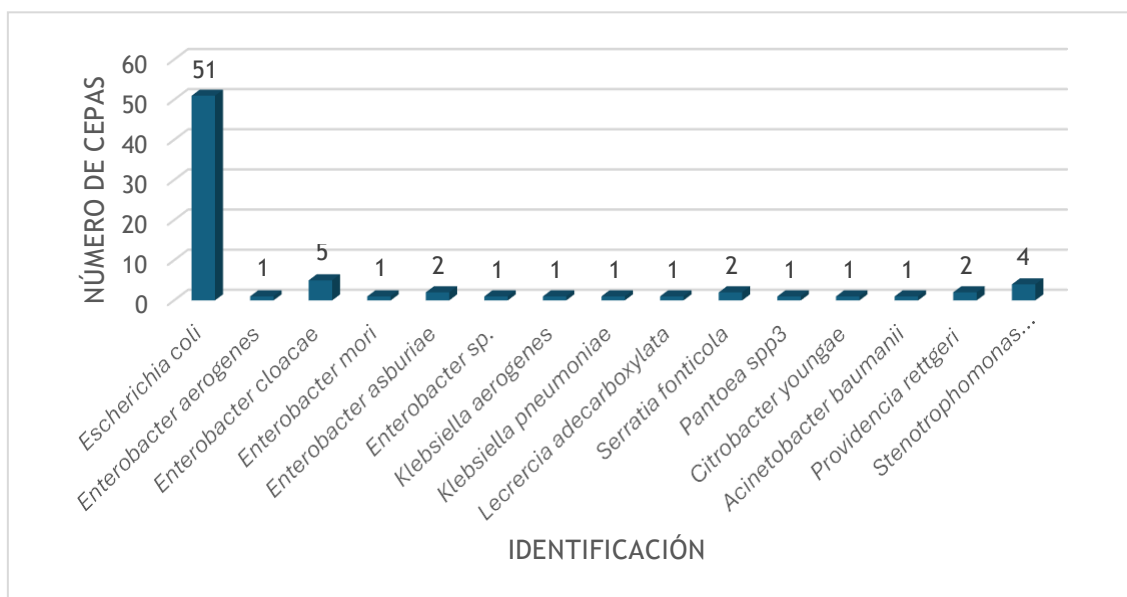
**Figura 4.** Cepas aisladas medio ESBL



**Figura 5.** Cepas aisladas medio SC

### 4.3 PREVALENCIA DE CEPAS AISLADAS DE LOS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS

De los 3 procedimientos se consiguieron aislar 75 cepas de 15 especies diferentes (Figura 6). Todas las especies a excepción de *S. maltophilia* pueden potencialmente formar parte del grupo crítico en la lista actualizada de bacterias patógenas prioritarias en 2024, el cual incluye *K. pneumoniae* y *A. baumannii* y enterobacterias resistentes a carbapenemes así como enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación (3GCRE) [77].



**Figura 6.** Identificación y distribución de especies aisladas por los 3 procedimientos de aislamiento.

Destacamos el aislamiento de *K. pneumoniae* al ser el patógeno que en 2024 se encuentra primero en la lista de prioridad en comparación con su quinto puesto en 2017. Por otro lado, pese a que *A. baumannii* ha bajado puestos en cuanto a prioridad de primero en 2017 a cuarto en 2024 continúa siendo un desafío global formidable debido a su virulencia, resistencia y sus elevadas tasas de mortalidad, siendo el principal patógeno en el sudeste asiático y este de Asia en cuanto a mortalidad atribuible a la resistencia microbiana [78]. Cabe destacar que de las cepas multirresistentes comentadas tanto *E. coli* como *K. pneumoniae* han sido causantes de más de 1,5 millones de muertes en todo el mundo [79].

En este estudio pese a que no se han identificado algunos de los géneros comunes a partir de los medios con antibióticos, se puede observar una mayor variabilidad en las especies potencialmente resistentes a antibióticos en comparación con estudios anteriores realizadas en diferentes tipos de agua. En un estudio en ríos del norte de España, se identificaron solo siete especies entre las 440 cepas aisladas, destacando *E. coli*, *S. fonticola* y *K. pneumoniae* como las más predominantes, mientras que *K. oxytoca*, *C. freundii*, *S. liquefaciens* y *Pseudomonas aeruginosa* estaban presentes en menor medida. En otro estudio de aguas grises de 2009, se aislaron 81 cepas de cuatro especies: *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, presentando el 86,7% multirresistencia [80, 81].

Estas diferencias en la variabilidad de las especies podrían deberse a la compleja mezcla de contaminantes y condiciones ambientales específicas de las acequias, que favorecen la proliferación de una amplia gama de microorganismos. El flujo irregular y la exposición a diversas fuentes de contaminación en las acequias contribuyen a la presencia y diversificación de bacterias multirresistente [82, 83].

#### 4.4 ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS AISLADOS

Se realizaron los antibiogramas de las 75 cepas según el apartado 3.6 de materiales y métodos, obteniéndose perfiles de resistencia a diferentes grupos de

antibióticos. El ensayo se realizó empleando 8 grupos de antibióticos según la clasificación de antibióticos de la OMS para evaluación y monitoreo de uso de 2021 [84]. Estos grupos fueron penicilinas (AMP, AMC), cefalosporinas de tercera generación (CTX, CTL, CAZ, CAL, CRO), cefalosporinas de cuarta generación (FEP, FEL), carbapenemes (MEM, IPM), quinolonas (NA, LEV, CIP), aminoglucósidos (CN), fenicoles (C) y tetraciclinas (TE).

De las 75 cepas solamente 2 fueron susceptibles a todos los antibióticos mientras que el resto presentaron resistencia frente al menos uno de los antibióticos testados.

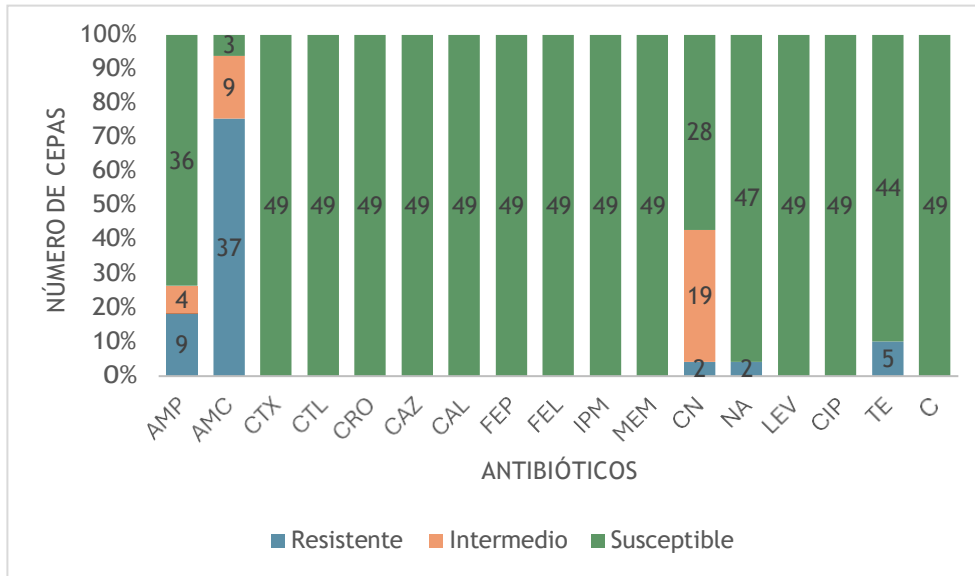
#### **4.4.1 Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados identificados como *E. coli***

Del protocolo de aislamiento de *E. coli* 47 cepas fueron confirmadas como *E. coli* y 2 fueron identificadas como *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. Se comprobó que el 75,5% de las cepas fueron resistentes a la AMC y el 18,3% a AMP. Además, se observó resistencia a TE en 5 cepas, a CN en 2 cepas y a NA en 2 cepas, como se detalla en la Figura 7. No se observaron diferencias significativas en el perfil de resistencias de las especies identificadas diferentes a *E. coli*.

A lo largo de los años, se ha comprobado que muchos géneros bacterianos presentan resistencia intrínseca a AMC y AMP, siendo *E. coli* uno de los géneros en los que aún se comprueba la eficacia de estos antibióticos [85]. En este contexto, destaca el alto número de cepas de *E. coli* que presentan resistencia a estas penicilinas, subrayando la importancia de un control adecuado de su uso y la necesidad de continuar desarrollando fármacos efectivos.

El ácido clavulánico se emplea como potenciador en el tratamiento de infecciones causadas por cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, ya que actúa como inhibidor de la producción de estas enzimas. Se observó un notable aumento en la resistencia a AMC en comparación con AMP. Este incremento puede atribuirse a que, dependiendo de la concentración de ácido clavulánico utilizada, este puede inducir la producción de  $\beta$ -lactamasas a través de genes inducibles, lo que reduce la eficacia del antibiótico [86]. Este parámetro se verificó en un estudio en Francia de 2004 donde se demostró que la frecuencia de susceptibilidad de *E. coli* a AMC estaba más influenciada por la metodología empleada (siendo la concentración de ácido clavulánico el parámetro principal) que por un problema de resistencia localizado [87]. No obstante, este incremento también se puede deber a que, en los últimos años, se ha reportado un aumento en el número de cepas de *E. coli* resistentes a AMC en diversas zonas de España, con un incremento de hasta el 3% (12% a 15%) en la proporción de aislamientos no susceptibles en un período de un año (2015-2016) [88].

