



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

Estudio del resistoma ambiental como estrategia en la prevención de enfermedades transmisibles.

TESIS DOCTORAL

Autora

Ana Carmen González Román

Directora

Elena Espigares Rodríguez

Granada

2024

Estudio del resistoma ambiental como estrategia en la prevención de enfermedades transmisibles.

Tesis Doctoral que presenta ANA CARMEN GONZÁLEZ ROMÁN para aspirar al Título de Doctora.

Granada, a 22 de diciembre de 2024.

Directora de la Tesis Doctoral:

Dra. Dña. ELENA ESPIGARES RODRÍGUEZ.

Profesora Titular del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Granada.

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ana Carmen González Román
ISBN: 978-84-1195-783-0
URI: <https://hdl.handle.net/10481/103708>

ELENA ESPIGARES RODRÍGUEZ, Profesora Titular del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta Dña. ANA CARMEN GONZÁLEZ ROMÁN, al superior juicio del tribunal que designe la Universidad de Granada, sobre el tema: “Estudio del resistoma ambiental como estrategia en la prevención de enfermedades transmisibles”, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de la autora, en condiciones que le hacen acreedora al Título de Doctora, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

En Granada, a 22 de diciembre de 2024.

Fdo. Elena Espigares Rodríguez

RESUMEN

Las resistencias a los antibióticos están presentes en el medioambiente desde mucho antes del descubrimiento del primer antibiótico en 1928. Sin embargo, la abusiva utilización de estos fármacos, tanto a nivel clínico como veterinario, desde mediados del siglo XX, ha conducido al aumento exponencial de la prevalencia y dispersión de las resistencias. La enorme capacidad de intercambio genético de los microorganismos mediante transferencia horizontal, permite la propagación de los genes de resistencia a los antibióticos por todos los ambientes ecológicos, lo cual aumenta notablemente la probabilidad de que estos genes acaben en patógenos humanos. Este acontecimiento se ve promovido por la liberación al entorno natural de residuos antibióticos (junto a metales pesados y biocidas), bacterias resistentes y genes de resistencia procedentes de las industrias farmacéuticas, las estaciones depuradoras de aguas residuales, la ganadería y la agricultura, entre otros. Consecuentemente, el tratamiento de las enfermedades transmisibles cada vez es más difícil, siendo todo un reto para la salud pública.

En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo un estudio fenotípico del resistoma ambiental en un ecosistema periurbano (en la ciudad de Granada, España). Para ello, se han recogido 70 muestras de diferentes nichos ecológicos (aire, superficies, alimentos, agua residual, residuos sólidos, instalaciones ganaderas, suelo agrícola y suelo natural), con distintos niveles de exposición a los antibióticos y a la acción antrópica. En primer lugar, se ha realizado una prueba de cribado para conocer la abundancia de cepas resistentes de cada muestra, y de estas se han aislado 710 cepas bacterianas para, en segundo lugar, realizar un análisis fenotípico de resistencia frente a 32 antibióticos de las clases más utilizadas en la terapia actual. Finalmente, partiendo de los perfiles fenotípicos obtenidos, se han estimado los posibles genes de resistencia a los antibióticos que podrían ser la causa de los fenotipos observados.

Los resultados obtenidos muestran un alto porcentaje de resistencias a los antibióticos en todos los ecosistemas estudiados. En la prueba de cribado, los mayores porcentajes de resistencia se obtuvieron en las placas cultivadas con vancomicina y eritromicina, mientras que las placas con cloranfenicol obtuvieron los niveles más bajos. De todos los ambientes, las aguas residuales mostraron los valores de resistencia más elevados, seguidas de las instalaciones ganaderas y los alimentos. Asimismo, los análisis fenotípicos determinaron una enorme abundancia de cepas resistentes a los

aminoglucósidos, penicilinas, glucopéptidos, macrólidos, aztreonam, ácido nalidíxico y tetraciclina. Aunque el suelo natural (sin impacto antrópico) fue de los nichos ecológicos con menores porcentajes de resistencia en general, cabe destacar que se detectaron valores preocupantemente altos para diversos grupos antibióticos.

La presente investigación aporta datos significativos sobre la distribución de resistencias a los antibióticos entre los distintos ecosistemas estudiados y, por ende, de su amplia propagación por el medioambiente. Por tanto, es una prueba más de la importancia de tomar medidas urgentes (como una mayor regulación de la prescripción antibiótica y un mejor control de los residuos), con el fin de mitigar las consecuencias que las resistencias a los antibióticos están ocasionando en el control de las infecciones en la actualidad y la amenaza que suponen para la medicina en un futuro próximo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Los antibióticos y su historia.....	2
1.2. La resistencia a los antibióticos y su diseminación.....	3
1.3. Los elementos genéticos móviles.	6
1.4. Mecanismos de resistencia a los antibióticos.	9
1.5. El resistoma ambiental.....	12
1.5.1. Resistencia a los antibióticos en instalaciones ganaderas.	14
1.5.2. Resistencia a los antibióticos en animales salvajes.	17
1.5.3. Resistencia a los antibióticos en aguas residuales y estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR).	18
1.5.4. Resistencia a los antibióticos en el suelo.	20
1.6. El control de la propagación de resistencias.	22
1.7. Situación actual.	24
1.7.1. A nivel europeo.	24
1.7.2. A nivel nacional.	28
2. JUSTIFICACIÓN	32
3. OBJETIVOS	34
4. METODOLOGÍA	36
4.1. Descripción de la muestra de estudio.	37
4.2. Toma de muestras.	37
4.3. Extracción y conservación del bioma.	38
4.4. Cribado para la cuantificación del bioma resistente.....	39
4.5. Análisis fenotípico.	40
4.5. Estimación de genes de resistencia probables.....	44
4.6. Análisis estadístico.....	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1. Cribado de cepas resistentes.....	46
5.2. Análisis del resistoma.....	49
5.2.1. Genes de resistencia probables.	57

6. DISCUSIÓN.....	61
6.1. Resistencia en instalaciones ganaderas.	66
6.2. Resistencia en alimentos.	72
6.3. Resistencia en aguas residuales y residuos sólidos.	76
6.4. Resistencia en suelo.	80
6.4. Resistencia en aire.	84
6.5. Resistencia en superficies.....	86
7. CONCLUSIONES.....	89
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ACRÓNIMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

AENOR: Asociación Española de Normalización y Certificación.

ANOVA: *analysis of variance*.

APHA: *American Public Health Association*.

AWWA: *American Water Works Association*.

BAH: bacterias aerobias heterótrofas.

BHI: *brain-heart infusion*.

BLEE: betalactamasas de espectro extendido.

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

CMI: concentración mínima inhibitoria.

CP: carbapenemasas.

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*.

EDAR: estación depuradora de aguas residuales.

EFSA: *European Food Safety Authority*.

EGM: elementos genéticos móviles.

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.

FDA: *Food and Drug Administration*.

MLS: macrólido-lincosamida-estreptogramina.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBP: *penicillin-binding proteins*.

PRAN: Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos.

RODAC: *replicate organism direct agar contact*.

ROS: *reactive oxygen species*.

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

SI: secuencias de inserción.

SPSS: *Statistical Package for Social Sciences*.

Tn: transposones.

UE: Unión Europea.

UFC: unidades formadoras de colonias.

WEF: *Water Environment Federation*.

WHO: *World Health Organization*.

Agradecimientos.

Quisiera empezar expresando mi enorme gratitud a todos los que me han acompañado en este largo proceso.

En primer lugar, a Elena Espigares. ¡No sé qué hubiera hecho sin ti! Ha sido todo un placer tenerte como directora de tesis y como amiga. Has sido una directora inmejorable. A pesar de todos los obstáculos que se nos han cruzado por el camino, siempre me he sentido reconfortada con tu ayuda y tu apoyo, realmente has hecho que todo sea mucho más fácil. Eres una gran persona y espero que siempre formes parte de mi vida.

En segundo lugar, tengo muchísimo que agradecer a Miguel Espigares que, aun estando jubilado, me ha seguido ayudando en todo lo posible, y a César, el mejor compañero que podía tener durante mis días en el laboratorio.

También quisiera dar las gracias a mi tutora, Aurora Bueno. Gracias infinitas por toda la ayuda que me has ofrecido durante estos años.

Asimismo, quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional en cada decisión que tomo y en todas las cosas que hago. Siempre habéis hecho que me sienta enormemente querida, sois increíbles.

Y por supuesto, no me puede faltar agradecer al amor de mi vida, siempre a mi lado, ayudándome en todo y aguantándome cada día (con lo intensa que me pongo a veces). Eres el pilar en el que siempre me apoyo y me hace más fuerte. No puedo más que agradecer la suerte que tengo de tenerte.

No puedo finalizar estos agradecimientos sin mencionar a Elena Moreno, que también fue mi directora de tesis y mi primera amiga en el Departamento. Siempre estás en mis recuerdos y sé lo mucho que te hubieras alegrado al verme terminar esta etapa.

Finalmente, quiero deciros que he sido muy feliz durante estos siete años en el Departamento y os lo debo a vosotros, por crear ese ambiente de trabajo tan especial y enseñarme tanto.

Todos sois muy importantes en mi vida y no tengo más que palabras de agradecimiento y cariño para vosotros.

Muchas gracias.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los antibióticos y su historia.

Durante cientos de años, las enfermedades transmisibles han sido la primera causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. El descubrimiento de los antibióticos fue clave para disminuir la gravedad de estas infecciones y, de manera drástica, la mortalidad.

Ya desde el siglo XIX se estaban investigando las propiedades antibacterianas de algunos hongos, pero no fue hasta principios del siglo XX cuando realmente se confirmó la efectividad de los antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas; como el salvarsán, descubierto en 1909 por Paul Ehrlich en el intento de desarrollar nuevas tinciones para la realización de exámenes histológicos en tejidos y que resultó ser un buen medicamento para el tratamiento de la sífilis; o la penicilina, descubierta por Sir Alexander Fleming, quien comprobó la capacidad de este hongo para inhibir cepas de *Staphylococcus aureus* (Iskandar, K. *et al.*, 2022).

A partir de la década de los 40, con el descubrimiento por Selman Waksman de la estreptomicina, procedente de la especie *Streptomyces griseus*, la producción y comercialización de antibióticos nuevos se incrementó tan notablemente que el período entre 1940 y 1990 se conoce como la “Era dorada de los antibióticos” (Karmakar & Gaitonde, 2019). La Figura 1 muestra el descubrimiento de distintas clases de antibióticos hasta la década de los 90; sin embargo, a partir de entonces, el desarrollo de nuevos antibióticos ha sufrido un descenso notable.

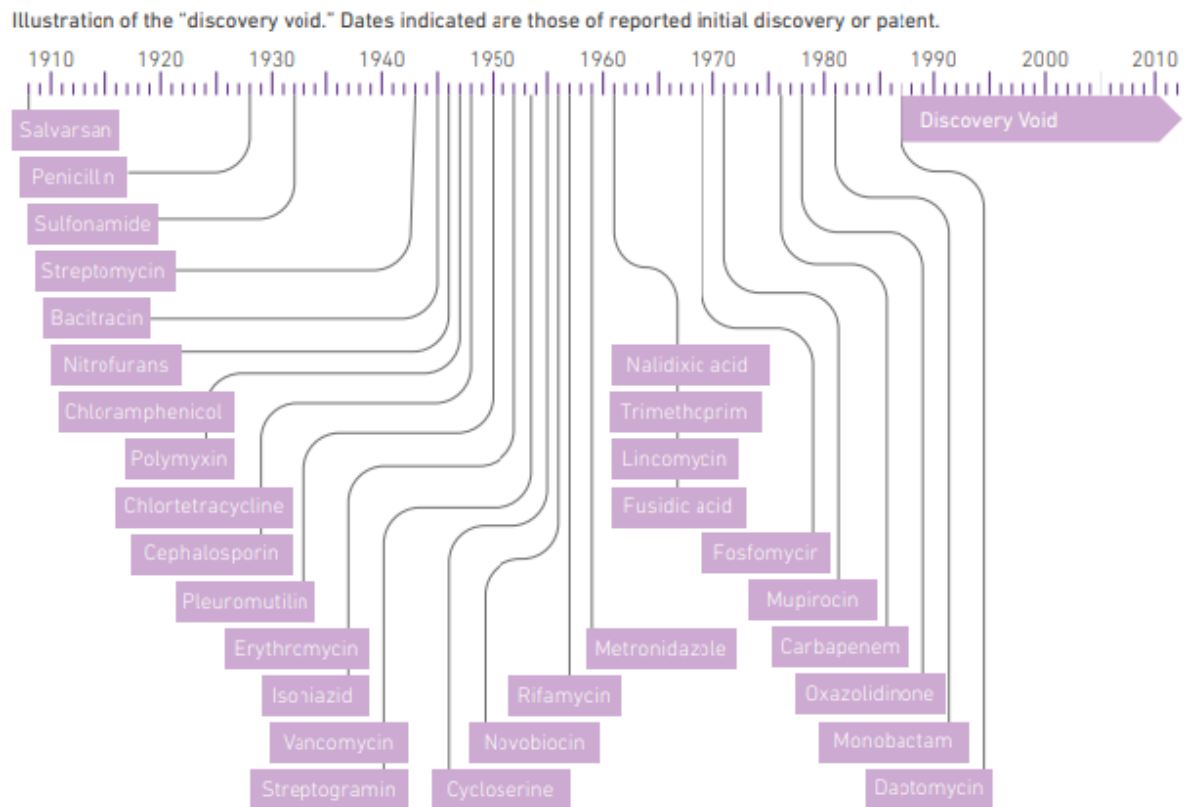


Figura 1. Datos del descubrimiento de distintas clases de antibióticos (Tomado de WHO, 2014).

1.2. La resistencia a los antibióticos y su diseminación.

La resistencia a los antibióticos se puede definir como la incapacidad o capacidad reducida de los agentes antimicrobianos para inhibir el crecimiento microbiológico, pudiendo desencadenar en un tratamiento fallido frente a bacterias patógenas, lo que constituye una gran amenaza para el control de las infecciones bacterianas (EFSA & ECDC, 2024). Las resistencias ya existían en la naturaleza desde mucho antes de que se descubrieran los antibióticos, pues las bacterias productoras de antibióticos contienen un mecanismo de resistencia propio contra el antibiótico que producen; muchas de ellas poseen incluso varios mecanismos de manera simultánea. De hecho, los determinantes genéticos de resistencia a menudo se encuentran agrupados junto a los genes relacionados con la biosíntesis del antibiótico (se co-regulan mutuamente).

No obstante, aunque el origen de la resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural, el uso indiscriminado de antibióticos a nivel clínico y veterinario (Sun *et al.*, 2023), así como la falta de buenas prácticas de higiene en los establecimientos sanitarios y en las

industrias alimentarias, han actuado como fuerza impulsora para la amplia diseminación de genes de multirresistencia, no solo en patógenos, sino también en bacterias ambientales, pues la coexistencia de bacterias patógenas y ambientales en un mismo ecosistema ofrece la posibilidad de que se produzca transferencia de genes de resistencia (Collignon & McEwen, 2019; Despotovic *et al.*, 2023). Aun así, se ha observado que, mientras que los genes de resistencia de las bacterias patógenas están generalmente localizados en elementos genéticos móviles (EGM), en las bacterias ambientales existen numerosos determinantes cromosómicos, los cuales se consideran fuente de multirresistencias en cepas patógenas (Peterson & Kaur, 2018).

Muchos patógenos forman biofilms mientras se produce la infección, lo que disminuye el efecto de los antibióticos y de la respuesta inmunitaria de la persona infectada. De hecho, muchas infecciones no se producen por un único patógeno, sino por un conjunto de microorganismos que coexisten en los biofilms mediante relaciones sinérgicas, potenciando la patogenicidad, la virulencia y la resistencia a los antibióticos (Marinelli *et al.*, 2021).

La resistencia a los antibióticos puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca se puede deber a diversas razones: que en la bacteria no exista la estructura (diana) sobre la que debería actuar el antibiótico; que la especie bacteriana posea en su genoma un gen de resistencia a los antibióticos de manera natural, independientemente de si ha sido expuesta previamente a estos fármacos (lo que ocurre en el caso de las bacterias productoras de antibióticos); o que en el genoma bacteriano se produzca una mutación espontánea que origine la resistencia. Una mutación es una alteración permanente en la secuencia de ADN de la bacteria que suele producirse por errores durante el proceso de replicación o por la acción de mutágenos químicos, físicos o biológicos; sea por factores que muestran una respuesta del sistema de reparación de emergencia (también conocida como respuesta SOS) al estrés del ADN o una respuesta al estrés oxidativo. La respuesta SOS es una respuesta global al daño de la molécula de ADN de la célula, mientras que la respuesta al estrés oxidativo se ve inducida por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno o ROS (por sus siglas en inglés) (Guo *et al.*, 2020). Las mutaciones que inducen la resistencia a los antibióticos ocurren principalmente en genes codificantes de sitios diana para los antibióticos, en genes codificantes de transportadores de antibióticos y en genes que codifican reguladores que reprimen la expresión de dichos transportadores. Un ejemplo de resistencia intrínseca es la resistencia a numerosos antibióticos por parte

de *Pseudomonas aeruginosa*, debido a la presencia de bombas de expulsión activa y a poseer una membrana externa impermeable (Hobson, Chan & Wright, 2021).

Sin embargo, lo más habitual es que la resistencia sea adquirida (de manera temporal o permanente) por transferencia horizontal de una bacteria a otra. Un ejemplo de este tipo es la resistencia a los carbapenémicos por parte de la familia *Enterobacteriaceae*, debido a la metalo-beta-lactamasa NDM-1 (Hobson, Chan & Wright, 2021). La transferencia génica horizontal aumenta la expresión y diseminación de resistencias, teniendo un impacto enorme en la salud pública. El intercambio genético entre bacterias es un proceso ampliamente extendido en la naturaleza y, como se puede observar en la Figura 2, se realiza por tres mecanismos principales (Iskandar, K. *et al.*, 2022):

- Transformación: incorporación de ADN libre. Fisiológicamente, este proceso se realiza para reparar ADN o diversificarlo, con el fin de mejorar la adaptabilidad bacteriana, y juega un papel muy importante en la evolución de las cepas de *Streptococcus* spp. resistentes a los antibióticos.
- Transducción: mediante bacteriófagos. La transferencia de resistencias por este mecanismo se considera poco habitual.
- Conjugación: mediante el paso de EGM de una bacteria a otra. Se considera el principal mecanismo de diseminación de genes de resistencia en la naturaleza, pues presenta numerosas ventajas en comparación con la transformación y la transducción: el contacto célula-célula facilita la protección del ADN, mientras que el ADN libre en la transformación es más vulnerable a ser degradado; en comparación con la transducción, aunque el ADN empaquetado en el interior de un fago está más protegido que si está libre, el rango de huéspedes es mucho más estricto.

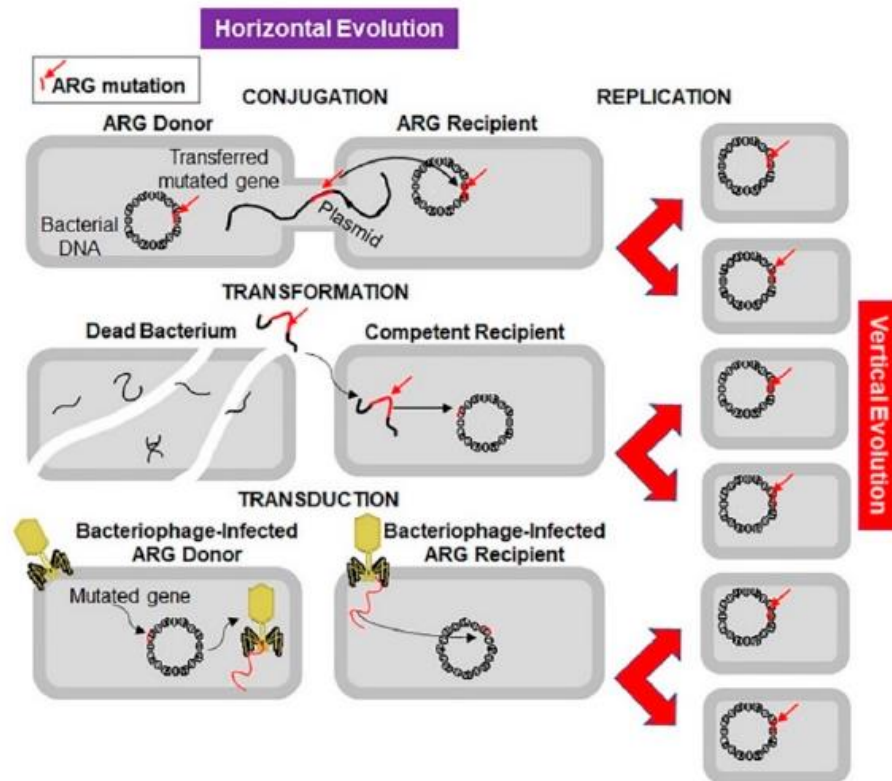


Figura 2. Mecanismos de transferencia génica horizontal y vertical en bacterias para el desarrollo de resistencias a los antibióticos (Tomado de Kumar, Arnipalli & Ziouzenkova, 2020).

Los genes que otorgan resistencia generalmente son genes que se expresan regularmente, pero también pueden ser genes silenciosos. Los genes silenciosos son aquellos que no se expresan normalmente o se expresan muy poco; se cree que porque no juegan un papel esencial en el ciclo vital de las bacterias. Sin embargo, pueden volverse activos tras una mutación o una recombinación génica, incluso tras ser transferidos a otro hospedador, y se ha observado que podrían ser causa de nuevos fenotipos de resistencia (Stasiak *et al.*, 2021).

1.3. Los elementos genéticos móviles.

Como se ha comentado en la conjugación, los EGM desempeñan un papel fundamental como vehículos de genes de resistencia y su propagación. Se pueden definir como un conjunto de elementos que proporcionan tanto movilidad intracelular (entre el

cromosoma y un plásmido o entre distintos plásmidos), como movilidad intercelular de ADN (Figura 3) (Partridge *et al.*, 2018).

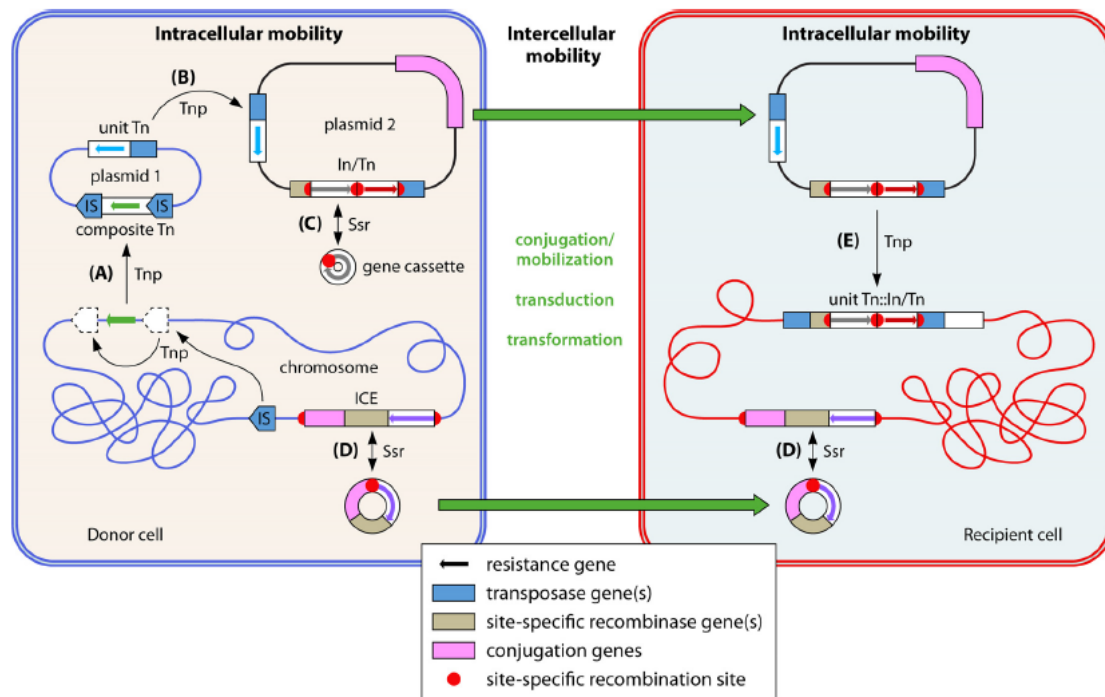


Figura 3. Ejemplo de elementos genéticos móviles y del proceso que implica la movilidad intracelular o la transferencia intercelular de genes de resistencia a los antibióticos (Tomado de Partridge *et al.*, 2018).

Entre los EGM se encuentran (Partridge *et al.*, 2018):

- Secuencias de inserción (SI): son generalmente EGM de pequeño tamaño, que pueden transportar uno o, como mucho, dos genes de resistencia, además de los necesarios para la inserción, como los que codifican las transposasas (tnp). La transposición genética puede ser conservativa (mecanismo de cortar y pasar, donde la SI escinde la secuencia del donador y la inserta en el receptor) o replicativa (mecanismo de copiar y pasar, donde la SI se replica para unirse al donador y al receptor al mismo tiempo o se replica formando un intermediario circular de doble cadena que se integra en el receptor). Tradicionalmente se pensaba que las SI no podían transportar genes “pasajeros”, pero se ha observado que pueden trasladar genes de resistencia como parte de un transposón compuesto, que se trata de una región formada por dos copias de la misma SI que se mueve como una sola unidad.

- Transposones (Tn): son EGM más grandes que las SI y poseen un gen transposasa y un gen “pasajero” interno que puede codificar resistencia a los antibióticos. Los genes de resistencia a los antibióticos están frecuentemente asociados a la familia Tn3 y a la familia del tipo Tn7. La transposición ocurre por mecanismos replicativos mediante una cointegración, que consiste en la formación de una estructura compuesta por múltiples copias del transposón que separan las moléculas donadora y receptora. Finalmente, la estructura cointegrativa se divide en moléculas separadas, cada una con una copia del transposón, y se produce la recombinación génica. Estos elementos proporcionan flexibilidad al genoma, ya que pueden alterar su posición, cambiando la configuración genética del locus donde se insertan. Al cambiar su localización, cabe la posibilidad de que los transposones pasen la secuencia génica desde el cromosoma a un plásmido y viceversa, contribuyendo a una mayor adquisición de genes de resistencia y a su sucesiva propagación (Sultan *et al.*, 2018).

Tanto Tn como SI son segmentos de ADN capaces de moverse al azar desde una localización a otra, dentro de la misma o de distinta molécula de ADN.

- Integrones: son EGM que utilizan la recombinación específica de sitio para mover genes de resistencia entre sitios definidos. Poseen tres componentes principales: un gen *intl* que codifica para una enzima tirosina recombinasa, denominada integrasa, necesaria para la integración de casetes de genes, un sitio de recombinación *attI* y un promotor que regula la expresión de los casetes de genes capturados. Normalmente presentan múltiples copias en diferentes ubicaciones del genoma, facilitando la recombinación homóloga, es decir, el intercambio de secuencias entre segmentos idénticos o relacionados entre sí. Los integrones de la clase 1 son los que están más relacionados con la resistencia a los antibióticos en aislados clínicos (Kaushik *et al.*, 2018).
- Casetes de genes: son un EGM de pequeño tamaño compuesto por un único gen, a veces dos, generalmente sin región promotora y con un sitio de recombinación *attC*. Los casetes pueden tener forma circular, pero estos no se replican y suelen

estar asociados a un integrón. Múltiples casetes pueden ser insertados en el mismo integrón, formando un conjunto de casetes que pueden conferir multirresistencia.

- **Plásmidos:** son los EGM con mayor implicación en la dispersión global de resistencias. Pueden asociarse a los demás EGM. Tienen un rango de tamaños muy amplio y pueden transferir genes a través de largas distancias a un gran número de huéspedes. Al ser extracromosómicos tienen la capacidad de autorreplicarse, pudiendo transmitirse tanto vertical como horizontalmente. Los plásmidos poseen un conjunto genético basado en genes implicados en su automantenimiento, así como algunas secuencias accesorias con actividad adaptativa, donde pueden albergar uno o más genes de resistencia y otros EGM. Los plásmidos conjugativos poseen genéticamente sistemas complejos para la transferencia horizontal, aunque también pueden ser adquiridos por recombinación homóloga, integración y escisión. Las regiones de transferencia codifican proteínas para la formación de parejas de apareamiento (para que se produzca una buena unión entre la célula donadora y receptora) y proteínas de replicación del DNA que se va a transferir. Se ha observado que se pueden mover por retrotransferencia, es decir, desde la bacteria receptora a la donadora y no únicamente desde la donadora a la receptora. Este proceso podría tener gran relevancia en el sistema de transferencia por plásmidos (Sultan *et al.*, 2018).

1.4. Mecanismos de resistencia a los antibióticos.

La resistencia a los antibióticos puede ser causada por los siguientes mecanismos (Figura 4) (Iskandar, K. *et al.*, 2022; Peterson & Kaur, 2018):

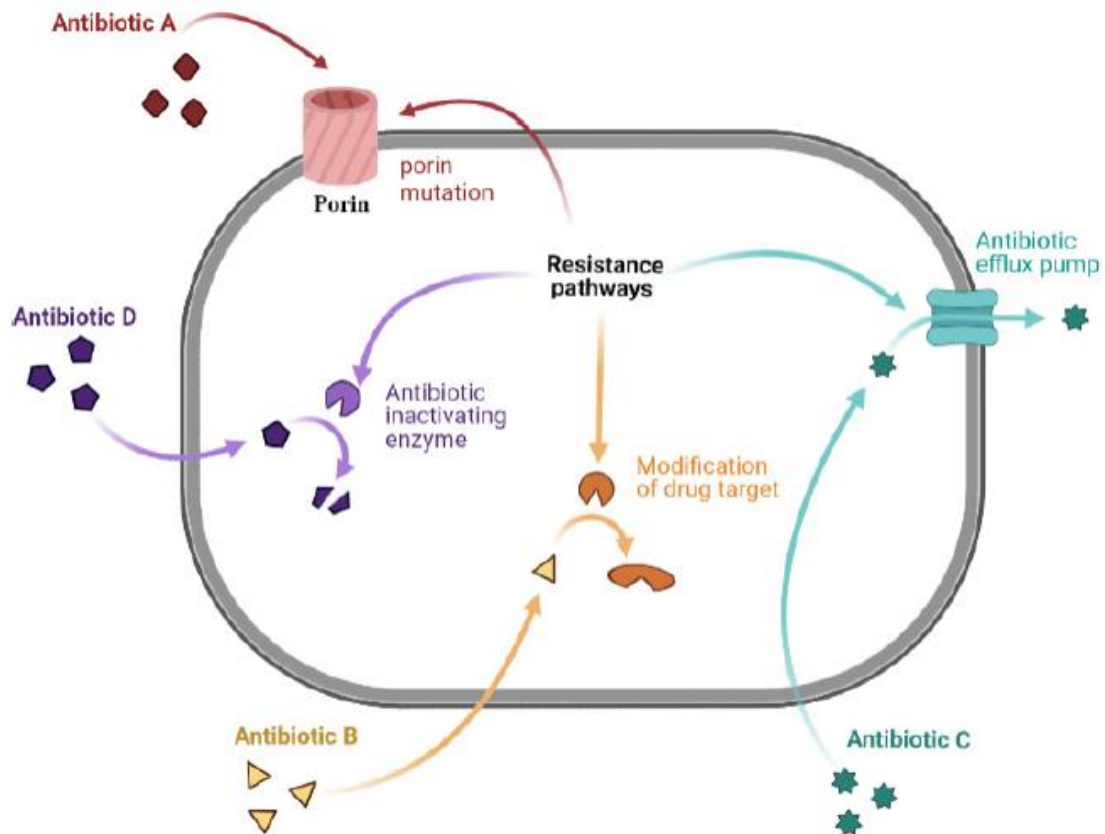


Figura 4. Representación de una célula bacteriana en la que se ilustran los mecanismos de resistencia a los antibióticos más comunes. El antibiótico A corresponde al mecanismo de disminución de la permeabilidad de la membrana bacteriana; el B, a la modificación de sitios diana; el C, a la eflujo activa del antibiótico; y el D, a la inactivación del antibiótico por enzimas bacterianas (Tomado de Iskandar, K. *et al.*, 2022).

