



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Evaluación de reservorios ambientales de partículas fágicas portadoras de genes de resistencia a antibióticos

William Ricardo Calero Cáceres

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA

FACULTAT DE BIOLOGIA

EVALUACIÓN DE RESERVORIOS AMBIENTALES DE PARTÍCULAS FÁGICAS PORTADORAS DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Tesis presentada por **William Ricardo Calero Cáceres** para optar por el título
de Doctor por la Universitat de Barcelona

Programa de doctorado EEES: Microbiología Ambiental y Biotecnología

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. M^a Teresa Muniesa Pérez en el
Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona

La directora y tutora,

Autor,

M^a Teresa Muniesa Pérez

William R. Calero Cáceres

Barcelona, octubre 2016

Beca doctoral otorgada por el Gobierno de la República del Ecuador

SENESCYT Convocatoria abierta 2012 primera fase



Secretaría de
Educación Superior,
Ciencia, Tecnología e Innovación

A mi familia,

A las víctimas del terremoto de Ecuador del 16 de abril de 2016

“Puncha tuta, llancacucpi, samacucpi, puñucucpipash yachacushpacatinami canchic”

Tayta Ushcu Maldonado -TCC

(En el día, en la noche, mientras trabajamos o descansamos, mientras soñamos, nuestro deber es siempre aprender).

“Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos”

Eduardo Galeano – El libro de los abrazos

AGRADECIMIENTOS

Recordar, del latín *re-cordaris*: volver al corazón.

He aquí, escribiendo las palabras más difíciles de esta tesis. Las mismas representan el final de una etapa que hasta hace poco no vislumbraba posible y que transcurrió como una estrella fugaz. Los 5 años que viví en Barcelona representan un gran porcentaje de mi vida; la cual está llena de historias felices, tristes, dulces y amargas... Parte de mí se queda aquí y me llevo un pedazo de esta ciudad. Quería expresar en las siguientes líneas mi agradecimiento a todas las personas que estuvieron a mi lado y que colaboraron para la ejecución de este proyecto.

En primer lugar quiero agradecer a la **Dra. Maite Muniesa**, o sólo Maite como me pidió que la llame desde nuestra primera reunión. Fue un honor y un privilegio trabajar para ti. Eres una persona ejemplar, siempre digo que en el futuro me gustaría ser como tú. Quiero agradecerte infinitamente por tu confianza, paciencia y formación, de la cual me siento satisfechísimo. Sé que no fue fácil aceptarme en tu grupo teniendo un *background* de químico, sin embargo me he esforzado mucho por estar al nivel que demandaba el puesto. Quiero que sepas que el agradecimiento hacia ti siempre me acompañará; y también que podrás contar conmigo siempre, como profesional y como amigo.

En segundo lugar, y no menos importante, quiero agradecer al **Pueblo Ecuatoriano** por financiar mis estudios de posgrado. Mi compromiso y fidelidad ha estado con ustedes por siempre. Espero entregar el talento que he recibido para colaborar en la transformación de una sociedad que en la actualidad está profundamente dolida y desunida. Un agradecimiento a la **Fundación Ramón Areces**, por financiar los materiales y reactivos utilizados durante mi tesis doctoral.

También quiero agradecer a los **Doctores Joan Jofre, Anicet Blanch y Francisco Lucena**. Jefes del grupo *Microbiologia d'aigües relacionada amb la salut*. Respetables científicos y unos verdaderos caballeros. Muchas gracias por todas sus enseñanzas, anécdotas y por su total apertura. También quiero agradecer a la **Dra. Cristina García y a la Dra. Elisenda Ballesté** por su consejos y apertura, en especial cuando trabajé con bacteriófagos de *Bacteroides* y por cedernos

amablemente su material y reactivos cuando los necesitaba. Un especial agradecimiento al **Dr. Javier Méndez**, cuyo criterio fue muy importante en el análisis estadístico del capítulo 4 de esta tesis doctoral.

Continúo con los miembros del **Lab. 10**. Fue un verdadero gusto trabajar con todos ustedes. Empezaré por el primero que conocí: **Alex**, hoy el Dr. Martínez Castillo. Una persona increíble y un excelente científico. Te agradezco por incluirme dentro del grupo, por tus bromas, por ser mi chofer cuando necesitaba muestrear y por tus consejos sobre ciclismo. Siempre recordaré los días de gordos, los bocatas del muestreo, las conversaciones de los chicos por las tardes y sobre todo: que la paella no lleva pimienta. Espero que me hayas perdonado la broma de la bici, y también espero que recuerdes que en mí tendrás un amigo a pesar del tiempo y la distancia.

Quiero continuar con **Pablo**, o como te bautizamos aquí: *Pau*. Eres una persona increíble, un verdadero caballero asturiano. Estoy en deuda ya que no pude visitar tu maravillosa tierra, la cual ya conozco en parte por los sabores de los platos y dulces que nos brindabas; sin olvidar la famosa sidra y la campaña del Real Oviedo. Espero volver a verte y sentarnos a recordar. **Maryury**, muchas gracias por tu cercanía y confianza. Compartimos muchas historias paralelas por lo que creo que nos comprendíamos muy bien. Sé que fue duro compartir poyata al lado de 3 gamberros, jejeje... Durante la escritura de la tesis eché de menos conversar contigo. Eres una mujer luchadora y constante, estoy seguro que llegarás muy lejos.

La persona que me formó, **Marta**, hoy la Dra. Colomer-Lluch. Muchas gracias por tus enseñanzas, gran parte de mis conocimientos de biología molecular te los debo a ti. A pesar de que llegué cuando estabas terminando la tesis, siempre me diste tu tiempo y tu paciencia para resolver mis dudas. Eres una de las personas más eficientes que conozco, y sin ninguna duda sé que llegarás hasta lo más alto en el área científica. Con orgullo diré que fuiste mi profe! También quería agradecer a **Marta G** y **Anna A**, hoy las Dras. Gómez y Allué. No olvidaré la bienvenida que me dieron, con el *best seller* que me hacía sentir cual sería el ambiente de un laboratorio increíble. Nunca olvidaré su buen rollo, sus sesiones Disney, sus hits del verano (donde aprendí mucha cultura española y catalana), el Línea 6.25, las pipetas de Anna (que son las mejores del 10), y sobre todo su total apertura y apoyo.

Bueno, quiero continuar con el **Lab. 9**. Nuestro laboratorio hermano. Empezaré por **Julia**, quien fue mi primera amiga española en el Máster. Guardo con mucho cariño muchos recuerdos: preparando exposiciones y trabajos del Máster, haciendo el prácticum, las salidas, los excelentes quesos y vinos de tu tierra, tu encantadora familia a la que siempre recuerdo; y sobre todo, tu amistad sincera y desinteresada. Recuerda que te espero en Ecuador a ti, a Óscar y a toda tu familia. **Laura**, o *Laurisqui*, o *Condesa Sala*. Muchas gracias por tu simpatía y ayuda. Recordaré siempre nuestras conversaciones y tus provisiones de galletas *Príncipe* que siempre me salvaban cuando necesitaba calorías urgentemente. No olvides la apuesta que hicimos en el bar de Lisboa. También quería agradecer a **Raquel**; muchas gracias por todas tus enseñanzas de bacteriología, siempre recordaré tu eficiencia y meticulosidad en el trabajo. **Miriam P**, gracias por tus consejos referentes al Llobregat y por alegrarnos las horas de trabajo con tu *playlist*. Te deseo muchos éxitos en estos años de doctorado.