Por tanto, el incremento en la resistencia a AMC puede atribuirse tanto a factores metodológicos en las pruebas de susceptibilidad como a un aumento en la proporción de bacterias no susceptibles en España.



**Figura 7.** Resistencia antimicrobiana de las cepas de *E. coli* (AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina con clavulánico; CTX: cefotaxima; CTL: cefotaxima con clavulánico; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CAL: ceftazidima con clavulánico; FEP: cefepima; FEL: cefepima con clavulánico; IPM: imipenem; MEM: meropenem; CN: gentamicina; NA: ácido nalidíxico; LEV: levofloxacino; CIP: ciprofloxacino; TE: tetraciclina; C: cloranfenicol).

#### 4.4.2 Aislados procedentes del análisis de *Salmonella*

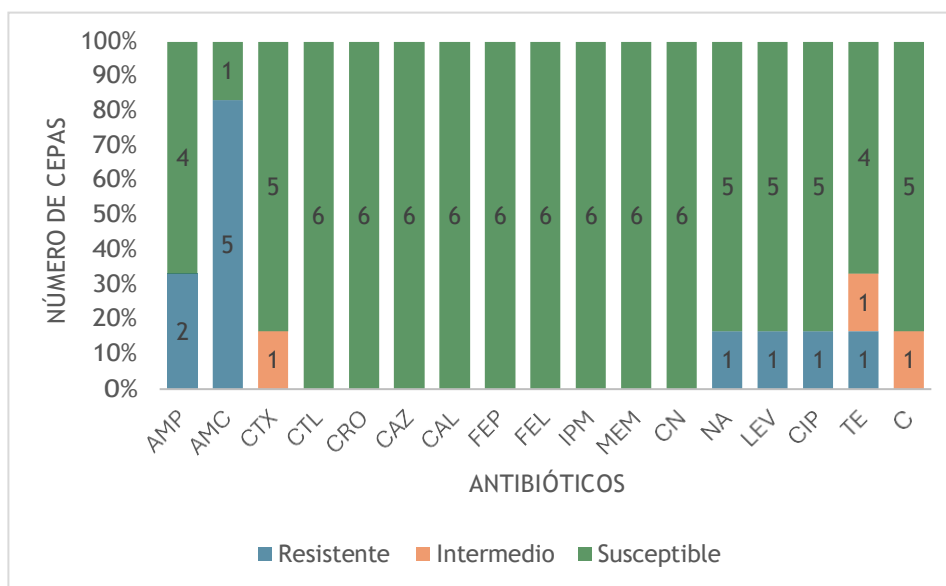
Tras comprobar que ninguna de las 6 cepas se identificaba como *Salmonella* spp. se procedió al estudio de susceptibilidad antimicrobiana de las mismas (Figura 8). Se observa que 5 de las cepas presentaban resistencia contra AMC, 2 contra AMP y 1 contra TE.

En la Tabla 9 se dispone, además, los perfiles de resistencia de las distintas cepas. Destaca la cepa correspondiente a *Pantoea* spp3 la cual presentaba además resistencia contra toda la familia de quinolonas (NA, LEV y CIP), por tanto, posiblemente esta bacteria presente alguna mutación en algún gen de la ADN girasa o la topoisomerasa IV [89]. La presencia de esta resistencia limita las opciones de tratamiento para esta bacteria oportunista rara y requiere la búsqueda de alternativas terapéuticas adecuadas.

**Tabla 9.** Patrones de resistencia de cepas aisladas del análisis de *Salmonella* spp.

Cepa	Patrón de resistencias
<i>P. rettgeri</i>	-
<i>Pantoea</i> spp3	AMC-NA-LEV-CIP
<i>C. youngae</i>	AMC-TE
<i>E. cloacae</i>	AMP-AMC
<i>A. baumannii</i>	AMC
<i>P. rettgeri</i>	AMP-AMC

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina con clavulánico; NA: ácido nalidíxico; LEV: levofloxacino; CIP: ciprofloxacino; TE: tetraciclina



**Figura 8.** Resistencias de cepas procedentes del análisis de *Salmonella* spp. (AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina con clavulánico; CTX: cefotaxima; CTL: cefotaxima con clavulánico; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CAL: ceftazidima con clavulánico; FEP: cefepima; FEL: cefepima con clavulánico; IPM: imipenem; MEM: meropenem; CN: gentamicina; NA: ácido nalidíxico; LEV: levofloxacino; CIP: ciprofloxacino; TE: tetraciclina; C: cloranfenicol)

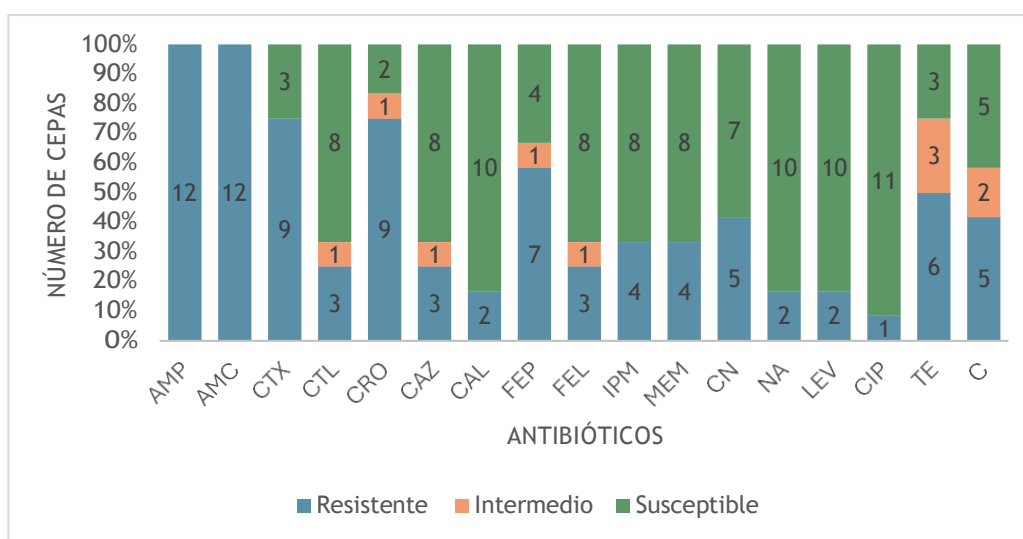
#### 4.4.3 Susceptibilidad antimicrobiana de cepas procedentes de medios con antibióticos

Del medio ESBL se aislaron cepas que potencialmente mostraban resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Los resultados del antibiograma se resumen en la Figura 9. Se observa una resistencia total a AMP y a AMC, lo que confirma la evolución de resistencias intrínsecas en cepas no identificadas como *E. coli*. Además, aproximadamente la mitad de las cepas mostraron resistencia a FEP, CN, TE y C, que corresponden a cuatro clases diferentes de antibióticos (cefalosporinas de cuarta generación, aminoglucósidos, tetraciclinas y fenicoles). Las quinolonas demostraron ser efectivas contra el 84% de las cepas, mientras que los carbapenémicos MEM y IPM tuvieron una actividad reducida, siendo efectivos solo contra el 66% de las cepas. Por otro lado las cefalosporinas de tercera generación tuvieron un porcentaje muy variable, habiendo un 75% de cepas resistentes a CTX y CRO pero solo un 25% resistentes a CAZ.

Estos porcentajes pueden variar significativamente dependiendo de la región y condiciones del estudio. Por ejemplo, en un estudio sobre agua potable en Bangladesh, todas las cepas confirmadas como ESBL mostraron resistencia a AMP, CTX y CAZ, pero solo un 22,7% fueron resistentes a FEP [90]. En contraste, un estudio en una planta de tratamiento de aguas de Sudáfrica encontró que el 100% de las cepas presuntamente productoras de ESBL eran resistentes a las penicilinas empleadas y a CTX [91], mientras que en otro estudio de aguas de riego de Alemania de 2018, todas las *E. coli* productoras de ESBL fueron resistentes a AMP, CTX, CAZ, CRO y FEP, mientras que solo un 50% presentaron resistencia a AMC [92].



En la evaluación de cepas productoras de ESBL mediante la adición de ácido clavulánico en combinación con antibióticos, se observó una mejora significativa en la actividad de ciertos agentes. Los datos muestran que la combinación de ácido clavulánico con cefalosporinas como cefotaxima (CTL) y cefepima (FEL) aumentó la tasa de cepas susceptibles, reduciendo el número de cepas resistentes de 9 a 3 y de 7 a 3, respectivamente, en comparación con CTX y FEP sin ácido clavulánico. De manera similar, para CAZ, el ácido clavulánico mejoró ligeramente la eficacia, convirtiendo una cepa resistente y una cepa intermedia en susceptibles. Estos resultados permiten identificar cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro y destacan que la adición de ácido clavulánico es efectiva para superar la resistencia mediada por estas enzimas en diferentes antibióticos, ampliando así su espectro de actividad y eficacia frente a infecciones resistentes [93].