- *Disminución de la permeabilidad de la membrana bacteriana:* este mecanismo de resistencia dificulta la penetración de aquellos antibióticos que necesitan unirse a dianas bacterianas intracelulares. Es de gran interés en las bacterias gram-negativas por la fisiología de su membrana externa, compuesta por dos membranas lipídicas (la membrana interna formada principalmente por fosfolípidos y la externa por lipopolisacáridos) separadas por una fina pared celular de peptidoglucano. Esta cobertura compleja les otorga protección contra antibióticos hidrófilos como la vancomicina. La susceptibilidad de las gram-negativas a los antibióticos hidrófilos también se ve alterada por la mutación de los genes que codifican las porinas (poros de membrana) o por cambios en su expresión.

- *Modificación de sitios diana*: implica cambios en la estructura, reubicación, omisión y/o protección de sitios diana, lo que disminuye o inhibe la unión del antibiótico. Actúa contra numerosas clases de antibióticos, como beta-lactámicos, glucopéptidos, macrólidos o aminoglucósidos. Un ejemplo de este mecanismo es la sobreproducción de proteínas PBP (*penicillin-binding proteins* o proteínas de unión a la penicilina), su mutación o la biosíntesis de PBP de baja calidad. Las PBP son claves en el proceso de síntesis de peptidoglucano (el principal componente de la pared celular) y actúan como sitio diana de los antibióticos beta-lactámicos, pues dichos antibióticos tienen una estructura muy similar a los sustratos de estas proteínas (Egorov, Ulyashova & Rubtsova, 2018). Por ello, su asociación a las PBP causa la adición de un grupo acilo en el sitio activo que produce su inhibición. En relación a los glucopéptidos, lo que se produce es la modificación de los precursores de peptidoglucano D-Ala-D-Ala, obteniéndose D-Ala-D-Lac o D-Ala-D-Ser, lo que disminuye ampliamente la afinidad del antibiótico por el sitio diana. La metilación del sitio diana por enzimas metiltransferasas es otro ejemplo de modificación que impide la unión del antibiótico, como ocurre en el caso de los aminoglucósidos. Por último, también se ha observado la producción de sitios diana adicionales de baja afinidad o la eliminación del antibiótico en el sitio diana. La coexistencia de bacterias productoras y no productoras ha contribuido a la evolución de mecanismos de resistencia de este tipo.

- *Eflujo activo del antibiótico*: las bacterias pueden tener genes codificantes de bombas de expulsión de antibióticos de manera intrínseca o adquirida. Estos sistemas de bombas ayudan a limitar la concentración del antibiótico en el interior de la bacteria. Funciona mediante la biosíntesis de proteínas transportadoras que actúan expulsando el antibiótico de forma específica. Para ello, pueden utilizar tanto proteínas que consumen ATP (adenosín trifosfato) como fuente de energía, como proteínas que acoplan el transporte de sustratos a gradientes iónicos.

- *Inactivación del antibiótico*: este mecanismo provoca la pérdida de eficacia del antibiótico, especialmente en el caso de los aminoglucósidos, el cloranfenicol y los beta-lactámicos. La inactivación suele ocurrir por modificación enzimática del antibiótico (Egorov, Ulyashova & Rubtsova, 2018), ya sea transfiriendo un grupo químico al antibiótico, como las N-acetiltransferasas, las O-fosfotransferasas o las O-adeniltransferasas, que añaden un grupo acetilo, fosfato o adenilo (respectivamente) a los antibióticos aminoglucósidos produciendo su inactivación; o mediante una reacción de hidrólisis, como ocurre en el caso de las enzimas beta-lactamasas (que actúan sobre los

beta-lactámicos) o de las enzimas TetX (que destruyen a las tetraciclinas mediante una reacción dependiente de oxígeno). Otro mecanismo de inactivación es el secuestro del antibiótico, que implica la unión del antibiótico a proteínas específicas antes de que se pueda acoplar con el sitio diana.

1.5. El resistoma ambiental.

El resistoma se puede definir como el conjunto de genes ambientales que confieren resistencia a los antibióticos, tanto intrínseca como adquirida (Marinelli *et al.*, 2021). La resistencia a los antibióticos es un problema ecológico que se caracteriza por las interacciones complejas establecidas entre las poblaciones bacterianas que afectan a la salud humana, animal y al medio ambiente (Collignon & McEwen, 2019; Despotovic *et al.*, 2023).

A pesar de que numerosos estudios han demostrado la existencia de genes resistentes a diversos antibióticos en bacterias ambientales anteriores al uso de fármacos (incluso se han encontrado genes de resistencia de hace millones de años), existe una gran evidencia de que la actividad humana ha tenido y continúa teniendo un fuerte impacto sobre el resistoma ambiental. De hecho, las mayores cantidades de genes de resistencia han sido detectadas en ecosistemas próximos a la actividad humana.

Los desechos humanos procedentes de núcleos urbanos, hospitales, instalaciones ganaderas, de la agricultura y la acuicultura, así como los residuos de las plantas de tratamiento de aguas residuales y de las industrias farmacéuticas, producen una enorme contaminación en el medioambiente, tanto de bacterias potencialmente patógenas como de genes de resistencia (Figura 5). Esta contaminación se está propagando a otros ecosistemas con poca o nula exposición a los antibióticos, tales como suelos, aguas superficiales (ríos, océanos, ...), sedimentos, etc., incluso se han detectado genes de resistencia en zonas polares como el Ártico. El aumento de población humana está trayendo consigo un incremento de los desechos y aguas residuales, que acaban liberándose al medioambiente. Las bacterias dominan todos estos ecosistemas y, mediante transferencia génica horizontal, se van transmitiendo los genes de resistencia de unas a otras (Collignon & McEwen, 2019; Larsson & Flach, 2022; Yang & Grossart, 2024; Zhu *et al.*, 2018).

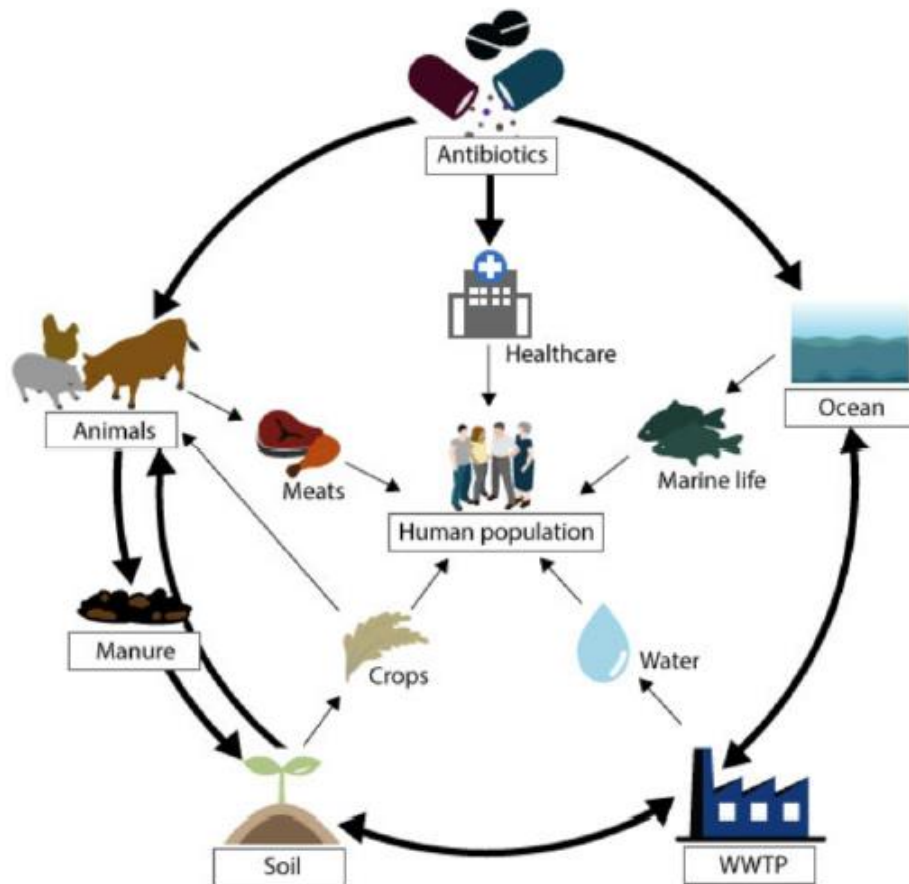


Figura 5. Descripción general de la alta prevalencia y transferencia de genes de resistencia a los antibióticos en el medioambiente (Tomado de Lim, Cho & Rho, 2018).

Por ello, en 2017, la Unión Europea (UE) adoptó un nuevo Plan de Acción para intentar controlar la propagación de resistencias a los antibióticos, denominado “One Health”, que considera al medioambiente en su conjunto, no solo a la salud humana y/o animal de manera aislada, pues todo está interconectado. Requiere la colaboración de las ciencias clínicas, veterinarias y medioambientales a nivel local, nacional y global para lograr la salud de humanos, animales domésticos y salvajes, plantas y del medioambiente en general (Manaia *et al.*, 2020). Esta acción se centra en promover el uso adecuado de antibióticos, focalizándose en la prevención de la infección y en la vigilancia y control del consumo de antibióticos (EFSA & ECDC, 2024).

1.5.1. Resistencia a los antibióticos en instalaciones ganaderas.

El uso de antibióticos en animales ha contribuido al aumento de resistencias a los antibióticos en los patógenos humanos, reduciendo la efectividad de la terapia con antibióticos y, por lo tanto, aumentando la gravedad e incidencia de la enfermedad y el coste sanitario. En efecto, se ha comprobado que existe una fuerte asociación entre el uso de antibióticos y la prevalencia de resistencias. Por ejemplo, tras la prohibición del uso de avoparcina en Dinamarca (1995), la población de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina disminuyó drásticamente del 72.7% al 5.8% en pollos y del 20.0% al 6.0% en cerdos en solo cinco años (Lim, Cho & Rho, 2018).

Existen algunas diferencias en el uso de antibióticos en humanos en comparación con su uso en otros sectores. Tanto en humanos como en animales de compañía, la administración de antibióticos suele ser clínica, para el tratamiento individual de una enfermedad infecciosa; también es habitual su uso profiláctico previo o posterior a una cirugía y, en algunos casos, como prevención grupal de alguna enfermedad, como la meningitis. Sin embargo, aunque en la actualidad este acontecimiento esté más controlado, en la ganadería intensiva, durante años, se han estado administrando antibióticos en el agua de bebida y el alimento de los animales para mejorar la producción, tanto como profilaxis para prevenir cualquier infección, como metafilaxis, para impedir que los animales sanos se contagien si una parte significativa de ellos han sido infectados (Collignon & McEwen, 2019).

Además, desde que, en 1951, la FDA (Food and Drug Administration) aprobara la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento en animales de producción alimentaria, su uso subterapéutico se magnificó, mejorando la eficiencia y disminuyendo la mortalidad y los costes de producción. Estados Unidos y China se convirtieron en los mayores productores y consumidores de antibióticos, tanto en la clínica como en el sector ganadero, siendo las tetraciclinas, las penicilinas y las sulfonamidas las clases de antibióticos más utilizadas.

Otro problema añadido a la adición de antibióticos en los piensos animales es la utilización de metales pesados como suplemento en la alimentación animal con fines no terapéuticos. Desde que en Europa se prohibieron los antibióticos como promotores del crecimiento, metales como el cobre y el zinc se utilizan por su efecto en la prevención de enfermedades y la promoción del crecimiento. No obstante, la Comisión Europea decidió

que desde 2019 se restringiera el uso de cobre en alimentos para animales y a partir de 2022 se eliminara gradualmente el uso de zinc medicinal en la producción porcina (Zhao *et al.*, 2021). Como se ha comentado, la contaminación por metales pesados en el medioambiente está estrechamente asociada con los genes de resistencia a antibióticos, por lo que el contenido en metales pesados en la alimentación del ganado influye en la co-selección de genes de resistencia y EGM, promoviendo la dispersión de estos genes (Zhang *et al.*, 2022a).

Durante la segunda mitad del siglo XX, se comenzaron a detectar problemas de resistencias a los antibióticos procedentes de animales productores y, poco a poco, muchos países de la UE fueron prohibiendo el uso de algunos antibióticos como promotores del crecimiento en la alimentación animal. Sin embargo, no fue hasta 2006 que la UE los retirara por completo. No obstante, en la mayoría de países sigue aprobado su uso terapéutico (tratando de evitar aquellos antibióticos más utilizados en la medicina humana), pues se ha observado que prohibir por completo la administración de antibióticos en los animales productores puede conllevar graves consecuencias en la salud animal, la producción y los costes alimentarios.

Aunque el uso de antibióticos en animales productores de alimentos no es la causa de que existan genes de resistencia en humanos, existen estudios suficientes que prueban la correlación entre la administración de antibióticos en la alimentación animal y el aumento de resistencias en bacterias comensales y patógenas en humanos (Xiong, Sun & Zeng, 2018). Las bacterias resistentes a los antibióticos procedentes de animales productores de alimentos pueden trasladarse al tracto gastrointestinal humano a través de la alimentación (y más teniendo en cuenta que, en la sociedad actual, el consumo de productos de origen animal, especialmente de carne, huevo y pescado, es cada vez mayor), pero también por medio del agua, de ambientes contaminados o por contacto directo con los animales (EFSA & ECDC, 2024).

Por otro lado, la exposición animal a antibióticos no es únicamente un problema de seguridad alimentaria, sino un problema de salud pública que repercute también en la contaminación ambiental de suelo, aire y agua. La administración de antibióticos en ganadería desarrolla bacterias resistentes a los antibióticos en el intestino animal, que finalmente se liberan al medioambiente (Figura 6). A través de la orina y las heces, tanto bacterias como genes de resistencia son excretados a las aguas superficiales y los suelos.

Además, solo pequeñas cantidades de antibióticos son absorbidas y metabolizadas por los animales, la gran mayoría son excretados sin metabolizar o como metabolitos activos, por lo que también forman parte de la contaminación ambiental.

Añadido a lo anterior, en muchos casos, los residuos sólidos de los animales son utilizados como abono en el sector agrícola. Tanto residuos sólidos como compostaje introducen en el suelo enormes cantidades de trazas de antibióticos, de genes de resistencia y de bacterias resistentes. También se han observado casos de utilización de estiércol como alimento en acuicultura. Todo esto aumenta la abundancia y diversidad de determinantes de resistencia a los antibióticos en el medioambiente (Rousham, Unicomb & Islam, 2018; Xie, Shen & Zhao, 2018).

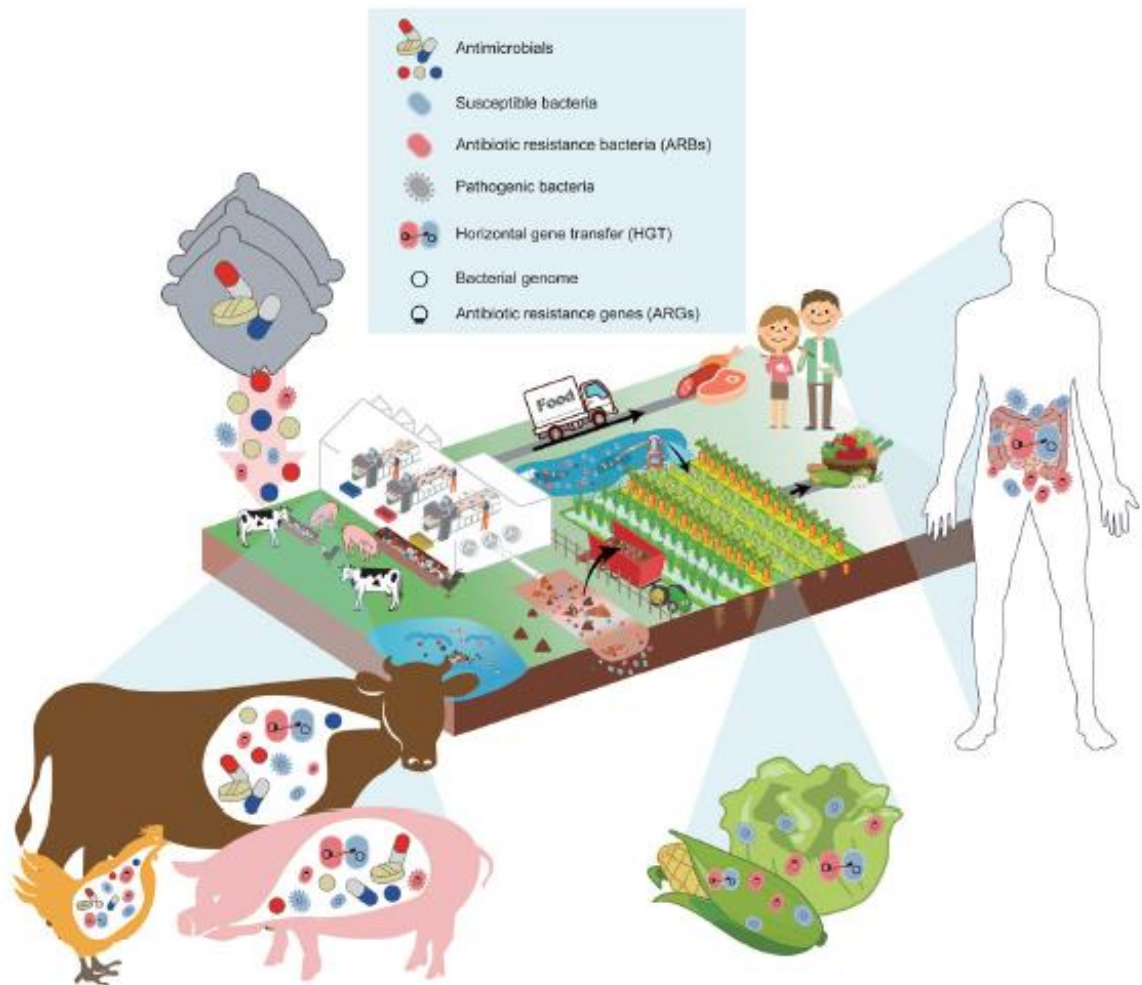


Figura 6. Posibles vías de transmisión de bacterias y genes de resistencia desde las instalaciones ganadera a los humanos (Tomado de Zhao *et al.*, 2021).

1.5.2. Resistencia a los antibióticos en animales salvajes.

Según Dolejska (2020), aunque los animales salvajes no están expuestos directamente a los antibióticos, se ven altamente afectados por el consumo clínico y veterinario de estos fármacos. Por un lado, la población humana domina cada vez más hábitats naturales, y por otro, la contaminación de las actividades antropogénicas se ha propagado ampliamente por todo el medioambiente. Cada vez es más frecuente que los animales salvajes se acerquen a entornos urbanos para conseguir alimento, y muchos de ellos, se han acomodado a la facilidad de conseguir alimento en los vertederos, pudiendo infectarse por bacterias resistentes a los antibióticos. Estos animales suelen migrar de un lado a otro según las estaciones del año en busca de agua y alimento, actuando como vectores de transmisión de resistencias. Las aves, en concreto, son una fuente de transmisión de alto riesgo para la salud pública, pues pueden vivir en zonas próximas a los humanos y sus actividades y viajan largas distancias, dispersando sus heces por numerosas zonas, pudiendo contaminarlas con bacterias y genes de resistencia a los antibióticos. Este mismo acontecimiento ocurre con los insectos.

Asimismo, las aguas residuales han contaminado las aguas superficiales, como ríos, lagos e, incluso, el agua del mar, donde se han encontrado bacterias resistentes, restos de antibióticos, genes de resistencia y metales pesados. Esta situación ocurre con mayor gravedad en los países en desarrollo, donde las aguas residuales tienen escaso o nulo tratamiento y, además, existe una mayor diversidad de vida salvaje que interacciona con las aguas contaminadas.

Como se ha comentado en el apartado anterior, los suelos abonados con estiércol procedente de animales productores que han sido tratados con antibióticos contienen una concentración desmesuradamente mayor de genes de resistencia que los suelos no abonados, así como los que son regados con aguas residuales. Los ambientes relacionados con la ganadería y la agricultura (aguas, suelo, alimentos, residuos sólidos y líquidos, abonos, ...) son una fuente de contaminación de resistencias, afectando a los animales salvajes que se alimentan en ellos.

Por último, hay que destacar que aproximadamente un 40.0% de las enfermedades humanas proceden de animales salvajes (Cupertino *et al.*, 2020; Zurek & Ghosh, 2014). Por ello, estos animales no solo pueden diseminar bacterias resistentes por el

medioambiente, sino que pueden transferirlas de nuevo a los humanos y animales domésticos.

1.5.3. Resistencia a los antibióticos en aguas residuales y estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR).

Las EDAR son una de las fuentes principales de transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos y de genes de resistencia, que posteriormente son liberadas al medioambiente. Reciben residuos de diferentes fuentes y, por lo tanto, bacterias de distintos ambientes (tanto patógenas como comensales), que pueden interactuar e intercambiar genes horizontalmente: se combinan residuos procedentes de domicilios urbanos, hospitales y de otras actividades antropogénicas como industrias farmacéuticas y ganaderas (Karkman *et al.*, 2018).

La probabilidad de que ocurra una mutación genética espontánea es muy baja, pero la presencia de restos antibióticos y otros contaminantes en los sistemas de aguas residuales puede facilitar que se produzca. La gran mayoría de antibióticos pueden promover la producción de ROS en las bacterias, lo cual induciría una respuesta SOS y una mutagénesis genética. Otros contaminantes ambientales como los metales pesados, los desinfectantes o los fármacos, también pueden aumentar la frecuencia de mutación, así como la transferencia génica, mediante co-selección (Figura 7).

La co-selección es la adquisición de genes de resistencia a los antibióticos en ausencia de antibióticos u otros contaminantes ambientales. La co-selección puede ocurrir fisiológicamente (resistencia cruzada) o genéticamente (co-resistencia). La resistencia cruzada ocurre cuando un gen de resistencia para un antibiótico o grupo de antibióticos confiere resistencia frente a otros antibióticos distintos. Por ejemplo, la exposición a metales induce un mecanismo de resistencia mediante bombas de eflujo activa que expulsan toxinas intracelulares al exterior de la célula; este mecanismo, a su vez, disminuye la susceptibilidad a los metales y a los antibióticos. La co-resistencia es un mecanismo genético en el que numerosos tipos de genes de resistencia están localizados en el mismo elemento genético móvil (Guo *et al.*, 2020).

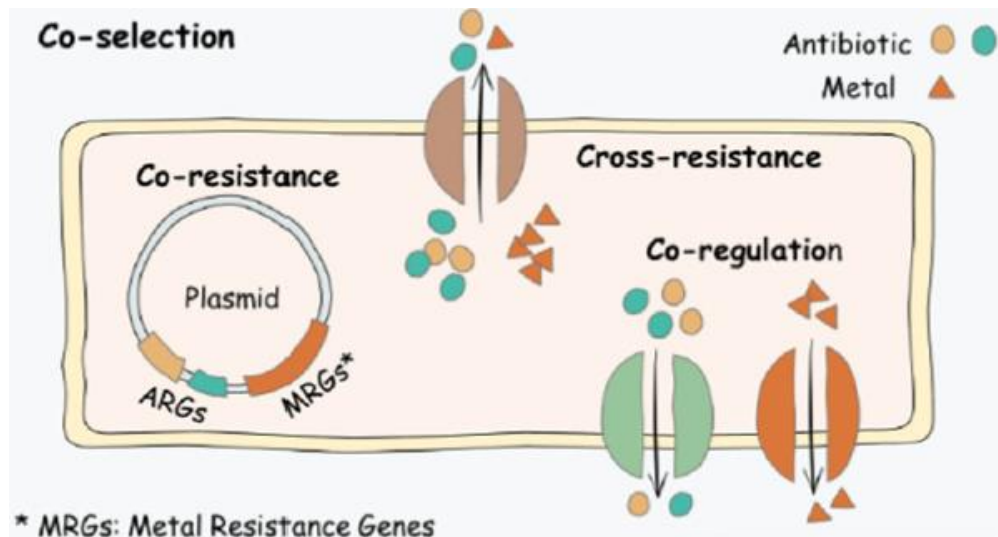


Figura 7. Proceso de co-selección (Tomado de Zhang *et al.*, 2022a).

Los tratamientos que se realizan en las plantas de aguas residuales no eliminan por completo las bacterias resistentes, los genes de resistencia ni los residuos de antibióticos. Además, diversos estudios han mostrado que, aunque los residuos de las industrias farmacéuticas sean tratados y se consiga eliminar un alto porcentaje de antibióticos, la concentración de antibióticos que permanece sigue suponiendo un gran riesgo para la selección de resistencias. De hecho, estos residuos actúan como reservorios, amplificadores y diseminadores de elementos de resistencia en el medioambiente.

Las mayores descargas de antibióticos a las aguas residuales las efectúan países asiáticos como China o India, donde se produce la mayor parte de los antibióticos del mundo debido a su bajo coste y a las escasas regulaciones medioambientales (Šimatović & Udiković-Kolić, 2020). A nivel europeo, existe un mayor control legislativo. De hecho, en los últimos años, el Plan de acción frente a la resistencia a antimicrobianos de la UE (2017) reconoció la gran importancia de controlar los residuos antibióticos en el medioambiente y se marcó el objetivo de reforzar la monitorización ambiental de los mismos. Para ello, hay que tener en consideración la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, y la Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales por su posible impacto en la gestión de residuos de antibióticos en el medioambiente. Además, en 2013, la Directiva 2013/39/UE introdujo la “Lista de

observación” para aguas superficiales, que incluye las sustancias químicas que deben analizarse periódicamente para conocer si se encuentra dentro del límite máximo aceptable o si es necesario establecer normas de calidad medioambiental con límites de concentración para esas sustancias, entre las cuales se encuentran antibióticos de uso humano y veterinario. Por su parte, la Directiva del Consejo 91/271/CEE establece que todos los Estados Miembros de la UE deben tomar las medidas necesarias que garanticen que las aguas residuales urbanas sean tratadas antes de su vertido (AEMPS, 2023).

Por otro lado, el uso de los efluentes y lodos biológicos tratados en las EDAR para riego y abono en la agricultura se ha visto intensificado en los últimos años, provocando que los elementos de resistencia contenidos en los mismos sean transmitidos a los productos vegetales, ocasionando también un riesgo directo para los agricultores e indirecto para los consumidores de dichos productos. En muchos casos, estos efluentes van a parar a las aguas naturales (mares, ríos o lagos), llegando los elementos de resistencia a los animales acuáticos y pudiendo alcanzar de nuevo a los humanos por la cadena alimentaria.

Como objetivo para poder corregir este problema, se debe conseguir una mejora de los procesos de depuración de residuos. Por ejemplo, se ha comprobado que la incorporación de un tratamiento terciario, como la ozonización o la utilización de radiación ultravioleta, en las EDAR puede lograr una depuración de las aguas residuales mucho más efectiva (Calabria de Araújo *et al.*, 2020). Es más, la UE recomienda incluso incluir un tratamiento cuaternario en las EDAR que traten cargas de agua equivalentes a 100.000 habitantes o superior (AEMPS, 2023).

1.5.4. Resistencia a los antibióticos en el suelo.

La microbiota del suelo es uno de los más antiguos orígenes evolutivos de la resistencia a los antibióticos, actuando como reservorio, debido en parte a que contiene la mayor diversidad de microorganismos y secuencias genéticas de todos los ecosistemas, por lo que de forma natural puede albergar una enorme cantidad de bacterias resistentes a los antibióticos (muchas de ellas bacterias productoras de antibióticos) y genes de resistencia. Por ello, ejerce un papel muy importante en la diseminación de resistencias a los antibióticos. Los humanos estamos constantemente expuestos al microbioma del suelo, como medio de cultivo, como medio de vida. Al igual que ocurre con la microbiota

humana, existen genes de resistencia en suelos que no han sido expuestos a ningún antibiótico (Karkman *et al.*, 2018; Lim, Cho & Rho, 2018).

Conjuntamente, recibe enormes cantidades de bacterias y genes de resistencia procedentes de los residuos humanos y animales, siendo considerados actualmente como importantes contaminantes medioambientales. Como se ha comentado, un porcentaje muy elevado de las heces que se producen en la ganadería son utilizadas como abono para los campos de cultivo. El uso de antibióticos en este sector aumenta el riesgo de transmisión de resistencias desde el abono fresco y el compostaje al suelo, más aún si están acompañados o localizados en EGM. Este mismo problema ocurre con la utilización de lodo activo como fertilizante y de aguas residuales para el riego de los cultivos.

Los genes de resistencia también pueden llegar al suelo transmitidos por el aire, especialmente cuando este está muy contaminado, ya que aumenta la concentración de partículas y, por tanto, el transporte de microorganismos al disponer de más sitios de adhesión. Las bacterias y genes procedentes de los animales productores pueden fácilmente formar aerosoles y ser posteriormente depositados en el suelo por deposición seca (por sedimentación) o húmeda (incorporadas al agua de lluvia). El mayor problema de la transmisión por aire es que los genes de resistencia pueden propagarse por distintas regiones y llegar a lugares muy remotos de la Tierra.

Igualmente, se ha observado que una exposición a largo plazo de las plantas a los restos de antibióticos y genes de resistencia disponibles en el suelo aumenta el riesgo de que se transmitan resistencias a través de la cadena alimentaria, mediante el consumo de vegetales contaminados que se han preparado y/o cocinado sin realizar unas correctas prácticas de higiene durante su manipulación.

El origen, la dinámica y la propagación de genes de resistencia en el suelo están relacionados con las prácticas agrícolas que se realicen y con las propiedades fisicoquímicas del suelo. Los parámetros físicos, químicos y biológicos del suelo (como el pH o el contenido en materia orgánica) se han identificado como estresores medioambientales que pueden inducir o mantener la evolución y transmisión de resistencias. Además, contribuyen junto con el clima, las especies vegetales y las sustancias químicas, a la diversidad, estructura y función de las comunidades bacterianas que habitan el suelo, influyendo en la composición de los genes de resistencia.