También quiero agradecer al resto de miembros del departamento con quienes he compartido estos años: **Ayalke, Noemí, Tania, Eloy, Marcelle, Lucía, Carla T, Judit, Yexenia, Maite P, Elena, Susana, Nerea, Andrés, Lily, Ferrán, Ana M, Ángela, Aiora, Daniel, Lirain, Carmen, Eduard...** Gracias por sus conversaciones en los laboratorios, en el pasillo, en la hora de la comida o en la biblioteca. Les deseo todo lo mejor. Muchas gracias igualmente al **Dr. Carlos Balsalobre**, coordinador del programa de Doctorado en Microbiología Ambiental y Biotecnología, por su total apertura y disponibilidad. Muchas gracias también al equipo de la Secretaría del Departamento: **Manolo, Bea, Susana, Rosario, Mónica y Macu**. Por estar siempre dispuestos a ayudar de manera rápida y cordial a todos nuestros requerimientos.

Continuaré con las personas que me ayudaron mucho durante estos años fuera del laboratorio. Al **Dr. Pablo Bonilla**: el profesor, el director de tesis de grado, el compañero y hoy el amigo. Gracias por todos sus consejos y su gran ayuda cuando llegué a Barcelona. Recordaré siempre las visitas a los museos y su apoyo moral constante. Estoy seguro que pronto empezará a cosechar los frutos en un terreno que fue árido y que pocos locos como usted se obstinaron por sembrar.

Cecilia, Marlene, Liz y Henry, mis primeros compañeros de piso. Gracias por todo el cariño y las atenciones que me brindaron durante mi primer año, ustedes fueron en parte los responsables de mi adaptación a esta cultura tan diferente.

Creo que el hecho de haber sufrido el desarraigo los hizo muy empáticos al recibirme. Espero que pronto nos volvamos a ver.

Thank you very much **Manon, Clare and Julio**. I've enjoyed a lot the time that I stayed in your home. I learned a lot about France, UK and Brazil with you. Thank you for the *fish and chips*, the traditional *Quiche Lorraine* and *Crêpes*, and the "traditional" Brazilian pasta. And also, for all the incredible nights. I really hope that we will meet again. My home in Ecuador is your home.

Quería agradecer también a mis compatriotas que he conocido en toda Europa: **Pablo B, Iván D, Antonio, Juan Pablo, Yanara, Lourdes, David, Luis, Luis C, Andrés I, Andrés A, Juan Carlos, Jorge Luis, Pamela M, Pamela V, Fernanda, Sofía, M^a Cristina, Israel, Michelle, Darío, Tania, Nancy, Lily C, Lily L, Diego, Lorena, Miriam...** Gracias por compartir viajes, experiencias, conversaciones y una que otra cerveza. Su presencia fue muy importante para desconectar la mente del trabajo y tener un equilibrio como personas. Les deseo todo lo mejor.

También quiero agradecer a **Lily**, una excelente persona y una gran amiga. Gracias por siempre estar allí y apoyarme de manera desinteresada; por tus conversaciones, salidas y ayuda constante. Sabes que siempre podrás contar conmigo cuando lo necesites. A **Jonás**, gracias por ser mi compañero de ruta. Hemos compartido miles de kilómetros en bicicleta y muchas conversaciones; fue reconfortante encontrar a alguien con las mismas ideas políticas y valores. Te deseo todo lo mejor.

Gracias a mis amigos de Ecuador, en especial a **Vladimir, Lore, David, Alejandra, Yuri, Anita N, Fer, Erika, Vero, Berenice, Xiomara...** los cuales nunca se olvidaron de mí a pesar de los años y la distancia. Me perdí muchos eventos importantes de sus vidas, pero ahora les prometo estar presente, en especial en las bodas de los que aún estamos en el club de solteros.

Quiero agradecer también a **Ana Karina**, gracias por todos los momentos que vivimos, por tus cuidados y tu apoyo. Tu compañía fue fundamental para mí y estoy seguro que no lo habría logrado sin ti. Guardaré en el corazón los buenos tiempos, los cuales serán eternos. Te admiro como mujer y como científica, se que

llegarás muy lejos y me llenaré de orgullo cuando escuche de ti. Que Dios te bendiga y te guarde.

Ahora quiero empezar con mi familia: En primer lugar quiero agradecer a mis tíos **Patricio y Rosita**, gracias por siempre estar allí: cuidándome, aconsejándome y apoyándome. Ustedes son como unos segundos padres para mí. Les guardo un eterno agradecimiento. También a mis tíos **Rocío, Gonzalo y Carmen Elena**, gracias por su apoyo incondicional y sus afectuosos saludos a la distancia. Ya me verán visitándolos para tomar un buen café. A todos mis **primos**, muchas gracias por todo; fue agradable tenerlos a algunos de visita en Barcelona y haber tenido la oportunidad de recordar.

Otro pilar fundamental en el desarrollo de mis estudios de posgrado han sido el primo **Fernando** y su esposa **Belén**; muchas gracias por su confianza al ser mis garantes solidarios de la beca. Nunca olvidaré el gran apoyo que me han dado. También quiero agradecer a toda la familia **Rodríguez-Logroño** (ñaña Bertha, Raulito, Sory, Angelito, Jackie, Sandy) por siempre estar presentes y enviarme muchos ánimos a la distancia.

Mi padre **William**, estos 5 años lejos de ustedes han sido muy largos y difíciles... gracias por tu incondicional apoyo durante toda mi vida; a pesar de los días malos, siempre te esforzaste para que no nos falte comida en la mesa y un libro bajo el brazo. Deseo que a este logro lo consideres como tuyo. A mi madre **Sarita**, cómo hubiera deseado que me acompañes este día... A ti te debo mi carácter y mi amor por los libros, guardo la esperanza de encontrarnos nuevamente a la luz del creador. A mis hermanos **Estefanía y Santiago**, espero haber sido un ejemplo para ustedes. Me llena de orgullo ver que se han convertido en unas excelentes personas, quiero que sepan que siempre estaré allí cuando me necesiten. A la esposa de mi padre, **Casilda**; gracias por todos sus cuidados y por velar siempre de mi padre y de mis hermanos, es una persona honorable y con un gran corazón. A mi sobrino **Sebastián**, la nueva alegría de la casa; prometo no perderme más momentos de tu vida. Ustedes han sido mi principal motivación.

ABREVIATURAS

ARBs	Bacterias resistentes a antibióticos, del inglés <i>antibiotic resistance bacteria</i> .
ARGs	Genes de resistencia a antibióticos, del inglés <i>antibiotic resistance genes</i> .
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
dNTP	Deoxirribonucleótidos.
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm.
ECDC	Centro Europeo de Control de Enfermedades y Prevención, del inglés <i>European Center for Disease Control and Prevention</i> .
ESBLs	B-lactamasas de espectro extendido, del inglés <i>Extended spectrum β-lactamases</i> .
g	Fuerza centrífuga, no confundir con g: gramo.
GC	Copia Genómica, del inglés <i>Gene Copy</i> .
GTAs	Agente de transferencia genómica, del inglés <i>gene transfer agents</i> .
HGT	Transferencia Genética Horizontal, del inglés <i>Horizontal Gene Transfer</i> .
Kb	Kilobases.
kDa	Kilodaltons.
MGEs	Elementos Genéticos Móviles, del inglés <i>Mobile Genetic Elements</i> .
MIC	Concentración mínima inhibitoria, del inglés <i>minimum inhibitory concentration</i> .
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente, del inglés <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> .
P	Probabilidad estadística.
PBS	Tampón salino de fosfato, del inglés <i>Phosphate buffered saline</i> .