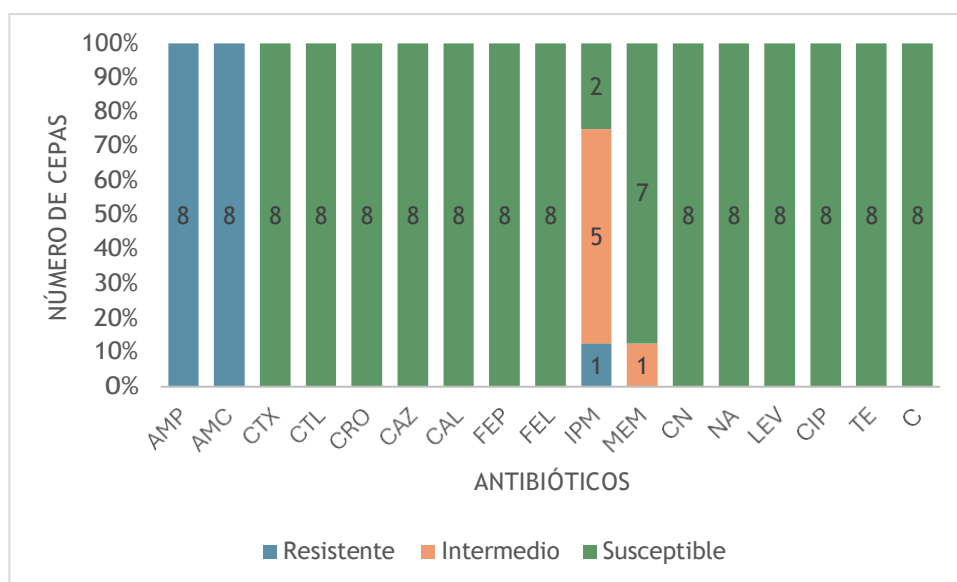
**Figura 9.** Resistencias de cepas aisladas del medio ESBL (AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina con clavulánico; CTX: cefotaxima; CTL: cefotaxima con clavulánico; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CAL: ceftazidima con clavulánico; FEP: cefepima; FEL: cefepima con clavulánico; IPM: imipenem; MEM: meropenem; CN: gentamicina; NA: ácido nalidíxico; LEV: levofloxacino; CIP: ciprofloxacino; TE: tetraciclina; C: cloranfenicol)

Por otro lado, del medio SC se aislaron cepas que potencialmente presentan resistencia a los antibióticos carbapenémicos. Los resultados del antibiograma se muestran en la Figura 10. Se observa una resistencia total a AMP y AMC. En contraste, para las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, los anfenicoles y las tetraciclinas, las cepas demostraron una susceptibilidad total, sugiriendo una alta efectividad de estos antibióticos.

Sin embargo, los carbapenémicos mostraron variabilidad en su eficacia. IPM presentó una eficacia moderada, con un 25% de cepas susceptibles y un 62,5% con susceptibilidad intermedia al antibiótico. Por otro lado, MEM demostró ser más efectivo, con un 87,5% de cepas susceptibles y solo un 12,5% con susceptibilidad intermedia. La mayor eficacia de MEM en comparación con el IPM se atribuye a su menor susceptibilidad a la hidrólisis por  $\beta$ -lactamasas, gracias a su estructura química más

resistente y su mejor capacidad para atravesar las membranas externas de las bacterias gramnegativas [94].

A pesar de la variabilidad observada, estos "antibióticos de última línea" siguen siendo altamente efectivos contra bacterias potencialmente resistentes. En otro estudio en los EE. UU., se encontró que el 96,1% de las cepas aisladas de agua superficial eran susceptibles a MEM, mientras que el 80% lo eran a IPM. Además, en un estudio realizado en un entorno hospitalario de 2022 en Taiwan, el 100% de las cepas fueron susceptibles al IPM, mientras que el 90% fueron susceptibles a MEM [95, 96], mientras que, en un estudio realizado con anterioridad en nuestro laboratorio sobre acequias de La Albufera en 2023, todas las cepas fueron susceptibles a IMP, y el 98% fueron susceptibles al MEM [97]. Por tanto, los carbapenémicos, aunque presentan cierta variabilidad en su eficacia, continúan siendo una opción clave en el tratamiento de infecciones por bacterias gramnegativas, especialmente en contextos donde otras opciones terapéuticas resultan ineficaces.



**Figura 10.** Resistencias de cepas aisladas de medio SuperCARBA (AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina con clavulánico; CTX: cefotaxima; CTL: cefotaxima con clavulánico; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CAL: ceftazidima con clavulánico; FEP: cefepima; FEL: cefepima con clavulánico; IPM: imipenem; MEM: meropenem; CN: gentamicina; NA: ácido nalidíxico; LEV: levofloxacino; CIP: ciprofloxacino; TE: tetraciclina; C: cloranfenicol)

Al analizar las cepas obtenidas de medios ESBL y SC en conjunto, se observó una gran variabilidad en la resistencia a las diferentes familias de antibióticos. El 100% de las cepas mostró resistencia a AMP y AMC, mientras que el 45% presentó resistencia a las cefalosporinas de tercera generación CTX y CRO. La resistencia a CAZ y CTL fue del 15%, y la resistencia a CAL alcanzó el 10%. En cuanto a los carbapenems, el 20% de las cepas fueron resistentes a IPM y el 25% a MEM. La resistencia a anfenicoles (C), y aminoglucósidos (CN) se mantuvo en un 25% para cada uno mientras que el 30% fue resistente a TE. En la familia de las quinolonas, el 10% mostró resistencia a LEV y NA,

mientras que solo el 5% fue resistente a CIP, siendo este el antibiótico menos frecuente en cuanto a resistencia. Finalmente, en las cefalosporinas de cuarta generación, el 35% de las cepas fueron resistentes a FEP y el 12% a FEL, destacando el aumento de la eficacia con la adición de ácido clavulánico.

#### 4.4.4 Perfiles de resistencia antibiótica del total de los aislados

Los resultados de la resistencia del total de los aislados se muestran en la Tabla 10. De las 75 cepas analizadas, 63 (84%) eran resistentes a al menos un antibiótico y entre todas las cepas, las que presentaron el mayor número de resistencias fueron 3 cepas aisladas del medio ESBL todas identificadas como *S. maltophilia*, procedentes del P1 y P2 con 13, 12 y 10 resistencias respectivamente. La mayor presencia de bacterias resistentes en los puntos P1 y P2 podría deberse a los efluentes urbanos, que contienen residuos de antibióticos provenientes de hogares, hospitales y otras fuentes en la ciudad. Aunque las plantas de tratamiento filtran muchos contaminantes, algunos residuos pueden persistir en el agua, favoreciendo la selección de bacterias resistentes que luego son transportadas hacia la Albufera donde se diluyen en la masa de agua. Por otro algunas cepas procedentes de P7 llegaron a presentar hasta 8 resistencias, que se podría vincular a un tratamiento de las aguas menos riguroso o a prácticas agrícolas intensivas como el uso extensivo de antibióticos en la ganadería al tratarse de una zona más rural o periurbana.

La resistencia más frecuente se observó para AMC, con un 84% de las cepas afectadas, seguida de AMP, que mostró resistencia en el 47% de las cepas. Es importante resaltar que los géneros *Providencia sp.*, *Acinetobacter sp.* y *Pantoea sp.* demostraron una completa susceptibilidad a AMP. La tercera resistencia más común fue a TE, con un 15%, debida principalmente al 16% de resistencia en *E. coli*. En cuanto a las cefalosporinas de tercera generación, se registró un 12% de resistencia para CTX y CRO, y un 4% para CAZ. Sin embargo, la adición de clavulánico redujo la resistencia a un 4% en CTL y a un 3% en CAL. Las cefalosporinas de cuarta generación mostraron un 7% de resistencia a FEP, la cual mejoró a un 4% con la adición de clavulánico en FEL. Solo *E. coli*, *Enterobacter sp.* y *Stenotrophomonas sp.* presentaron algún grado de resistencia a estos antibióticos. Para los carbapenémicos, la resistencia fue del 7% y 5% para IMP y MEM, respectivamente. Sin embargo, esta resistencia se debió casi exclusivamente a la completa resistencia de *Stenotrophomonas sp.* Por último, tanto C como CN mostraron un 7% de cepas resistentes, mientras que las quinolonas NA, LEV y CIP presentaron resistencias del 7%, 4% y 1% respectivamente. Es destacable que estas fueron completamente efectivas contra *Stenotrophomonas sp.*, con CIP siendo el antibiótico más eficaz, ya que solo una cepa aislada mostró resistencia a este.

En el estudio previo de la red de acequias de la Albufera, un año antes del presente análisis [97], se identificaron ocho perfiles de resistencia. Sin embargo, los porcentajes de resistencia obtenidos en ese estudio mostraron diferencias notables con respecto a los resultados actuales. En el estudio previo, el porcentaje de cepas resistentes fue superior, con un 95,5% de resistencia a AMP y un 90,9% a AMC. Además de una mayor resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, quinolonas, anfenicoles, tetraciclinas y aminoglucósidos en comparación con nuestro estudio. Estas diferencias podrían deberse a factores como variaciones climáticas, la frecuencia de

precipitaciones, los diferentes momentos de toma de muestra o la localización específica de las muestras [98, 99, 100, 101].

Al analizar las cepas individualmente, se observó que la cepa identificada como *K. pneumoniae* era susceptible a todos los antibióticos y que la cepa identificada como *A. baumannii* no presentaba resistencia a los carbapenemes ni a cefalosporinas de tercera generación, por lo que no se incluirían en la lista de patógenos priorizados para 2024. Sin embargo, cinco cepas deberían ser consideradas en la lista debido a su resistencia a cefalosporinas de tercera generación (CTX, CRO). Estas cepas fueron todas aisladas del medio ESBL, 4 identificadas como *E. coli* y 1 como *E. cloacae*.