Los metales pesados y metaloides que se adicionan a los piensos animales como promotores del crecimiento o para controlar infecciones, también se acumulan en el suelo y suelen ejercer estrés en las bacterias y seleccionar determinantes para la resistencia a los antibióticos a través de la co-resistencia y la resistencia cruzada. Además, la presencia en el suelo de nanomateriales, como la nanoalumina, se ha visto relacionada con una mayor transferencia genética horizontal, debido a que promueven la adquisición de genes de resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias.

La presencia de antibióticos en el suelo ayuda a mantener y enriquecer el resistoma ambiental y, además, puede inhibir procesos bacterianos tan importantes como la respiración, la nitrificación o la reducción de hierro. Por otro lado, se ha observado que los suelos que han sido expuestos a los antibióticos han mejorado el proceso de degradación de estos fármacos (Figura 8), pero este proceso trae consigo un aumento de genes de resistencia (Wang & Tiedje, 2020; Xie, Shen & Zhao, 2018).

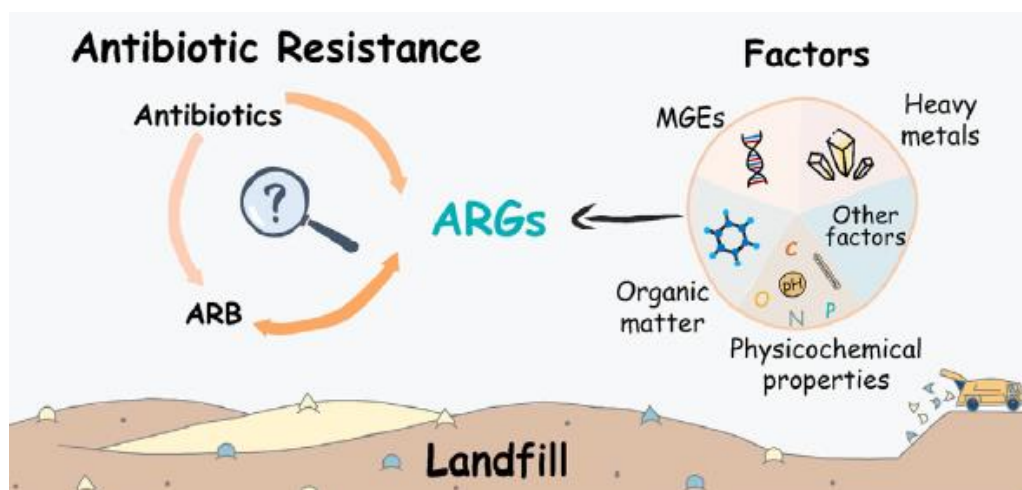


Figura 8. Factores que influyen en la presencia de genes de resistencia en el suelo (Tomado de Zhang *et al.*, 2022a).

1.6. El control de la propagación de resistencias.

Debido a que la transmisión de resistencias a los antibióticos es especialmente acusada en países con escasa calidad del agua y de las condiciones sanitarias, es fundamental enfocarse en mejorar el saneamiento de los países en vías de desarrollo. Asimismo, las aguas residuales y residuos sólidos, tanto humanos como animales, son una importante fuente de transmisión, al igual que la utilización de aguas residuales sin tratar o poco

tratadas para el riego de los cultivos, favoreciendo que la contaminación se transmita directamente por los alimentos. Por ello, el tratamiento de residuos es clave, así como la separación de residuos de las zonas donde se realizan actividades humanas.

De igual modo, los residuos de las industrias farmacéuticas también deben ser minuciosamente tratados, con el fin de intentar que la concentración de restos antibióticos que se libera a la naturaleza sea mínima, pues, aunque haya bajos niveles de antibióticos en la naturaleza, su presencia siempre va a facilitar el intercambio de plásmidos y genes de resistencia entre las distintas bacterias.

El comercio internacional y el turismo pueden estar bastante implicados en la dispersión mundial de resistencias. Por este motivo, el control de que todos los bienes que se comercializan, fundamentalmente alimentos, estén libres de agentes infecciosos es otro aspecto muy importante.

Finalmente, se debe controlar y regular el uso de antibióticos tanto a nivel clínico como veterinario en todos los países.

A pesar de que controlar el uso de antibióticos es necesario para reducir la propagación de resistencias, lo más importante es que las autoridades se impliquen en reforzar los sistemas de tratamiento de residuos, sobre todo en los países más pobres (Manaia *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta lo anteriormente comentado, la Organización Mundial de la Salud (OMS), junto con otras agencias internacionales, han desarrollado una serie de objetivos para tratar de controlar y disminuir la diseminación de resistencia a los antibióticos (OMS, 2016):

Objetivo 1: Mejorar el conocimiento de la resistencia a los antimicrobianos a través de la comunicación, educación y formas efectivas, y la concienciación al respecto.

Objetivo 2: Reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación.

Objetivo 3: Reducir la incidencia de las infecciones con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de la infección.

Objetivo 4: Utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal.

Objetivo 5: Preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, y aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones.

1.7. Situación actual.

1.7.1. A nivel europeo.

Aunque el uso innecesario de antibióticos en la salud humana ha decrecido en los últimos años, la disminución en el consumo de antibióticos en animales productores de alimentos ha sido mucho más notable. De hecho, en el período de 2014-2020, se observó una disminución del 23.0% en el consumo clínico de antibióticos en la UE, mientras que las ventas de antibióticos para animales productores disminuyeron alrededor del 43.0% en 25 países de la UE.

Igualmente, se ha notificado que durante el primer año de pandemia de la COVID-19, el consumo de antibióticos en la clínica ha sido menor, probablemente porque la infección por el virus SARS-CoV-2 desplazó la transmisión de muchas otras enfermedades infecciosas causadas por bacterias y, por lo tanto, no fue necesario el tratamiento antibiótico. No obstante, el consumo de antibióticos de amplio espectro aumentó en comparación con los de espectro reducido, cuando estos deberían ser la terapia de primera línea.

A pesar de los esfuerzos realizados para disminuir el consumo de antibióticos, las resistencias a los antibióticos siguen siendo un enorme problema, especialmente preocupante en los países del sureste de Europa. Entre las cepas resistentes que se han incrementado en los últimos años, cabe destacar el porcentaje de *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina, desde un 9.0% en 2014 a un 17.0% en 2020, y el porcentaje de *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenémicos, que ha aumentado desde un 8.0% en 2014 hasta un 10.0% en 2020. En cuanto a los niveles de resistencia a los antibióticos en las bacterias generalmente responsables de las infecciones con mayor asociación al sistema sanitario, se han mantenido estables, por lo que continúan siendo muy elevados (Figura 9); por ejemplo: la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación por *K. pneumoniae* (34.0%) o la resistencia a los carbapenémicos por *Pseudomonas aeruginosa* (18.0%) y por *Acinetobacter* spp. (38.0%) (OECD, 2022).

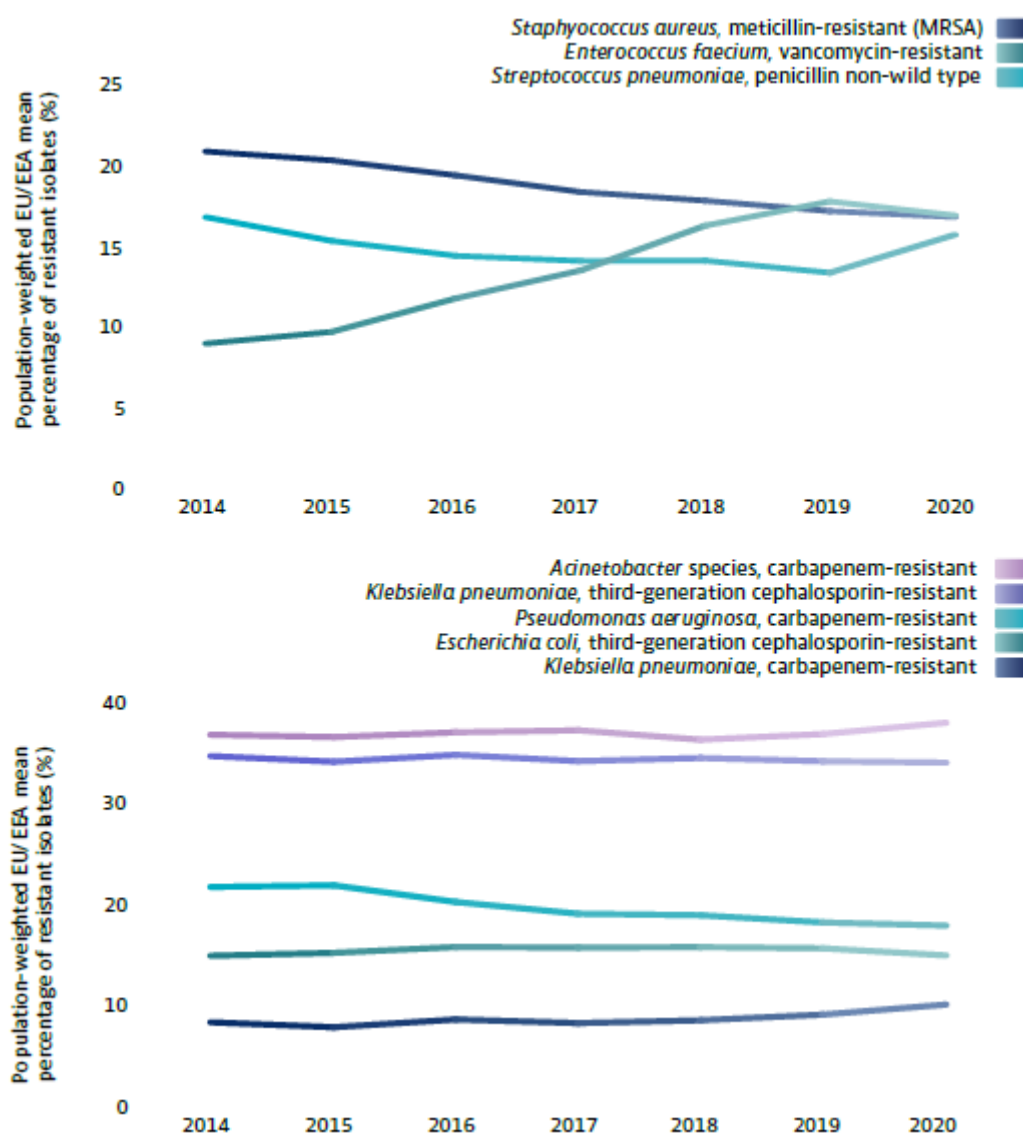


Figura 9. Porcentaje medio ponderado por población de aislados resistentes entre aislados bacterianos invasivos (principalmente infecciones del torrente sanguíneo), en 29 países de la UE/EEE, entre 2014 y 2020 (Tomado de OECD, 2022).

En referencia a las resistencias en animales productores de alimentos, en el período de 2014 a 2019 se observó un aumento significativo del porcentaje de cepas de *Escherichia coli* resistentes a todos los antibióticos testados en 12 países de la UE (de los 30 países estudiados). Sin embargo, se han observado algunos progresos como, por ejemplo, la disminución de la prevalencia de *E. coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y betalactamasas AmpC en 14 países o bajos porcentajes de resistencia en cepas de *Salmonella* resistente a las fluoroquinolonas y a las cefalosporinas de tercera

generación y en cepas de *Campylobacter* resistente a las fluoroquinolonas y a los macrólidos. A pesar de estos avances, los niveles de resistencia a los antibióticos más utilizados siguen siendo notablemente altos (OECD, 2022).

En el informe realizado por la European Food Safety Authority (EFSA) y el European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), con datos recogidos entre 2021 y 2022 en los 27 países de la UE, Irlanda del Norte y cuatro países no miembros (EFSA & ECDC, 2024), se determinó la resistencia a los antibióticos en *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* y *C. coli* procedentes de humanos, animales productores de alimentos y carne fresca. Asimismo, se analizaron los datos de resistencias en *E. coli* comensal (como indicador), *E. coli* productor de BLEE, de AmpC y de carbapenemasas (CP), y en *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) de animales y alimentos.

En las muestras de *Salmonella* spp. de origen humano, se detectaron altos niveles de resistencia a ampicilina (25.2%), sulfonamidas (25.6%) y tetraciclinas (25.1%). No obstante, se observó una disminución significativa de la resistencia a ampicilina y tetraciclina, en 15 y 12 países respectivamente, durante el período 2013-2022, especialmente por parte de *S. typhimurium*. Asimismo, se observó una incidencia moderada de resistencia a la ciprofloxacina (18.7%) en 2022. Cabe destacar los porcentajes de resistencia extremadamente altos obtenidos en *S. kentucky* (72.7%) y la tendencia creciente de resistencia a la ciprofloxacina en *S. enteritidis* en 12 países durante el período 2013-2022.

En el caso de *Salmonella* spp. aislada de animales productores y carcasas de aves de corral, se manifestó un incremento de moderados a muy altos en los niveles de resistencia a la ampicilina (50.2% en pavos), las tetraciclinas (40.2% en pollos de engorde y 41.4% en pavos) y las sulfonamidas (42.5% en pollos de engorde y 26.7% en pavos) en la mayoría de países. Los aislados de *Salmonella* spp. procedentes de aves de corral también manifestaron los mayores porcentajes de resistencia a las fluoroquinolonas (con un 55.5% de los aislamientos en pollos de engorde y un 57.9% en pavos resistentes a la ciprofloxacina y un 55.3% en pollos de engorde y un 49.1% en pavos resistentes al ácido nalidíxico). Específicamente, se informó de una resistencia extremadamente alta de resistencia a la ciprofloxacina en *S. kentucky*, llegando a alcanzar el 100.0% de los aislamientos en pavos de engorde. Asimismo, *E. coli* mostró niveles altos de resistencia

a la ampicilina, la tetraciclina, la trimetoprima y el sulfametoxazol en todas las categorías animales, aunque estos valores variaron ampliamente entre los distintos países, y porcentajes de 51.4% y 48.0% de resistencia a la ciprofloxacina y el ácido nalidíxico, respectivamente, en los pollos de engorde. Rara vez se detectó resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, con porcentajes de 1.4% a la cefotaxima y 1.3% a la ceftazidima en pollos de engorde, 2.2% a la cefotaxima y a la ceftazidima en pavos y 2.6% a la cefotaxima y 1.3% a la ceftazidima en ganado menor de 1 año de edad en los aislamientos de *Salmonella* spp., e inferiores al 1.0% en los aislamientos de *E. coli*.

Tanto en humanos como en animales productores de alimentos y carne fresca importada, se detectaron bajos niveles de *Salmonella* spp. productora de BLEE o AmpC (1.4% en pollos de engorde, 2.2% en pavos de engorde, 0.2% en gallinas ponedoras, 0.9% en cerdos de engorde y 2.5% en bovinos menores de 1 año), mientras que la prevalencia de *E. coli* productor de BLEE/AmpC en ganado y alimentos resultó variable entre los distintos países. Aun así, se observaron tendencias decrecientes de *E. coli* productora de BLEE en pollos de engorde (de 38.0% a 34.9%), pavos de engorde (de 47.0% a 32.1%) y en carne de pollo (de 30.6% a 29.2%). En general, se observó una mayor proporción de presuntas cepas productoras de BLEE que productoras de AmpC. Además, se identificaron algunos aislados de *E. coli* productora de CP en animales productores de alimentos en Italia, Hungría, Austria, España y la República Checa. Por el contrario, no se notificó ningún aislado de *Salmonella* productora de CP en animales durante este período, aunque sí se detectaron algunos casos en humanos.

Las muestras de *Campylobacter* (*C. jejuni* y *C. coli*) manifestaron niveles de resistencia de alta a extremadamente alta a las fluoroquinolonas, principalmente a la ciprofloxacina, en humanos y animales productores, por lo que se ha prohibido su uso clínico en las infecciones por *Campylobacter*. Los niveles de resistencia a la eritromicina resultaron ser muy bajos en humanos y bajos en animales en *C. jejuni*; sin embargo, se observaron niveles más altos en *C. coli*, alcanzando el 43.0% en aislados de aves de corral. Este dato es particularmente preocupante para la salud pública, pues los macrólidos se han convertido en el tratamiento de primera línea en el tratamiento de las campilobacteriosis humanas. La resistencia a la tetraciclina varió de alto a extremadamente alto (90.5%) en animales productores, especialmente en los aislados de *C. coli*, al igual que ocurre en las muestras de humanos, en las que también se han detectado niveles extremadamente altos (71.2%). La resistencia combinada a la ciprofloxacina y la eritromicina también tuvo una

menor manifestación en los aislados de *C. jejuni* que en los de *C. coli*, en los que se observó un aumento del 4.1% en 2020 al 8.2% en 2022 en muestras de pollos de engorde. No obstante, este incremento puede deberse a un mayor número de países que notificaron resultados de resistencias para este tipo de muestra. *C. coli* también manifestó niveles de multirresistencia notablemente mayores que *C. jejuni*, alcanzando el 39.3% en los aislamientos de ganado menor de 1 año y el 16.9% en los aislamientos de pavos de engorde.

En cuanto a la detección de SARM en alimentos y animales sanos, se reveló que la mayoría de aislamientos estaban asociados a animales productores, aunque también se identificaron algunos casos de SARM adquiridos en la comunidad y en el hospital. Otra observación de importancia fue la detección de resistencia a la rifampicina en aislamientos de ganado y carne de cerdo y de aves de corral. En cambio, ningún aislamiento mostró resistencia a la vancomicina durante los dos años de estudio.

1.7.2. A nivel nacional.

El Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) destaca una disminución del 32.4% en el consumo de antibióticos en la medicina humana y del 56.7% en la venta de antibióticos veterinarios desde 2014 hasta 2020 (AEMPS, 2022). Con estos datos, España pasó de ser el país con mayor venta de antibióticos veterinarios en Europa en 2014 a ocupar el séptimo lugar en 2020. A pesar de que estos avances fueron extraordinarios, en los últimos años los informes muestran datos mucho más exitosos. En octubre de 2023, el PRAN, coordinado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), organizó una reunión de alto nivel entre representantes de la UE para abordar los principales desafíos que supone la resistencia a los antibióticos para la salud pública en la perspectiva “One-Health”. En esta reunión, se demostró el compromiso que España había adoptado en la toma de acción y el seguimiento de las recomendaciones de la UE, actualizando los datos de consumo de antibióticos para alcanzar una disminución del 69.5% en veterinaria y del 17.0% en la clínica; con ello, se había logrado alcanzar el primer puesto de la UE en reducción del consumo de antibióticos en salud animal y el tercer puesto, en salud humana.

En lo relativo a la resistencia a los antibióticos, el informe nacional más reciente es el JIACRA (AEMPS, 2018), el cual muestra la evolución de la resistencia a los antibióticos en España hasta 2016. A continuación, se redactan los datos más relevantes:

En las cepas de *Salmonella* spp. aisladas en humanos, el porcentaje de resistencia a las tetraciclinas se mantiene bastante alto y se ha detectado un aumento en la resistencia a la cefotaxima. En ambos casos, el porcentaje de cepas resistentes es notablemente más alto en *S. typhimurium* que en *S. enteritidis*. En las cepas animales de *Salmonella* spp. son preocupantes los altos niveles de resistencia a las fluoroquinolonas, especialmente por parte de *S. kentucky*. *S. enteritidis* ha resultado ser la única serovariedad que ha manifestado resistencias significativas a la colistina (Figura 10). Los porcentajes de resistencia a las tetraciclinas en los aislados animales se muestran similares a los aislados en personas.

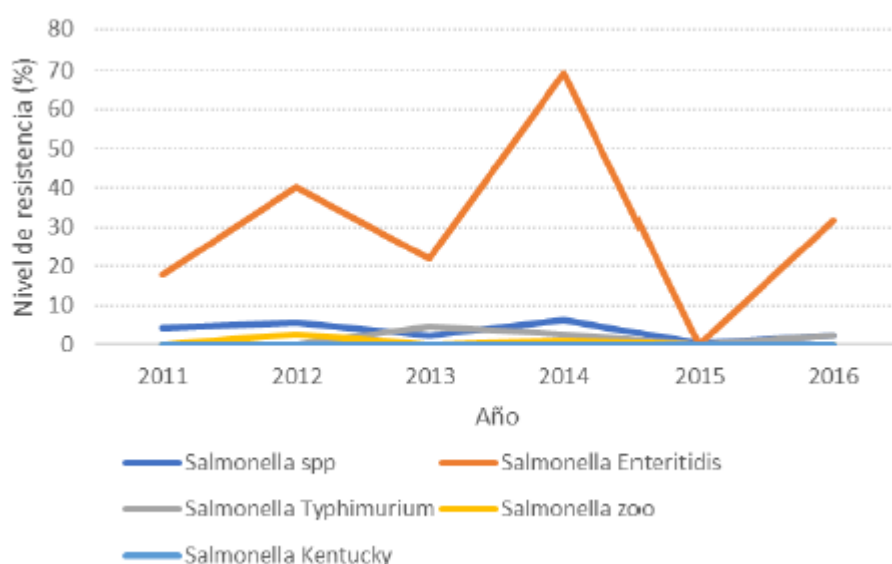


Figura 10. Evolución del porcentaje anual de resistencias frente a colistina de cepas de *Salmonella* spp., *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. zoonótica* y *S. kentucky* (Tomado de AEMPS, 2018).

En las cepas de *Campylobacter* spp. aisladas en humanos, se puede observar un porcentaje de resistencia a la eritromicina relativamente alto por parte de *C. coli* (Figura 11). Cabe destacar una prevalencia de resistencia a la ciprofloxacina y a la tetraciclina por encima del 80.0% (aunque en los últimos años se puede apreciar un ligero descenso en los porcentajes de resistencia a la tetraciclina). En aislados animales de este género bacteriano

se observa un descenso significativo del porcentaje de resistencia a la eritromicina. Los niveles de resistencia a las fluoroquinolonas y tetraciclinas se mantienen muy elevados, (especialmente en *C. coli*).

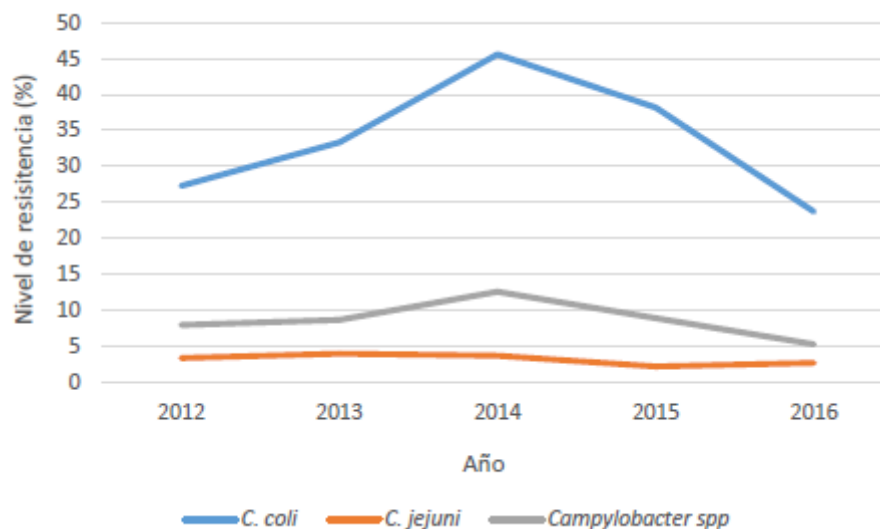


Figura 11. Evolución de la resistencia a eritromicina en *Campylobacter spp.*, *C. coli* y *C. jejuni* (Tomado de AEMPS, 2018).

Desde 2001, la prevalencia de resistencia a la ampicilina en aislados humanos de *E. coli* ha sufrido un aumento hasta estabilizarse alrededor del 65.0%. También se ha observado un aumento importante en el porcentaje de resistencia a la cefotaxima (principalmente por producción de BLEE) (Figura 12), al igual que a la ciprofloxacina (hasta 34.1%, de los porcentajes más elevados de Europa). Este mismo incremento ha ocurrido en los aislados de *K. pneumoniae*. Además, esta última especie bacteriana ha manifestado un aumento significativo en los porcentajes de resistencia a imipenem desde 2010. En los aislados animales de *E. coli*, se observan porcentajes de resistencia a la ampicilina, a las cefalosporinas de tercera generación y a la ciprofloxacina muy variables a lo largo de los años. Los porcentajes de resistencia a la tetraciclina se mantienen por encima del 60.0% en todos los grupos animales, destacando su prevalencia en pavos y cerdos.

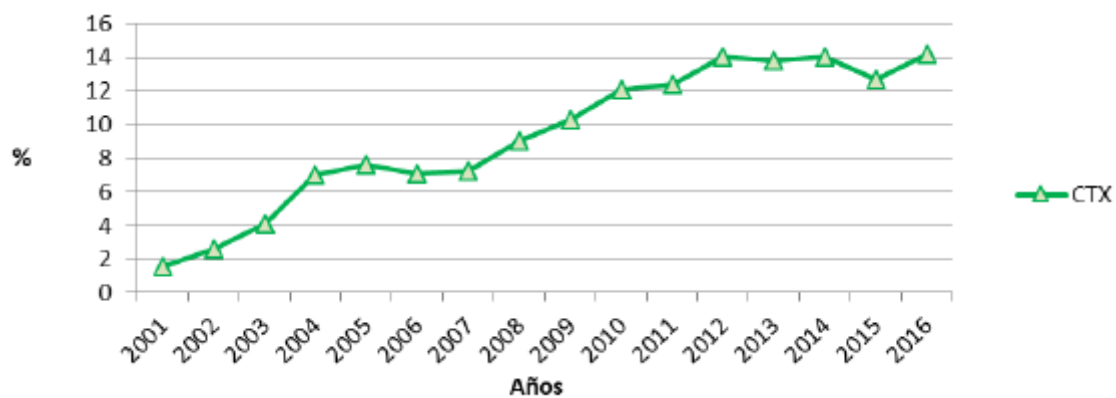


Figura 12. Evolución de la resistencia a la cefotaxima en aislamientos invasivos de *E. coli* (Tomado de AEMPS, 2018).

2. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antibióticos es un problema de enorme relevancia en la actualidad y, debido al continuo intercambio de genes de resistencia entre los microorganismos ambientales y patógenos, las enfermedades transmisibles causadas por bacterias resistentes a los antibióticos cada vez serán más frecuentes, pudiendo llegar a un punto en el que estos fármacos no sean eficaces para el tratamiento infeccioso.

Numerosas investigaciones se basan en el estudio de resistencias en el entorno clínico, pero hoy sabemos que este problema va más allá, pues las bacterias ambientales contribuyen a su extensa propagación. Por eso, el presente trabajo es vital para reforzar el conocimiento actual sobre la dispersión de resistencias a los antibióticos entre distintos nichos ecológicos; partiendo de puntos críticos como las EDAR, las instalaciones ganaderas y los entornos agrícolas, a partir de los cuales las bacterias resistentes y los genes de resistencia son liberados al medioambiente o llegan a los humanos a través de la cadena alimentaria, el aire o el contacto directo.

Este estudio es de enorme interés para la salud pública y de gran ayuda para concienciar a la comunidad sobre la necesidad de tomar medidas más estrictas que permitan el control de las resistencias a los antibióticos y disminuyan drásticamente su amplia dispersión por todos los ecosistemas, naturales y urbanizados.

3. OBJETIVOS

Se puede considerar que la resistencia a los antibióticos sigue un modelo similar a la cadena epidemiológica: la fuente de infección son las bacterias resistentes que, por diversos mecanismos de transmisión, generan nuevas cepas resistentes, teniendo especial interés aquellas causantes de procesos patológicos en la población humana.

El objetivo general de esta tesis doctoral es el estudio del resistoma ambiental como agente causal de la aparición de resistencias y, por lo tanto, como fuente de transmisión de mecanismos de resistencia e incremento de cepas patógenas humanas resistentes a los antibióticos.

Para ello, nos hemos planteado el estudio del resistoma ambiental en una zona periurbana con los siguientes objetivos específicos:

1. Cuantificar el porcentaje de bioma ambiental que presenta resistencia a los antibióticos.
2. Determinar en este bioma los patrones fenotípicos de multirresistencia.
3. Estimar los genes probables que podrían estar implicados en la resistencia a los antibióticos.

4. METODOLOGÍA

4.1. Descripción de la muestra de estudio.

La recolección de muestras para el estudio fenotípico del resistoma se ha realizado en el ecosistema periurbano de la ciudad de Granada (España), entre los años 2020 y 2022. Se llevó a cabo un muestreo de conveniencia, en función del gran volumen de material que se iba a procesar. En total, se han recogido 70 muestras procedentes de diversos entornos ambientales, con el fin de determinar las diferencias en el resistoma de los distintos ambientes.

Los compartimentos ambientales escogidos para tomar las muestras de este estudio son los siguientes:

- Centros educativos de educación secundaria y superior, en los que se recogieron muestras de aire (n=6) y superficies (n=6), tanto en aulas como en zonas comunes.
- Instalaciones ganaderas de vacas, cerdos, pollos y cabras, donde se recogieron muestras de aire (n=6), muestras fecales (n=6) y muestras de los comederos (n=6).
- Alimentos, distinguiendo entre muestras de carne cruda (n=6) y muestras de frutas y hortalizas (n=6).
- Aguas residuales (n=6), procedentes de un colector urbano, no sometidas a tratamiento.
- Residuos sólidos urbanos (n=6), obtenidos en una planta de recogida tras su trituración y homogeneización.
- Suelos agrarios (n=6), procedentes de diversos campos de cultivo de regadío.
- Suelo natural (n=10) extraído de reservas naturales de zonas de montaña no afectadas por actividades antropogénicas.

4.2. Toma de muestras.

La toma de muestras se desarrolló de forma específica para cada tipo de muestra:

- Muestras de aire: se han tomado utilizando un muestreador volumétrico inercial (Air Ideal 3PTM, BioMérieux), en cuyo interior se introduce una placa de cultivo con medio agar BHI (Panreac®, Ref. 413772), recogiendo entre 500 y 1000 L de aire.

- Muestras de superficies: para el muestreo se han utilizado placas de contacto RODAC (Replicate Organism Direct Agar Contact) con agar BHI.
- Muestras de alimentos: se han adquirido en distintos establecimientos comerciales de venta al público localizados en el área periurbana de Granada.
- Muestras de aguas residuales: se han tomado muestras de 250 ml de aguas residuales urbanas de los colectores antes de ser sometidas a ningún tratamiento. Se han utilizado recipientes estériles, los cuales se han transportado refrigerados (8-10°C) al laboratorio, para ser procesados en un máximo de 24 horas.
- Muestras sólidas de instalaciones ganaderas, residuos sólidos urbanos y suelos (tanto agrarios como naturales): para la recolección de todas las muestras sólidas, se han utilizado recipientes de polietileno estériles, los cuales se han transportado refrigerados (8-10°C) al laboratorio, para ser procesados en un máximo de 24 horas. Concretamente, las muestras de residuos sólidos urbanos, una vez trituradas y homogeneizadas, han sido proporcionadas por distintas instalaciones municipales. Por su parte, las muestras de suelo se han recolectado de la capa superficial (aproximadamente 10 cm de profundidad) en distintas localizaciones, siendo las de suelo natural recogidas en zonas de montaña alejadas del tránsito humano y de cualquier actividad antrópica.

4.3. Extracción y conservación del bioma.

Aunque las muestras se procesaron directamente como se describe en los siguientes apartados relativos al cribado y análisis fenotípico, se realizó la extracción y conservación del bioma de cada muestra, por si fuesen necesarias comprobaciones de los ensayos y para posibles estudios posteriores.