PCR	Reacción de cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polimerase chain reaction</i> .
PFU	Unidades formadoras de calva, del inglés <i>plaque forming unit</i> .
qPCR	Reacción de cadena de la polimerasa cuantitativa, del inglés <i>Quantitative polimerase chain reaction</i> .
rARN	Ácido ribonucleico ribosomal.
SLHs	Mataderos animales, del inglés <i>Slaughterhouse</i> .
SOMCPH	Colifagos somáticos, del inglés <i>Somatic coliphages</i> ,
spp	Especie.
TSA	Agar tripticasa de soya, del inglés <i>Trypticase soy agar</i> .
TSB	Caldo tripticasa de soya, del inglés <i>Trypticase soy broth</i> .
UFC	Unidades formadoras de colonia.
UV	Ultravioleta.
WHO	Organización Mundial de la Salud, del inglés <i>World Health Organization</i> .
WWTP	Estación depuradora de agua residual, del inglés <i>Wastewater treatment plant</i> .

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
ABREVIATURAS.....	vii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Descubrimiento de los agentes causantes de las infecciones	3
1.2. Origen y evolución de los antibióticos	3
1.3. Clasificación de los antibióticos	7
1.4. Usos de los antibióticos	11
1.5. Resistencia a antibióticos.....	12
1.6. Situación actual en Europa.....	15
1.7. Mecanismos y origen de la resistencia a antibióticos.....	17
1.7.1. Resistencia intrínseca	17
1.7.2. Resistencia adquirida.....	17
1.7.2.1. Factores de resistencia adquiridos por mutación	17
1.7.2.2. Transferencia genética horizontal (HGT).....	18
1.7.2.2.1. Elementos genéticos móviles.	18
⊙ Transposones	18
⊙ Plásmidos.....	19
⊙ Bacteriófagos	19
⊙ Agentes de transferencia genética (GTAs).....	21
⊙ Integrones	22
⊙ Elementos de integración conjugativa.....	22
⊙ Islas genómicas	23
1.7.2.2.2. Mecanismos de transferencia genética horizontal.	23
⊙ Transformación.....	24
⊙ Conjugación	24
⊙ Transducción.....	25
⊙ Transducción generalizada	25
⊙ Transducción especializada	26
1.8. Genes de resistencia a antibióticos.....	27
1.8.1. Genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos.....	28
1.8.2. Genes de resistencia a aminoglicósidos.	32

1.8.3.	Genes de resistencia a quinolonas.	33
1.8.4.	Genes de resistencia a sulfonamidas.	34
1.9.	Resistencia a Antibióticos en el medio ambiente.	35
2.	OBJETIVOS.....	39
3.	PUBLICACIONES.....	43
3.1.	Listado de publicaciones	45
3.2.	Informes de participación	47
3.3.	Informe sobre el factor de impacto	49
4.	RESULTADOS.....	51
4.1.	CAPÍTULO 1: Genes de resistencia a antibióticos en la fracción bacteriana y fágica de aguas residuales de Túnez y España como marcadores para la comparación de los patrones de resistencia a antibióticos en cada población.	53
4.2.	CAPÍTULO 2: Persistencia de los genes de resistencia a antibióticos en las fracciones de bacteria y bacteriófagos en agua residual.	71
4.3.	CAPÍTULO 3: Los lodos de depuradora representan una fuente importante de genes de resistencias a antibióticos en las fracciones bacteriana y fágica.	89
4.4.	CAPÍTULO 4: Los sedimentos de un río Mediterráneo son un reservorio de genes de resistencia a antibióticos.	107
5.	DISCUSIÓN GENERAL	147
6.	CONCLUSIONES	163
7.	BIBLIOGRAFÍA	167
8.	ANEXOS	203
	ANEXO 1. OTRAS PUBLICACIONES	205
	ANEXO 2: MEDIOS DE CULTIVO.....	209
	ANEXO 3: PROTOCOLOS USADOS EN ESTE ESTUDIO	213
	ANEXO 4: REACCIONES DE PCR Y qPCR.....	227

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Descubrimiento de los agentes causantes de las infecciones

A lo largo de la historia, el hombre ha intentado comprender las fuerzas naturales y los factores de riesgo que influyen en los patrones de morbilidad y mortalidad en la sociedad. Las epidemias por enfermedades infecciosas han sido ampliamente documentadas, ya que han representado en ciertas ocasiones, el punto de inflexión en la historia política, social y comercial del mundo (Nelson & Williams, 2007). Durante miles de años, las tesis religiosas de las enfermedades fueron las que prevalecieron en diferentes culturas. Sin embargo, existen evidencias científicas que relacionaban a las enfermedades con el ambiente y con determinados episodios.

El desarrollo del microscopio por parte de Antoine van Leeuwenhoek en el siglo XVII permitió conocer la presencia de organismos antes considerados invisibles (Porter, 1976). Este descubrimiento abrió el camino para el establecimiento de la microbiología como ciencia. Doscientos años más tarde, el químico francés Louis Pasteur demostró la ubicuidad de los microorganismos y desmontó la idea de la generación espontánea, entre otros aportes. Contemporáneo a Pasteur, el médico alemán Robert Koch estableció en base a un vasto soporte experimental, la *Teoría de las Enfermedades Infecciosas*. La detección, aislamiento e inoculación del hoy conocido como *Bacillus anthracis* permitió conocer el agente causal del carbunco (Anthrax) (Madigan et al., 2000). Estas demostraciones sirvieron de guía para los futuros investigadores acerca de las causas de ciertas enfermedades y además para el desarrollo de tratamientos.

1.2. Origen y evolución de los antibióticos

El término "*antibiótico*" fue usado por primera vez por S. Waksman en 1942, que las define como sustancias producidas por microorganismos, las cuales poseen un efecto antagonista frente al crecimiento o supervivencia de otros en grandes diluciones (Finch et al., 2010; Waksman & Woodruff, 1942). Sin embargo, la historia de los compuestos químicos usados para el tratamiento de enfermedades infecciosas se remonta al uso de metales pesados como el mercurio y bismuto, cuyas sales fueron usadas para el tratamiento de la sífilis. Se ha evidenciado su uso desde el siglo XV, sin embargo no se encuentran disponibles estudios sistemáticos que validen su eficacia frente al agente causal, *Treponema pallidum*

(Shlaes, 2010). Su uso se ha discontinuado debido a la elevada toxicidad en humanos que tienen estos metales y su tendencia acumulativa en seres vivos.

El micólogo Paul Vuillemin en 1889 propuso el término “*antibiosis*”, que denota antagonismo entre seres vivos en general. Esta propiedad sería usada como punto de partida para el desarrollo de compuestos con efecto terapéutico, una excelente revisión de Howard Florey publicada en el *British Medical Journal* detalla las investigaciones más relevantes en esta área, así como los primeros estudios sobre el uso y comercialización de extractos antibacterianos (Florey, 1945). Sin embargo, la ausencia de caracterización química dificultaba la evaluación de sus efectos locales y transitorios, dosis efectiva, toxicidad y espectro de acción.