En este análisis se identificaron 20 perfiles de resistencia distintos como se muestra en la Tabla 11. de los cuales 10 muestran multirresistencia, considerada esta como la resistencia a 3 o más clases de antibióticos [102]. De ellos, 4 perfiles presentaban resistencia a 5 clases de antibióticos, 5 perfiles a 4 clases y 1 a 3 clases. El porcentaje total de cepas multirresistentes fue del 13%. Todos los perfiles multirresistentes mostraron resistencia a al menos una penicilina y a una cefalosporina de tercera generación. Además, se observó que 4 de las 10 cepas (40%) presentaron resistencia a algún carbapenem. Así mismo, destaca, especialmente la resistencia a cefalosporinas de cuarta generación, a pesar de ser antibióticos de uso más reciente, presente en 7 de los perfiles. Estudios recientes de Japón e Irán han informado de un aumento en el número de aislados resistentes a la FEP, especialmente en hospitales [103, 104]. En uno de estos estudios se llegó a la conclusión que el uso de FEP para tratar infecciones causadas por organismos gramnegativos multirresistentes no era recomendable. El mismo estudio sugiere que los carbapenemes podría ser una opción terapéutica más eficaz y segura. [104, 105]

Entre los perfiles no multirresistentes destaca el perfil AMP-AMC con un 21,3% de y la combinación de AMP-AMC-TE que estuvo presente en el 4% de las cepas.

**Tabla 10.** Incidencia de resistencias a antibióticos en las cepas, agrupadas por género.

	Nº cepas	% aislados resistentes																
		AMP	AMC	CTX	CTL	CRO	CAZ	CAL	FEP	FEL	IPM	MEM	CN	NA	LEV	CIP	TE	C
<i>E. coli</i>	51	31	80	8	0	8	0	0	4	0	0	0	3	8	2	2	16	3
<i>Enterobacter sp</i>	10	100	100	10	0	10	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	10
<i>Klebsiella sp.</i>	2	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia sp.</i>	2	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter sp.</i>	1	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pantoea sp.</i>	1	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0
<i>Leclercia sp.</i>	1	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acinetobacter sp.</i>	1	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	4	100	100	100	75	100	50	50	100	75	100	100	50	0	0	0	25	50
<i>Providencia sp.</i>	2	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0
Total	75	47	84	12	4	12	4	3	7	4	7	5	7	7	4	1	15	7

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina con clavulánico; CTX: cefotaxima; CTL: cefotaxima con clavulánico; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CAL: ceftazidima con clavulánico; FEP: cefepima; FEL: cefepima; IPM: imipenem; MEM: meropenem; CN: gentamicina; NA: ácido nalidíxico; LEV: levofloxacino; CIP: ciprofloxacino; TE: tetraciclina; C: cloranfenicol

**Tabla 11.** Perfiles de resistencia de las cepas

Perfil de resistencia	N.º de cepas	Punto de muestreo
AMP	1	P7
AMC	26	Todos
CN	1	P5
AMP-AMC	16	P1, P2, P3, P4 P6
AMC/TE	2	P2, P7
AMC/CN	1	P3
AMP-AMC/TE	3	P1, P4, P7
AMP-AMC/LEV	1	P1
AMP-AMC/IPM	1	P4
AMC/NA-LEV-CIP	1	P1
AMC/NA/TE	1	P1
AMP-AMC/CTX-CRO/CN/TE/C	1	P7
AMP-AMC/CTX-CRO-FEP/NA/TE	1	P7
AMP-AMC/CTX-CRO-FEP/CN/TE/C	1	P7
AMP-AMC/CTX-CRO/NA-LEV-CIP/TE	1	P7
AMP-AMC/CTX-CRO-FEP-FEL/IPM-MEM/CN	1	P2
AMP-AMC/CTX-CRO-CTL-FEP/IPM-MEM/CN/C	1	P2
AMP-AMC/CTX-CRO-CAZ- FEP /CN/TE	1	P7
AMP-AMC/CTX-CRO-CAZ-CTL-CAL-FEP-FEL/ IPM-MEM/TE/C	1	P1
AMP-AMC/CTX-CRO-CAZ-CTL-CAL-FEP-FEL/IPM-MEM/CN	1	P1

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina con clavulánico; CTX: cefotaxima; CTL: cefotaxima con clavulánico; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CAL: ceftazidima con clavulánico; FEP: cefepima; FEL: cefepima; IPM: imipenem; MEM: meropenem; CN: gentamicina; NA: ácido nalidíxico; LEV: levofloxacino; CIP: ciprofloxacino; TE: tetraciclina; C: cloranfenicol

#### 4.5. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Se realizaron PCRs multiplex para detectar genes de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>), carbapenémicos (*bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>) y quinolonas (*qnrA*, *qnrS*, *qnrB*) a partir del ADN extraído de las cepas. De las 75 cepas estudiadas, 53 presentaron al menos un gen de resistencia, destacando que se consiguieron detectar todos los genes estudiados, como se detalla en la Tabla 12. El gen *bla*<sub>TEM</sub> fue el más común, presente en el 32% de las cepas, seguido por el gen *bla*<sub>CMY</sub>, encontrado en el 27% de las mismas. El gen de resistencia a quinolonas *qnrS* se detectó en el 20% de las cepas, seguido por el gen *qnrB* en el 17%. Los genes de carbapenemasas *bla*<sub>OXA</sub> y *bla*<sub>IMP</sub> se hallaron en el 13% y 7% de las cepas, respectivamente. El gen *qnrA* se encontró en el 5% de las cepas, y los genes *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> en el 3%. Finalmente, el gen *bla*<sub>VIM</sub> se detectó en el 1% de las cepas.

El análisis estadístico mostró relación de dependencia entre la presencia de los genes *bla<sub>IMP</sub>*, y *bla<sub>OXA</sub>* y *qnrS* con el punto de muestreo, siendo significativamente mayor en los puntos de muestreo P5, y P1 respectivamente. Coincidiendo nuevamente con puntos donde las acequias drenan hasta la laguna y haya más presencia de bacterias resistentes.

En el análisis de las cepas (Tabla 13), se observó que el 52,2% presentaba genes de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, el 24% mostraba resistencia a carbapenemes y el 40% tenía genes de resistencia a quinolonas. Estos datos son consistentes con estudios previos realizados en aguas de riego [109]), donde se identificó una prevalencia similar de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos y carbapenemes. Sin embargo, en esos estudios previos la resistencia a quinolonas se registraba en un 13%, mientras que en el presente análisis se observa un incremento significativo, alcanzando el 40%. Los estudios más recientes han señalado que los ambientes acuáticos, especialmente aquellos afectados por vertidos, son críticos para la transferencia de resistencia a quinolonas. Este aumento en la prevalencia de genes de resistencia a quinolonas podría estar relacionado con la influencia de estos entornos contaminados en la propagación de dicha resistencia [106].

El momento y el punto de toma de muestras son factores cruciales en el estudio de genes de resistencia. En un estudio realizado en las aguas de riego de La Albufera en 2021, se encontró que hasta el 96% de las cepas de *E. coli* presentaban el gen *bla<sub>TEM</sub>*, y el 21,6% contenía el gen *qnrS* [97]. Por otro lado, en un análisis de vegetales frescos en Valencia, los genes más comunes fueron *bla<sub>VIM</sub>* y *bla<sub>IMP</sub>*, que en el presente estudio son menos frecuentes [107]. Además, en un estudio de muestras clínicas en Arabia Saudita, el gen *bla<sub>TEM</sub>* fue el más prevalente, encontrándose en el 84,7% de las cepas, mientras que el gen *bla<sub>OXA</sub>* fue el menos frecuente, presente solo en el 1,4% de las cepas [108]. Esta variabilidad en los genes de resistencia observada en diferentes estudios y ambientes destaca la importancia de considerar tanto el contexto ambiental como el momento de la toma de muestras en la evaluación de genes de resistencia a antibióticos.

Aunque 22 cepas dieron resultados negativos para todos los genes estudiados, aún podrían mostrar resistencia a los antibióticos que se probaron. Esto puede deberse a que podrían portar genes de resistencia que no se evaluaron en este estudio, o bien a que utilizan mecanismos distintos para resistir los antibióticos, como bombas de eflujo, una absorción limitada del medicamento o modificaciones en el objetivo de este [33].

#### **4.6 PERFILES GENÉTICOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

Tras el análisis individual de la resistencia se procedió a realizar el análisis de los diferentes perfiles de resistencia en base a los datos obtenidos de la PCRm como se detalla en la Tabla 14.