Al llegar al laboratorio, todas las muestras sólidas (alimentos, suelos y residuos sólidos, tanto urbanos como de instalaciones ganaderas) se han procesado de la misma manera. Se han pesado 25g de cada muestra y se han añadido 225 ml de agua de peptona (Panreac®, Ref. 414944), para introducir posteriormente la mezcla en un homogeneizador (Stomacher 400 Circulator) a 150 rpm durante 15 min. A continuación, la muestra se deja decantar y el sobrenadante (donde queda suspendido el bioma) se utiliza para los ensayos de cribado y análisis fenotípico. En el caso de las muestras líquidas (aguas residuales) no es necesario ningún procesamiento.

Para la extracción y conservación del bioma de las muestras sólidas y líquidas, se procedía a una centrifugación de 150 ml (en el caso de las muestras sólidas del sobrenadante) a 4000 rpm durante 15 minutos y el sedimento obtenido (bioma) se resuspendía en 3 ml del medio 5NBS (peptona, 25 g; extracto de carne deshidratado, 15 g; NaCl, 1 g; agua destilada, 1000 ml. Ajustar a pH = 7. Repartir en tubos con cierre de tapón hermético, 3 ml/tubo, y esterilizar en autoclave a 120 °C durante 30 min.) y 2 ml de glicerina al 50% estéril, para conservarlo mediante congelación a -80°C.

En las muestras de aire y superficies, el bioma se ha obtenido directamente de las placas de cultivo utilizadas en el muestreo. Para la extracción y conservación del bioma, se ha arrastrado todo el crecimiento bacteriano de cada placa y se ha resuspendido, como en las anteriores muestras, en un tubo con 3 ml del medio 5NBS y 2 ml de glicerina estéril, para conservarlo mediante congelación a -80°C.

4.4. Cribado para la cuantificación del bioma resistente.

Tras obtener el bioma de las muestras, se ha procedido a la cuantificación del microbioma resistente frente al total de bacterias aerobias heterótrofas (BAH) presentes. En este procedimiento, se han utilizado placas de 90 mm de diámetro con agar BHI, siguiendo una metodología normalizada de recuento en superficie (AENOR, 1999; AENOR, 2014; APHA, AWWA & WEF, 2023). Para el análisis cuantitativo, se han inoculado 0.1 ml de cada muestra homogeneizada en la superficie de nueve placas: una sin antibióticos, que servirá como recuento total de BAH (control); y las otras ocho placas conteniendo, cada una, uno de los siguientes antibióticos en la concentración adecuada: ampicilina (32 µg/ml), kanamicina (64 µg/ml), tetraciclina (16 µg/ml), ciprofloxacina (4 µg/ml), eritromicina (8 µg/ml), gentamicina (16 µg/ml), cloranfenicol (32 µg/ml) y vancomicina (16 µg/ml). Estos antibióticos fueron seleccionados por ser indicativos de la presencia de genes de resistencia transferibles, utilizando las CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) para las cuales se considera que una bacteria es resistente (CLSI, 2022; EUCAST, 2022).

Todos los cultivos se realizaron siempre por duplicado. En las muestras con elevado contenido de BAH se utilizaron diluciones decimales, de forma que las colonias obtenidas no fuesen confluentes, con el fin de permitir su recuento y caracterización. Tras 48 horas de incubación de las placas de cultivo a 37°C, se realizó el recuento de BAH y se

calcularon las unidades formadoras de colonias (UFC) por unidad de peso o volumen, dependiendo del tipo de muestra (AENOR, 1999). Este tiempo de incubación se consideró preferible a las 72 horas, para evitar la posible extensión de colonias (AENOR, 2014). Comparando el crecimiento de BAH en la placa control (sin antibióticos) con el crecimiento obtenido en las placas cultivadas con cada uno de los ocho antibióticos, fue posible obtener el porcentaje de bioma resistente de cada muestra a cada uno de los antibióticos analizados.

4.5. Análisis fenotípico.

De cada una de las placas con antibióticos cultivadas en la prueba de cribado, se han seleccionado las cepas morfológicamente diferentes de cada muestra, obteniendo un total de 710 cepas en las que se ha realizado el estudio fenotípico de resistencias. El número de cepas correspondientes a cada nicho ecológico fue: 127 de aire (64 de instalaciones ganaderas y 63 de centros educativos); 50 de superficies; 126 de alimentos (58 de carnes y 68 de frutas y hortalizas); 137 de residuos sólidos ganaderos (71 de comederos y 66 de heces); 58 de residuos sólidos urbanos; 86 de aguas residuales; 67 de suelos agrarios; y 59 de suelos naturales.

Para el análisis fenotípico, se ha determinado la sensibilidad a los antibióticos mediante el test de susceptibilidad de Kirby-Bauer o de difusión en disco, siguiendo los procedimientos estandarizados (CLSI, 2022; EUCAST, 2022). Para ello, cada cepa seleccionada se ha sembrado en agar Mueller-Hinton (Panreac®, Ref. 413787) y se ha determinado su sensibilidad frente a los 32 antibióticos que se muestran en la Tabla 1, en la cual se expone el diámetro de los halos de inhibición para cada antibiótico. Puesto que este estudio no pretendía identificar las especies bacterianas, ni si eran gram-positivas o gram-negativas, se ha utilizado el halo de resistencia con el diámetro más pequeño.

Antibiótico	Siglas	Gram-negativas (Enterobacterales) Resistencia ($\leq$ mm)	Criterio	Gram-positivas (Staphilococcus) Resistencia ($<$ mm)	Criterio
Aminoglucósidos					
Amikacina (30 μ g)	AK	14	CLSI 2022	15	EUCAST 2022
Espectinomicina (100 μ g)	SH	14	CLSI 2022 ¹	-	-
Estreptomina (10 μ g)	S	11	CLSI 2022	-	-
Gentamicina (10 μ g)	CN	12	CLSI 2022	12	CLSI 2022
Kanamicina (30 μ g)	K	13	CLSI 2022	-	-
Tobramicina (10 μ g)	TOB	12	CLSI 2022	18	EUCAST 2022
Antagonistas					
Trimetoprim-sulfametoxazol (25 μ g)	SXT	10	CLSI 2022	10	CLSI 2022
Beta-lactámicos					
Amoxicilina-clavulánico (30 μ g)	AMC	13	CLSI 2022	-	-
Carbapenémicos					
Doripenem (10 μ g)	DOR	19	CLSI 2022	-	-
Imipenem (10 μ g)	IMP	19	CLSI 2022	-	-
Meropenem (10 μ g)	MEM	19	CLSI 2022	-	-
Cefalosporinas I, II, III y IV					
Cefalotina (30 μ g)	KF	14	CLSI 2015	-	-
Cefazolina (30 μ g)	KZ	14	CLSI 2022	-	-
Cefepima (30 μ g)	FEP	18	CLSI 2022	-	-
Cefotaxima (30 μ g)	CTX	22	CLSI 2022	-	-
Cefoxitina (30 μ g)	FOX	14	CLSI 2022	-	-
Ceftazidima (30 μ g)	CAZ	17	CLSI 2022	-	-
Cefuroxima (30 μ g)	CXM	14	CLSI 2022	-	-

¹Criterio para *Neisseria gonorrhoeae*.

²Criterio para *Enterococcus* spp.

Tabla 1. Antibióticos utilizados en el análisis fenotípico y diámetro de los halos de inhibición correspondientes según los criterios de estandarización.

Antibiótico	Siglas	Gram-negativas (Enterobacterales) Resistencia ($\leq$ mm)	Criterio	Gram-positivas (Staphylococcus) Resistencia ($<$ mm)	Criterio
Fenicoles					
Cloranfenicol (30 μ g)	C	12	CLSI 2022	12	CLSI 2022
Fluoroquinolonas					
Ácido nalidíxico (30 μ g)	NA	13	CLSI 2022	-	-
Ciprofloxacina (5 μ g)	CIP	21	CLSI 2022	15	CLSI 2022
Levofloxacina (5 μ g)	LEV	16	CLSI 2022	13	CLSI 2022 ²
Fosfomicinas					
Fosfomicina- trometamol (200 μ g)	FOT	12	CLSI 2022	12	CLSI 2022
Glucopéptidos					
Teicoplanina (30 μ g)	TEC	-	-	10	CLSI 2022 ²
Vancomicina (30 μ g)	VA	-	-	14	CLSI 2022 ²
Macrólidos					
Clindamicina (2 μ g)	DA	-	-	14	CLSI 2022
Eritromicina (15 μ g)	E	-	-	13	CLSI 2022
Monobactámicos					
Aztreonam (30 μ g)	ATM	17	CLSI 2022	-	-
Penicilinas					
Ampicilina (10 μ g)	AMP	13	CLSI 2022	16	CLSI 2022 ²
Piperacilina (100 μ g)	PRL	17	CLSI 2022 ³	-	-
Ticarcilina (75 μ g)	TIC	20	EUCAST 2022	-	-
Tetraciclinas					
Tetraciclina (30 μ g)	TE	11	CLSI 2022	14	CLSI 2022

¹Criterio para *Neisseria gonorrhoeae*.

²Criterio para *Enterococcus* spp.

³Criterio para *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 1 (continuación). Antibióticos utilizados en el análisis fenotípico y diámetro de los halos de inhibición correspondientes según los criterios de estandarización.

La Figura 13 muestra de forma esquematizada la metodología seguida para la realización del presente trabajo.

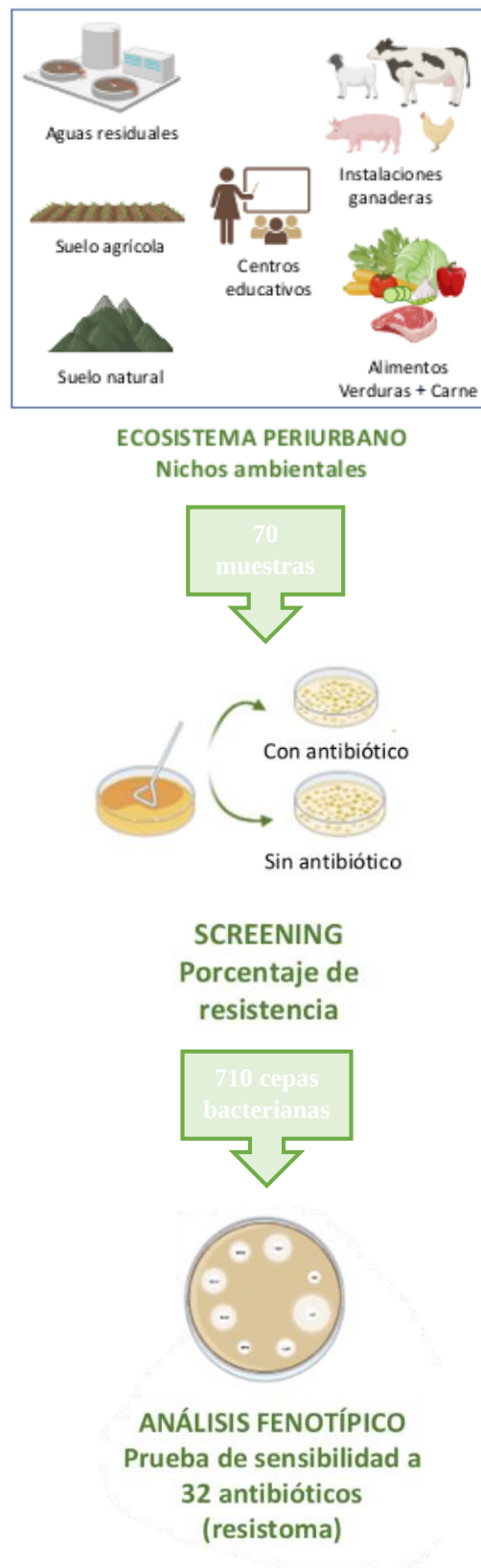


Figura 13. Esquema de la metodología desarrollada.

4.5. Estimación de genes de resistencia probables.

Basándonos en los resultados obtenidos en el análisis fenotípico del resistoma, y tras una exhaustiva consulta de la bibliografía científica existente (Jian *et al.*, 2021; Leite *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2013; Poomchuchit *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021; Zhuang *et al.*, 2021; Zurfluh *et al.*, 2020), se ha realizado una estimación de los genes de resistencia probables que han podido causar los fenotipos de resistencia detectados en el bioma.

De acuerdo con datos publicados previamente, los genes de resistencia son responsables de numerosos mecanismos, generalmente enzimáticos, que inactivan simultáneamente un grupo de antibióticos con una estructura similar. Cada uno de estos genes se manifiesta en un perfil de resistencia a los antibióticos. Por tanto, en sentido contrario, el perfil de resistencias permite plantear hipótesis sobre la presencia de un gen determinado. De esta manera, se ha tratado de indicar la probabilidad de la presencia de genes de resistencia, aunque para confirmarlo con certeza sería necesaria la realización de un estudio genómico.

4.6. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico, toda la información obtenida se ha introducido en una base de datos y ha sido procesada utilizando el programa SPSS para Windows (versión 28). Este análisis ha consistido en un estudio descriptivo, incluyendo media y desviación estándar, y un estudio analítico en el que se han realizado pruebas de análisis de la varianza (ANOVA) y de comparación de medias independientes (*t*-test), con el fin de comprobar si las diferencias entre las distintas muestras eran significativas ($p < 0.05$). Los gráficos han sido generados en Microsoft Excel.

5. RESULTADOS

5.1. Cribado de cepas resistentes.

Como se ha comentado en la metodología, en el cribado de resistencias se han determinado los porcentajes de BAH resistentes a cada uno de los ocho antibióticos que se habían añadido al medio de cultivo realizando la comparación del recuento obtenido en las placas con antibiótico y del recuento obtenido en las placas control sin antibiótico. La Figura 14 muestra el valor medio del porcentaje de cepas resistentes a cada antibiótico. Como valor medio total se ha obtenido que el 12.9% de las BAH presentes en las diversas muestras presentaban alguna resistencia a los antibióticos utilizados en el procedimiento de cribado. Considerando cada antibiótico de manera individual, los porcentajes más bajos de BAH resistentes se han observado en las placas con cloranfenicol (2.7%) y gentamicina (2.9%), mientras que el mayor porcentaje se ha obtenido en las placas que contenían eritromicina (33.4%), seguidas por las de vancomicina (27.0%).

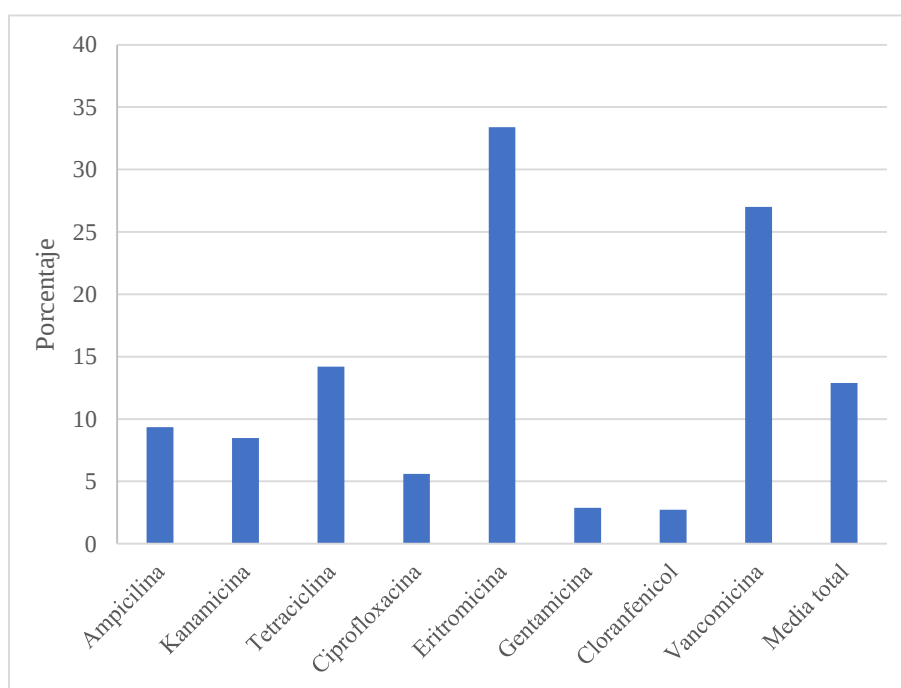
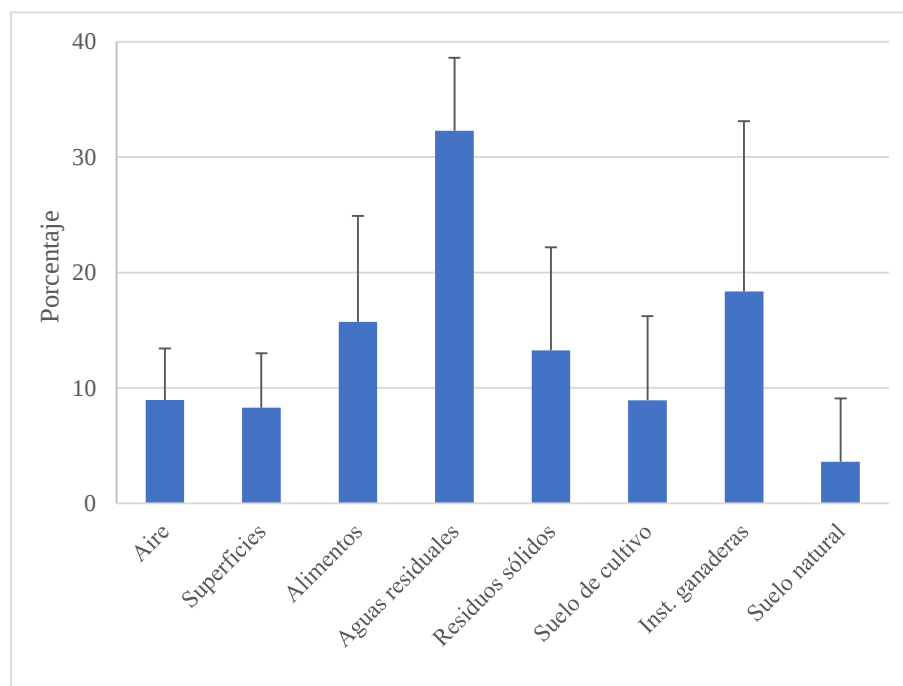


Figura 14. Porcentaje de cepas resistentes a los antibióticos utilizados en el cribado de las muestras ambientales.

Asimismo, se ha analizado la frecuencia de cepas resistentes según la procedencia de las muestras. Como se puede observar en la Figura 15, las diferencias entre los distintos ambientes estudiados son significativas (ANOVA: $p < 0.001$). En este caso, el porcentaje

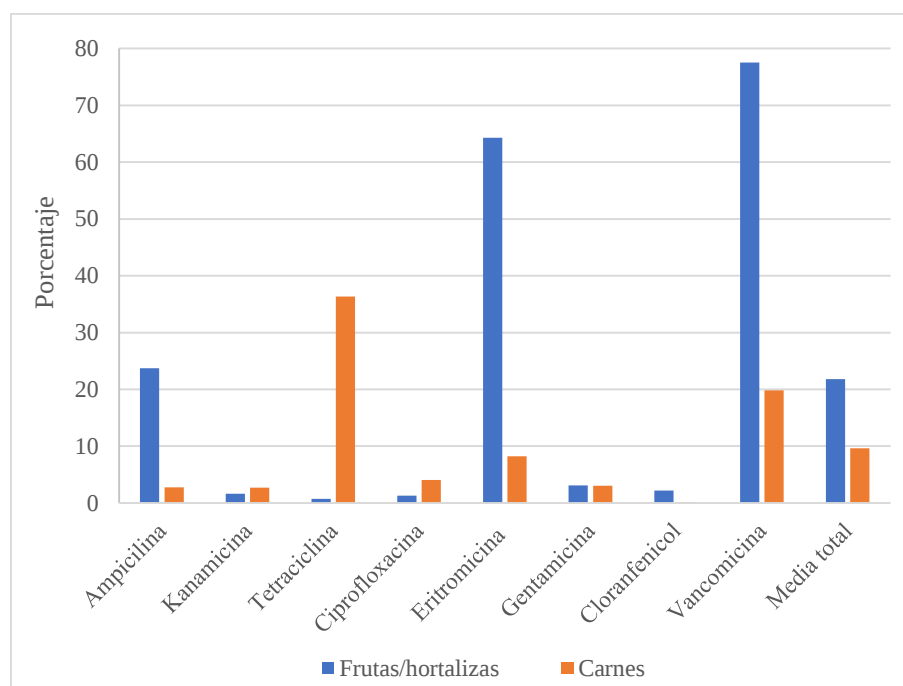
más alto de cepas resistentes se observó en las muestras de aguas residuales (32.3% de las cepas), mientras que el más bajo fue hallado en las muestras de suelo natural (3.6%).



ANOVA: $p < 0.001$

Figura 15. Porcentaje de cepas resistentes a los antibióticos utilizados en el cribado según la procedencia de las muestras ambientales.

Tal y como se detalla en el apartado 2.1, las muestras de alimentos se han dividido en dos grupos: frutas/hortalizas y carnes. La Figura 16 muestra la comparación de los porcentajes de BAH resistentes entre ambos grupos. Para analizar las diferencias entre las frutas/hortalizas y las carnes, se ha realizado un test de comparación de medias independientes en el que se han podido observar diferencias significativas en los porcentajes de cepas resistentes para los antibióticos ampicilina, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol y vancomicina. La diferencia del total de cepas resistentes también es significativa. Como se puede apreciar, en el grupo frutas/hortalizas el mayor porcentaje de cepas son resistentes a la vancomicina, la eritromicina y la ampicilina; en cambio, en las muestras de carne predominaron las resistencias a la tetraciclina.



Valor de p en el test de comparación de medias: ampicilina, $p=0.013$; kanamicina, $p=0.288$; tetraciclina, $p=0.009$; ciprofloxacina, $p=0.255$; eritromicina, $p=0.002$; gentamicina, $p=0.491$; cloranfenicol, $p=0.037$; vancomicina, $p<0.001$; total, $p=0.006$.

Figura 16. Porcentaje de cepas resistentes a los antibióticos utilizados en el cribado en las muestras de alimentos.

El análisis estadístico de la distribución de las cepas resistentes a cada antibiótico en función de la procedencia de las muestras mediante el test ANOVA, únicamente ha mostrado diferencias significativas para ampicilina ($p=0.001$), eritromicina ($p<0.001$), cloranfenicol ($p=0.004$) y vancomicina ($p<0.001$). Como se muestra en la Figura 17, los niveles más altos de resistencia se obtuvieron para la eritromicina y la vancomicina de todos los tipos de muestra, lo que coincide con el análisis global previamente expuesto (Figura 14). También se puede observar que las muestras de aguas residuales manifestaron, con diferencia, los porcentajes de BAH resistentes más altos frente a todos los antibióticos, a excepción del cloranfenicol, en cuyo caso destacó el crecimiento de BAH en las muestras de instalaciones ganaderas. Asimismo, se puede apreciar que, aunque en la mayoría de muestras predominara la resistencia a la eritromicina, en las muestras de alimentos y de suelo natural las mayores frecuencias de resistencia se manifestaron en presencia de vancomicina.

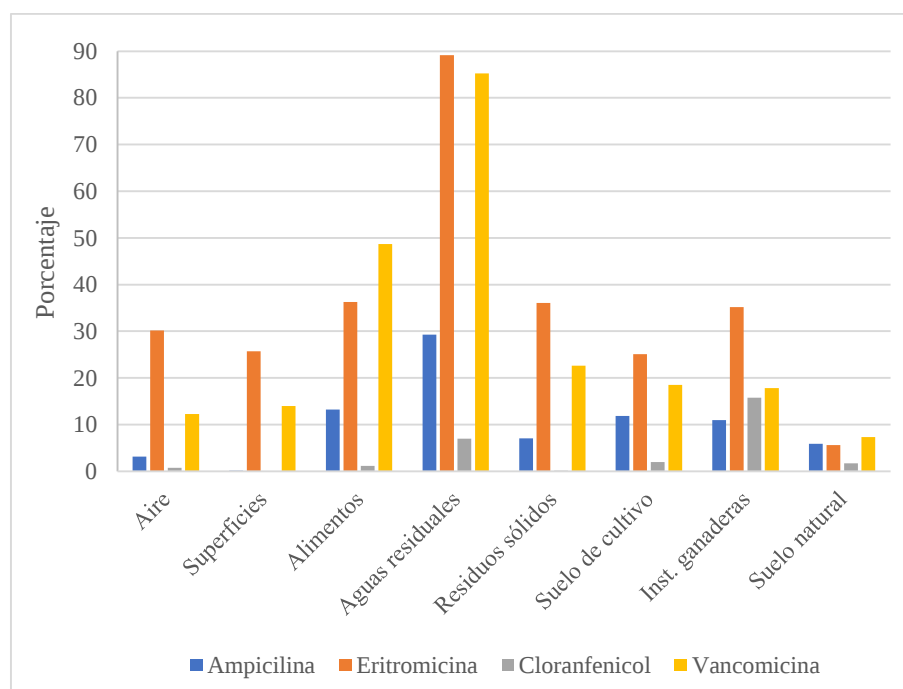


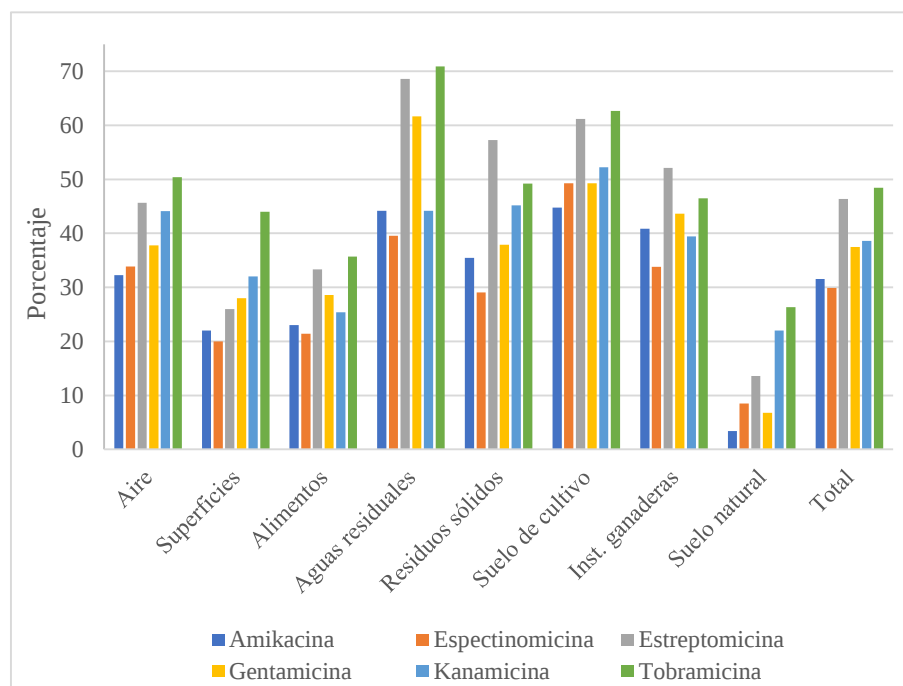
Figura 17. Porcentaje de cepas resistentes a los antibióticos estadísticamente significativos en el test ANOVA según la procedencia de las muestras ambientales. Únicamente se muestran los resultados de los antibióticos que han mostrado diferencias significativas: ampicilina ($p=0.001$), eritromicina ($p<0.001$), cloranfenicol ($p=0.004$) y vancomicina ($p<0.001$).

5.2. Análisis del resistoma.

El análisis del resistoma se ha realizado sobre 710 cepas de BAH aisladas de las placas de cultivo con antibiótico utilizadas en el cribado, tal y como se indica en la metodología. Este análisis ha consistido en la determinación de los porcentajes de resistencia frente a los 32 antibióticos presentados en la Tabla 1, diferenciándolos según el grupo antibiótico al que pertenecen.

La resistencia a los aminoglucósidos fue detectada en un gran número de cepas (Figura 18), siendo la tobramicina el antibiótico de este grupo que presentó el mayor nivel de resistencias. A nivel global, el 48.5% de las cepas bacterianas estudiadas mostró resistencia a la tobramicina, incrementándose hasta alcanzar el 70.9% en las cepas procedentes de muestras de aguas residuales. La estreptomicina también presentó niveles elevados de cepas resistentes en aguas residuales (68.6%), suelo de cultivo (61.2%) y residuos sólidos (57.3%). Los menores porcentajes de BAH resistentes se obtuvieron en

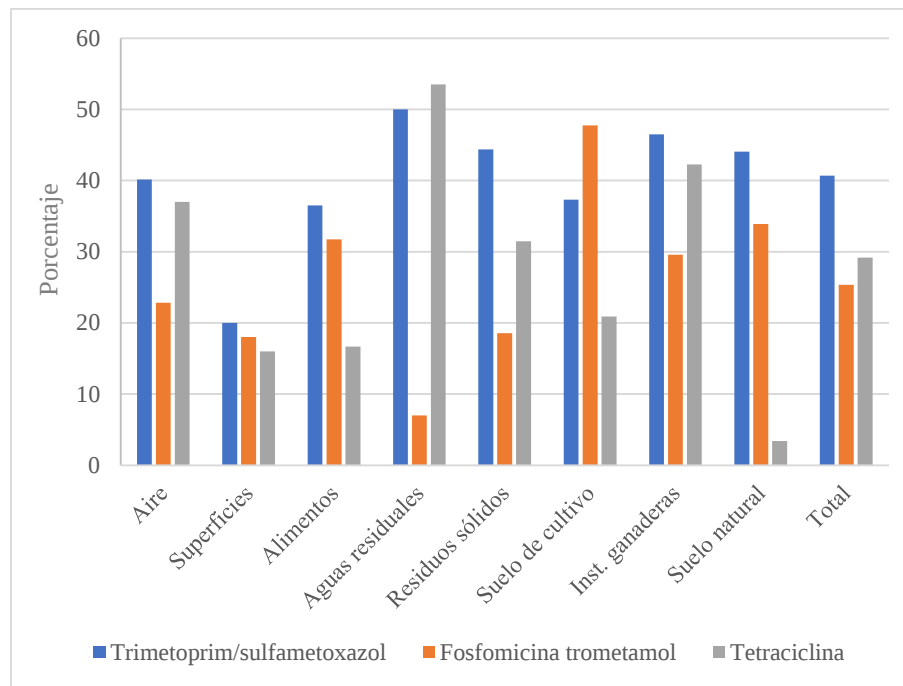
las muestras de suelo natural, con un valor máximo de 26.3% para la tobramicina y un valor mínimo de 3.4% para la amikacina.



N=710; Chi cuadrado: $p < 0.001$ para todos los antibióticos.

Figura 18. Distribución de las resistencias a antibióticos aminoglucósidos en las cepas de BAH aisladas de los cultivos de la prueba de cribado.