Un colorante azo (Prontosil) sintetizado por Bayer en 1932 demostró su actividad antibacteriana en estudios *in vitro* e *in vivo* frente a infecciones estreptocócicas. Este compuesto está constituido por dos fracciones: triamino-benceno y p-amino benceno sulfonamida; esta última es la responsable de la actividad antimicrobiana del compuesto (Dougherty & Pucci, 2012). La implementación de estos compuestos provocó un descenso dramático de las defunciones por infecciones estreptocócicas hemolíticas (Jayachandran et al., 2009; Loudon, 2008) y otorgó a los químicos el punto de partida para el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos sintéticos.

Mientras la industria química se encontraba desarrollando activamente compuestos químicos sintéticos, Alexander Fleming publicó su trabajo sobre la actividad antibacteriana del extracto de *Penicillium* frente a bacterias patógenas (Dougherty & Pucci, 2012). Sin embargo, no fue hasta 1940 en donde se describió a su sustancia activa, la cual fue denominada penicilina (Chain et al., 1940). Este descubrimiento marcó una era en la prospección de microorganismos como fuente de compuestos activos con la capacidad de eliminar bacterias patógenas (Tabla 1). Es de especial relevancia el trabajo de Selman Waksman y colaboradores, los cuales centraron su investigación en los microorganismos del suelo y en la caracterización de estructuras con actividad antimicrobiana, en especial sobre el grupo *Actinomycetes* (Waksman & Woodruff, 1940).

El uso hospitalario de estos compuestos trajo consigo un inmediato descenso de la mortalidad clínica. Un ejemplo son los estudios de Leonard Colebrook en

Inglaterra (1936), en los cuales se demostró la eficacia de la sulfonamida para el tratamiento de la fiebre puerperal, que representa la principal causa de muerte materna (Colebrook & Kenny, 1936). La figura 1 representa la tasa de muerte materna en Estados Unidos e Inglaterra, en donde se aprecia un notable descenso en la incidencia de casos a partir del año de introducción de los antibióticos en el mercado.

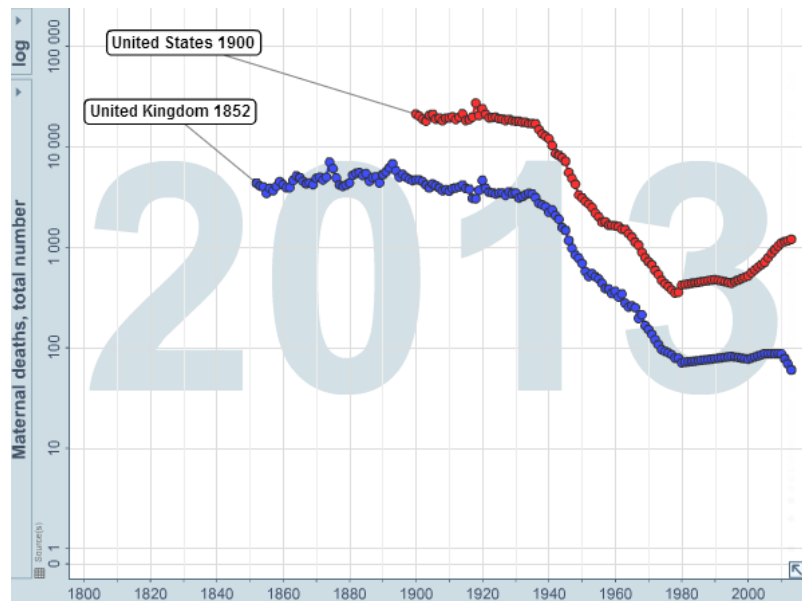


Figura 1. Número total de casos de defunción materna en función del tiempo en Estados Unidos e Inglaterra, gráfico reproducido a partir de la página web Gapminder Foundation ©, 2015.

A partir de estos descubrimientos, la industria farmacéutica promovió sendos programas de investigación y desarrollo. El período entre 1950 y 1970 es conocido como la *Edad de oro de los antimicrobianos*, en donde la mayor cantidad de clases de antibióticos fueron descubiertos (Aminov, 2010; Davies, 2006).

Tabla 1. Antibióticos de fuente natural, fecha de descubrimiento y microorganismo de origen. Tomado de Finch et al., 2010.

Nombre	Fecha de descubrimiento	Microorganismo
Penicilina	1929-40	<i>Penicillium notatum</i>
Tirotricina	1939	<i>Bacillus brevis</i>
Griseofulvina	1939	<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx
	1945	<i>Penicillium janczewski</i>
Estreptomycina	1944	<i>Streptomyces griseus</i>
Bacitracina	1945	<i>Bacillus licheniformis</i>
Cloranfenicol	1947	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Polimixina	1947	<i>Bacillus polymyxa</i>
Framitecina	1947-53	<i>Streptomyces lavendulae</i>
Clortetraciclina	1948	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Cefalosporina C, N y P	1948	<i>Cephalosporium</i> sp.
Neomicina	1949	<i>Streptomyces fradiae</i>
Oxitetraciclina	1950	<i>Streptomyces rimosus</i>
Nistanina	1950	<i>Streptomyces noursei</i>
Eritromicina	1952	<i>Streptomyces erythreus</i>
Oleandomicina	1954	<i>Streptomyces antibioticus</i>
Espiramicina	1954	<i>Streptomyces ambofaciens</i>
Novobiocina	1955	<i>Streptomyces spheroides</i>
		<i>Streptomyces niveus</i>
Cicloserina	1955	<i>Streptomyces orchideceus</i>
		<i>Streptomyces gaeryphalus</i>
Vancomicina	1956	<i>Streptomyces orientalis</i>
Rifamicina	1957	<i>Streptomyces mediterranei</i>
Kanamicina	1957	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
Nebramicina	1958	<i>Streptomyces tenebraeus</i>
Paromomicina	1959	<i>Streptomyces rimosus</i>
Ácido fusídico	1960	<i>Fusidium coccineum</i>
Espectinomicina	1961-62	<i>Streptomyces flavopersicus</i>
Lincomicina	1962	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
Gentamicina	1963	<i>Micromonospora purpurea</i>
Josamicina	1964	<i>Streptomyces naroonensis</i>
Tobramicina	1968	<i>Streptomyces tenebraeus</i>
Ribostamicina	1970	<i>Streptomyces ribosidificus</i>
Butirosina	1970	<i>Bacillus circulans</i>
Sisomicina	1970	<i>Micromonospora myosensis</i>
Rosaramicina	1972	<i>Micromonospora rosaria</i>

Cuando la prospección de antibióticos naturales a partir de bacterias se encontraba en declive, las investigaciones se centraron en la modificación química de un antibiótico pre-existente, como por ejemplo los análogos de la penicilina, ampicilina, tetraciclina, cefalosporina, entre otros. Estos nuevos antibióticos semi-sintéticos demostraron ser más potentes, menos susceptibles a

la inactivación enzimática, o bien proveían mayor adherencia a las bacterias. Debido a su eficacia muchos de ellos son todavía usados (Kalant, 1965; Kumazawa & Yagisawa, 2002). Un excelente ejemplo de este grupo son las fluoroquinolonas, introducidas al mercado en la década de los 80, las cuales fueron desarrolladas a partir del ácido nalidíxico. Las quinolonas representaron el punto de partida en la investigación de nuevos antimicrobianos durante 20 años más (Emmerson & Jones, 2003; Fernandes, 2006).