**Tabla 12.** Incidencia de genes de resistencia en las cepas aisladas

	N° cepas	N° cepas positivas (%)									
		<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
<b>P1</b>	19	8 (42,1)	2 (10,5)	8 (42,1)	0	7(36,8)	0	0	2 (10,5)	3 (15,8)	7 (36,8)
<b>P2</b>	14	3 (21,4)	0	1 (7,1)	1 (7,1)	0	0	0	1 (7,1)	3 (21,4)	0
<b>P3</b>	12	7 (58,3)	0	2 (16,7)	0	1 (8,3)	0	1 (8,3)	0	2 (16,7)	4 (33,3)
<b>P4</b>	13	1 (7,7)	0	4 (30,8)	1 (7,7)	1 (7,7)	1 (7,7)	1 (7,7)	0	1 (7,7)	1 (7,7)
<b>P5</b>	8	3 (37,5)	0	3 (37,5)	3 (37,5)	1 (12,5)	0	0	1 (12,5)	4 (50,0)	4 (50,0)
<b>P6</b>	4	1 (25,0)	0	1 (25,0)	0	0	0	0	0	0	0
<b>P7</b>	5	1 (20,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	75	24 (32,0)	3 (4,0)	20 (26,7)	5 (6,7)	10 (13,3)	1 (1,3)	2 (2,6)	4 (5,2)	13 (17,3)	15 (20,0)
	$\chi^2$	9,497	7,566	6,370	15,107	13,248	4,834	4,119	3,835	8,887	18,385
	$p$	0,147	0,2717	0,3831	0,0194	0,0393	0,5653	0,6605	0,6990	0,1800	0,0053

**Tabla 13.** Incidencia de genes de resistencia por familias de antibióticos

Cepas positivas	Genes de resistencia por familias		
	$\beta$ -lactámicos	Carbapenemes	Quinolonas
N°	39	18	30
%	52	24	40



Se obtuvieron 31 perfiles de resistencia diferentes siendo los más frecuentes los genes de resistencia aislados *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *qnrB*, no obstante, hay que destacar 4 combinaciones que se catalogarían como multirresistentes al presentar los 3 tipos diferentes de genes de resistencia, estas cuatro combinaciones serían *bla*<sub>CMY</sub>-*bla*<sub>OXA</sub>-*qnrS*, *bla*<sub>TEM</sub>-*bla*<sub>OXA</sub>-*qnrA-qnrS*, *bla*<sub>SHV</sub>-*bla*<sub>CMY</sub>-*bla*<sub>OXA</sub>-*qnrA*, *bla*<sub>TEM</sub>-*bla*<sub>CMY</sub>-*bla*<sub>OXA</sub>-*qnrS*. Estas cuatro cepas multirresistentes procederían de P4 y P7 identificándose todas como *E. coli* a través del aislamiento en TBX y la prueba del Indol, evidenciando así que *E. coli* es una fuente significativa de genes de resistencia en la actualidad [109]. Esto se corrobora en un estudio previo de Singapur de 2018, donde se identificó una prevalencia mayor en aguas superficiales para los genes de β-lactamasas *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>OXA</sub> en *E. coli* en comparación con otras fuentes de agua [110] mientras que en otro estudio en ríos de la India detectó la presencia de hasta 6 genes diferentes de resistencia a quinolonas y 7 genes de β-lactámicos en diferentes aislados de *E. coli* [111]. Asimismo, se puede destacar una cepa procedente de P6 también identificada como *E. coli* que presenta los 3 genes de resistencia de β-lactámicos *bla*<sub>TEM</sub>- *bla*<sub>SHV</sub>-*bla*<sub>CMY</sub>.

Destaca que pese al gran número de perfiles genéticos obtenidos, una gran parte de las cepas, presentaban susceptibilidad contra los antibióticos del ensayo previo contra los cuales deberían presentar resistencia según su perfil genético, especialmente con respecto a las quinolonas y carbapenemes. La discrepancia entre un gen positivo y un fenotipo negativo puede deberse a mutaciones o cambios en los reguladores genéticos, a mutaciones en el propio gen de resistencia o a la presencia de reguladores alternativos entre otros [112].

En los últimos años se ha producido un aumento significativo en la presencia de bacterias portadoras de genes de resistencia a diferentes grupos de antibióticos, destacando especialmente la combinación de genes de β-lactamasas y carbapenemasas. [113, 114]. Es probable que esta tendencia hacia el incremento de genes de resistencia continúe en el futuro, lo que complicará aún más el tratamiento de infecciones y amenazará la eficacia de los antibióticos disponibles actualmente.

**Tabla 14.** Perfiles de genes de resistencia en las cepas estudiadas.

Grupos de genes	Patrón de resistencias	Nºde cepas	Punto de muestreo
<b>β-lactámicos</b>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	8	P1, P2, P5, P7
	<i>bla</i> <sub>CMY</sub>	4	P1, P2, P5, P7
	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> - <i>bla</i> <sub>CMY</sub>	1	P7
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>bla</i> <sub>SHV</sub> - <i>bla</i> <sub>CMY</sub>	1	P6
<b>Carbapenemes</b>	<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	1	P7
	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	2	P1, P4
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	1	P2
<b>Quinolonas</b>	<i>qnrA</i>	1	P1
	<i>qnrB</i>	3	P1, P2
	<i>qnrS</i>	2	P2, P7
	<i>qnrB</i> - <i>qnrS</i>	1	P4
<b>β-lactámicos + Carbapenemes</b>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>bla</i> <sub>OXA</sub>	2	P2, P7
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>bla</i> <sub>IMP</sub>		P3
	<i>bla</i> <sub>CMY</sub> - <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	1	P3
	<i>bla</i> <sub>CMY</sub> - <i>bla</i> <sub>OXA</sub> - <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	1	P3
<b>β-lactámicos + Quinolonas</b>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrB</i>	3	P1, P2, P7
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	3	P2, P7
	<i>bla</i> <sub>CMY</sub> - <i>qnrB</i>	1	P3
	<i>bla</i> <sub>CMY</sub> - <i>qnrS</i>	2	P3, P4
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>bla</i> <sub>CMY</sub> - <i>qnrB</i>	1	P4
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>bla</i> <sub>CMY</sub> - <i>qnrS</i>	2	P4
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrB</i> - <i>qnrS</i>	1	P7
	<i>bla</i> <sub>CMY</sub> - <i>qnrA</i> - <i>qnrS</i>	1	P7
	<i>bla</i> <sub>CMY</sub> - <i>qnrB</i> - <i>qnrS</i>	1	P7
<b>Carbapenemes + Quinolonas</b>	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> - <i>qnrS</i>	1	P7
	<i>bla</i> <sub>IMP</sub> - <i>qnrB</i>	2	P4
<b>β-lactámicos + Carbapenemes + Quinolonas</b>	<i>bla</i> <sub>CMY</sub> - <i>bla</i> <sub>OXA</sub> - <i>qnrS</i>	1	P7
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>bla</i> <sub>OXA</sub> - <i>qnrA</i> - <i>qnrS</i>	1	P4
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>bla</i> <sub>CMY</sub> - <i>bla</i> <sub>OXA</sub> - <i>qnrS</i>	1	P7
	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> - <i>bla</i> <sub>CMY</sub> - <i>bla</i> <sub>OXA</sub> - <i>qnrA</i>	1	P7

## 5. CONCLUSIONES

La calidad higiénico-sanitaria del agua de las acequias de la Albufera es adecuada para regadío, según los estándares internacionales como los de la USEPA. No obstante, la muestra P7 de febrero procedente del municipio de Meliana no cumple estos estándares, posiblemente debido a una contaminación de las aguas por prácticas agrícolas o factores externos.

A pesar de que todas las muestras analizadas contenían *E. coli*, los niveles de estos son más bajos en comparación con aguas de regadío de otros estudios, no obstante, factores ambientales como el clima y la escasez de lluvias pueden influir en la presencia y cantidad de microorganismos patógenos, por tanto, es necesario una vigilancia constante para garantizar la calidad sanitaria del agua en todo momento.

Aunque no se detectó *Salmonella* spp. en las muestras, la identificación de otras bacterias patógenas oportunistas como *Providencia rettgeri* y *Citrobacter youngae* es un potencial riesgo para la salud especialmente en poblaciones vulnerables.

El análisis de las cepas aisladas en medios selectivos para  $\beta$ -lactámicos y carbapenémicos ha mostrado una notable presencia de bacterias potencialmente resistentes, predominando las especies *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y *Enterobacter* spp.. La presencia de estas especies subraya la importancia de continuar el monitoreo y análisis de las bacterias en el agua, especialmente en sistemas de riego. Por otro lado, las características específicas del agua analizada como el origen y el tratamiento de la misma se pueden relacionar con la ausencia de ciertos géneros que no se aislaron de estos medios.

El estudio de susceptibilidad antimicrobiana reveló una alta prevalencia de resistencia a varios antibióticos en las cepas analizadas. Se observó un aumento significativo en la resistencia a amoxicilina/clavulánico y a cefalosporinas, especialmente a las de tercera y cuarta generación sin clavulánico. Aunque la resistencia a los carbapenémicos muestra cierta variabilidad, estos antibióticos siguen siendo en general efectivos, destacando el meropenem por su alta eficacia contra el 95% de las cepas. Además, el ciprofloxacino demostró ser el antibiótico más eficaz, con solo una cepa resistente al mismo.

El análisis de perfiles de resistencia mostró una elevada multiresistencia en ciertas cepas, no obstante, se destaca la importancia de ciertos factores locales y condiciones ambientales en la correcta evaluación de resistencias.

El estudio de los genes de resistencia a antibióticos en las cepas ha revelado una alta prevalencia de genes de  $\beta$ -lactamasas como *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CMY</sub>, y de genes de resistencia a quinolonas, destacando *qnrS* y *qnrB*. Aunque la presencia de genes de carbapenemasas es menor, sigue siendo un área de preocupación sanitaria.