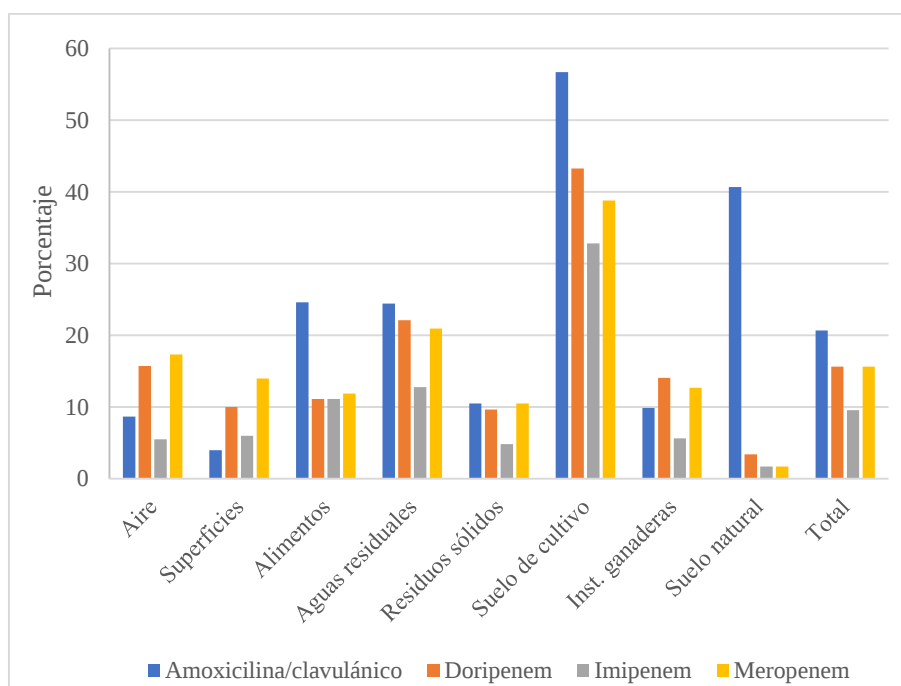
Varios antibióticos representados en la Figura 19 también presentaron un elevado porcentaje de BAH resistentes. El 40.7% del total de cepas aisladas resultaron resistentes al trimetoprim/sulfametoxazol, alcanzando el 50.0% en las muestras de aguas residuales y el 44.1% en las muestras de suelo natural. Los mayores porcentajes de BAH resistentes a fosfomicina trometamol se obtuvieron en las muestras de suelo de cultivo (47.8%) y las de suelo natural (33.9%). Con respecto a la tetraciclina, los niveles más bajos de resistencia se detectaron en las muestras de suelo natural (3.4%) y los más altos en las de aguas residuales (53.5%) e instalaciones ganaderas (42.3%).



N=710; Chi cuadrado: Trimetoprim/sulfametoxazol, $p=0.034$; fosfomicina trometamol y tetraciclina, $p<0.001$.

Figura 19. Distribución de las resistencias a varios antibióticos en las cepas de BAH aisladas de los cultivos de la prueba de cribado.

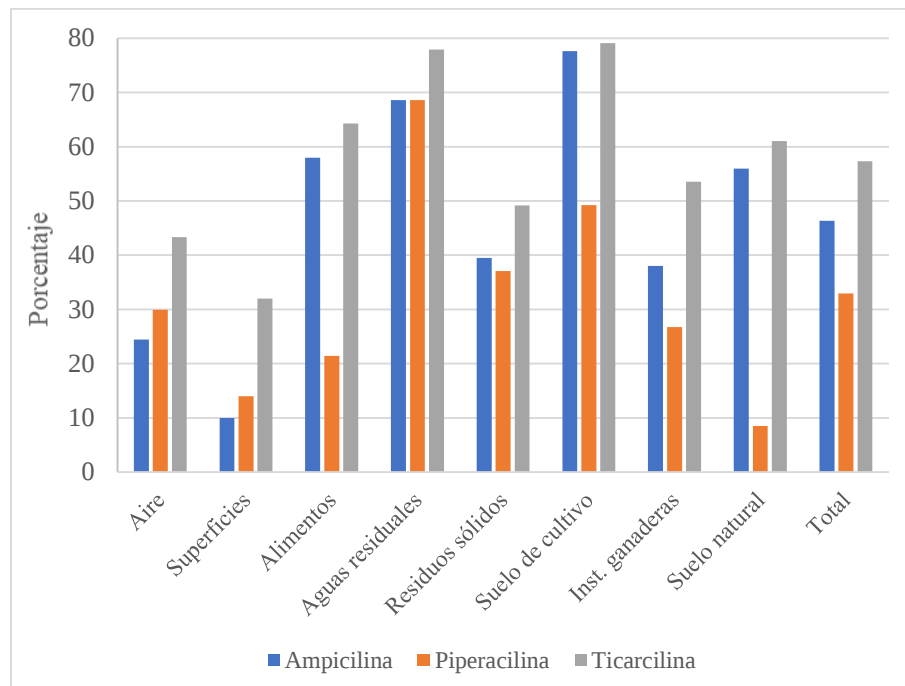
Para el grupo de antibióticos beta-lactámicos y carbapenémicos (Figura 20), el mayor número de BAH resistentes se encontró en las muestras de suelo de cultivo: amoxicilina/clavulánico, 57.6%; doripenem, 43.3%; imipenem, 32.8%; y meropenem, 38.8%. Cabe destacar el porcentaje tan alto de BAH resistentes a la amoxicilina/clavulánico en las muestras de suelo natural (40.7%).



N=710; Chi cuadrado: $p < 0.001$ para todos los antibióticos.

Figura 20. Distribución de las resistencias a antibióticos beta-lactámicos y carbapenémicos en las cepas de BAH aisladas de los cultivos de la prueba de cribado.

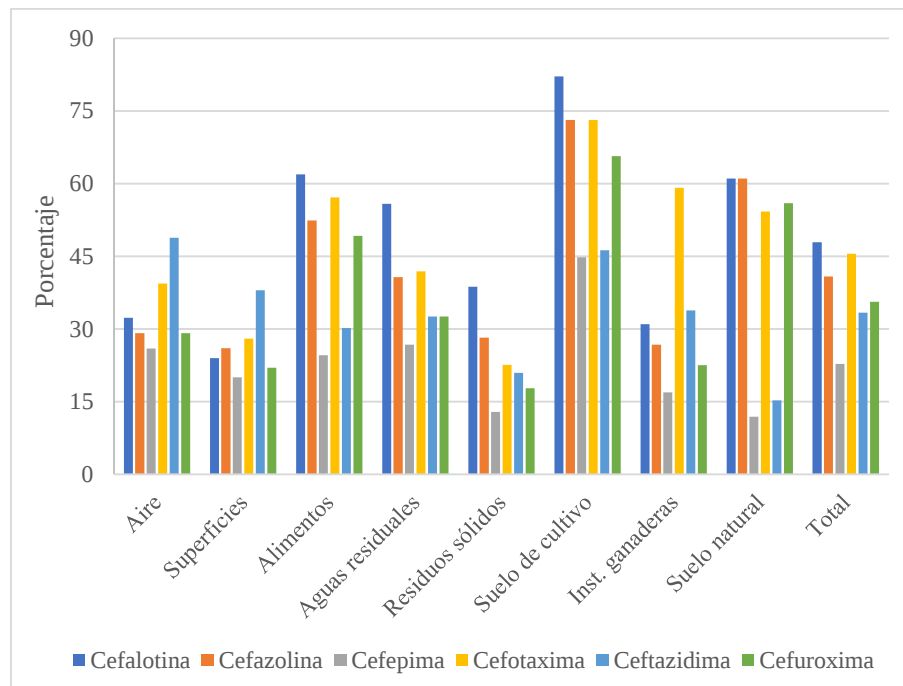
Las resistencias a las penicilinas resultaron ser muy abundantes (Figura 21). Los valores máximos se observaron para la ticarcilina (79.1%) y la ampicilina (77.6%) en las muestras de suelo de cultivo, y para la piperacilina (68.6%) en las muestras de aguas residuales. En este grupo antibiótico, también destacó el elevado porcentaje de resistencias encontrado en las muestras de suelo natural, en las cuales se obtuvieron datos del 55.9% para la ampicilina y del 57.3% para la ticarcilina.



N=710; Chi cuadrado: $p < 0.001$ para todos los antibióticos.

Figura 21. Distribución de las resistencias a antibióticos penicilinas en las cepas de BAH aisladas de los cultivos de la prueba de cribado.

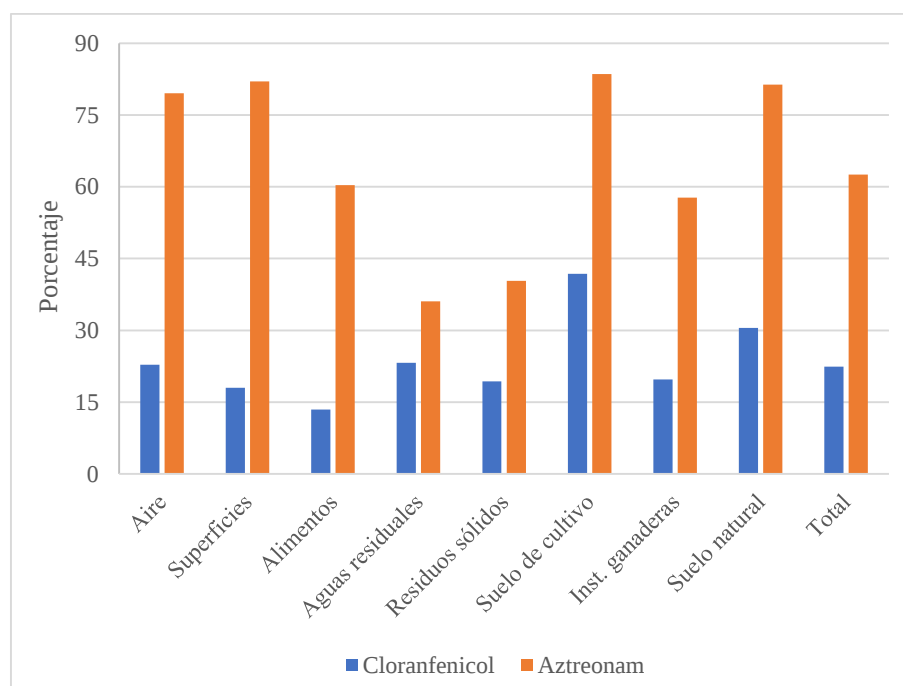
Respecto al grupo de las cefalosporinas, se obtuvieron valores de resistencia preocupantemente elevados en todos los compartimentos ambientales (Figura 22). Entre los datos más sobresalientes, se pueden indicar los porcentajes de BAH resistentes obtenidos en las muestras de suelo de cultivo: cefalotina, 82.1%; cefazolina y cefotaxima, 73.1%.



N=710; Chi cuadrado: $p < 0.001$ para todos los antibióticos.

Figura 22. Distribución de las resistencias a antibióticos cefalosporinas en las cepas de BAH aisladas de los cultivos de la prueba de cribado.

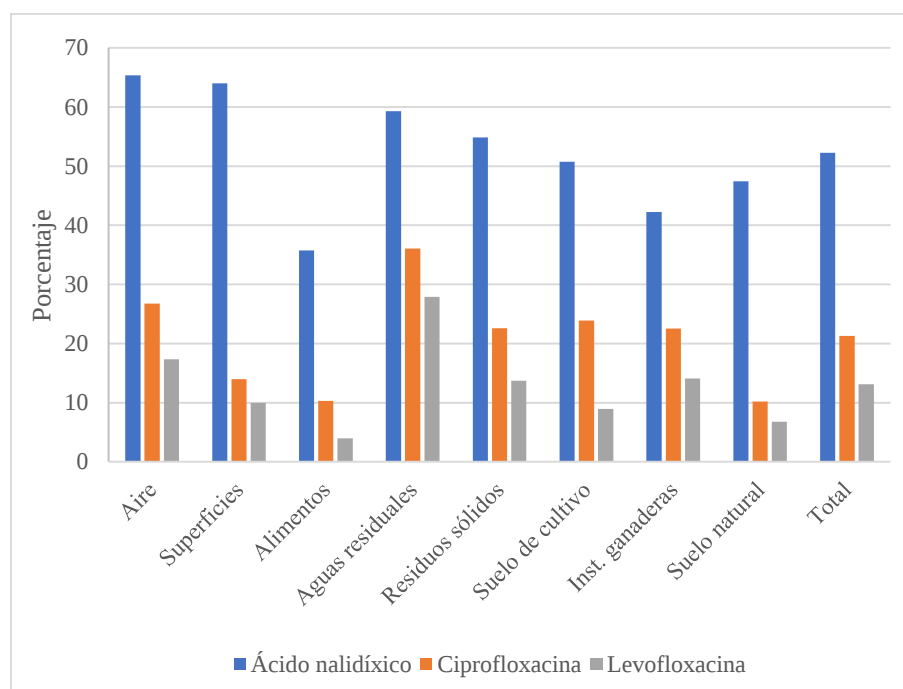
En los monobactámicos, el aztreonam mostró elevados niveles de resistencia con una amplia distribución, superando el 70.0% en las muestras de aire, superficies y suelo, tanto de cultivo como natural (Figura 23). En cambio, en el grupo de los fenicoles, el cloranfenicol presentó menores niveles de resistencia, siendo el valor más elevado un 41.8% de cepas resistentes en las muestras de suelo de cultivo.



N=710; Chi cuadrado: $p < 0.001$ para todos los antibióticos.

Figura 23. Distribución de las resistencias a antibióticos fenícoles y monobactámicos en las cepas de BAH aisladas de los cultivos de la prueba de cribado.

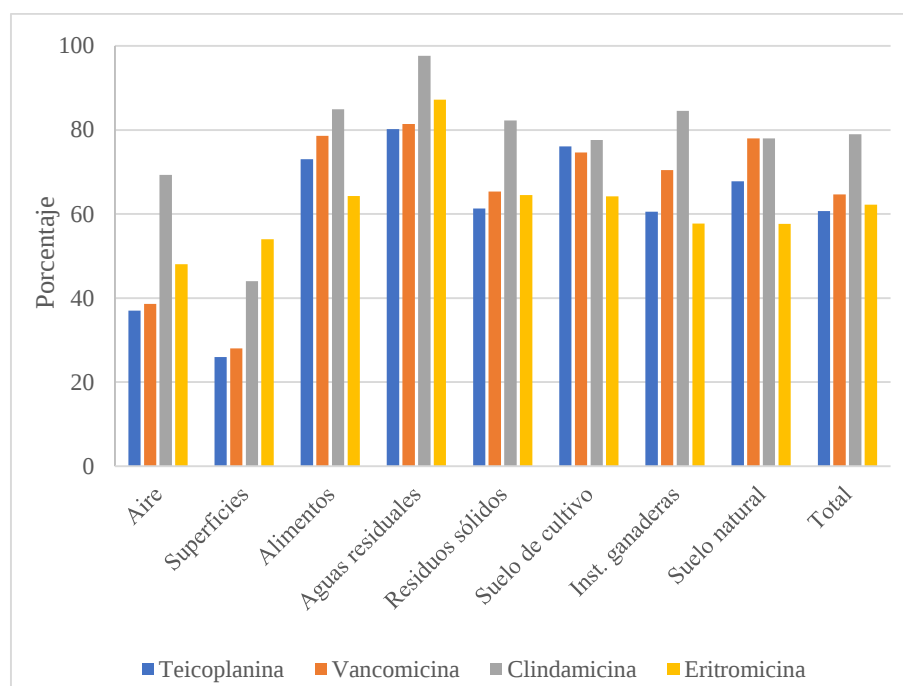
En relación al grupo de las quinolonas y fluoroquinolonas (Figura 24), destacó el elevado nivel de BAH resistentes al ácido nalidíxico en todos los compartimentos ambientales analizados. Considerando el total de cepas estudiadas, los resultados revelaron que el 52.3% eran resistentes a este antibiótico, presentando porcentajes superiores al 60.0% de resistencias en las muestras de aire y superficies. Además, cabe destacar el dato de 47.5% de BAH resistentes en las muestras de suelo natural. Para el resto de antibióticos de este grupo se detectaron menores niveles de resistencia, encontrándose los valores más altos en las muestras de aguas residuales, con un 36.1% de resistencias a la ciprofloxacina y un 27.9% a la levofloxacina.



N=710; Chi cuadrado, $p < 0.001$ para todos los antibióticos.

Figura 24. Distribución de las resistencias a antibióticos quinolonas y fluoroquinolonas en las cepas de BAH aisladas de los cultivos de la prueba de cribado.

En el grupo de los glucopéptidos y en el de los macrólidos también se encontraron niveles muy elevados de resistencia (Figura 25). Considerando los glucopéptidos, las muestras de aguas residuales manifestaron porcentajes del 80.2% de BAH resistentes a la teicoplanina y del 81.4% a la vancomicina. Asimismo, destacan los niveles de resistencia alcanzados en las muestras de alimentos y de suelo natural. En el caso de los macrólidos, el 97.7% de las cepas aisladas de las muestras de aguas residuales resultaron ser resistentes a la clindamicina, así como el 84.9% de las cepas procedentes de alimentos y el 78.0% de las cepas de suelo natural. En cuanto a la eritromicina, el valor más destacable es un 87.2% de resistencias detectadas en las muestras de aguas residuales.



N=710; Chi cuadrado: $p < 0.001$ para todos los antibióticos.

Figura 25. Distribución de las resistencias a antibióticos glucopéptidos y macrólidos en las cepas de BAH aisladas de los cultivos de la prueba de cribado.

5.2.1. *Genes de resistencia probables.*

A partir del perfil fenotípico de resistencias a los antibióticos, hemos podido estimar, con elevada probabilidad, los posibles genes de resistencia que podrían estar presentes en las cepas aisladas y ser la causa del fenotipo de resistencias obtenido. Con este propósito, tras una extensa consulta de la bibliografía científica existente, se han seleccionado los genes de resistencia que se muestran en la Tabla 2.

Genes	Perfil fenotípico de resistencias	Referencias
<i>bla</i>	Penicilinas, β -lactámicos, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos	Jian <i>et al.</i> , 2021; Zhu <i>et al.</i> , 2021; Zhuang <i>et al.</i> , 2021
<i>qnr/oqx</i>	Quinolonas y fluoroquinolonas	Jian <i>et al.</i> , 2021; Poomchuchit <i>et al.</i> , 2021; Zhu <i>et al.</i> , 2021
<i>aac/ant</i>	Aminoglucósidos	Jian <i>et al.</i> , 2021
<i>str</i>	Estreptomicina	Zhu <i>et al.</i> , 2021
<i>sul/dfr</i>	Sulfonamidas	Jian <i>et al.</i> , 2021; Zhu <i>et al.</i> , 2021; Zhuang <i>et al.</i> , 2021
<i>flo</i>	Cloranfenicol	Jian <i>et al.</i> , 2021; Li <i>et al.</i> , 2013
<i>fos</i>	Fosfomicina	Leite <i>et al.</i> , 2021; Zurfluh <i>et al.</i> , 2020
<i>van</i>	Glucopéptidos	Jian <i>et al.</i> , 2021; Zhuang <i>et al.</i> , 2021
<i>erm</i>	Macrólidos	Jian <i>et al.</i> , 2021; Zhu <i>et al.</i> , 2021
<i>tet</i>	Tetraciclinas	Jian <i>et al.</i> , 2021; Zhu <i>et al.</i> , 2021; Zhuang <i>et al.</i> , 2021

Tabla 2. Perfil fenotípico de resistencia a los antibióticos de los genes de resistencia considerados para el estudio.

Mediante este procedimiento, podemos señalar la enorme presencia del gen *bla*, pues podría estar presente en el 100.0% de las cepas aisladas de las muestras de suelo de cultivo y en el 90.1% del total de BAH aisladas del conjunto de compartimentos ambientales estudiados (Tabla 3). Los genes *van* y *erm* también serían muy frecuentes, con valores porcentuales máximos en las muestras de aguas residuales. Los genes *aac* y *ant*, que codifican los enzimas inactivantes aminoglucósido acetiltransferasa y aminoglucósido nucleotidiltransferasa respectivamente, serían más abundantes en las muestras de aguas residuales (83.7%), residuos sólidos (77.4%) y suelo de cultivo (77.6%). En las muestras de suelo natural, los genes probables más frecuentes serían *bla* (88.1%), *van* (78.0%) y *erm* (79.7%).

	<i>bla</i>	<i>qnr/oqx</i>	<i>aac/ant</i>	<i>str</i>	<i>sul/dfr</i>	<i>flo</i>	<i>fos</i>	<i>van</i>	<i>erm</i>	<i>tet</i>
Aire	92.13	66.14	70.87	45.67	40.16	22.83	22.83	40.94	81.10	37.01
Superficies	95.92	65.31	48.98	26.53	20.41	18.37	18.37	28.57	83.67	16.33
Alimentos	93.65	36.51	50.00	33.33	36.51	13.49	31.75	80.95	86.51	16.67
Aguas residuales	87.21	59.30	83.72	68.60	50.00	23.26	6.98	81.40	98.84	53.49
Residuos sólidos	79.03	55.65	77.42	57.26	44.35	19.35	18.55	67.74	85.48	31.45
Suelo de cultivo	100.00	53.73	77.61	61.19	35.82	41.79	47.76	76.12	86.57	20.90
Inst. ganaderas	91.55	46.48	69.01	52.11	46.48	19.72	29.58	69.01	88.73	42.25
Suelo natural	88.14	47.46	32.20	13.56	44.07	30.51	33.90	77.97	79.66	3.39
Total	90.13	53.46	65.59	46.40	40.62	22.43	25.39	66.01	86.32	29.20
Chi cuadrado	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.04	0.001	<0.001	<0.001	0.016	<0.001

Tabla 3. Porcentaje probable de cepas portadoras de genes de resistencia a los antibióticos según se deduce en el perfil fenotípico.

No obstante, cabe destacar que la gran mayoría de cepas aisladas no presentan un único gen de resistencia, sino que portan una gran carga de genes de resistencia que les confiere multirresistencia. De las 710 bacterias aisladas, solo 3 serían portadoras de un solo gen: *aac/ant*, *van* y *bla*, respectivamente; el resto contendrían un amplio y variado número de genes de resistencia en su genotipo (Tabla 4), los cuales se combinan de forma diversa conformando el resistoma ambiental (dado que las combinaciones genéticas potenciales son muy diversas, únicamente se han incluido las de mayor significación por su frecuencia en el microbioma o por el gran número de genes que podrían estar presentes en una misma cepa).

Genes presentes en una misma cepa	Número de cepas
<i>bla van erm</i>	51
<i>bla aac/ant str van erm</i>	28
<i>bla aac/ant str sul/dfr van erm</i>	22
<i>bla sul dfr van erm</i>	19
<i>bla qnr/oqx aac/ant str sul/dfr flo van erm tet</i>	19
<i>bla aac/ant van erm</i>	19
<i>bla qnr/oqx aac/ant str erm tet</i>	18
<i>bla qnr/oqx sul/dfr flo van erm</i>	16
<i>bla qnr/oqx aac/ant str sul/dfr erm tet</i>	16
<i>bla aac/ant str sul/dfr van erm tet</i>	16
<i>bla qnr/oqx aac/ant str sul/dfr van erm tet</i>	12
<i>bla qnr/oqx aac/ant str sul/dfr van erm</i>	12
<i>bla qnr/oqx aac/ant str sul/dfr flo van erm</i>	8
<i>bla qnr/oqx aac/ant str sul/dfr flo erm tet</i>	7
<i>bla qnr/oqx aac/ant str sul/dfr fos van erm tet</i>	4
<i>bla qnr/oqx aac/ant str sul/dfr flo fos van erm</i>	3

Tabla 4. Perfiles genéticos potenciales más frecuentes o con mayor número de genes de resistencia.

Como se puede observar, la combinación *bla van erm* sería la más frecuente, estando presente en el 7.2% de las cepas. Otras combinaciones genéticas destacables por su abundancia son *bla aac/ant str van erm* (3.9%), *bla aac/ant str sul/dfr van erm* (3.1%) o *bla qnr/oqx aac/ant str sul/dfr flo van erm tet* (2.7%).

6. DISCUSIÓN

La diversidad genética en el resistoma es muy amplia y refleja miles de millones de años de evolución de los microorganismos en estrecho contacto con moléculas tóxicas de muy diversos orígenes, la mayoría producidas por ellos mismos para su defensa. Efectivamente, el resistoma contiene genes de resistencia de productores de antibióticos y genes precursores que, bajo una presión selectiva apropiada, evolucionan para actuar como elementos de resistencia. Por ende, tanto los antibióticos como los mecanismos de resistencia han estado presentes en el medioambiente desde mucho antes de que los antibióticos fueran descubiertos por el ser humano, aunque el empleo masivo de estos medicamentos haya originado una presión de selección de bacterias resistentes (Canton, 2009). De hecho, se han encontrado genes de resistencia en la naturaleza no asociados a productores de antibióticos, como *qnr* y *bla*CTX, que afectan a las quinolonas y a las cefalosporinas de espectro extendido, respectivamente, que posiblemente se originaron como consecuencia de la mutación de genes existentes previamente (Canton, 2009); *qnrA* en la bacteria marina *Shewanella algae* (Martínez, 2012) y *bla*CTX en el género *Kluyvera* sp. (Finley *et al.*, 2013).

La enorme variedad del resistoma representa una importante barrera para el uso habitual de antibióticos en el tratamiento de las enfermedades transmisibles. Esto se debe a que todos los antibióticos son susceptibles a la resistencia, dejando de ser efectivos para la práctica clínica, lo cual supone una gran amenaza para la medicina en los últimos tiempos y la necesidad de fabricación continua de nuevos candidatos para el control de las infecciones (Hobson, Chan & Wright, 2021). El enorme pool de elementos de resistencia presente en las bacterias ambientales, acumulados durante milenios por el continuo intercambio genético, proporciona una reserva profunda de nuevos elementos de resistencia que pueden ser capturados y movilizados a bacterias patógenas. Como se ha comentado en la introducción, la mayoría de los genes de resistencia que se encuentran en patógenos se adquieren mediante transferencia horizontal de genes a través de EGM, como plásmidos. Diversos estudios han encontrado plásmidos bacterianos anteriores a la era de los antibióticos que no contienen genes de resistencia, pero que, tras el amplio uso de estos fármacos, se convirtieron rápidamente en vectores de genes de resistencia a antibióticos (Wright, 2010). Existen dos tipos de evidencias de que los patógenos humanos han adquirido genes de resistencia de bacterias ambientales: evidencia filogenética mediante el análisis de secuencias genéticas y evidencia epidemiológica directa de lugares con saneamiento deficiente (Finley *et al.*, 2013).

Existe certeza de que la selección de resistencias en entornos contaminados por la fabricación de antibióticos es mayor que la de antibióticos excretados por humanos y animales. En medios sólidos o semisólidos, como sedimentos, suelos y lodos activados, las concentraciones de bacterias resistentes y genes de resistencia suelen ser mucho más elevadas que en medios acuosos; aunque, generalmente, únicamente una pequeña fracción es biodisponible. Los metales y biocidas antibacterianos pueden co-seleccionar cepas resistentes a los antibióticos a través de la resistencia cruzada o co-resistencia. Sin embargo, la evidencia sugiere que es la exposición histórica a los antibióticos lo que ha llevado a la actual concurrencia de genes de resistencia a metales y biocidas y genes de resistencia a antibióticos situados en plásmidos, pues esta concurrencia está restringida a comunidades bacterianas que han sido moldeadas por fuertes presiones de selección de antibióticos. Aun así, metales y biocidas posiblemente tengan un papel importante en el mantenimiento de cepas que han desarrollado co-resistencia previamente. Asimismo, la contaminación ambiental con bacterias fecales proporciona contacto físico y, por lo tanto, mayor oportunidad de intercambio genético entre las bacterias ambientales y las bacterias del tracto intestinal humano y animal, además de que muchas de ellas portan EGM que facilitan la adquisición de genes y su transferencia a patógenos (Larsson & Flach, 2022).

Entre los años 2000 y 2015, el consumo mundial de antibióticos aumentó un 65.0% (Zhang *et al.*, 2022a). Este excesivo uso de antibióticos a nivel mundial, ha obligado a organizaciones como la OMS, Naciones Unidas y UE a tomar medidas para reducir y restringir el uso antibiótico en animales destinados al consumo humano y animales domésticos de compañía. Sin embargo, estos controles pueden ser difíciles de implementar, especialmente en países en desarrollo como la India, donde existe una de las tasas más altas de enfermedades infecciosas del planeta, incluidas aquellas causadas por bacterias multirresistentes. En estos países existen distintos factores de riesgo que contribuyen al aumento de la resistencia a los antibióticos: el control deficiente de la regulación de los antibióticos, la vigilancia insuficiente de la aparición de resistencias, el uso inadecuado de los antibióticos en entornos clínicos y veterinarios y el control inadecuado de la calidad de los antibióticos suministrados. Además, en estos países suele haber una mayor accesibilidad a estos medicamentos para la población general y una gran desinformación sobre su correcta utilización. Por el contrario, en los países desarrollados, los factores principales de riesgo incluyen el uso excesivo de antibióticos en la agricultura

y la ganadería y la prescripción excesiva en entornos clínicos (Tang, Millar & Moore, 2023).

La resistencia a los antibióticos se expresa en un fenotipo que puede ser determinado estudiando la inhibición del crecimiento microbiológico en ensayos realizados por medio del método de difusión en disco o la inhibición mediante la CMI en medio líquido, y se interpreta como cepa sensible o resistente a un determinado antibiótico. Los métodos fenotípicos de detección de resistencias son, por lo general, fáciles de ejecutar, interpretar e implementar en la rutina de laboratorio, a la vez que aportan información de gran relevancia (Hartinger *et al.*, 2021; Papajová *et al.*, 2022; Selvarajan *et al.*, 2023). Por este motivo, este método ha sido seleccionado para la realización de la presente investigación.

Este estudio se ha llevado a cabo en un medioambiente periurbano, extrapolable a otros ecosistemas con características similares. Para realizarlo, hemos diferenciado entre distintos nichos ecológicos o compartimentos (aire, superficies, alimentos, agua residual, residuos sólidos, instalaciones ganaderas, suelo de cultivo y suelo natural), para poder comparar los fenotipos de resistencia que se expresan en cada uno de ellos y, de esta forma, poder deducir el resistoma ambiental. Hay que tener en cuenta que no se trata de compartimentos cerrados, sino que entre ellos existe un intercambio de mecanismos de resistencia, que en su conjunto definen el resistoma del ecosistema considerado. Además, el estudio se ha llevado a cabo con BAH por ser el grupo más representativo y con mayor capacidad de intercambio genético, ya que las bacterias anaerobias poseen una mayor limitación.

Por tanto, en este trabajo se ha pretendido conseguir dos aspectos fundamentales del resistoma. En primer lugar, la cuantificación de los porcentajes de BAH resistentes en comparación con el total de BAH que se desarrollaron en el ecosistema analizado, teniendo en consideración los diferentes compartimentos, mediante una prueba de cribado. En segundo lugar, el análisis y la cuantificación del fenotipo de resistencia a 32 antibióticos de distinta naturaleza, en un amplio número de cepas bacterianas (n=710) aisladas al azar de las placas de cultivo analizadas en la prueba de cribado. Finalmente, a partir de los datos de multirresistencia fenotípica, de acuerdo con los datos aportados por la literatura científica existente, se han estimado los genes de resistencia potenciales que podrían ser causa del perfil fenotípico resultante.