A inicios de la década de los 90, la falta de éxito en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos, junto con los avances en química combinatoria de alto desempeño, generaron grandes librerías de compuestos sintéticos que representaron los puntos de partida para el diseño de nuevos compuestos sintéticos antibacterianos (Walsh, 2003; Wessjohann, 2000). Desafortunadamente, estos esfuerzos por desarrollar nuevos antibióticos, en la mayoría de los casos, fracasaron debido a la incompatibilidad estructural de estos compuestos para penetrar las células bacterianas y al modesto retorno de la inversión de los industriales farmacéuticos (Lewis, 2013).

En la actualidad, las investigaciones destinadas a la búsqueda de nuevas clases de antibióticos se encuentran focalizadas en la detección de proteínas bacterianas y en la identificación de inhibidores enzimáticos. Para este fin, se cuenta con tecnologías de última generación, tales como secuenciación genómica, clonación, librerías combinatorias y cribado de alto rendimiento (Fernandes, 2006; O'Connell et al., 2013).

1.3. Clasificación de los antibióticos

En el apartado anterior se describió a los antibióticos de acuerdo a su origen, el cual puede ser natural o sintético. Sin embargo existen otros sistemas de clasificación, basados en la estructura química, espectro de actividad o por medio del mecanismo de acción (Finch et al., 2010; Perlman, 1975; Walsh, 2003). La figura 2 representa los mecanismos de acción de diferentes clases de antibióticos en la célula bacteriana. La figura 3 muestra los grupos más característicos de antibióticos.

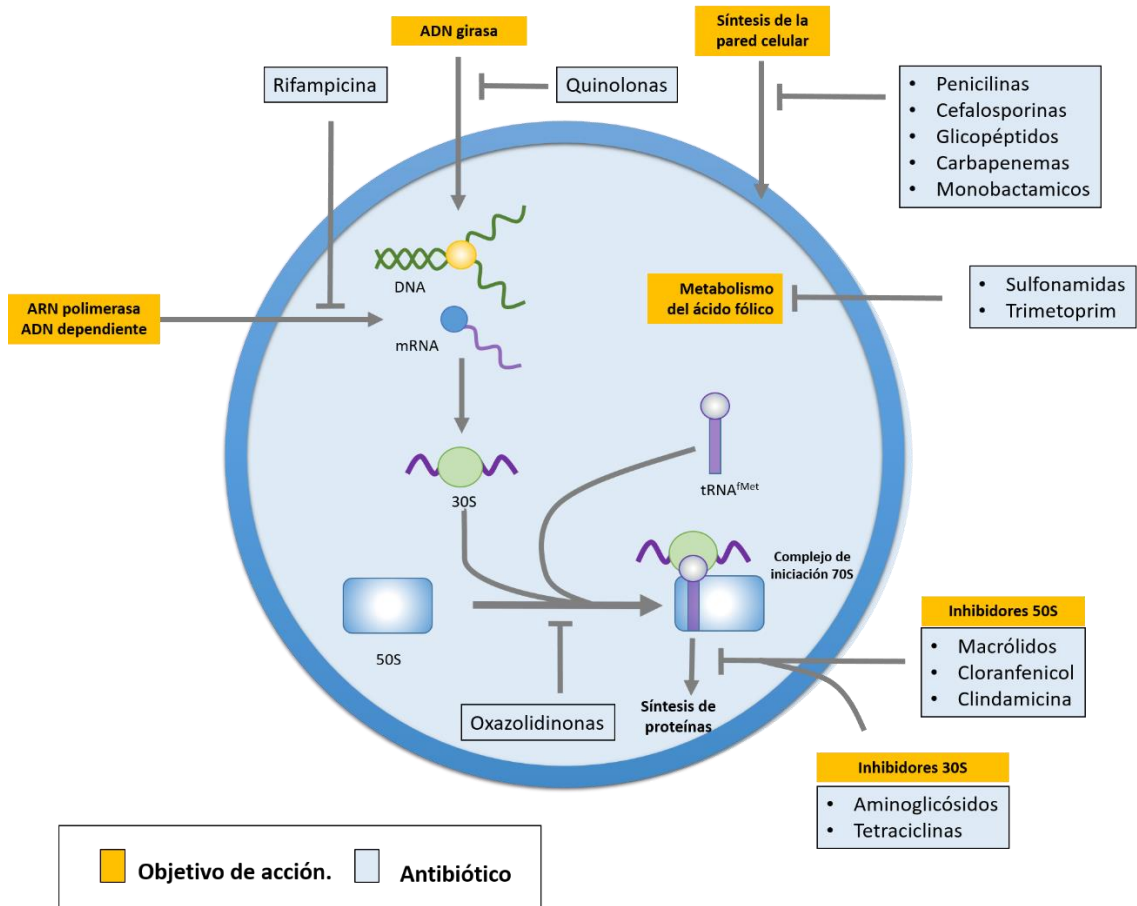
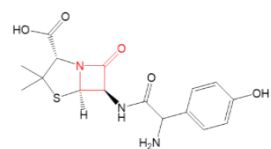
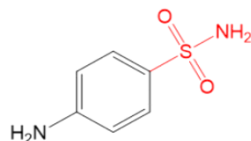


Figura 2. Objetivos de los compuestos antimicrobianos. Se detallan los cinco principales objetivos de los antimicrobianos en bacterias: Síntesis de la pared celular, ADN girasa, enzimas metabólicas, ARN polimerasa ADN dependiente y síntesis proteica. La figura muestra a los compuestos antimicrobianos específicos de cada objetivo. *Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nat. Rev. Drug Discov (Coates et al., 2002), copyright 2002. License number: 3824701259893.



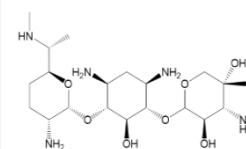
β-LACTÁMICOS

Penicilinas
 Penicilina, ampicilina*,
 oxacilina.
Cefalosporinas
 Cefazolina, cefotixina
 ceftriaxona.
Carbapenems
 Imipenem.



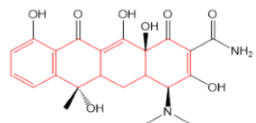
SULFONAMIDAS

Sulfanilamida (Prontosil)*
 Sulfadiazina.
 Sulfadimina.
 Sulfadoxina.
 Sulfametoxazol.
 Sulfisoxazol.



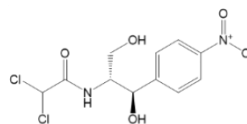
AMINOGLICÓSIDOS

Gentamicina*
 Netilmicina.
 Tobramicina.
 Estreptomicina.
 Kanamicina.
 Isepamicina.



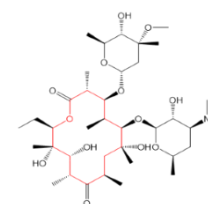
TETRACICLINAS

Tetraciclina*.
 Doxiciclina.
 Clortetraciclina.
 Demeclociclina.
 Metaciclina.
 Lymeciclina.
 Oxitetraciclina.



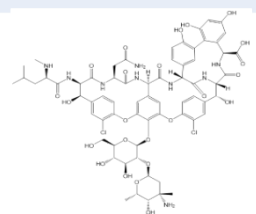
FENICOLES

Cloranfenicol*.
 Tianfenicol.



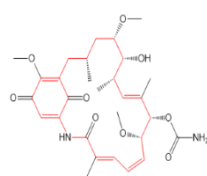
MACRÓLIDOS

Eritromicina*.
 Claritromicina.
 Azitromicina.
 Diritromicina.
 Roxitromicina.
 Espiramicina.
 Telitromicina.