La detección de cepas de *E. coli* con múltiples genes de resistencia indica un desafío para el control de infecciones. La variabilidad en los perfiles genéticos obtenidos subraya la importancia de un monitoreo continuo para abordar la creciente amenaza de microorganismos resistentes.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Conselleria de Medi Ambient, Aigua, Infraestructures i Territori. (s.f.). *Història i usos tradicionals PN L'Albufera*. Logo PN L'Albufera. Recuperado de <https://parquesnaturales.gva.es/va/web/pn-l-albufera/historia>
- [2] Direcció General de Medi Natural i d'Avaluació Ambiental. (s.f.). *Manejo de niveles del lago de l'Albufera*. CIUTAT ADMINISTRATIVA 9 D'OCTUBRE – TORRE 1. Recuperado de <http://www.conselleria-mediambient.com/manejo-lago-albufera>
- [3] Iversen, C. (2014). Electrical techniques. En C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed., pp. 653-658). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00095-1>
- [4] Guglielmetti, P., & Bartoloni, A. (2003). *Escherichia coli*: Occurrence and epidemiology of species other than *Escherichia coli*. En B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd ed., pp. 2162-2166). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00414-4>.
- [5] Holcomb, D. A., Stewart, J. R. (2020). Microbial Indicators of Fecal Pollution: Recent Progress and Challenges in Assessing Water Quality. *Current Environmental Health Reports*, 7(3), 311–324. <https://doi.org/10.1007/s40572-020-00278-1>
- [6] Khan, F., & Gupta, R. (2020). *Escherichia coli (E. coli) as an indicator of fecal contamination in groundwater: A review*. En H. Y. Jeon (Ed.), *Sustainable development of water and environment* (pp. 225-235). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-45263-6\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45263-6_21)
- [7] Hernández-Vásquez, A., Visconti-Lopez, F. J., & Vargas-Fernández, R. (2022). *Escherichia coli* contamination of water for human consumption and its associated factors in Peru: A cross-sectional study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 108(1), 187–194. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.22-0240>
- [8] Centers for Disease Control and Prevention. (2023). *Kinds of E. coli*. CDC. Recuperado de <https://www.cdc.gov/ecoli/about/kinds-of-ecoli.html>
- [9] Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C. L., Reid-Smith, R., Janecko, N., Lim, H., Nicholson, V., McEwen, S. A., Friendship, R., & Archambault, M. (2005). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6753–6761. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6753-6761.2005>
- [10] Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., & Tandoi, V. (2012). Salmonella in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International*, 45(2), 587–602. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.037>
- [11] World Health Organization. (2023, November 21). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- [12] Rodríguez, E. A., & Jiménez-Quiceno, J. N. (2023). Resistencia bacteriana a antibióticos en ambientes acuáticos: Origen e implicaciones para la salud pública. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 41(3), 45–60. <https://doi.org/10.1234/rfnsp.2023.1535274>
- [13] World Bank. (2017, March). *Drug-resistant infections: A threat to our economic future*. <https://www.worldbank.org/en/topic/health/publication/drug-resistant-infections-a-threat-to-our-economic-future>
- [14] Bharadwaj, A., Rastogi, A., Pandey, S., Gupta, S., & Sohal, J. S. (2022). Multidrug-resistant bacteria: Their mechanism of action and prophylaxis. *BioMed Research International*, 2022, 5419874. <https://doi.org/10.1155/2022/5419874>
- [15] Gall, E., Long, A., & Hall, K. K. (2020). Infections due to other multidrug-resistant organisms. En K. K. Hall, S. Shoemaker-Hunt, L. Hoffman, & al. (Eds.), *Making healthcare safer III: A critical analysis of existing and emerging patient safety practices* [Internet]. Agency for Healthcare Research and Quality. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555533/>
- [16] World Health Organization. (2024, May 17). *WHO updates list of drug-resistant bacteria most threatening to human health*. <https://www.who.int/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>
- [17] Blaak, H., de Kruijff, P., Hamidjaja, R. A., van Hoek, A. H., de Roda Husman, A. M., & Schets, F. M. (2014). Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Veterinary Microbiology*, 171(3-4), 448–459. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.007>

- [18] Servais, P., & Passerat, J. (2009). Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of the Total Environment*, 408, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.09.037>
- [19] Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4, 90–101.
- [20] Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 33(3), 300–305. [https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP\\_349\\_15](https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15)
- [21] Bui, T., Patel, P., & Preuss, C. V. (2024, February 17). Cephalosporins. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>
- [22] Pandey, N., & Cascella, M. (2023, June 4). Beta-lactam antibiotics. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>
- [23] Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
- [24] Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: The versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440–458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
- [25] Khanna, N. R., & Gerriets, V. (2022, September 26). Beta-lactamase inhibitors. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557592/>
- [26] *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. (2012). National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.
- [27] Yoneyama, H., & Katsumata, R. (2006). Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(5), 1060–1075. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.1060>
- [28] Shutter, M. C., & Akhondi, H. (2023, June 5). Tetracycline. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549905/>
- [29] Yan, A., & Bryant, E. E. (2023, May 22). Quinolones. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557777/>
- [30] Walker, R. C. (1999). The fluoroquinolones. *Mayo Clinic Proceedings*, 74(10), 1030–1037. <https://doi.org/10.4065/74.10.1030>
- [31] Fernández-Villa, D., Aguilar, M. R., & Rojo, L. (2019). Folic acid antagonists: Antimicrobial and immunomodulating mechanisms and applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 4996. <https://doi.org/10.3390/ijms20204996>
- [32] Martínez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
- [33] Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- [34] Lambert, P. A. (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), 46S–54S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.s1.12.x>
- [35] Pfeifer, Y., Cullik, A., & Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 300(6), 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.005>
- [36] Bush, K., & Bradford, P. A. (2016).  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- [37] Blair, J. M., Richmond, G. E., & Piddock, L. J. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future microbiology*, 9(10), 1165–1177. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.66>
- [38] He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R., Zhang, X., & Li, X. (2020). Antibiotic resistance genes from livestock waste: Occurrence, dissemination, and treatment. *npj Clean Water*, 3, 4. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0051-0>
- [39] Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B. A., & Leung, K. Y. (2021). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 285, 117402. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>

- [40] Bajpai, T., Pandey, M., Varma, M., & Bhatambare, G. S. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M beta-lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna Journal of Medicine*, 7(1), 12–16. <https://doi.org/10.4103/2231-0770.197508>
- [41] Heider, L. C., Hoet, A. E., Wittum, T. E., Khaitsa, M. L., Love, B. C., Huston, C. L., Morley, P. S., Funk, J. A., & Gebreyes, W. A. (2009). Genetic and phenotypic characterization of the bla(CMY) gene from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals, humans, the environment, and retail meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(10), 1235–1240. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0294>
- [42] Han, R., Shi, Q., Wu, S., Yin, D., Peng, M., Dong, D., Zheng, Y., Guo, Y., Zhang, R., Hu, F., & China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) Study Group. (2020). Dissemination of carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) among carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from adult and children patients in China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, Article 314. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00314>
- [43] Macesic, N., Hawkey, J., Vezina, B., Wisniewski, J. A., Cottingham, H., Blakeway, L. V., Harshegyi, T., Pragastis, K., Badoordeen, G. Z., Dennison, A., Spelman, D. W., Jenney, A. W. J., & Peleg, A. Y. (2023). Genomic dissection of endemic carbapenem resistance reveals metallo-beta-lactamase dissemination through clonal, plasmid and integron transfer. *Nature Communications*, 14, Article 4764. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39553-x>
- [44] Jacoby, G. A., Strahilevitz, J., & Hooper, D. C. (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology Spectrum*, 2(5), Article PLAS-0006-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013>
- [45] Organización Mundial de la Salud. (2023, 23 de octubre). *Una sola salud*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/one-health>
- [46] Organización de las Naciones Unidas. (n.d.). *Los 17 objetivos de desarrollo sostenible*. <https://sdgs.un.org/goals>
- [47] Real Decreto 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro. (2023). *Boletín Oficial del Estado*, núm. 9, 4253-4354. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2023/01/10/3>
- [48] 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>
- [49] 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>
- [50] 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>
- [51] Blumenthal, U., Mara, D., Peasey, A., Palacios, G., & Stott, R. (2000). Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(10), 1104-1116.
- [52] Alcalde-Sanz, L., & Gawlik, B. M. (2017). *Minimum quality requirements for water reuse in agricultural irrigation and aquifer recharge: Towards a legal instrument on water reuse at EU level* (EUR 28962 EN). Publications Office of the European Union. <https://doi.org/10.2760/804116>
- [53] Aquí tienes la referencia en formato APA para el documento que mencionas: Castillo Navarro, D. G. (2018). *Escherichia coli* en aguas de riego: Optimización del aislamiento mediante cultivo y detección por PCR. <http://hdl.handle.net/10251/109090>
- [54] Rusiñol, M., Hundesa, A., Cárdenas-Youngs, Y., Fernández-Bravo, A., Pérez-Cataluña, A., Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Calvo, M., Alonso, J. L., Figueras, M. J., Araujo, R., Bofill-Mas, S., & Girones, R. (2020). Microbiological contamination of conventional and reclaimed irrigation water: Evaluation and management measures. *Science of The Total Environment*, 710, 136298. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136298>
- [55] Ministry for the Environment. (2017). *Swimming categories for E. coli in the Clean Water package: A summary of the categories and their relationship to human health risk from swimming*. Wellington: Ministry for the Environment.