Los resultados de la prueba de cribado muestran un microbioma con un elevado porcentaje de resistencias, especialmente a eritromicina y vancomicina. Asimismo, se puede observar un importante porcentaje de bacterias resistentes en la cuantificación de resistencias en los diferentes nichos ecológicos del ecosistema periurbano, siendo las aguas residuales el nicho ecológico donde el crecimiento de BAH resistentes ha sido mayor, seguido de las instalaciones ganaderas, los alimentos y los residuos sólidos. Todos ellos son medios en los que habitualmente hay presencia de residuos antibióticos, metales pesados y biocidas, y una elevada proliferación microbiológica, lo cual favorece el intercambio de material genético (Anthony *et al.*, 2020; Kunhikannan *et al.*, 2021; Uluseker *et al.*, 2021).

Nuestros resultados muestran que los genes *bla*, *aac/ant*, *van* y *erm* (que causan resistencia a penicilinas, betalactámicos, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos, el primero de ellos, y a aminoglucósidos, glucopéptidos y macrólidos, respectivamente, los tres restantes) aparecen con mayor frecuencia en el total de las cepas, lo que coincide con el gran consumo de antibióticos betalactámicos y aminoglucósidos desde hace tiempo y, más recientemente, con el consumo de glucopéptidos (vancomicina) y macrólidos (eritromicina). Además, estos mismos genes se encuentran ampliamente distribuidos por todos los compartimentos ambientales, especialmente en las aguas residuales, los residuos sólidos y los suelos agrícolas.

Es necesario destacar que, muy frecuentemente, las bacterias albergan varios genes de resistencia en su genoma, como se ha podido observar en nuestros resultados. Es el caso del genotipo *bla van erm*, el más frecuente encontrado, o genotipos tan extensos como *bla qnr/oqx aac/ant str sul/dfr flo van erm tet*. Este acontecimiento tiene una enorme transcendencia, pues implica que la utilización de un único antibiótico puede seleccionar una cepa de resistencia multigénica, lo cual conducirá a la resistencia a múltiples antibióticos (Yang & Grossart, 2024). Los EGM también pueden incluir genes de resistencia para más de un antibiótico, haciendo que un mismo gen pueda ser seleccionado para una amplia gama de antibióticos. Al mismo tiempo, estos EGM pueden contener un gen de resistencia para un desinfectante o un metal, seleccionando aún más la resistencia a los antibióticos (Karkman *et al.*, 2018).

6.1. Resistencia en instalaciones ganaderas.

Las muestras de instalaciones ganaderas ocupan el segundo lugar de mayor porcentaje de cepas resistentes a los antibióticos utilizados en la prueba de cribado. Zhao *et al.* (2021) coinciden en que la dispersión de bacterias y genes de resistencia a los antibióticos desde puntos críticos como las instalaciones ganaderas, es el contribuyente más significativo para la diseminación ambiental de genes de resistencia. Una de las causas de la amplia distribución de resistencias en este medio se debe a que los animales absorben o metabolizan tan solo una pequeña proporción de los antibióticos que se les administran, y alrededor del 58.0% de ellos se excretan en las heces y la orina animal al medioambiente (Xie, Shen & Zhao, 2018). Una revisión mencionada de Zhao *et al.* (2021) expone que el 74.0% de los estudios analizados proporciona evidencias de la transferencia de resistencias a los antibióticos desde los animales destinados al consumo hasta los humanos; fundamentalmente, mediante la exposición directa por parte de los granjeros, veterinarios, trabajadores de mataderos y manipuladores de alimentos procedentes de animales, la cadena alimentaria y la aplicación de estiércol en los suelos para mejorar el crecimiento de los cultivos agrícolas.

Aunque en la prueba de cribado el porcentaje más elevado de resistencia se detectó frente a la eritromicina, este medio alcanzó los mayores porcentajes de cepas resistentes al cloranfenicol (a pesar de estar prohibido en la UE desde 1994 por sus efectos adversos). Esta resistencia se puede producir por tres mecanismos principales: cloranfenicol acetiltransferasas, exportación de cloranfenicol mediada por transportadores de múltiples fármacos o transportadores específicos y mediante la metilasa de RNA ribosómico (rRNA) mediada por el gen *cfr*. Li *et al.* (2013) realizaron un estudio sobre los riesgos potenciales de transferencia de genes de resistencia al cloranfenicol en granjas de engorde de cerdos y su entorno y, en sus análisis, detectaron genes de resistencia al cloranfenicol como *floR*, *cfr*, ... además de *cmlA*, *fexA* y *fexB*, tanto en las aguas residuales originadas en estas instalaciones como en los suelos agrícolas que se regaban con dichas aguas. Por lo tanto, coincidiendo con nuestros datos, este estudio valora las granjas de cerdos como fuente de contaminación de genes de resistencia al cloranfenicol a través del uso de residuos en campos agrícolas, así como por su liberación a ríos naturales (aunque las concentraciones de residuos de cloranfenicol en el ambiente sean bajas).

Por otra parte, en nuestros resultados cabe destacar un 42.3% de BAH resistentes a la tetraciclina, un 46.5% al trimetoprim/sulfametoxazol y un 57.8% al aztreonam. No obstante, glucopéptidos y macrólidos mostraron las resistencias más elevadas en este nicho ecológico, resaltando un 70.4% a la vancomicina y un 84.5% a la clindamicina. Estos porcentajes coinciden con los antibióticos más utilizados en las instalaciones ganaderas a nivel mundial: tetraciclinas, penicilinas, betalactámicos, macrólidos, sulfonamidas y aminoglucósidos; y en menor concentración, cefalosporinas, lincosamidas, fenicoles y fluoroquinolonas (Cameron & McAllister, 2016).

La OMS ha declarado que los aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas, macrólidos y carbapenémicos son grupos de antibióticos críticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas resistentes potencialmente mortales en humanos y, por tanto, su uso en ganadería debe estar muy controlado (Zhao *et al.*, 2021). No obstante, como se ha podido observar en nuestros resultados, los niveles de resistencia a estos grupos de antibióticos son muy elevados. A pesar de las advertencias expuestas por esta organización, un equipo de investigación español que llevó a cabo un estudio transversal desde 2009 hasta 2018 en el que aislaron microorganismos SARM de 300 muestras recogidas en 15 granjas de cerdos de Tenerife (España), pudo observar que, desde el comienzo del estudio, las resistencias a gentamicina, tobramicina, trimetoprim/sulfametoxazol, clindamicina, fosfomicina y tigeciclina habían sufrido un aumento considerable en las cepas estudiadas (Abreu *et al.*, 2019).

Algunos antibióticos, como la amikacina o el ácido nalidíxico, sí han sido aprobados para su uso veterinario, aunque el empleo de estos antibióticos en animales puede aumentar la posibilidad de aparición de patógenos humanos resistentes (Zhao *et al.*, 2021). En efecto, en nuestros análisis, casi la mitad de las cepas procedentes de granjas animales mostraron resistencia a ambos antibióticos (40.9% a la amikacina y 42.3% al ácido nalidíxico).

Al igual que en nuestros resultados, en la mayoría de estudios revisados, la tetraciclina supone un porcentaje importante de la resistencia a los antibióticos detectada en este ecosistema (Bassitta *et al.*, 2022; Ma, McAllister & Guan, 2021; Mencía-Ares *et al.*, 2020). Ya desde los inicios de uso de la tetraciclina en los años cuarenta se observaron resistencias a este antibiótico. Aun así, estos fármacos siguen siendo muy utilizados para tratar multitud de infecciones, tanto humanas como veterinarias, e incluso, para la protección de cultivos. (Markley & Wencewicz, 2018).

Ma, McAllister & Guan (2021) realizaron una revisión sobre el resistoma presente en el tracto digestivo de animales destinados a la producción de alimentos y, en la mayor parte de los estudios, también predominaron las resistencias a la tetraciclina. En uno de los estudios considerados sobre ganado porcino determinaron que los genes de resistencia más abundantes en las heces de los cerdos fueron *tetW*, *tetQ*, *tet44*, *tet37* y *tet40*, todos implicados en la resistencia a la tetraciclina (Joyce *et al.*, 2019). En la industria avícola, la tetraciclina supone las dos terceras partes de los antibióticos suministrados en este sector en Estados Unidos, mientras que en la UE actualmente solo alcanza el 37.0%. Aun así, en un estudio realizado con 178 muestras de heces de pollos recolectadas en 9 países europeos expusieron que la tetraciclina y los macrólidos representaban la mayoría del resistoma (Ma *et al.*, 2016). En otra investigación incluida en esta revisión, determinaron que, tras la resistencia a la tetraciclina, los aminoglucósidos y los macrólidos fueron los grupos de antibióticos predominantes (Hu *et al.*, 2020).

En España, un estudio realizado por Mencía-Ares *et al.* (2020) también destacó las resistencias a la tetraciclina y los betalactámicos mediante una investigación del resistoma de 38 granjas de cría porcina, distinguiendo entre sistemas de producción intensiva y extensiva. En sus análisis, las resistencias halladas fueron significativamente más abundantes en las muestras fecales de las granjas intensivas en comparación con las de cría extensiva, además de poseer una menor diversidad. Los genes predominantes fueron *tetQ*, *tetW*, *tet32* y *tetO* en las muestras de heces y *tetM* y *tet36* en los purines.

Todos estos estudios contradicen ligeramente los resultados obtenidos en nuestros análisis pues, aunque los niveles de resistencia a la tetraciclina fueron elevados, la resistencia a los macrólidos predominó con casi un 85.0% de resistencias a la clindamicina. Igualmente, al comparar estos resultados con nuestras estimaciones, podemos observar que, aunque el gen *tet* se encontraría en el 42.3% de las cepas aisladas de las muestras de instalaciones ganaderas, estaría lejos de ser el gen de resistencia más abundante.

La cría porcina y las aves de corral son los principales sectores ganaderos de producción de carne y productos cárnicos a nivel mundial. Osorio, Mezquita & Balcázar (2023) realizaron una revisión en la que llevaron a cabo una comparación de estudios metagenómicos entre el resistoma presente en las heces de distintos animales de producción alimentaria (aves de corral, cerdos y vacas) y observaron que las aves de corral predominaron en abundancia de genes de resistencia totales, obteniendo valores de

resistencia significativamente más altos que el resto de las especies estudiadas. Las heces de aves manifestaron una mayor abundancia de genes de multirresistencia a múltiples fármacos, además de genes *mcr-1*, de resistencia a la polimixina, y de genes pertenecientes a la familia de los betalactámicos (*bla*PER, *bla*OXA, *bla*SHV y *bla*TEM), fluoroquinolonas (*mfd*) y fosfomicina (*fosB*). No obstante, la resistencia a la tetraciclina fue más abundante en las demás especies que en las muestras avícolas. La abundancia de genes *bla* coincide con las estimaciones realizadas en nuestros resultados, en los que se ha calculado que este gen podría estar presente en el 91.6% de las cepas aisladas de instalaciones ganaderas; sin embargo, en nuestro estudio, el gen *fos* tan solo se hallaría en el 29.6% de estas cepas y los genes de resistencia a las quinolonas (en nuestro caso *qnr/oqx*) en el 46.5%, difiriendo de las abundancias encontradas en el estudio comentado.

En el ganado bovino destinado a la producción de leche, las penicilinas, las cefalosporinas y otros betalactámicos son usados para prevenir y controlar la mastitis. En cambio, en el ganado vacuno de producción cárnica son más frecuentes antibióticos como la clortetraciclina y la oxitetraciclina para tratar infecciones hepáticas, mientras que macrólidos y tetraciclinas se utilizan habitualmente para las infecciones respiratorias. Aun así, en las heces de los rumiantes, los genes de resistencia a la tetraciclina también suelen ser los más abundantes, seguidos de macrólidos y aminoglucósidos (Ma, McAllister & Guan, 2021). Un equipo de investigación español (López-Catalina *et al.*, 2021) demuestra estos patrones de resistencia en sus análisis del rumen de 416 vacas procedentes de 14 granjas españolas, en los que hallaron 998 genes de resistencia a antibióticos, siendo el 57.0% de los genes pertenecientes al grupo de las tetraciclinas, macrólidos y lincosamidas (destacando la elevada prevalencia de genes *tetA*, *tetB*, *tetW* y *tetQ*), y el 43.0% restante al grupo de las fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, glucopéptidos y estreptograminas. Estos datos contrastan con nuestros resultados, en los que la resistencia a los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) predomina sobre la resistencia a tetraciclina y el macrólido eritromicina; aunque, como se ha expuesto anteriormente, la resistencia al macrólido clindamicina sí destacó sobre los demás antibióticos.

La reducción del consumo antibiótico en la ganadería mediante una mejor gestión del ganado, una mayor higiene en los entornos agrícolas y el uso de vacunas preventivas es una de las principales actuaciones para mitigar la diseminación de resistencias a los antibióticos (Zhao *et al.*, 2021). Por ello, en los últimos años, numerosos equipos de

investigación han tratado de conocer cómo varía el resistoma animal en ausencia de antibióticos. Luiken *et al.* (2019) manifestaron que, a pesar de que un 38.0% de las 176 granjas avícolas investigadas (procedentes de distintos países europeos) garantizaron no haber utilizado antibióticos en el ganado de muestreo, la cantidad y diversidad de genes de resistencia a los antibióticos solo se vio ligeramente reducida en comparación con las granjas que sí habían utilizado estos fármacos. Asimismo, en China, se realizó un estudio para determinar el resistoma en dos granjas avícolas en las que no se habían administrado antibióticos en los últimos cinco años. En la primera granja, destinada a la puesta de huevos, en cada muestra se detectaron entre 80 y 89 genes de resistencia a los antibióticos, entre los que se encontraron genes de resistencia a los aminoglucósidos (*aadA*, *aadA1*, *aadA2* y *strB*), las sulfonamidas (*sul2*) y la tetraciclina (*tetM*, *tetK* y *tetX*). En la segunda, destinada a la cría de pollos de engorde, se detectaron un total de 34 genes en más del 80.0% de las muestras, siendo los más abundantes el gen *strB*, de resistencia a los aminoglucósidos, y los genes *tetL*, *tetM* y *tetX*, de resistencia a la tetraciclina, además de los genes *sul2*, *ermB*, *aadA* y *aadA2* (Liu *et al.*, 2020). A pesar de no haber utilizado antibióticos, los genes de resistencia detectados en ambas granjas coinciden con las estimaciones realizadas en nuestras muestras, donde se calculó un porcentaje del 69.0% de cepas probables portadoras de genes de resistencia *aac/ant* (asociados a la resistencia a los aminoglucósidos), un 52.1% de genes *str*, un 46.5% de genes *sul*, un 88.7% de genes *erm* y un 42.3% de genes *tet* (como ya se ha comentado).

Igualmente, Zhou *et al.* (2022) quisieron conocer en qué medida afectaba la administración de antibióticos al desarrollo de resistencias y, para ello, compararon muestras de cerdos de crianza en ocho granjas chinas con jabalíes salvajes que nunca habían recibido tratamiento antibiótico y, al igual que en otros estudios mencionados, en el análisis general, el 71.4% de los genes conferían resistencia a tetraciclina, aminoglucósidos y macrólido-lincosamida-estreptogramina (MLS). No obstante, como era de esperar, esta abundancia de genes de resistencia fue notablemente mayor en los cerdos criados en granjas que en los jabalíes. De forma similar, Wang *et al.* (2021) realizaron un estudio en el que se comparó el resistoma fecal de ganado vacuno (tanto lechero como destinado a la producción de carne) con el de yaks salvajes, obteniendo un total de 734 subtipos de genes de resistencia a los antibióticos. Como resultado, el número de genes y su abundancia relativa fue menor en los yaks y, además, el tipo de genes también era diferente, lo que indica una fuerte presión de selección del consumo de

antibióticos. Mientras que, en el ganado vacuno para carne y leche, más del 50.0% de los genes otorgaban resistencia a las tetraciclinas y los betalactámicos, en los yaks predominaron los genes de multirresistencia. Por consiguiente, aunque los animales no estén sometidos a la exposición de antibióticos, es preocupante observar como, aun así, contienen genes de resistencia a los antibióticos susceptibles de ser transferidos.

Los altos porcentajes de resistencia a tetraciclinas y betalactámicos en las muestras de instalaciones ganaderas, coincide con los resultados publicados correspondientes a suelos que han sido abonados con estiércol de animales de granja (Chen *et al.*, 2019a; Osorio, Mezquita & Balcázar, 2023; Qi *et al.*, 2023; Xiong, Sun & Zeng, 2018), debido principalmente a la presión de selección del elevado consumo de estos antibióticos en ganadería. Considerando que el suelo de manera natural alberga diversos genes de resistencia intrínsecos debido a la amplia diversidad microbiana y a la presencia de microorganismos productores de antibióticos, la aplicación de estiércol no solo favorece la introducción de nuevos genes de resistencia a partir de la contaminación fecal, sino que también promueve la transferencia génica horizontal entre las bacterias resistentes del suelo y las bacterias introducidas mediante el abono (Zhao *et al.*, 2021). En efecto, Radu *et al.* (2021) observaron que, al analizar heces y estiércol procedentes de cerdos, las abundancias absolutas de los genes de resistencia *sul1*, *vanA*, *ermB* y *blaTEM-1* (estimados con elevada frecuencia en nuestras muestras de instalaciones ganaderas) mostraron un aumento de 100 a 10000 veces desde la maduración de las heces frescas hasta la formación del estiércol.

Las investigaciones de Han *et al.* (2021) fueron más allá, pues determinaron la resistencia a los antibióticos en muestras de heces frescas, estiércol, suelo estercolado, suelo control sin fertilizantes, agua residual cruda y agua residual tratada, de tres granjas intensivas de cerdos en el norte de China e hicieron un seguimiento durante un año para estudiar la transferencia de genes de resistencia desde los desechos porcinos hasta los ambientes receptores. Para ello, se analizó la presencia de genes de resistencia a seis clases de antibióticos: sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas, macrólidos, betalactámicos y colistina. A pesar de que los genes más frecuentemente detectados (*sul1*, *sul2*, *tetO*, *tetQ* y *tetW*) no son los que más abundarían en nuestras cepas, tanto los genes *erm* como *bla* (*blaOXA-1*, *blaTEM-1* y *blaampC*) alcanzaron tasas de detección superiores al 90.0%, lo cual sí coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio. Como dato complementario, se determinó que, en general, la diversidad de genes de resistencia en

los desechos porcinos fue mayor en primavera y menor en invierno, lo cual puede deberse al uso de antibióticos variable según las distintas estaciones y a una mayor supervivencia de las bacterias en el clima primaveral. Además, se confirmó la eficiencia del compostaje natural y los tratamientos de las aguas residuales para la eliminación de genes de resistencia a la tetraciclina, pero no surtió el mismo efecto para los genes de resistencia a las sulfonamidas y los betalactámicos.

Tanto nuestros resultados, como los datos obtenidos por los estudios comentados en este apartado, corroboran el enorme problema de resistencias asociado a las instalaciones ganaderas. Por consiguiente, se puede señalar que, junto con la regulación de la administración de antibióticos en este sector, el control y adecuado tratamiento de los desechos ganaderos se considera de vital importancia para lograr frenar la amplia diseminación de resistencias a los antibióticos.

6.2. Resistencia en alimentos.

En las muestras de alimentos analizadas en el presente trabajo, se ha observado que las carnes presentaban una mayor frecuencia de cepas resistentes a la tetraciclina, antibiótico ampliamente utilizado en ganadería como se ha indicado; mientras que, en frutas y verduras, se han observado porcentajes muy elevados de resistencias a la vancomicina, la eritromicina y la ampicilina, posiblemente por una mayor abundancia de bacterias gram-negativas en los suelos de cultivo (Al-Kharousi *et al.*, 2019).

En el análisis del resistoma resalta que un 31.8% de las cepas eran resistentes a la fosfomicina trometamol, un 24.6% a la amoxicilina/clavulánico, un 57.9% a la ampicilina y un 64.3% a ticarcilina; ocupando el tercer lugar de mayor resistencia a estos antibióticos entre los distintos medios analizados. El grupo de las cefalosporinas también ha obtenido las resistencias más elevadas en las muestras de alimentos, especialmente frente a la cefalotina (61.9%) y la cefotaxima (57.1%). El dato de un 84.9% de cepas resistentes a la clindamicina también es muy relevante.

Existe un gran número de investigaciones que demuestran la propagación de resistencias a través de la contaminación de la superficie de los alimentos (Akram, Imtiaz & ul Haq, 2023). Las verduras consumidas crudas pueden ser una ruta potencial de transmisión de bacterias resistentes y genes de resistencia a los antibióticos a los seres humanos. A través

del suelo de cultivo, los microorganismos resistentes pueden ingresar en el microbioma de la planta colonizando tanto las raíces como las partes aéreas. Asimismo, el resistoma de los vegetales se puede ver influenciado por varios factores como el tipo de verdura, el suelo en el que estén cultivados, el agua utilizada para el riego y los fertilizantes empleados; pues el riego con aguas residuales, aunque estén previamente tratadas, y el uso de abono orgánico, participan en la modificación tanto del resistoma del suelo como de la planta (Fernández-Trapote *et al.*, 2024; Gentile *et al.*, 2024).

Al igual que nuestro trabajo, diversos estudios realizados en vegetales muestran la abundancia y diversidad del resistoma en estos alimentos. Un ejemplo es el estudio realizado por Yin *et al.* (2022), en el que se analizó la filosfera de seis tipos diferentes de verduras (espinacas, dos variedades de lechuga, ajo, cilantro y amaranto). Considerando el tipo de vegetal, la lechuga presentó la mayor abundancia de patógenos potenciales y genes de resistencia a antibióticos, mientras que la espinaca mostró la mayor diversidad; en cambio, el ajo manifestó los resultados más bajos tanto en abundancia como en diversidad bacteriana y genética. En total, se hallaron 205 genes de resistencia, siendo los más abundantes los genes de resistencia a múltiples fármacos, los aminoglucósidos, los betalactámicos y los MLS. La abundante resistencia a macrólidos y betalactámicos coincide con los resultados obtenidos en nuestras cepas de alimentos; sin embargo, en nuestro caso, las resistencias a los aminoglucósidos no resultaron ser de las más destacables.

Por su parte, Al-Kharousi *et al.* (2019) analizaron la presencia de enterobacterias en frutas y verduras frescas (banana, pollo, pimiento, zanahoria, pepino, dátiles, lechuga, mango, papaya, granada, rábano, tomate y sandía) y las resistencias a los antibióticos que estas bacterias presentaban. Los porcentajes de resistencia obtenidos en sus resultados, ampicilina (66.0%), cefalotina (57.0%), amoxicilina/clavulánico (33.0%), cefoxitina (31.0%), tetraciclina (9.0%), ácido nalidíxico (7.0%), trimetoprima (6.0%) y kanamicina (5.0%) son similares a los porcentajes alcanzados en nuestros análisis, aunque nuestros resultados muestran niveles de resistencia aún más elevados. Al igual que en nuestro estudio, estos investigadores también determinaron que un porcentaje considerable de las cepas eran multirresistentes.

En un estudio realizado por Sun *et al.* (2021) evaluaron las resistencias a los antibióticos en bacterias aisladas de cinco variedades de tomates frescos adquiridos en supermercados

de China, tres de ellos tratados con fertilizantes orgánicos. Los tomates orgánicos mostraron más cantidad y diversidad tanto de genes como de EGM, destacando los genes de resistencia a los aminoglucósidos (*strA* y *strB*), el gen de resistencia a las sulfonamidas *sul1* y el gen de resistencia a múltiples fármacos *qacA1-01*. En nuestros análisis, también se estimó que un 33.3% de las cepas aisladas de alimentos serían portadoras del gen *str* y un 36.5% del gen *sul*; no obstante, estos genes no son los que más abundarían en nuestras cepas. Asimismo, en este estudio se encontraron diferencias significativas en función del tipo de fertilizante utilizado, pues, mientras que en los tomates en los que se había utilizado fertilizante inorgánico predominaron genes de resistencia a MLS y vancomicina; en los que se había utilizado estiércol abundaron los genes de resistencia a aminoglucósidos, sulfonamidas, cloranfenicol, betalactámicos, tetraciclina y multifármacos, lo cual coincide con las resistencias a estos antibióticos encontradas en nuestras muestras de instalaciones ganaderas, probablemente debido a la transferencia genética desde el abono animal a los cultivos.

Seyoum *et al.* (2022) también investigaron los niveles de genes de resistencia en cultivos de tomates regados con dos tipos de agua residual tratada (una con tratamiento secundario y otra con tratamiento terciario) en comparación con el riego con agua dulce. Contrariamente a lo que se podría pensar, la superficie de los tomates presentó un resistoma específico no detectado ni en el agua ni en los suelos irrigados, con predominio de los genes *ermB*, *ermF* y *qnrS*. Estos genes también se encontrarían en un elevado porcentaje de nuestras cepas, siendo *erm* el segundo gen de resistencia (después de *bla*) que estaría presente con mayor frecuencia en las muestras de alimentos, con una estimación del 86.5%. Además de los genes mencionados, en sus análisis se detectó abundancia relativa de los genes *intl1*, *sul1*, *tetW* y *blaCTX-M32* en la superficie de los tomates, pero no se encontraron diferencias significativas entre los tomates regados con agua dulce y agua tratada.

La lechuga es de los cultivos vegetales que más se asocia a la transmisión de resistencias a los antibióticos por sus altas concentraciones de genes de resistencia y porque, generalmente, se consume cruda. Por ello, existen numerosos estudios que investigan el resistoma de esta verdura. Por ejemplo, Wind *et al.* (2021) analizaron el efecto de la aplicación de estiércol procedentes de vacas lecheras (distinguiendo en si se les había suministrado antibióticos o no), tanto crudo como compostado, a suelos en los que se habían cultivado lechugas. Sus análisis mostraron que la superficie de las hojas de lechuga

cultivadas con el abono orgánico manifestó las mayores abundancias relativas de genes de resistencia, compartiendo 55 subtipos de genes de resistencia a los antibióticos con el estiércol utilizado. Estos resultados demuestran que los genes de resistencia originados en el estiércol se podían transmitir a las superficies de los cultivos. En todos los casos, los niveles de abundancia relativa de genes de resistencia de las superficies de lechuga fueron hasta 50.0% superior que en los suelos en los que se cultivaron. Además, en el total de muestras, de los 854 genes de resistencia aislados, 123 resultaron ser clínicamente relevantes, principalmente *bla*CARB-14, *bla*OXA-322 y *vanA*, lo cual coincide con los elevados porcentajes de cepas que portarían genes *bla* (93.7%) y *van* (81.0%) en nuestras muestras de alimentos.

La carne es el segundo grupo de alimentos analizados en el presente estudio. Otros estudios han investigado las resistencias a los antibióticos en la carne con resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Un ejemplo es el estudio de Lowe *et al.* (2024), en el que se analizó carne de cerdo cruda procedente de 11 establecimientos minoristas de Sudáfrica y se encontró una gran prevalencia de genes de resistencia a la tetraciclina, los betalactámicos y los multifármacos; aunque en nuestro caso, aun estimando su presencia en el 16.7% de las cepas aisladas en alimentos, los genes *tet* serían de los menos abundantes.

Por su parte, Doster *et al.* (2020) analizaron muestras de carne picada comprada en supermercados minoristas en Colorado (Estados Unidos), distinguiendo entre aquellas etiquetadas como provenientes de sistemas de producción convencional y aquellas criadas sin antibióticos. Contrariamente a lo esperado, no encontraron diferencias significativas entre los productos de ganado criado sin antibióticos frente a aquellos que sí habían sido expuestos. En los análisis genéticos, al contrario que en nuestros resultados, la presencia de genes de resistencia a la tetraciclina fue predominante en todas las muestras, constituyendo el 91.8% de los resultados. Además, se obtuvo un 3.4% de genes de resistencia a MLS, un 2.3% a multifármacos y un 1.4% a betalactámicos. Estos datos difieren de los elevados porcentajes de resistencia a macrólidos y betalactámicos hallados en nuestro estudio.

La carne proporciona un entorno con un alto contenido de agua y nutrientes que puede servir de reservorio de diversos microorganismos. Etapas de procesamiento como el desollado o la evisceración de los animales de producción de carne son muy susceptibles

de colonización microbiana, fundamentalmente de contaminación cruzada. Aunque los protocolos de saneamiento tienen la función de eliminar los microorganismos que se encuentran en los mataderos y en las plantas de procesamiento de carne y productos cárnicos, una pequeña fracción puede permanecer viable y contaminar el alimento (Fernández-Trapote *et al.*, 2024). Un estudio español analizó distintas superficies de una planta de procesamiento de carne de cerdo y detectaron abundancias significativas de genes de resistencia a betalactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos y sulfonamidas, además de EGM, procedentes de la carne procesada (Cobo-Díaz *et al.*, 2021). Con este estudio se puede concluir que las muestras de carne, especialmente si está picada o envasada, además de portar sus genes de resistencia propios, pueden contaminar y ser contaminadas en las instalaciones de la planta de procesado.

Por tanto, toda la información que aquí se presenta acentúa la importancia de llevar a cabo una buena higiene alimentaria y una adecuada manipulación y procesamiento de los alimentos, tanto vegetales como cárnicos, para evitar que las bacterias resistentes se transmitan al ser humano a través de la cadena alimentaria.

6.3. Resistencia en aguas residuales y residuos sólidos.

Las aguas residuales y las EDAR se consideran puntos críticos para la proliferación de bacterias resistentes a los antibióticos y el intercambio de genes de resistencia (Ma *et al.*, 2024; Selvarajan *et al.*, 2023; Shen *et al.*, 2023), tal y como se ha podido demostrar en nuestros resultados, en los que las aguas residuales superaban ampliamente los porcentajes de resistencia hallados en los análisis realizados. Esta acumulación de resistencias no solo es causada por las aguas residuales hospitalarias, pues las aguas residuales urbanas contienen residuos de todos los antibióticos que las personas consumen en sus hogares. Al igual que los residuos ganaderos, además de las trazas de antibióticos, las aguas residuales incluyen restos de desinfectantes y metales pesados que pueden causar presión de selección para la resistencia a los antibióticos, incluso a concentraciones bajas. De igual manera, la alta densidad de bacterias en las EDAR proporciona un entorno óptimo para la transferencia horizontal de genes de resistencia entre las bacterias ambientales y los patógenos humanos (Karkman *et al.*, 2018; Kim & Cha, 2021). Como agravante de este problema, en las aguas residuales de diferentes etapas de una EDAR de Polonia se han identificado bacterias multirresistentes que están

incluidas en la lista de patógenos prioritarios de la OMS y, 12 de estos patógenos se hallaron en las aguas naturales que recibían el efluente tratado, probablemente, debido a la confluencia de restos antibióticos y genes de resistencia comentada (Jałowiecki *et al.*, 2021).