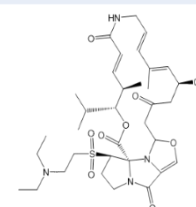
GLICOPÉPTIDOS

Vancomicina*.
 Teicoplanina.



RIFAMICINAS

Geldanamicina*.
 Rifampicina..
 Naftomicina.
 Rifabutina.
 Rifamida.
 Rifamixina.



ESTREPTOGRAMINAS

Quinupristina.
 Dalfopristina*
 Pristamicina..

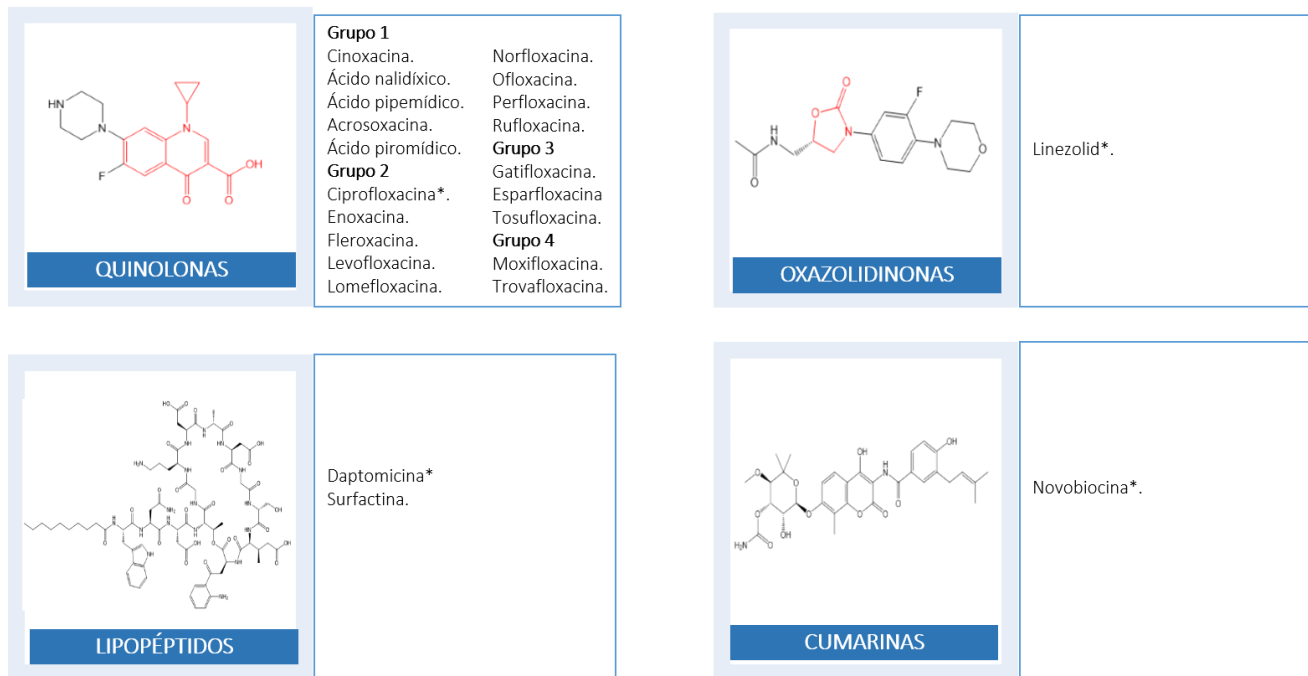


Figura 3. Clasificación de los antibióticos de acuerdo a su clase. En rojo se muestra la estructura base de algunas clases. (Finch et al., 2010; Kohanski et al., 2010).

1.4. Usos de los antibióticos

El descubrimiento y desarrollo de los antibióticos representó uno de los más grandes logros en la medicina humana. El uso de estos compuestos ha mejorado el control de las enfermedades infecciosas alrededor del mundo, transformó a la cirugía y ha potenciado el efecto de muchos tratamientos, haciéndolos más efectivos y seguros. La versatilidad y eficiencia para el control de microorganismos hizo que fueran rápidamente implementados en el sector veterinario y agrícola; ya que aparte de su efecto para el tratamiento de enfermedades, han demostrado su aplicabilidad como promotor de crecimiento y en la mejora de la eficiencia alimenticia animal (Sarmah, Meyer, & Boxall, 2006). Desde su introducción, millones de toneladas métricas de antibióticos han sido producidas. Desafortunadamente, la creciente dependencia humana por estas drogas ha tenido considerables consecuencias medioambientales.

En Europa, el uso de antibióticos para uso humano representa menos de la tercera parte del total del consumo de antimicrobianos (ECDC, EFSA, & EMA, 2015). Las concentraciones de antibióticos usadas con fines no medicinales se encuentran por debajo de la dosis terapéutica y corresponden aproximadamente el 80-90% del total de antibióticos usados en el sector agrícola (Hollis & Ahmed, 2014). El último reporte de la Agencia Europea de Medicamentos señaló que en Europa se consumieron en el año 2013 alrededor de 8,126.28 toneladas de compuestos antimicrobianos para uso animal, de los cuales España consume el 27% del total, de los cuales más del 60% corresponden a penicilinas y tetraciclinas (European Medicines Agency, 2013).

El uso, sobreuso y persistencia de los antibióticos a nivel mundial ha originado un impacto ambiental severo, el cual durante los últimos años ha recibido un creciente interés científico. Las investigaciones sobre la diseminación de compuestos farmacéuticos en el medio ambiente abarcan el análisis de los compuestos, así como estudios de laboratorio y de campo relacionados a sus efectos (Halling-Sorensen et al., 1998; Kreuzig & Höltge, 2005; Kümmerer, 2009c).

Los principales focos de diseminación son las aguas residuales humanas y animales. De acuerdo a estudios metabólicos, entre el 40 % y el 90 % de la cantidad de la mayoría de antibióticos son excretados en su estructura parental (Hirsch et al., 1999). Adicionalmente, estos compuestos son eliminados de

manera parcial durante el tratamiento de aguas residuales, y por consiguiente, son liberados al medio ambiente (Da Silva et al., 2006; Figueira et al., 2011; Kümmerer, 2009a). El panorama resulta más crítico en países de baja renta, los cuales en su mayoría carecen de sistemas de tratamiento de residuos líquidos (Qadir et al., 2010).