- [56] Palop Guillem, S. F. (2015). *Procesos ecológicos, agronómicos y ambientales en el humedal de l'Albufera de Valencia: Construcción de escenarios de futuro* (Tesis doctoral). Departamento de Producción Vegetal y Ecosistemas Agroforestales, Universitat Politècnica de València.
- [57] Montero, L., Irazabal, J., Cardenas, P., Graham, J. P., & Trueba, G. (2021). Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from irrigation waters and produce in Ecuador. *Frontiers in Microbiology*, 12, 709418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709418>
- [58] Lu, L., Hume, M. E., Sternes, K. L., & Pillai, S. D. (2004). Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates in irrigation water and associated sediments: Implications for source tracking. *Water Research*, 38(18), 3899-3908. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.020>
- [59] Ali, A. S., Gari, S. R., Goodson, M. L., Walsh, C. L., Dessie, B. K., & Ambelu, A. (2023). Fecal Contamination in the Wastewater Irrigation System and its Health Threat to Wastewater-Based Farming Households in Addis Ababa, Ethiopia. *Environmental health insights*, 17, 11786302231181307. <https://doi.org/10.1177/11786302231181307>
- [60] Billah, M. M., & Rahman, M. S. (2024). Salmonella in the environment: A review on ecology, antimicrobial resistance, seafood contaminations, and human health implications. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 13, 100407. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2024.100407>
- [61] Simental, L., & Martinez-Urtaza, J. (2008). Climate patterns governing the presence and permanence of salmonellae in coastal areas of Bahia de Todos Santos, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 5918–5924. <https://doi.org/10.1128/AEM.01139-08>
- [62] Moriñigo, M. A., Muñoz, M. A., Martínez-Manzanares, E., Sánchez, J. M., & Borrego, J. J. (1993). Laboratory study of several enrichment broths for the detection of *Salmonella* spp., particularly in relation to water samples. *The Journal of Applied Bacteriology*, 74(3), 330–335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03033.x>
- [63] Hendricks, C. W. (1971). Increased recovery rate of *Salmonella* from stream bottom sediments versus surface waters. *Applied Microbiology*, 21(2), 379–380. <https://doi.org/10.1128/am.21.2.379-380.1971>
- [64] Viñuela González, L. (2022). Human pathogenic *Enterobacterales*. In N. Rezaei (Ed.), *Encyclopedia of infection and immunity* (pp. 628–636). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00160-9>
- [65]. Haque, A., Yoshizumi, A., Saga, T., Ishii, Y., & Tateda, K. (2014). ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in environmental water in Dhaka, Bangladesh. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 20(11), 735–737. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.07.003>
- [66]. Tissera, S., & Lee, S. M. (2013). Isolation of Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) Producing Bacteria from Urban Surface Waters in Malaysia. *The Malaysian journal of medical sciences : MJMS*, 20(3), 14–22.
- [67]. De Boeck, H., Miwanda, B., Lunguya-Metila, O., Muyembe-Tamfum, J. J., Stobberingh, E., Glupczynski, Y., & Jacobs, J. (2012). ESBL-positive Enterobacteria isolates in drinking water. *Emerging infectious diseases*, 18(6), 1019–1020. <https://doi.org/10.3201/eid1806.111214>
- [68]. Cherak, Z., Loucif, L., Moussi, A., & Rolain, J. M. (2021). Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in aquatic environments: A review. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 25, 287–309. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.03.024>
- [69]. Osman, M., Daaboul, D., Ghorbani Tajani, A., El Omari, K., Bisha, B., Hassan, J., Cazer, C., Fiorella, K., Karah, N., Abbara, A., Hamze, M., Cummings, K., Naas, T., & Kassem, I. (2023). Multidrug-resistant pathogens contaminate river water used in irrigation in disenfranchised communities. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 36, 100735. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.12.016>
- [70]. Hubeny, J., Korzeniewska, E., Buta-Hubeny, M., Zieliński, W., Rolbiecki, D., & Harnisz, M. (2022). Characterization of carbapenem resistance in environmental samples and *Acinetobacter* spp. isolates from wastewater and river water in Poland. *The Science of the Total Environment*, 822, 153437. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153437>
- [71]. Oliveira, M., Leonardo, I. C., Nunes, M., Silva, A. F., & Barreto Crespo, M. T. (2021). Environmental and Pathogenic Carbapenem Resistant Bacteria Isolated from a Wastewater Treatment Plant Harbour Distinct Antibiotic Resistance Mechanisms. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1118. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091118>

- [72]. Zaatout, N., Bouras, S., & Slimani, N. (2021). Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in wastewater: a systematic review and meta-analysis. *Journal of water and health*, 19(5), 705–723. <https://doi.org/10.2166/wh.2021.112>
- [73]. Essert, S. M., Zacharias, N., Precht, T., Pankratz, D., Funken, K., Mutters, N. T., Kistemann, T., & Schreiber, C. (2023). Persistence of MRSA and ESBL-producing *E. coli* and *K. oxytoca* in river water. *Hygiene and Environmental Health Advances*, 7, 100072. <https://doi.org/10.1016/j.heha.2023.100072>
- [74] Rogers, K. (2024, April 28). *Enterobacter*. In *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/Enterobacter>
- [75] Al-Anazi, K. A., & Al-Jasser, A. M. (2014). Infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Frontiers in Oncology*, 4, 232. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00232>
- [76] Bujňáková, D., Puvača, N., & Čirković, I. (2022). Virulence Factors and Antibiotic Resistance of Enterobacterales. *Microorganisms*, 10(8), 1588. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081588>
- [77] World Health Organization. (2024). *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [78] Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., & Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3(3), 243–250. <https://doi.org/10.4161/viru.19700>
- [79] Murray, C. J. L., et al. (2018). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- [80] De Boeck, H., Miwanda, B., Lunguya-Metila, O., Muyembe-Tamfum, J. J., Stobberingh, E., Glupczynski, Y., & Jacobs, J. (2012). ESBL-positive Enterobacteria isolates in drinking water. *Emerging infectious diseases*, 18(6), 1019–1020. <https://doi.org/10.3201/eid1806.111214>
- [81] Pérez-Etayo, L., González, D., Leiva, J., & Vitas, A. I. (2020). Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Different Aquatic Environments in the North of Spain and South of France. *Microorganisms*, 8(9), 1425. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091425>
- [82] Banach, J. L., & Van Der Fels-Klerx, H. J. (2020). Microbiological reduction strategies of irrigation water for fresh produce. *Journal of Food Protection*, 83(6), 1072–1087. <https://doi.org/10.4315/JFP-19-466>
- [83] Guillén-Ferraro, M., Cordovéz-Martínez, M., González, A., Medina-Ramírez, G., Mur-Cacedo, L., & Marcillo-Valencia, K. (2024). Bacterias multirresistentes en aguas de riego del río Chibunga, Chimborazo, Ecuador. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, 17, 16–25. <https://doi.org/10.29166/revfig.v17i1.5793>
- [84] World Health Organization. (2021). *2021 AWaRe classification: WHO access, watch, reserve, classification of antibiotics for evaluation and monitoring of use (WHO/HMP/HPS/EML/2021.04)*. <https://www.who.int/publications/i/item/2021-aware-classification>
- [85] Oliver, A., Pérez-Vázquez, M., Martínez-Ferrer, M., Baquero, F., De Rafael, L., & Cantón, R. (1999). Ampicillin-sulbactam and amoxicillin-clavulanate susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates with different beta-lactam resistance phenotypes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(4), 862–867. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.862>
- [86] Stobberingh, E. E. (1988). Induction of chromosomal  $\beta$ -lactamases by different concentrations of clavulanic acid in combination with ticardillin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 21(1), 9–16. <https://doi.org/10.1093/jac/21.1.9>
- [87]. Patry, I., Hocquet, D., Talon, D., Plesiat, P., & Bertrand, X. (2005). Susceptibility of *Escherichia coli* to the amoxicillin-clavulanate combination: which recommendations should be used to provide relevant information to clinicians?. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11(3), 237–240. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01075.x>
- [88]. Oteo, J., Campos, J., Lázaro, E., Cuevas, O., García-Cobos, S., Pérez-Vázquez, M., de Abajo, F. J., & Spanish Members of EARSS (2008). Increased amoxicillin-clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* blood isolates, Spain. *Emerging infectious diseases*, 14(8), 1259–1262. <https://doi.org/10.3201/eid1408.071059>
- [89] Pham, T. D. M., Ziora, Z. M., & Blaskovich, M. A. T. (2019). Quinolone antibiotics. *MedChemComm*, 10(10), 1719–1739. <https://doi.org/10.1039/c9md00120d>