Considerando nuestros resultados en la prueba de cribado, las aguas residuales manifestaron porcentajes extremadamente altos de resistencia a la eritromicina (89.2%) y la vancomicina (85.3%), y bastante más altos que el resto de muestras en el caso de la ampicilina (29.3%). Los análisis fenotípicos revelaron valores muy altos de resistencia a los aminoglucósidos, principalmente a la tobramicina (70.9%), la estreptomycinina (68.6%) y la gentamicina (61.6%). Asimismo, en este medio se encontraron los mayores porcentajes de resistencia a la tetraciclina (53.5%) y al trimetoprim/sulfametoxazol (50.0%). Aun así, resalta un porcentaje de tan solo el 7.0% de cepas resistentes a la fosfomicina trometamol, el más bajo de todos los medios estudiados. Los porcentajes de resistencia a las penicilinas alcanzaron valores muy elevados, siendo el ecosistema con mayor resistencia a la piperacilina (68.6%). Las aguas residuales fueron, asimismo, el medio con mayor número de cepas resistentes a las fluoroquinolonas (con un 36.1% de resistencias a la ciprofloxacina y un 27.9% a la levofloxacina), a los glucopéptidos (con un 80.2% de cepas resistentes a la teicoplanina y un 81.4% a la vancomicina) y a los macrólidos (alcanzando el 97.7% de resistencias a la clindamicina y el 87.2% a la eritromicina). Por ello, los genes *bla*, *aac/ant*, *van* y *erm* serían los más frecuentes en las muestras de aguas residuales y aparecen con mucha frecuencia en estudios realizados en este medio ecológico (Rodríguez *et al.*, 2021).

En 2019, se realizó un estudio en el que se pretendía caracterizar el resistoma bacteriano en las distintas regiones del mundo, tomando muestras de aguas residuales urbanas sin tratar de 60 países y pudieron observar que la diversidad y abundancia de genes de resistencia a los antibióticos globales variaba enormemente según la región y el continente. Mientras que en Europa y Norteamérica predominó la resistencia a los macrólidos (tal y como se corrobora en nuestros resultados), en Asia y África destacó la resistencia a sulfonamidas y fenicoles (Hendriksen *et al.*, 2019).

En comparación con las aguas residuales, las muestras de residuos sólidos obtuvieron porcentajes de resistencia notablemente más bajos en la prueba de cribado. Asimismo, destacan los porcentajes de resistencias tan bajos obtenidos frente al grupo de las

cefalosporinas. Sin embargo, en el grupo de los aminoglucósidos, este medio alcanzó un 57.3% de resistencias a la estreptomina y un 45.2% de resistencias a la kanamicina, ocupando el segundo puesto de los medios analizados, después del suelo agrario. Al igual que en el agua residual, un porcentaje elevado de cepas resultaron ser resistentes al trimetoprim/sulfametoxazol (44.4%). Además, sigue a las aguas residuales siendo el segundo ecosistema con mayor resistencia a la eritromicina (64.5%).

Un equipo de investigación español también quiso comparar las comunidades bacterianas y los genes de resistencia presentes en aguas residuales y residuos sólidos. Para ello, analizó una EDAR (que incluía fuentes hospitalarias y comunitarias) y, coincidiendo con nuestros resultados, se observó que los residuos sólidos tenían una riqueza de genes significativamente menor que los efluentes en fase líquida. Se cuantificaron un total de 255 genes de resistencia que conferían predominantemente resistencia a aminoglucósidos, betalactámicos, multifármacos, tetraciclina y MLS, dispuestos de mayor a menor abundancia; resultados bastante similares a nuestras muestras, aunque, en nuestro caso, las resistencias a los macrólidos sean predominantes. Se expuso, además, que los efluentes de la EDAR en fase líquida contribuyeron a la cantidad de genes de resistencia detectados en el río donde se liberaban, pues se encontraron 122 genes de resistencia en los sedimentos del ambiente fluvial (Quintela-Baluja *et al.*, 2019).

Otro estudio quiso conocer la prevalencia de genes de resistencia a los antibióticos y bacterias resistentes en cinco procesos distintos realizados en una EDAR y observaron que los genes de resistencia a sulfonamidas (*sul1*) y aminoglucósidos (*aadA1*, *aadA13* y *aadA2*) prevalecieron en todos los procesos ejecutados (Kang *et al.*, 2022). Estos genes de resistencia también serían muy abundantes en nuestras muestras de aguas residuales sin tratar, alcanzando los porcentajes más elevados de todos los nichos ecológicos analizados en nuestra investigación, con una estimación del 83.7% de cepas probables portadoras de genes *aac/ant* y un 50.0% de genes *sul*.

Al comparar las resistencias a los antibióticos de los afluentes y los efluentes de una EDAR en Singapur, los datos mostraron que tanto las aguas residuales sin tratar como las ya tratadas compartían 21 genes que les conferían resistencia a multifármacos, aminoglucósidos, MLS, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas; coincidiendo con los genes de resistencia probablemente más abundantes en nuestras muestras. Además, las aguas residuales sin tratar contenían una enorme abundancia de genes *bla* clínicamente

relevantes, siendo extremadamente altas las concentraciones de genes *blaKPC2*, que otorgan resistencia a los carbapenémicos (Ng *et al.*, 2017); lo cual podría explicar los porcentajes de resistencia a doripenem (22.1%) y meropenem (20.9%) tan elevados que se han determinado en nuestros análisis fenotípicos. En relación a estos resultados, otro estudio de aguas residuales realizado en Colombia también detectó con frecuencia genes de resistencia clínicamente importantes, como *blaKPC-2* y *blaCTX-M* (Rodríguez *et al.*, 2021). Además, cabe destacar que, mientras que en sus resultados abundaron las resistencias a la fosfomicina, nuestros análisis estimaron que el gen *fos* sería el gen de resistencia que se presentaría en un menor número de cepas procedentes de las muestras de aguas residuales (7.0%), obteniendo el porcentaje más bajo de todos los ecosistemas considerados en nuestro estudio.

De acuerdo con los estudios anteriores, se llevó a cabo una investigación que recogió muestras de los efluentes de 16 EDAR urbanas de 10 países europeos diferentes y, aunque las aguas residuales habían sido tratadas, los genes de resistencia que se detectaron en mayor abundancia en todas las muestras (*intl1*, *sul1*, *tetM*, *blaOXA-58*, *blaTEM*, *blaOXA.48*, *blaCTX-M-32*, *mcr-1*, *blaCTX-M-15* y *blaKPC-3*) fueron similares a los hallados con más frecuencia en estudios como el nuestro o los recientemente comentados (Cacace *et al.*, 2019).

Datos similares a los obtenidos en nuestros resultados los obtuvieron Zieliński *et al.* (2022) al analizar las aguas residuales durante distintos procesos llevados a cabo en una EDAR de Polonia, pues determinaron que, en todas las etapas del proceso de tratamiento de aguas residuales, los genes de resistencia a múltifármacos, MLS, betalactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos, sulfonamidas y bacitracina fueron los más abundantes. Como era de esperar, las aguas residuales sin tratar se caracterizaron por la mayor diversidad de genes de resistencia y fueron la principal fuente de los mismos en las etapas posteriores de tratamiento. Igualmente, en un estudio realizado en una EDAR convencional de residuos urbanos en Virginia (Estados Unidos), también destacaron las resistencias a multifármacos, MLS y betalactámicos (Majeed *et al.*, 2021).

Al igual que en los estudios anteriormente comentados, Wang *et al.* (2022) realizaron una revisión en la que se corroboran los genotipos de resistencia estimados en nuestra investigación, pues, según los estudios revisados, en los afluentes de las EDAR los genes de resistencia predominantes confieren resistencia a los macrólidos (*ermB* y *ermF*),

tetraciclinas (*tetW*, *tetA* y *tetC*), sulfonamidas (*sul1* y *sul2*) y betalactámicos (*blaOXA* y *blaTEM*), destacando especialmente los genes *ermB*, *tetW* y *sul1*, lo cual concuerda con los datos obtenidos en nuestros resultados. Como problema añadido a la enorme prevalencia de genes de resistencia en las aguas residuales, Shen *et al.* (2023) observaron que estos genes tan abundantes son muy persistentes, pues prevalecen en las aguas residuales, incluso tras la realización de un proceso de ozonización.

A pesar de que todos los datos expuestos muestran la importancia del tratamiento de las aguas residuales y los residuos sólidos para mitigar la propagación de resistencias a los antibióticos, también confirman la necesidad de investigar e implementar nuevos procesos que consigan eliminar por completo los genes de resistencia y las bacterias resistentes presentes en los residuos, para que puedan ser liberados al medioambiente sin suponer un problema para la salud pública.

6.4. Resistencia en suelo.

Es importante señalar que el suelo natural es un ecosistema seleccionado por no tener aporte de antibióticos ni acción humana, y que únicamente recibe agua de lluvia. Sin embargo, en este medioambiente ya se detecta un 3.6% de cepas resistentes a alguno de los antibióticos utilizados en la prueba de cribado, incrementándose hasta el 8.9% en las muestras de suelo de cultivo, lo que corrobora que los genes de resistencia están en los ecosistemas naturales.

Muchas bacterias localizadas en el suelo pueden contener genes de resistencia que les confieren diferentes mecanismos de resistencia frente a los antibióticos naturalmente presentes en el medioambiente. Estos genes incluyen los responsables de las metilasas ribosómicas que afectan a los aminoglucósidos (*armA*, *rtmB*), metiltransferasas que afectan a linezolid (*cfr*), o bombas de eflujo mediadas por plásmidos que confieren resistencia a las fluoroquinolonas (*qepA*); todas estas enzimas asociadas a bacterias productoras de antibióticos (Canton, 2009). Sin embargo, existe un aumento constante de la presencia de genes de resistencia a antibióticos en suelos desde 1940, lo que es una prueba clara de la contaminación de los ecosistemas naturales y la resiliencia de estos elementos de resistencia para su eliminación (Martínez, 2012). Asimismo, se ha visto que la pérdida de diversidad bacteriana autóctona del suelo afecta negativamente a la abundancia de genes de resistencia a los antibióticos, pues facilita la proliferación y

dispersión de bacterias resistentes. Por el contrario, una alta diversidad bacteriana puede actuar como barrera biológica contra estas bacterias resistentes y, por lo tanto, contribuir en la salud del ecosistema (Chen *et al.*, 2019b).

Los genes de resistencia naturales del suelo se conocen como el resistoma intrínseco y es muy diverso, superando en número a los genes de resistencia considerados clínicamente relevantes. Las concentraciones subinhibitorias de antibióticos aumentan las tasas de mutación, recombinación y transferencia horizontal de genes entre las poblaciones microbianas. Así, los microorganismos del suelo pueden adquirir resistencias con mayor facilidad (Finley *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2019). La abundancia de genes de resistencia a antibióticos en el suelo tiene implicaciones directas para la salud humana y la práctica clínica, debido, fundamentalmente, al vínculo entre los suelos y la producción de alimentos (Zhu *et al.*, 2019).

En efecto, resulta impactante los porcentajes tan altos de resistencia a los antibióticos estudiados obtenidos en los análisis fenotípicos de las muestras de suelo agrario, siendo el medio con mayor número de cepas resistentes a numerosos grupos antibióticos. Entre ellos se encuentran los aminoglucósidos amikacina (44.8%), espectinomicina (49.3%), estreptomycin (61.2%) y kanamicina (52.2%); la fosfomicina trometamol (47.8%); los carbapenémicos (con un 43.3% de cepas resistentes al doripenem, un 32.8% al imipenem y un 38.8% al meropenem); el aztreonam (83.6%); y las penicilinas ampicilina (77.6%) y ticarcilina (79.1%). Asimismo, supera notablemente a los demás nichos ecológicos en los valores de resistencia obtenidos frente a la amoxicilina/clavulánico (56.7%), la ampicilina (77.6%), el grupo de las cefalosporinas (cefalotina (82.1%), cefazolina (73.1%), cefepima (44.8%), cefotaxima (73.1%) y la cefuroxima (65.7%)) y el cloranfenicol (41.8%). Por ello, no es de extrañar que se halla estimado que el 100.0% de las BAH aisladas de las muestras de suelo de cultivo sean poseedoras de genes *bla*.

En contraste, se debe señalar que, aunque las muestras de suelo natural sean el medio ecológico con menor porcentaje de resistencias en general (tal y como cabría esperar), se han detectado valores realmente preocupantes en un amplio número de antibióticos utilizados, como un 26.3% de cepas resistentes a la tobramicina, un 44.1% al trimetoprim/sulfametoxazol, o un 33.9% a la fosfomicina trometamol, alcanzando, incluso, el segundo lugar (tras las cepas aisladas de suelo de cultivo) en el caso de la amoxicilina/clavulánico (40.7%) y el cloranfenicol (30.5%). Otros grupos de antibióticos

en los que se han obtenido porcentajes de resistencia alarmantes son las penicilinas, con un 55.9% de cepas resistentes a la ampicilina y un 61.0% a la ticarcilina; las cefalosporinas, con un 61.0% de resistencia a la cefalotina y la cefazolina, un 54.2% a la cefotaxima y un 55.9% a la cefuroxima; los glucopéptidos, con un 67.8% de resistencia a la teicoplanina y un 78.0% a la vancomicina; y los macrólidos, con un 78.0% de resistencia a la clindamicina y un 57.6% a la eritromicina. De hecho, un estudio confirma la abundante presencia en suelos de genes *erm*, junto a genes PKS, que están implicados en la síntesis de diversas sustancias antibióticas, entre ellas la eritromicina, tanto en suelos con influencia antropogénica como en suelos sin impacto humano (Yi, Wang & Zhou, 2019).

Numerosos estudios han constatado la presencia de genes de resistencia a betalactámicos, quinolonas, macrólidos y tetraciclinas en zonas sin impacto antropogénico; aunque, evidentemente, estos son más abundantes en zonas que presentan cualquier tipo de acción humana (Centurion *et al.*, 2022; Gentile *et al.*, 2024). En Alemania, se ha realizado un estudio en el que se ha determinado la carga de bacterias resistentes y los genes de resistencia en suelos de cultivo regados con aguas residuales tratadas (al igual que nuestras muestras), comparándolos con suelos no irrigados. Los genes de resistencia *sul1*, *qnrS*, *blaOXA-58* y *tetM* únicamente se encontraron en los suelos regados con aguas residuales, mientras que los suelos no irrigados manifestaron una mayor abundancia de genes *blaCTX-M-32* y *blaTEM* (Kampouris *et al.*, 2021). Aunque este estudio coincide con nuestras estimaciones del 100.0% de cepas portadoras de genes *bla*, los genes *sul*, *qnr* y *tet* no serían los más abundantes en nuestras muestras de suelo agrario.

Como dato complementario, Zhu *et al.* (2020) también analizaron suelos agrícolas regados con aguas residuales tratadas, en las que se había conseguido reducir un 84.0% de la abundancia relativa de genes de resistencia durante los procesos de tratamiento. Sin embargo, en el suelo receptor se detectó un enriquecimiento de genes de resistencia persistentes, posiblemente por la propagación de bacterias resistentes.

Pese a conocer esta información, todavía existen países, generalmente de ingresos bajos, en los que se utilizan aguas residuales sin tratar para el riego de los cultivos. Un ejemplo de ello es el estudio llevado a cabo por Bougnom *et al.* (2019) en tres ciudades africanas en las que se tomaron muestras de suelo y se observó que el riego con aguas residuales

crudas había afectado significativamente a la diversidad microbiana y genética resistente del suelo, incluidos los genes de resistencia a BLEE.

Por otro lado, existen numerosos estudios que investigan el efecto de la utilización de estiércol como fertilizante para los suelos de cultivo. Así, un estudio realizado en China analizó las comunidades bacterianas y los genes de resistencia presentes en suelos de campo con distintos cultivos a los que se les había aplicado estiércol (de vacas lecheras y cerdos) y, observó que, tanto en las muestras de estiércol como en las de suelo abonado, los genes de resistencia más frecuentes otorgaban resistencia a múltiples fármacos, tetraciclina, MLS, aminoglucósidos, vancomicina y betalactámicos (Chen *et al.*, 2019a); lo cual concuerda con los elevados porcentajes de resistencia a estos antibióticos hallados en nuestras muestras de residuos ganaderos y suelos agrarios, demostrando, así, la enorme transferencia de genes de resistencia desde las bacterias presentes en los abonos hasta los suelos de cultivo. Otros estudios (Liu *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022b; Zhang *et al.*, 2023a) coinciden en que la aplicación de estiércol al suelo de cultivo aumenta significativamente la concentración de los genes de resistencia más abundantes en los residuos animales, especialmente los genes de resistencia a tetraciclina, macrólidos y sulfonamidas (siendo los genes *tetW*, *ermB*, *ermT* y *sul2* los más frecuentemente detectados).

Al igual que en nuestra investigación, un estudio austríaco analizó tanto muestras de suelos agrícolas como de suelos forestales con bajo impacto antropogénico y determinaron que, aunque fueron mayores las resistencias encontradas en los suelos de cultivo, el suelo forestal también mostró altas concentraciones de genes de resistencia a los antibióticos. Sin embargo, al contrario que en nuestras estimaciones, tanto en los suelos naturales como en los agrícolas, los genes detectados con mayor frecuencia fueron *tetW* y *sul1*; aunque coinciden con nuestro trabajo en la gran abundancia del gen *ermB* (Radu *et al.*, 2021).

Igualmente, Qian *et al.* (2021) analizaron muestras de suelo natural procedentes de tres entornos distintos: la tundra de Alaska, la pradera del medio oeste de Estados Unidos y la selva amazónica y muestras de suelo de pasto y suelo cultivado. En todos ellos, predominaron los genes de resistencia a múltiples fármacos (57.1%), con 67 subtipos diferentes, seguidos de los genes de resistencia a MLS (11.2%), con 28 subtipos; corroborando, junto a nuestro trabajo, la enorme cantidad de resistencias a los macrólidos

presente en los suelos. Coincidiendo con nuestras estimaciones, también detectaron 71 subtipos de genes de resistencia a betalactámicos (2.6%), 24 a tetraciclinas (3.0%) y 20 a aminoglucósidos (1.6%). Cabe destacar que en los suelos naturales se detectaron genes exclusivos de resistencia a la vancomicina, lo cual concuerda con nuestras estimaciones de un 78.0% de cepas probables portadoras del gen *van* en nuestras muestras de suelo natural.

Nuestros resultados, al igual que los de los estudios comentados en este apartado, nos permiten concluir que el suelo, como reservorio natural de genes de resistencia, es un ecosistema en el que el intercambio genético se ve promovido, amplificando considerablemente la diseminación de resistencias a los antibióticos; aún más si se le añaden residuos que puedan contener restos de antibióticos y bacterias resistentes. Por lo tanto, todos los desechos que se vierten a los suelos deberían ser correctamente tratados, prohibiendo por completo el riego o abono de los suelos agrícolas con residuos sin tratar o con un tratamiento insuficiente.

6.4. Resistencia en aire.

Existen evidencias recientes sobre el transporte de resistencias a los antibióticos mediante el microbioma presente en el aire (Gwenzi *et al.*, 2022). La presencia de genes de resistencia es superior en los aerosoles de ambientes de interior comparados con los aerosoles de exterior, debido a una menor ventilación y, por lo tanto, una mayor concentración de microorganismos por centímetro cúbico.

Nuestras muestras de aire se tomaron en ambientes de interior y procedían la mitad de centros educativos y la otra mitad de instalaciones ganaderas, por lo que no es de extrañar el dato de un 37.0% de cepas resistentes a la tetraciclina (ocupando el tercer lugar entre los medios analizados). Aunque en nuestros resultados no abundan demasiado las resistencias a los carbapenémicos, las muestras de aire son el tercer nicho ecológico con mayor número de cepas resistentes al doripenem (15.8%) y al meropenem (17.3%). En relación con el grupo de las cefalosporinas, este ecosistema mostró el valor más elevado de resistencia a la ceftazidima (48.8%). Asimismo, presentó el mayor porcentaje de BAH resistentes al ácido nalidíxico (65.4%) entre todos los medios analizados. En el total de resistencias, los porcentajes de resistencias más elevados se detectaron frente al monobactámico aztreonam (79.5%) y la clindamicina (69.3%).

En los diversos estudios previamente realizados, el resistoma del aire incluye una gran variedad de genes de resistencia a los antibióticos, entre ellos *bla*, *erm*, *van*, *tet* y *aac* (Banchón *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2023; Gwenzi *et al.*, 2022); coincidiendo por completo con los resultados de las estimaciones genéticas realizadas en nuestra investigación, en las que *bla* (92.1%), *erm* (81.1%) y *aac/ant* (70.9%) serían los genes de resistencia más frecuentes. Similar a nuestros resultados, un estudio analizó muestras de aire de aulas y zonas comunes de dos centros educativos de Polonia, de las que aislaron las cepas de *Staphylococcus aureus* presentes y determinaron las resistencias a los antibióticos, hallando que el 62.5% de las cepas presentaban resistencia a la eritromicina, el 25.0% a la cefoxitina, el 20.8% a la tetraciclina y el 100.0% a la penicilina (Małecka-Adamowicz, Koim-Puchowska & Dembowska, 2020).

De igual modo, en un estudio realizado en la Universidad de Agricultura de Cracovia (Polonia) encontraron que, de los estafilococos aislados en el aire, más del 50.0% eran resistentes a la eritromicina y alrededor del 33.0% a la tetraciclina (Wolny-Koładka *et al.*, 2019). En cambio, otro estudio sobre bioaerosoles transportados por el aire en dependencias universitarias de Ibadan (Nigeria), detectó que el 75.0% de las cepas era resistentes a la tetraciclina (Giwa & Ogunjobi, 2017), valores mucho más elevados que los hallados en nuestro trabajo.

En relación con nuestras muestras de aire procedentes de instalaciones ganaderas, Xu *et al.* (2022) analizaron muestras de aerosoles tanto en el interior como en el exterior de una granja avícola y sus resultados manifestaron la presencia de patógenos zoonóticos y genes de resistencia en ambos tipos de muestra, siendo los genes de resistencia predominantes *bla*TEM, *tet*Q, *erm*B y *sul*1, muy elevados también en nuestras estimaciones. Continuando con la comparación entre muestras de aire de interior y exterior de instalaciones ganaderas, Zhao *et al.* (2021) describieron una mayor abundancia de resistencias a los betalactámicos y a la tetraciclina en los aerosoles de interior, mientras que en los aerosoles de exterior predominan las resistencias a los aminoglucósidos y a la tetraciclina.

Asimismo, Song *et al.* (2021) también determinaron que, en muestras de heces y aire recogidas en una granja porcina de cría intensiva china, predominó la resistencia a la tetraciclina, siendo *tet*M el gen de resistencia dominante entre todos los subtipos de resistencia, tanto en aire como en heces. Como posible explicación, un estudio realizado

en una granja porcina del sur de China (Gao *et al.*, 2023) demostró que las heces de los cerdos eran responsables de la transmisión de la mayoría de bacterias resistentes a través del aire, aportando el 77.0% de las bacterias del aire de la granja y el 35.0% de las bacterias que se encontraron en los entornos cercanos a la granja (áreas agrícolas y públicas). Además, estas bacterias eran portadoras principalmente de genes *dfrA*, *blaTEM1*, *tetM*, *mcr1*, *ermB* y *sul1*, estimados con alta frecuencia en nuestras muestras de aire. En el polvo presente en el aire del interior de granjas europeas también se ha determinado la presencia de genes *tetW*, *aph(3')-III*, *ermB* y *sul2* asociados a las heces animales (Luiken *et al.*, 2022). Contrastando los resultados de estas investigaciones con nuestros análisis, aunque se ha estimado que el gen *tet* podría estar presente en el 37.0% de las cepas de aire (tal y como se ha comentado), los genes *bla*, *erm*, *sul* y *dfr* serían notablemente más abundantes.

Finalmente, algunos autores han analizado el resistoma en muestras de aire procedentes de otros ambientes diferentes a los considerados en el presente estudio, pero con patrones de resistencia parecidos. Un ejemplo es un estudio en el que se recolectaron muestras de aire de 11 entornos urbanos diferentes de China, entre los que se incluyeron calles, parques, hospitales y un área rural, en el que determinaron que los genes de resistencia detectados estaban principalmente asociados a aminoglucósidos, betalactámicos, fluoroquinolonas, glucopéptidos, MLS, fenicoles, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprima; todos ellos muy presentes en nuestras cepas, aunque los fenicoles en menor medida (Zhou *et al.*, 2023).

Consiguientemente, todos los resultados indican que el aire es un medio de riesgo en la transmisión de resistencias a los antibióticos, lo cual se potencia aún más en las proximidades de los nichos ecológicos más contaminados (como es el caso de las instalaciones ganaderas).

6.5. Resistencia en superficies.

Las muestras de superficies son el nicho ecológico más cercano al contacto humano de todos los ecosistemas estudiados y cabe destacar que, junto con las muestras de suelo natural, obtuvieron los porcentajes más bajos de resistencia en la prueba de cribado; presentando los porcentajes de resistencia a ampicilina y cloranfenicol más bajos de todos los nichos ecológicos. En el análisis fenotípico, los datos más relevantes son un 38.0% de

cepas resistentes a la ceftazidima (ocupando el tercer puesto), un 82.0% al aztreonam y un 64.0% al ácido nalidíxico (siendo, en ambos antibióticos, el segundo medio con mayor resistencia).

En nuestro estudio, las muestras de superficies proceden exclusivamente de centros escolares y universitarios. Actualmente, no existen muchos estudios que hayan investigado el resistoma en muestras de superficies. Además, entre los estudios realizados, muy pocos analizan las superficies de entornos educativos y, en ellos, los resultados no son concluyentes. No obstante, existen algunos estudios realizados en muestras de superficies procedentes de otros ecosistemas que pueden compararse con nuestra investigación.

Un estudio analizó muestras de distintas superficies de un gimnasio y encontraron abundancia de los genes *intl*, *sul1* y *bla*TEM, presentando diferencias entre los equipos ubicados en el interior del gimnasio y aquellos que se hallaban en las zonas de exterior, como una mayor abundancia de *sul1* en los equipos de interior (Zhang *et al.*, 2023b). Comparando con nuestros resultados, estos datos coinciden en que *bla* sería el gen de resistencia más abundante, pudiendo estar presente en el 96.0% de las cepas aisladas de las muestras de superficies; sin embargo, en nuestro estudio, los genes de resistencia a las sulfonamidas tan solo se hallarían en un 20.4% de las cepas.

Por su parte, Gupta *et al.* (2019) analizaron las superficies de suelos de distintos edificios (centros médicos, veterinarios y un centro que contiene clases, oficina y laboratorios), detectando genes de resistencia específicos en todos los edificios, entre los que predominaron *tetQ* y *sul1*, lo cual contrasta con los bajos porcentajes de estos genes que presentarían nuestras cepas de estudio. Por otro lado, cabe señalar que la concentración del gen *tetQ* se relacionó con el nivel de tráfico del edificio, es decir, se halló una mayor abundancia de este gen en los ambientes en los que había un mayor tránsito de personas al día.

Como se ha comentado anteriormente, la pérdida de diversidad bacteriana influye en la presencia de genes de resistencia a los antibióticos en el ambiente. Mahnert *et al.* (2019) confirman este acontecimiento, pues realizaron un estudio en el que compararon muestras de superficies de suelo en entornos clínicos y no clínicos (edificios públicos y casas privadas), obteniendo que aquellas superficies en las que se había realizado una limpieza más profunda conducían a una pérdida de la diversidad bacteriana y un aumento de la

diversidad de genes de resistencia. Entre los genes de resistencia detectados, en las muestras de entornos clínicos predominaron las resistencias a las fluoroquinolonas y el triclosán; en cambio, en las muestras urbanas, los genes de resistencia más representativos otorgaban resistencia a los aminoglucósidos, diaminopirimidinas y macrólidos. Los genes de resistencia tanto a quinolonas como a aminoglucósidos y macrólidos también se han estimado con elevada frecuencia en nuestras muestras de superficies, con valores del 65.3%, el 49.0% y el 83.7%, respectivamente; siendo superadas únicamente por los genes *bla*.

A pesar de proceder de entornos distintos, tanto nuestra investigación como los estudios comentados muestran la enorme prevalencia de resistencias en las superficies de los edificios públicos (centros de estudios, hospitales, gimnasios, ...), constituyendo una peligrosa fuente de transmisión de bacterias resistentes y genes de resistencia, debido al enorme tránsito de personas que estas instalaciones presentan. Esta información ratifica la importancia de la higiene personal y el lavado de manos para prevenir la dispersión de bacterias resistentes.