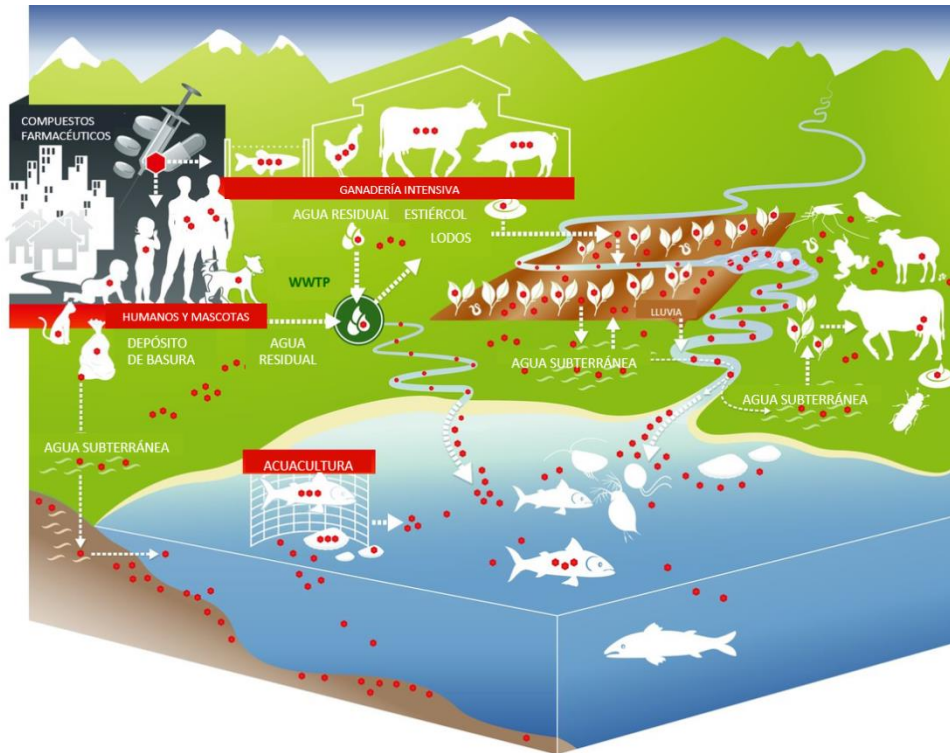


Figura 4. Diseminación de antibióticos en el medio ambiente. Los agentes antimicrobianos de uso humano y animal son esparcidos en el ecosistema por medio de diferentes vías. Los residuos de antibióticos están simbólicamente representados con puntos rojos. *Adapted by permission from John Wiley and Sons Ltd: *EMBO Reports* (Berkner et al., 2014), copyright 2014. License number 3861360383235.

1.5. Resistencia a antibióticos

En su discurso de aceptación del premio Nobel en 1945, Alexander Fleming mencionó “La penicilina puede representar un peligro en dosis subletales. No es difícil obtener microorganismos resistentes a la penicilina en el laboratorio al exponerlos a concentraciones no suficientes para eliminarlos”. Además, usando analogías pudo retratar un panorama futuro en el cual los cultivos persistentes llegarían a imponerse en caso de un uso negligente de estos compuestos (Fleming, 1945). Lastimosamente, en la actualidad esta visión es una realidad y representa el objeto de estudio multidisciplinar con resultados todavía inciertos.

La resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos es un fenómeno natural, el cual se ha visto acelerado debido a la presión selectiva que ejercen las ingentes cantidades de compuestos antimicrobianos presentes en el medio ambiente. Esta presión selectiva ha activado un fenómeno evolutivo antiguo y ejemplifica el Darwinismo por excelencia (Ciba Foundation Symposium, 1997). Desafortunadamente, este ritmo evolutivo avanza de manera descontrolada, a tal punto que la Organización Mundial de la Salud ha alertado sobre el peligro latente de retornar a la era pre-antibiótica, donde las infecciones simples no responderían a los tratamientos, y las intervenciones de cirugía rutinarias podrían comprometer en mayor grado la supervivencia (World Health Organization, 2011).

La figura 5 muestra de manera cronológica la relación entre la introducción comercial de un nuevo antibiótico y la identificación de su resistencia (CDC, 2016). En el gráfico se puede visualizar una tendencia cada vez más perpendicular en la aparición de nuevas resistencias. Los aislamientos de bacterias resistentes inicialmente ocurrieron en hospitales. Por ejemplo, la bacteria penicilina-resistente *Staphylococcus aureus* apareció tan pronto la penicilina fue introducida en los hospitales de Londres en la década de 1940 (Levy & Marshall, 2004; Levy, 1998). Los primeros aislamientos de bacterias entéricas multirresistentes fueron detectados a finales de la década de 1950 (Levy, 2001; Watanabe, 1963). Durante los siguientes años, el incremento del uso de compuestos antimicrobianos, catalizado con el escaso control en la prescripción y uso de los mismos, provocó un escalado en las frecuencias de resistencia de diferentes bacterias, originando uno de los mayores problemas de salud pública del siglo 21 (World Health Organization, 2015).

La hipótesis de la ventana de selección de mutantes establece que, para cada combinación antibiótico-patógeno, existe una concentración del antimicrobiano en la cual se produce una amplificación selectiva de mutantes resistentes a antibióticos. Dicha concentración se encuentra por debajo de la concentración mínima inhibitoria (MIC, del inglés *minimum inhibitory concentration*) (Drlica & Zhao, 2007). Esta hipótesis ha sido confirmada en recientes investigaciones, sugiriendo que, las concentraciones de antibióticos de muchos ambientes son trascendentales en la generación y mantenimiento de las poblaciones bacterianas resistentes (Gullberg, 2014; Gullberg et al., 2011; Sandegren, 2014).

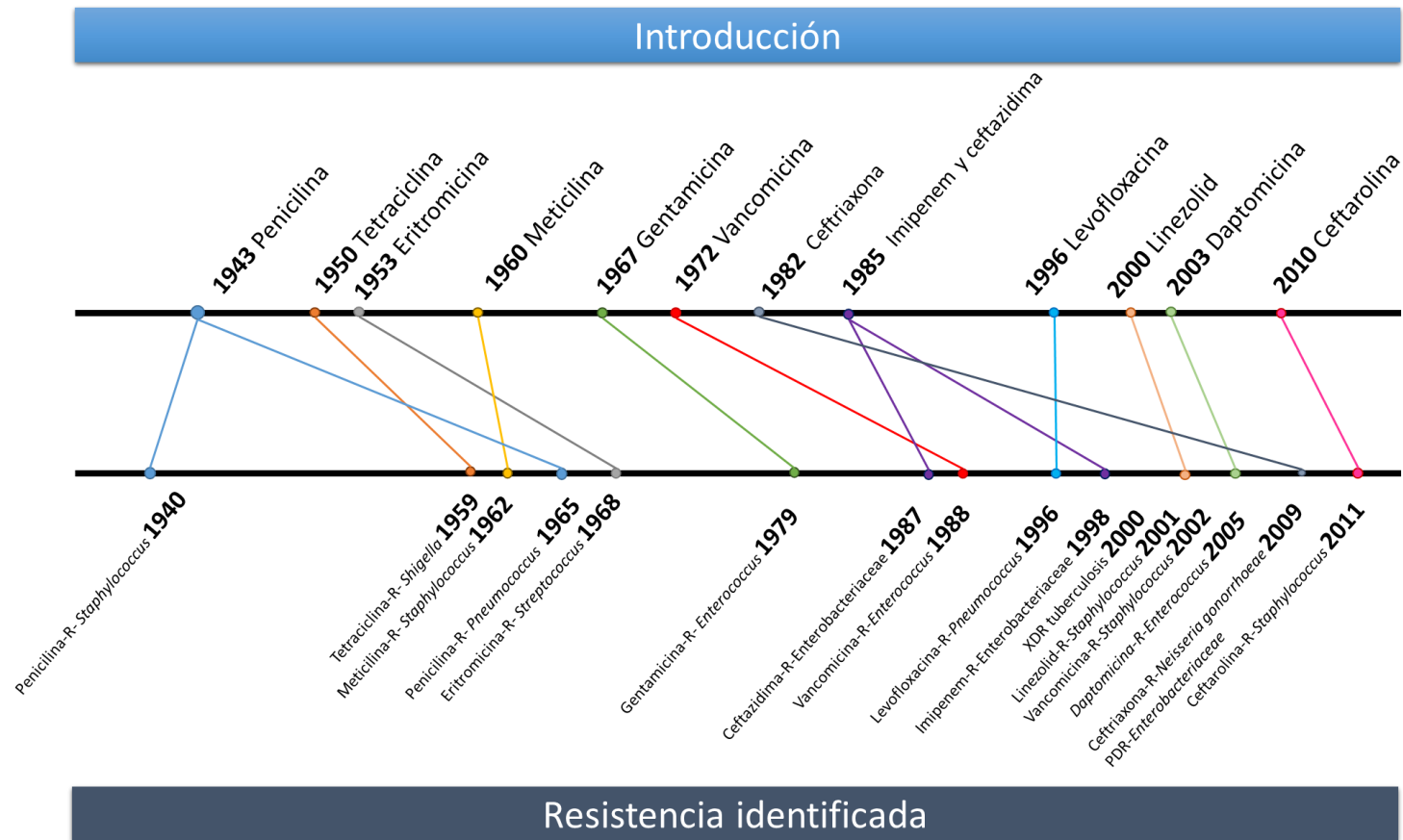


Figura 5. Línea del tiempo de la introducción de ciertos antibióticos y la identificación de su resistencia. Adaptado de CDC, 2016.