- [90] Mahmud, Z. H., Kabir, M. H., Ali, S., Moniruzzaman, M., Imran, K. M., Nafiz, T. N., Islam, M. S., Hussain, A., Hakim, S. A. I., Worth, M., Ahmed, D., Johnston, D., & Ahmed, N. (2020). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in drinking water samples from a forcibly displaced, densely populated community setting in Bangladesh. *Frontiers in Public Health*, 8, 228. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00228>
- [91] Adegoke, A. A., Madu, C. E., Aiyegoro, O. A., Stenström, T. A., & Okoh, A. I. (2020). Antibigram and beta-lactamase genes among cefotaxime-resistant *E. coli* from a wastewater treatment plant. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-0702-4>
- [92] Gekenidis, M. T., Qi, W., Hummerjohann, J., Zbinden, R., Walsh, F., & Drissner, D. (2018). Antibiotic-resistant indicator bacteria in irrigation water: High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *PLOS ONE*, 13(11), e0207857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207857>
- [93] Uto, L. R., & Gerriets, V. (2023, May 29). Clavulanic acid. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545273/>
- [94] Salmon-Rousseau, A., Martins, C., Blot, M., Buisson, M., Mahy, S., Chavanet, P., & Piroth, L. (2020). Comparative review of imipenem/cilastatin versus meropenem. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 50(4), 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.01.001>
- [95] Nnamani, K. O., Nnamani, C. P., Iloh, K. K., Aghanya, I. N., Ushie, S. N., Ofiaeli, O. C., Ezeudu, C. E., Onubogu, C. U., Ugochukwu, E. F., Akujobi, C. N., & Ezechukwu, C. C. (2022). Bacterial isolates, antibiogram, and outcomes of blood culture-proven sepsis in neonates at a tertiary institution in South East Nigeria: A cross-sectional study. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 9, 20499361221122479. <https://doi.org/10.1177/20499361221122479>
- [96] Jean, S. S., Harnod, D., & Hsueh, P. R. (2022). Global threat of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 823684. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.823684>
- [97] Colomer Buigues, M. (2023). *Presencia de resistencias a antibióticos en aguas de riego que vierten a la Albufera (Valencia)*. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/195869>
- [98] Rodríguez-Verdugo, A., Lozano-Huntelman, N., Cruz-Loya, M., Savage, V., & Yeh, P. (2020). Compounding effects of climate warming and antibiotic resistance. *iScience*, 23(4), 101024. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101024>
- [99] Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. J. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 42(1), fux053. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux053>
- [100] Poonia, S., Singh, T. S., & Tsering, D. C. (2014). Antibiotic susceptibility profile of bacteria isolated from natural sources of water from rural areas of East sikkim. *Indian journal of community medicine : official publication of Indian Association of Preventive & Social Medicine*, 39(3), 156–160. <https://doi.org/10.4103/0970-0218.137152>
- [101] Jofré Bartholin, M., Barrera Vega, B., & Berrocal Silva, L. (2023). Antibiotic-resistant bacteria in environmental water sources from southern Chile: A potential threat to human health. *Microbiology Research*, 14, 1764–1773. <https://doi.org/10.3390/microbiores14040121>
- [102] Gómez, R. F., Castillo, A., & Chávez-Vivas, M. (2017). Characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter* ssp. strains isolated from medical intensive care units in Cali - Colombia. *Colombia medica (Cali, Colombia)*, 48(4), 183–190. <https://doi.org/10.25100/cm.v48i4.2858>
- [103] Chong, Y., Yakushiji, H., Ito, Y., & Kamimura, T. (2010). Cefepime-resistant Gram-negative bacteremia in febrile neutropenic patients with hematological malignancies. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 14 Suppl 3, e171–e175. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.01.004>
- [104] Khorvash, F., Mostafavizadeh, K., Mobasherizadeh, S., Behjati, M., & Salehi, M. (2009). Emergence of cefepime resistance in gram-negative induced nosocomial infections. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases*, 4, 13–18.
- [105] Herrmann, J., Burgener-Gasser, A. V., Goldenberger, D., Roth, J., Weisser, M., Tamma, P. D., & Tschudin-Sutter, S. (2024). Cefepime versus carbapenems for treatment of AmpC beta-lactamase-producing Enterobacterales bloodstream infections. *European journal of clinical*

- [106] Miranda, C. D., Concha, C., Godoy, F. A., & Lee, M. R. (2022). Aquatic Environments as Hotspots of Transferable Low-Level Quinolone Resistance and Their Potential Contribution to High-Level Quinolone Resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(11), 1487. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111487>
- [107] Jiménez-Belenguer, A. I., Ferrús, M. A., Hernández, M., García-Hernández, J., Moreno, Y., & Castillo, M. Á. (2023). Prevalence and Characterization of Beta-Lactam and Carbapenem-Resistant Bacteria Isolated from Organic Fresh Produce Retailed in Eastern Spain. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(2), 387. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020387>
- [108] Ibrahim, M. E., Algak, T. B., Abbas, M., & Elamin, B. K. (2021). Emergence of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>OXA</sub> genes in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia. *Experimental and therapeutic medicine*, 22(6), 1450. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10885>
- [109] Bong, C. W., Low, K. Y., Chai, L. C., & Lee, C. W. (2022). Prevalence and diversity of antibiotic-resistant *Escherichia coli* from anthropogenic-impacted Larut River. *Frontiers in Public Health*, 10, 794513. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.794513>
- [110] Ng, C., Chen, H., Goh, S. G., Haller, L., Wu, Z., Charles, F. R., Trottet, A., & Gin, K. (2018). Microbial water quality and the detection of multidrug resistant *E. coli* and antibiotic resistance genes in aquaculture sites of Singapore. *Marine pollution bulletin*, 135, 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.07.055>
- [111] Akiba, M., Sekizuka, T., Yamashita, A., Kuroda, M., Fujii, Y., Murata, M., Lee, K., Joshua, D. I., Balakrishna, K., Bairy, I., Subramanian, K., Krishnan, P., Munuswamy, N., Sinha, R. K., Iwata, T., Kusumoto, M., & Guruge, K. S. (2016). Distribution and Relationships of Antimicrobial Resistance Determinants among Extended-Spectrum-Cephalosporin-Resistant or Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Rivers and Sewage Treatment Plants in India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(5), 2972–2980. <https://doi.org/10.1128/AAC.01950-15>
- [112] Weller T. M. (1999). The distribution of *mecA*, *mecR1* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 43(1), 15–22. <https://doi.org/10.1093/jac/43.1.15>
- [113] Fernando, D. M., Tun, H. M., Poole, J., Patidar, R., Li, R., Mi, R., Amarawansa, G. E. A., Fernando, W. G. D., Khafipour, E., Farenhorst, A., & Kumar, A. (2016). Detection of Antibiotic Resistance Genes in Source and Drinking Water Samples from a First Nations Community in Canada. *Applied and environmental microbiology*, 82(15), 4767–4775. <https://doi.org/10.1128/AEM.00798-16>
- [114] Jain, P., Bepari, A. K., Sen, P. K., et al. (2021). High prevalence of multiple antibiotic resistance in clinical *E. coli* isolates from Bangladesh and prediction of molecular resistance determinants using WGS of an XDR isolate. *Scientific Reports*, 11, 22859. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02251-w>





**ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA  
AGENDA 2030**

**Anexo al Trabajo de Fin de Grado y Trabajo de Fin de Máster: 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).

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

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

\*\*\*Utilice tantas páginas como sea necesario.

**Anexo al Trabajo de Fin de Grado y Trabajo de Fin de Máster: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.** (Numere la página)

ODS 1: Fin de la pobreza. Las bacterias resistentes en las aguas afectan directamente a las comunidades agrícolas vulnerables, aumentando el riesgo de enfermedades infecciosas y limitando su capacidad para producir alimentos de manera eficiente. Esto exacerba la pobreza y dificulta el cumplimiento de la meta 1.5, que busca fortalecer la resiliencia y reducir la vulnerabilidad de las personas en situaciones de pobreza ante fenómenos ambientales adversos.

ODS 2: Hambre cero. Las bacterias resistentes a antibióticos pueden estar presentes en los cultivos, disminuyendo la producción agrícola y ganadera. Esto impacta negativamente en la seguridad alimentaria de los consumidores y el sustento de los agricultores, y obstaculiza la meta 2.3 de duplicar la productividad agrícola y los ingresos de los pequeños productores de alimentos. La contaminación de los cultivos también puede llevar a pérdidas económicas significativas, afectando la disponibilidad de alimentos.

ODS 3: Salud y bienestar. La presencia de bacterias resistentes puede contribuir a la propagación de enfermedades infecciosas difíciles de tratar, aumentando la morbilidad y mortalidad en la población. Esto es especialmente crítico para la meta 3.2, que se centra en reducir las muertes evitables de recién nacidos y menores de cinco años, y la meta 3.8, que promueve el acceso a medicamentos seguros y eficaces. La lucha contra la resistencia antimicrobiana en las aguas de riego es esencial para proteger la salud pública.

ODS 6: Agua limpia y saneamiento. Garantizar la calidad del agua es crucial para la agricultura y la salud humana. La meta 6.3 busca mejorar la calidad del agua reduciendo la contaminación, minimizando la liberación de productos químicos y materiales peligrosos. El monitoreo y tratamiento de las aguas de riego en Valencia para eliminar bacterias resistentes es necesario para cumplir con estos objetivos y asegurar un suministro de agua seguro y sostenible para la agricultura.

ODS 12: Producción y consumo responsables. El uso responsable de antimicrobianos en la agricultura, ganadería y medicina es esencial para evitar la propagación de bacterias resistentes. La meta 12.3 busca reducir a la mitad el desperdicio de alimentos y las pérdidas en las cadenas de producción y suministro. Controlar la contaminación de las aguas de riego con bacterias resistentes ayuda a mantener la integridad de los cultivos y reducir las pérdidas, promoviendo una producción agrícola sostenible y responsable.