7. CONCLUSIONES

Del estudio del resistoma ambiental en el entorno periurbano de la ciudad de Granada, se pueden obtener las conclusiones que se exponen a continuación:

1. En la cuantificación del bioma resistente, se ha determinado que el 12.9% de las bacterias aerobias heterótrofas presentes en las diversas muestras presentaban resistencia a los antibióticos utilizados en la prueba de cribado.
2. La eritromicina y la vancomicina han sido los antibióticos con mayores porcentajes de bacterias aerobias heterótrofas resistentes en la prueba de cribado, obteniendo un 33.4% y un 27.0%, respectivamente.
3. El análisis fenotípico ha mostrado elevados porcentajes de resistencia a los grupos antibióticos de aminoglucósidos, penicilinas, glucopéptidos y macrólidos, e, individualmente, al aztreonam, el ácido nalidíxico y la tetraciclina, en prácticamente la totalidad de los nichos ecológicos estudiados.
4. Las aguas residuales y las instalaciones ganaderas son los ecosistemas en los que se han detectado mayores niveles de resistencia, considerándose puntos críticos de propagación de bacterias resistentes y genes de resistencia a los antibióticos.
5. En la estimación de genes de resistencia probables se ha observado que la mayoría de las cepas bacterianas aisladas portaría más de un gen de resistencia, confiriéndoles multiresistencia, siendo *bla van erm* la combinación de genes más frecuente, pudiendo estar presente en el 7.2% de las cepas.
6. La solución a la propagación de resistencias a los antibióticos es compleja, pero debe incluir: una mayor regularización de la utilización de antibióticos en entornos clínicos y veterinarios y una disminución drástica de los residuos antibióticos y bacterias resistentes que se liberan al medioambiente.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, R., Rodríguez-Álvarez, C., Lecuona, M., Castro, B., González, J. C., Aguirre-Jaime, A. & Arias, Á. (2019). Increased antimicrobial resistance of MRSA strains isolated from pigs in Spain between 2009 and 2018. *Veterinary Sciences*, 6(2), 38. <https://doi:10.3390/vetsci6020038>
- AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios), 2018. Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN). Informe JIACRA España. Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. <https://www.resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-jiacra-espana>
- AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios), 2022. Informe Anual 2020-2021 del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN). <https://resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-anual-2020-2021-plan-nacional-frente-la-resistencia-los-antibioticos>
- AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios), 2023. Informe del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos Medioambiente (PRAN-MA) 2.2: Residuos de antibióticos en estaciones depuradoras de aguas residuales y aguas superficiales. <https://www.resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-22-residuos-de-antibioticos-en-estaciones-depuradoras-de-aguas-residuales>
- AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación), 1999. Calidad del agua. Enumeración de microorganismos cultivables. Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo, vol. 6222. ISO, 1999. <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0022196>
- AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación), 2014. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 2: Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en superficie ISO 4833-2:2014. <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0052560>
- Akram, F., Imtiaz, M. & ul Haq, I. (2023). Emergent crisis of antibiotic resistance: A silent pandemic threat to 21st century. *Microbial Pathogenesis*, 174, 105923. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105923>

- Al-Kharousi, Z. S., Guizani, N., Al-Sadi, A. M. & Al-Bulushi, I. M. (2019). Antibiotic resistance of Enterobacteriaceae isolated from fresh fruits and vegetables and characterization of their AmpC β -lactamases. *Journal of Food Protection*, 82(11), 1857-1863. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-089>
- Anthony, E. T., Ojemaye, M. O., Okoh, O. O. & Okoh, A. I. (2020). A critical review on the occurrence of resistomes in the environment and their removal from wastewater using apposite treatment technologies: Limitations, successes and future improvement. *Environmental Pollution*, 263, 113791. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113791>
- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association) & WEF (Water Environment Federation). Lipps, W. C., Braun-Howland, E.B. & Baxter, T.E. (Ed.) (2023). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 24th ed. Washington DC: APHA Press.
- Banchón, C., Vivas, T., Aveiga, A. & Díaz, L. (2021). Airborne Bacteria from Wastewater Treatment and their Antibiotic Resistance: A Meta-Analysis. *Journal of Ecological Engineering*, 22(10). <https://doi.org/10.12911/22998993/142207>.
- Bassitta, R., Nottensteiner, A., Bauer, J., Straubinger, R. K. & Hölzel, C. S. (2022). Spread of antimicrobial resistance genes via pig manure from organic and conventional farms in the presence or absence of antibiotic use. *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), 2457-2465. <https://doi.org/10.1111/jam.15717>
- Bougnom, B. P., Thiele-Bruhn, S., Ricci, V., Zongo, C. & Piddock, L. J. V. (2019). Raw wastewater irrigation for urban agriculture in Africa increases the diversity of transferable antibiotic resistances genes in soil, including those encoding ESBLs. *BioRxiv*, 615922. <https://doi.org/10.1101/615922>
- Cacace, D., Fatta-Kassinos, D., Manaia, C. M., Cytryn, E., Kreuzinger, N., Rizzo, L., Karaolia, P., Schwartz, T., Alexander, J., Merlin, C., Garelick, H., Schmitt, H., de Vries, D., Schwermer, C. U., Meric, S., Ozkal, C. B., Pons, M-N., Kneis, D. & Berendonk, T. U. (2019). Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Research*, 162, 320-330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.039>

- Calabria de Araújo, J., de Queiroz Silva, S., de Aquino S. F., Leroy Freitas, D., Machado, E. C., Rezende Pereira, A., Gomes de Oliveira Paranhos, A. & de Paula Dias, C. (2020). Antibiotic Resistance, Sanitation, and Public Health. En Manaia, C. M., Donner, E., Vaz-Moreira, I., & Hong, P. (Eds.), *Antibiotic Resistance in the Environment: A Worldwide Overview* (pp. 189-216). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/698_2020_470
- Cameron, A. & McAllister, T. A. (2016). Antimicrobial usage and resistance in beef production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7, 1-22. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0127-3>
- Canton, R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 20-25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x>
- Centurion, V. B., Silva, J. B., Duarte, A. W. F., Rosa, L. H. & Oliveira, V. M. (2022). Comparing resistome profiles from anthropogenically impacted and non-impacted areas of two South Shetland Islands–Maritime Antarctica. *Environmental Pollution*, 304, 119219. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119219>
- Chen, Z., Zhang, W., Yang, L., Stedtfeld, R. D., Peng, A., Gu, C., Boyd, S. A. & Li, H. (2019a). Antibiotic resistance genes and bacterial communities in cornfield and pasture soils receiving swine and dairy manures. *Environmental Pollution*, 248, 947-957. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.093>
- Chen, Q. L., An, X. L., Zheng, B. X., Gillings, M., Peñuelas, J., Cui, L., Su, J. Q. & Zhu, Y. G. (2019b). Loss of soil microbial diversity exacerbates spread of antibiotic resistance. *Soil Ecology Letters*, 1, 3-13. <https://doi.org/10.1007/s42832-019-0011-0>
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2022. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute <https://clsi.org/about/press-releases/clsi-publishes-m100-performance-standards-for-antimicrobial-susceptibility-testing-32nd-edition/>

- Cobo-Díaz, J. F., Alvarez-Molina, A., Alexa, E. A., Walsh, C. J., Mencía-Ares, O., Puente-Gómez, P., Likotrafiti, E., Fernández-Gómez, P., Prieto, B., Crispie, F., Ruiz, L., González-Raurich, M., López, M., Prieto, M., Cotter, P. & Alvarez-Ordóñez, A. (2021). Microbial colonization and resistome dynamics in food processing environments of a newly opened pork cutting industry during 1.5 years of activity. *Microbiome*, 9, 1-19. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01131-9>
- Collignon, P. J. & McEwen, S. A. (2019). One health—its importance in helping to better control antimicrobial resistance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(22). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>
- Cupertino, M. C., Resende, M. B., Mayer, N. A., Carvalho, L. M. & Siqueira-Batista, R. (2020). Emerging and re-emerging human infectious diseases: A systematic review of the role of wild animals with a focus on public health impact. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 13(3), 99-106. <https://doi.org/10.4103/1995-7645.277535>
- Despotovic, M., Wilmes, P., Nies, L. & Busi, S.B. (2023). Reservoirs of antimicrobial resistance in the context of One Health. *Current Opinion in Microbiology*, 73(102291). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102291>
- Dolejska, M. (2020). Antibiotic-Resistant Bacteria in Wildlife. En Manaia, C. M., Donner, E., Vaz-Moreira, I. & Hong, P. (Eds.), *Antibiotic Resistance in the Environment: A Worldwide Overview* (pp. 19-70). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/698_2020_467
- Doster, E., Thomas, K. M., Weinroth, M. D., Parker, J. K., Crone, K. K., Arthur, T. M., Schmidt, J. W., Wheeler, T. L., Belk, K. E. & Morley, P. S. (2020). Metagenomic characterization of the microbiome and resistome of retail ground beef products. *Frontiers in Microbiology*, 11, 541972. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.541972>
- EFSA (European Food Safety Authority) & ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2024. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2021–2022. *EFSA Journal*, 21(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8583>

- Egorov, A. M., Ulyashova, M. M. & Rubtsova, M. Y. (2018). Bacterial enzymes and antibiotic resistance. *Acta Naturae*, 10(4), 33-48.
- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), 2022. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints
- Fernández-Trapote, E., Oliveira, M., Cobo-Díaz, J. F. & Alvarez-Ordóñez, A. (2024). The resistome of the food chain: A One Health perspective. *Microbial Biotechnology*, 17(7), e14530. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14530>
- Finley, R. L., Collignon, P., Larsson, D. J., McEwen, S. A., Li, X. Z., Gaze, W. H., Reid-Smith, R., Timinouni, M., Graham, D. W. & Topp, E. (2013). The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases*, 57(5), 704-710. <https://doi.org/10.1093/cid/cit355>
- Gao, F. Z., He, L. Y., Bai, H., He, L. X., Zhang, M., Chen, Z. Y., Liu, Y. S. & Ying, G. G. (2023). Airborne bacterial community and antibiotic resistome in the swine farming environment: metagenomic insights into livestock relevance, pathogen hosts and public risks. *Environment International*, 172, 107751. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107751>
- Gentile, A., Di Stasio, L., Oliva, G., Vigliotta, G., Cicatelli, A., Guarino, F., Nissim, W. G., Labra, M. & Castiglione, S. (2024). Antibiotic resistance in urban soils: Dynamics and mitigation strategies. *Environmental Research*, 120120. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.120120>
- Giwa, H. J. & Ogunjobi, A. A. (2017). Prevalence of multiple antibiotic resistant bacteria in selected libraries of University of Ibadan, Nigeria. *Journal of American Science*, 13(2), 18-25. <https://doi.org/10.7537/marsjas130217.03>
- Guo, J., Wang, Y., Ahmed, Y., Jin, M. & Li, J. (2020). Control Strategies to Combat Dissemination of Antibiotic Resistance in Urban Water Systems. En Manaia, C. M., Donner, E., Vaz-Moreira, I., & Hong, P. (Eds.), *Antibiotic Resistance in the Environment: A Worldwide Overview* (pp. 147-187). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/698_2020_474

- Gupta, M., Lee, S., Bisesi, M. & Lee, J. (2019). Indoor microbiome and antibiotic resistance on floor surfaces: an exploratory study in three different building types. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(21), 4160. <https://doi.org/10.3390/ijerph16214160>
- Gwenzi, W., Shamsizadeh, Z., Gholipour, S. & Nikaeen, M. (2022). The air-borne antibiotic resistome: Occurrence, health risks, and future directions. *Science of the Total Environment*, 804, 150154. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150154>
- Han, B., Yang, F., Tian, X., Mu, M., & Zhang, K. (2021). Tracking antibiotic resistance gene transfer at all seasons from swine waste to receiving environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 219, 112335. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150154>
- Hartinger, S.M., Medina-Pizzali, M.L., Salmon-Mulanovich, G., Larson, A.J., Pinedo-Bardales, M., Verastegui, H., Riberos, M. & Mäusezahl, D. (2021). Antimicrobial resistance in humans, animals, water and household environs in rural Andean Peru: exploring dissemination pathways through the One Health lens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 4604. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094604>.
- Hendriksen, R. S., Munk, P., Njage, P., Van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., Röder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S. K., Kjeldgaard, J., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., de Roda Husman, A. M., Rasmussen, S., Petersen, B., The Global Sewage Surveillance project consortium, Amid, C., Cochrane, G., Sicheritz-Ponten, T., Schmitt, H., Alvarez, J. R. M., Aidara-Kane, A., Pamp, S. J., Lund, O., Hald, T., Woolhouse, M., Koopmans, M. P., Vigre, H., Petersen, T. N. & Aarestrup, F. M. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications*, 10(1), 1124. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>
- Hobson, C., Chan, A. N. & Wright, G. D. (2021). The antibiotic resistome: A guide for the discovery of natural products as antimicrobial agents. *Chemical Reviews*, 121, 3464-3494. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01214>

- Hu, Q., Liu, C., Zhang, D., Wang, R., Qin, L., Xu, Q., Che, L. & Gao, F. (2020). Effects of low-dose antibiotics on gut immunity and antibiotic resistomes in weaned piglets. *Frontiers in Immunology*, 11, 903. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00903>
- Iskandar, K., Murugaiyan, J., Hammoudi Halat, D., Hage, S. E., Chibabhai, V., Adukkadukkam, S., Roques, C., Molinier, L., Salameh, P. & Van Dongen, M. (2022). Antibiotic Discovery and Resistance: The Chase and the Race. *Antibiotics*, 11(182). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020182>
- Jałowicki, Ł., Hubeny, J., Harnisz, M. & Płaza, G. (2021). Seasonal and technological shifts of the WHO priority multi-resistant pathogens in municipal wastewater treatment plant and its receiving surface water: a case study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(1), 336. <https://doi.org/10.3390/ijerph19010336>
- Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Huang, Y., Jia, J. & Dou, T. (2021). Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of Basic Microbiology*, 61(12), 1049-1070. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100201>
- Joyce, A., McCarthy, C. G., Murphy, S. & Walsh, F. (2019). Antibiotic resistomes of healthy pig faecal metagenomes. *Microbial Genomics*, 5(5), e000272. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000272>
- Kampouris, I. D., Agrawal, S., Orschler, L., Cacace, D., Kunze, S., Berendonk, T. U. & Klümper, U. (2021). Antibiotic resistance gene load and irrigation intensity determine the impact of wastewater irrigation on antimicrobial resistance in the soil microbiome. *Water Research*, 193, 116818. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116818>
- Kang, M., Yang, J., Kim, S., Park, J., Kim, M. & Park, W. (2022). Occurrence of antibiotic resistance genes and multidrug-resistant bacteria during wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment*, 811, 152331. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152331>

- Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F. & Virta, M. P. (2018). Antibiotic-resistance genes in waste water. *Trends in Microbiology*, 26(3), 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.005>
- Karmakar, P. & Gaitonde, V. (2019). Promising recent strategies with potential clinical translational value to combat antibacterial resistant surge. *Medicines*, 6(21). <https://doi.org/10.3390/medicines6010021>
- Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R. K., Viridi, J. S. & Gulati, P. (2018). Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(2), 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004>
- Kim, D. W. & Cha, C. J. (2021). Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(3), 301-309. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00569-z>
- Kumar, S. B., Arnipalli, S. R. & Ziouzenkova, O. (2020). Antibiotics in Food Chain: The Consequences for Antibiotic Resistance. *Antibiotics*, 9(688). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100688>
- Kunhikannan, S., Thomas, C. J., Franks, A. E., Mahadevaiah, S., Kumar, S. & Petrovski, S. (2021). Environmental hotspots for antibiotic resistance genes. *Microbiologyopen*, 10(3), e1197. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1197>
- Larsson, D. G. & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257-269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Leite, G. C., Perdigão-Neto, L. V., Martins, R. C. R., Rizek, C., Levin, A. S. & Costa, S. F. (2021). Genetic factors involved in fosfomycin resistance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infection, Genetics and Evolution*, 93, 104943. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104943>
- Li, J., Shao, B., Shen, J., Wang, S. & Wu, Y. (2013). Occurrence of chloramphenicol-resistance genes as environmental pollutants from swine feedlots. *Environmental Science & Technology*, 47(6), 2892-2897. <https://doi.org/10.1021/es304616c>

- Lim, M. Y., Cho, Y. & Rho, M. (2018). Diverse distribution of Resistomes in the human and environmental microbiomes. *Current Genomics*, 19(8), 701-711. <https://doi.org/10.2174/1389202919666180911130845>
- Lipps, W.C., Braun-Howland, E.B. & Baxter, T.E. (2023). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twenty fourth ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington DC.
- Liu, Y., Dyall-Smith, M., Marends, M., Hu, H. W., Browning, G. & Billman-Jacobe, H. (2020). Antibiotic resistance genes in antibiotic-free chicken farms. *Antibiotics*, 9(3), 120. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030120>
- Liu, W., Ling, N., Guo, J., Ruan, Y., Wang, M., Shen, Q. & Guo, S. (2021). Dynamics of the antibiotic resistome in agricultural soils amended with different sources of animal manures over three consecutive years. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123399. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123399>
- López-Catalina, A., Atxaerandio, R., García-Rodríguez, A., Goiri, I., Gutierrez-Rivas, M., Jiménez-Montero, J. A. & González-Recio, O. (2021). Characterisation of the rumen resistome in Spanish dairy cattle. *Animal Microbiome*, 3, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00125-0>
- Lowe, M., Strasheim, W., Chan, W. Y. & Perovic, O. (2024). Bacterial and Genetic Features of Raw Retail Pork Meat: Integrative Analysis of Antibiotic Susceptibility, Whole-Genome Sequencing, and Metagenomics. *Antibiotics*, 13(8), 700. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080700>
- Luiken, R. E., Van Gompel, L., Munk, P., Sarrazin, S., Joosten, P., Dorado-García, A., Hansen, R. B., Knudsen, B. E., Bossers, A., Wagenaar, J. A., Aarestrup, F. M., Dewulf, J., Mevius, D. J., Heederik, D. J. J., Smit, L. A. M. & Schmitt, H. (2019). Associations between antimicrobial use and the faecal resistome on broiler farms from nine European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(9), 2596-2604. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz235>

- Luiken, R. E., Heederik, D. J., Scherpenisse, P., Van Gompel, L., van Heijnsbergen, E., Greve, G. D., Jongerius-Gortemaker, B. GM., Terstees-Zijdeveld, M. HG., Fischer, J., Juraschek, K., Sharzynska, M., Zajac, M., Wasyl, D., EFFORT-group, Wagenaar, J. A., Smit, L. AM., Wouters, I. M., Mevius, D. J. & Schmitt, H. (2022). Determinants for antimicrobial resistance genes in farm dust on 333 poultry and pig farms in nine European countries. *Environmental Research*, 208, 112715. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112715>
- Ma, L., Xia, Y., Li, B., Yang, Y., Li, L. G., Tiedje, J. M. & Zhang, T. (2016). Metagenomic assembly reveals hosts of antibiotic resistance genes and the shared resistome in pig, chicken, and human feces. *Environmental Science & Technology*, 50(1), 420-427. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03522>
- Ma, T., McAllister, T. A. & Guan, L. L. (2021). A review of the resistome within the digestive tract of livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00643-6>
- Ma, J., Sun, H., Li, B., Wu, B., Zhang, X. & Ye, L. (2024). Horizontal transfer potential of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plants unraveled by microfluidic-based mini-metagenomics. *Journal of Hazardous Materials*, 465, 133493. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133493>
- Mahnert, A., Moissl-Eichinger, C., Zojer, M., Bogumil, D., Mizrahi, I., Rattei, T., Martinez, J. L. & Berg, G. (2019). Man-made microbial resistances in built environments. *Nature Communications*, 10(1), 968. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08864-0>
- Majeed, H. J., Riquelme, M. V., Davis, B. C., Gupta, S., Angeles, L., Aga, D. S., Garner, E., Pruden, A. & Vikesland, P. J. (2021). Evaluation of metagenomic-enabled antibiotic resistance surveillance at a conventional wastewater treatment plant. *Frontiers in Microbiology*, 12, 657954. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.657954>
- Małacka-Adamowicz, M., Koim-Puchowska, B. & Dembowska, E. A. (2020). Diversity of bioaerosols in selected rooms of two schools and antibiotic resistance of isolated staphylococcal strains (Bydgoszcz, Poland): a case study. *Atmosphere*, 11(10), 1105. <https://doi.org/10.3390/atmos11101105>

- Manaia, C. M., Graham, D., Topp, E., Martínez, J. L., Collignon, P. & Gaze, W. H. (2020). Antibiotic Resistance in the Environment: Expert Perspectives. En Manaia, C. M., Donner, E., Vaz-Moreira, I., & Hong, P. (Eds.), *Antibiotic Resistance in the Environment: A Worldwide Overview* (pp. 1-18). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/698_2020_472
- Marinelli, F., Alifano, P., Landini, P. & Visca, P. (2021). XXXIII SIMGBM Congress 2019-Antimicrobials and Host-Pathogen Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 12, 672517. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.672517>
- Markley, J. L. & Wencewicz, T. A. (2018). Tetracycline-inactivating enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1058. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01058>
- Martínez, J. L. (2012). Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 3(1). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00001>
- Mencía-Ares, O., Cabrera-Rubio, R., Cobo-Díaz, J. F., Álvarez-Ordóñez, A., Gómez-García, M., Puente, H., Cotter, P. D., Crispie, F., Carvajal, A., Rubio, P. & Argüello, H. (2020). Antimicrobial use and production system shape the fecal, environmental, and slurry resistomes of pig farms. *Microbiome*, 8, 1-17. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00941-7>
- Ng, C., Tay, M., Tan, B., Le, T. H., Haller, L., Chen, H., Koh, T. H., Barkham, T. M. S., Thompson, J. R. & Gin, K. Y. H. (2017). Characterization of metagenomes in urban aquatic compartments reveals high prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in wastewaters. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02200>
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority) y EMA (European Medicines Agency), 2022. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA: A One Health Response. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-eueea-one-health-response>

- OMS (Organización Mundial de la Salud), 2016. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241509763>
- Osorio, V., Mezquita, A. S. & Balcázar, J. L. (2023). Comparative metagenomics reveals poultry and swine farming are hotspots for multidrug and tetracycline resistance. *Environmental Pollution*, 322, 121239. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121239>
- Papajová, I., Šmigová, J., Gregová, G., Šoltys, J., Venglovský, J., Papaj, J., Szabóová, T., Dančová, N., Ihnacik, L., Schusterová, I., Sušinková, J., Raková, J. & Regecová, I. (2022). Effect of wastewater treatment on bacterial community, antibiotic-resistant bacteria and endoparasites. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), 2750. <https://doi.org/10.3390/ijerph19052750>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Peterson, E. & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9(2928). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
- Poomchuchit, S., Kerdsin, A., Chopjitt, P., Boueroy, P., Hatrongjit, R., Akeda, Y., Tomono, K., Nuanualsuwan, S. & Hamada, S. (2021). Fluoroquinolone resistance in non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from slaughtered pigs in Thailand. *Journal of Medical Microbiology*, 70(7), 001386. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001386>
- Qi, Z., Jin, S., Guo, X., Tong, H., Ren, N. & You, S. (2023). Distribution and transmission of β -lactamase resistance genes in meal-to-milk chain on dairy farm. *Environmental Pollution*, 331, 121831. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121831>

- Qian, X., Gunturu, S., Guo, J., Chai, B., Cole, J. R., Gu, J. & Tiedje, J. M. (2021). Metagenomic analysis reveals the shared and distinct features of the soil resistome across tundra, temperate prairie, and tropical ecosystems. *Microbiome*, 9(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01047-4>
- Quintela-Baluja, M., Abouelnaga, M., Romalde, J., Su, J. Q., Yu, Y., Gomez-Lopez, M., Smets, B., Zhu, Y. G. & Graham, D. W. (2019). Spatial ecology of a wastewater network defines the antibiotic resistance genes in downstream receiving waters. *Water Research*, 162, 347-357. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.075>
- Radu, E., Woegerbauer, M., Rab, G., Oismüller, M., Strauss, P., Hufnagl, P., Gottsberger, R. A., Krampe, J., Weyermair, K. & Kreuzinger, N. (2021). Resilience of agricultural soils to antibiotic resistance genes introduced by agricultural management practices. *Science of the Total Environment*, 756, 143699. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143699>
- Rodríguez, E. A., Ramirez, D., Balcázar, J. L. & Jiménez, J. N. (2021). Metagenomic analysis of urban wastewater resistome and mobilome: a support for antimicrobial resistance surveillance in an endemic country. *Environmental Pollution*, 276, 116736. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116736>
- Rousham, E. K., Unicomb, L. & Islam, M. A. (2018). Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1876). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0332>
- Selvarajan, R., Obize, C., Sibanda, T., Abia, A. L. K. & Long, H. (2023). Evolution and emergence of antibiotic resistance in given ecosystems: possible strategies for addressing the challenge of antibiotic resistance. *Antibiotics*, 12(1), 28. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010028>
- Seyoum, M. M., Lichtenberg, R., Orlofsky, E., Bernstein, N. & Gillor, O. (2022). Antibiotic resistance in soil and tomato crop irrigated with freshwater and two types of treated wastewater. *Environmental Research*, 211, 113021. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113021>

- Shen, M., Hu, X., Li, M., Lyu, C., Hu, Y., Bu, X., Chen, T., Cai, H., Li, C., Liu, J. & Fan, K. (2023). Distribution of Antibiotic Resistance Genes and Their Association with Microbes in Wastewater Treatment Plants: A Metagenomics Analysis. *Water*, 15(8), 1587. <https://doi.org/10.3390/w15081587>
- Šimatović, A. & Udiković-Kolić, N. (2020) Antibiotic Resistance in Pharmaceutical Industry Effluents and Effluent-Impacted Environments. En Manaia, C. M., Donner, E., Vaz-Moreira, I., & Hong, P. (Eds.), *Antibiotic Resistance in the Environment: A Worldwide Overview* (pp. 101-122). Springer International Publishing.
- Song, L., Wang, C., Jiang, G., Ma, J., Li, Y., Chen, H. & Guo, J. (2021). Bioaerosol is an important transmission route of antibiotic resistance genes in pig farms. *Environment International*, 154, 106559. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106559>
- Stasiak, M., Maćkiw, E., Kowalska, J., Kucharek, K. & Postupolski, J. (2021). Silent Genes: Antimicrobial Resistance and Antibiotic Production. *Polish Journal of Microbiology*, 70(4), 421-429. <https://doi.org/10.33073/pjm-2021-040>
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H. & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9(2066). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>
- Sun, Y., Guo, G., Tian, F., Chen, H., Liu, W., Li, M. & Wang, S. (2021). Antibiotic resistance genes and bacterial community on the surfaces of five cultivars of fresh tomatoes. *Ecotoxicology*, 30, 1550-1558. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02303-3>
- Sun, J., Yuan, Y., Cai, L., Zeng, M., Li, X., Yao, F., Chen, W., Huang, Y., Shafiq, M., Xie, Q., Zhang, Q., Wong, N., Wang, Z. & Jiao, X. (2023). Metagenomic evidence for antibiotics-driven co-evolution of microbial community, resistome and mobilome in hospital sewage. *Environmental Pollution*, 327(121539). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121539>
- Tang, K. W. K., Millar, B. C. & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial resistance (AMR). *British Journal of Biomedical Science*, 80, 11387. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>

- Uluseker, C., Kaster, K. M., Thorsen, K., Basiry, D., Shobana, S., Jain, M., Kumar, G., Kommedal, R. & Pala-Ozkok, I. (2021). A review on occurrence and spread of antibiotic resistance in wastewaters and in wastewater treatment plants: mechanisms and perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 12, 717809. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.717809>
- Wang, F. & Tiedje, J. M. (2020). Antibiotic Resistance in Soil. En Manaia, C. M., Donner, E., Vaz-Moreira, I., & Hong, P. (Eds.), *Antibiotic Resistance in the Environment: A Worldwide Overview* (pp. 267-293). Springer International Publishing.
- Wang, F., Han, W., Chen, S., Dong, W., Qiao, M., Hu, C. & Liu, B. (2020). Fifteen-year application of manure and chemical fertilizers differently impacts soil ARGs and microbial community structure. *Frontiers in Microbiology*, 11, 62. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00062>
- Wang, W., Wei, X., Wu, L., Shang, X., Cheng, F., Li, B., Zhou, X. & Zhang, J. (2021). The occurrence of antibiotic resistance genes in the microbiota of yak, beef and dairy cattle characterized by a metagenomic approach. *The Journal of Antibiotics*, 74(8), 508-518. <https://doi.org/10.1038/s41429-021-00425-2>
- Wang, Y., Han, Y., Li, L., Liu, J. & Yan, X. (2022). Distribution, sources, and potential risks of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant: a review. *Environmental Pollution*, 310, 119870. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119870>
- WHO (World Health Organization), 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>
- Wind, L., Keenum, I., Gupta, S., Ray, P., Knowlton, K., Ponder, M., Hession, W. C., Pruden, A. & Krometis, L. A. (2021). Integrated metagenomic assessment of multiple pre-harvest control points on lettuce resistomes at field-scale. *Frontiers in Microbiology*, 12, 683410. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.683410>
- Wolny-Koładka, K., Malinowski, M., Pieklik, A. & Kurpaska, S. (2019). Microbiological air contamination in university premises and the evaluation of drug resistance of staphylococci occurring in the form of a bioaerosol. *Indoor and Built Environment*, 28(2), 235-246. <https://doi.org/10.1177/1420326X17748463>

- Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 589-594. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.005>
- Xie, W. Y., Shen, Q. & Zhao, F. J. (2018). Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *European Journal of Soil Science*, 69(1), 181-195. <https://doi.org/10.1111/ejss.12494>
- Xiong, W., Sun, Y. & Zeng, Z. (2018). Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(19), 18377-18384. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1852-2>
- Xu, X., Zhou, W., Xie, C., Zhu, Y., Tang, W., Zhou, X. & Xiao, H. (2022). Airborne bacterial communities in the poultry farm and their relevance with environmental factors and antibiotic resistance genes. *Science of the Total Environment*, 846, 157420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157420>
- Yang, Y. & Grossart, H. P. (2024). Antibiotic resistance genes: A global change factor. *Global Change Biology*, 30(8), e17448. <https://doi.org/10.1111/gcb.17448>
- Yi, X., Wang, M. & Zhou, Z. (2019). The potential impact of naturally produced antibiotics, environmental factors, and anthropogenic pressure on the occurrence of *erm* genes in urban soils. *Environmental Pollution*, 245, 282-289. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.009>
- Yin, Y., Zhu, D., Yang, G., Su, J. & Duan, G. (2022). Diverse antibiotic resistance genes and potential pathogens inhabit in the phyllosphere of fresh vegetables. *Science of the Total Environment*, 815, 152851. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152851>
- Zhang, R., Yang, S., An, Y., Wang, Y., Lei, Y. & Song, L. (2022a). Antibiotics and antibiotic resistance genes in landfills: A review. *Science of the Total Environment*, 806. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150647>
- Zhang, H., Ling, H., Zhou, R., Tang, J., Hua, R. & Wu, X. (2022b). Contrasting dynamics of manure-borne antibiotic resistance genes in different soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 246, 114162. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114162>

- Zhang, Y., Hao, X., Thomas, B. W., McAllister, T. A., Workentine, M., Jin, L., Shi, X. & Alexander, T. W. (2023a). Soil antibiotic resistance genes accumulate at different rates over four decades of manure application. *Journal of Hazardous Materials*, 443, 130136. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130136>
- Zhang, M., Ma, Y., Xu, H., Wang, M. & Li, L. (2023b). Surfaces of gymnastic equipment as reservoirs of microbial pathogens with potential for transmission of bacterial infection and antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1182594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1182594>
- Zhao, Y., Yang, Q. E., Zhou, X., Wang, F. H., Muurinen, J., Virta, M. P., Brandt, K. K. & Zhu, Y. G. (2021) Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(19), 2159-2196. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1777815>
- Zhou, Y., Fu, H., Yang, H., Wu, J., Chen, Z., Jiang, H., Liu, M., Liu, Q., Huang, L., Gao, J. & Chen, C. (2022). Extensive metagenomic analysis of the porcine gut resistome to identify indicators reflecting antimicrobial resistance. *Microbiome*, 10(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01241-y>
- Zhou, X. Y., Li, H., Zhang, Y. S. & Su, J. Q. (2023). City-scale distribution of airborne antibiotic resistance genes. *Science of the Total Environment*, 856, 159176. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159176>
- Zhu, Y. G., Gillings, M., Simonet, P., Stekel, D., Banwart, S. & Penuelas, J. (2018). Human dissemination of genes and microorganisms in Earth's Critical Zone. *Global Change Biology*, 24(4), 1488-1499. <https://doi.org/10.1111/gcb.14003>
- Zhu, Y. G., Zhao, Y., Zhu, D., Gillings, M., Penuelas, J., Ok, Y. S., Capon, A. & Banwart, S. (2019). Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health. *Environment International*, 131, 105059. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105059>
- Zhu, N., Jin, H., Ye, X., Liu, W., Li, D., Shah, G. M. & Zhu, Y. (2020). Fate and driving factors of antibiotic resistance genes in an integrated swine wastewater treatment system: From wastewater to soil. *Science of the Total Environment*, 721, 137654. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137654>

- Zhu, T., Chen, T., Cao, Z., Zhong, S., Wen, X., Mi, J., Ma, B., Zou, Y., Zhang, N., Liao, X., Wang, Y. & Wu, Y. (2021). Antibiotic resistance genes in layer farms and their correlation with environmental samples. *Poultry Science*, 100(12), 101485. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101485>
- 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*, 285, 117402. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>
- Zieliński, W., Hubeny, J., Buta-Hubeny, M., Rolbiecki, D., Harnisz, M., Paukszto, Ł. & Korzeniewska, E. (2022). Metagenomics analysis of probable transmission of determinants of antibiotic resistance from wastewater to the environment—A case study. *Science of the Total Environment*, 827, 154354. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154354>
- Zurek, L. & Ghosh, A. (2014). Insects represent a link between food animal farms and the urban environment for antibiotic resistance traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(12), 3562-3567. <https://doi.org/10.1128/AEM.00600-14>
- Zurfluh, K., Treier, A., Schmitt, K. & Stephan, R. (2020). Mobile fosfomycin resistance genes in Enterobacteriaceae—An increasing threat. *Microbiologyopen*, 9(12), e1135. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1135>