1.6. Situación actual en Europa

Anualmente en Europa, alrededor de 25.000 personas mueren debido a infecciones por bacterias multirresistentes. Este problema genera además un coste adicional para los sistemas de salud y una consiguiente pérdida de productividad, con pérdidas aproximadas de 1,5 billones de euros anuales (ECDC/EMEA, 2009).

El Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) han priorizado el monitoreo de la frecuencia de las infecciones por bacterias multirresistentes en la Unión Europea, haciendo énfasis en las siguientes bacterias:

- *S. aureus*, metilina resistente (MRSA).
- *S. aureus*, vancomicina intermedio resistente y vancomicina resistente (VISA/VRSA).
- *Enterococcus spp.* (Ej. *Enterococcus faecium*), vancomicina resistente (VRE).
- *Streptococcus pneumoniae*, penicilina resistente (PRSP).
- *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), cefalosporina de tercera generación resistente.
- *Enterobacteriaceae* (Ej: *K. pneumoniae*), carbapenem resistente.
- Bacterias Gram-negativas no fermentadoras (Ej: *Pseudomonas aeruginosa*), carbapenem resistente.

Estos microorganismos han sido seleccionados ya que están frecuentemente asociados a septicemias y debido a que representan un indicador adecuado de multirresistencias (ECDC/EMA, 2009).

Durante los últimos años, los porcentajes de *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación (Figura 6a), fluoroquinolonas (Figura 6b) y aminoglicósidos, así como la resistencia combinada de los tres grupos; ha incrementado significativamente en toda la región europea (ECDC et al., 2015). En contraste, la persistencia de *S. aureus* Metilina-resistente (MRSA) ha disminuido significativamente en muchos países de la Unión Europea (Figura 6c), en especial en aquellos con altas tasas de positivos; este fenómeno puede ser relacionado a la implementación de medidas preventivas focalizadas en la detección, análisis, precaución de contacto y prescripción (Köck et al., 2010).

En general, la actual situación con respecto a la resistencia a antibióticos en Europa muestra grandes variaciones dependiendo del microorganismo, grupo antimicrobiano y región geográfica. Para ciertas combinaciones se observa un gradiente norte/sur y oeste/este, con una clara tendencia a encontrar un menor porcentaje de positivos en el norte del continente (One Health ministerial conference, 2016).

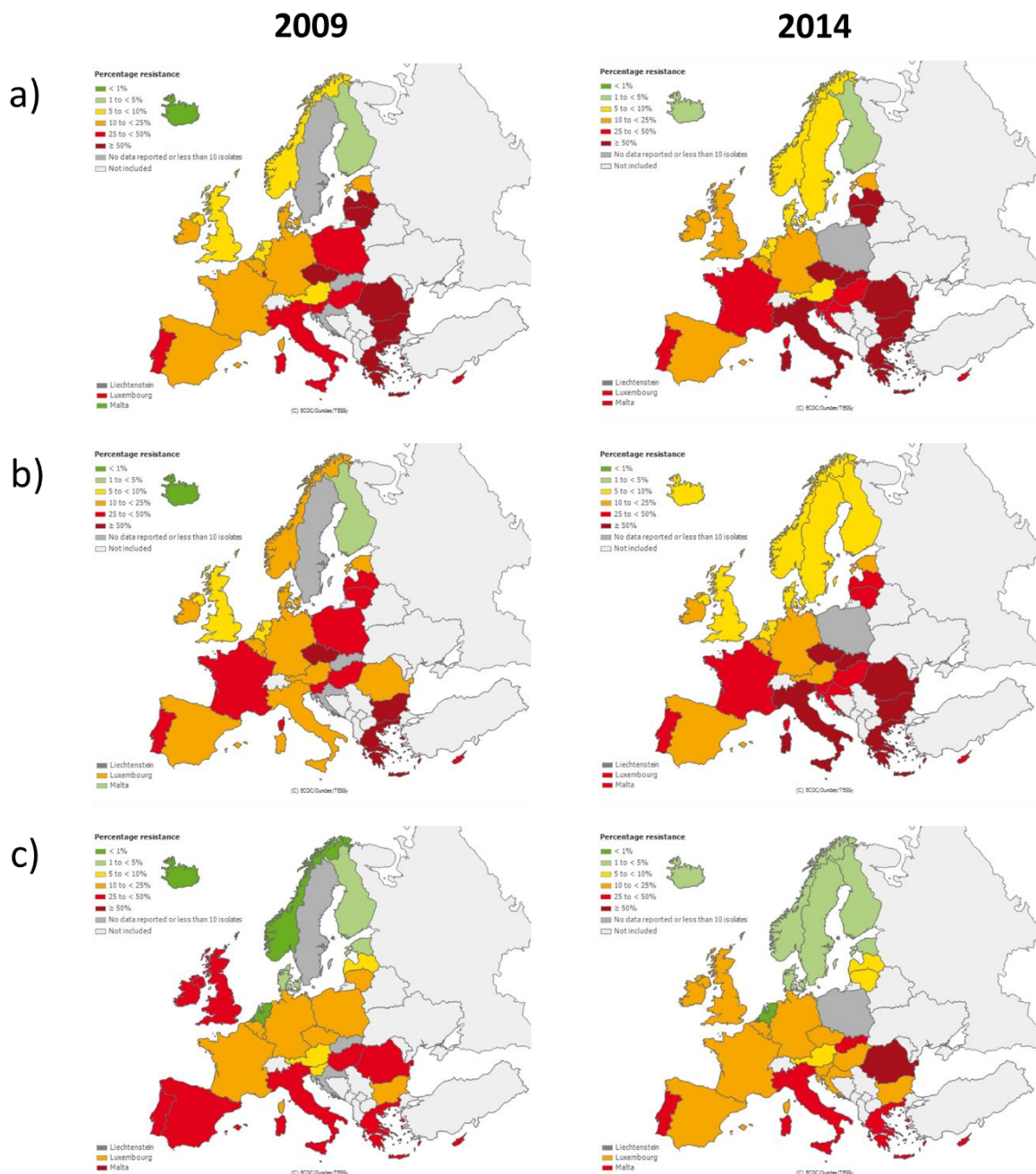


Figura 6. Prevalencia de aislamientos resistentes por país durante 2009 y 2014. a) *K. pneumoniae* cefalosporina 3ra generación resistente(R+I). b) *K. pneumoniae* fluoroquinolona resistente (R+I). c) *S. aureus* metilina resistente (MRSA). Adaptado de ECDC, 2016.

1.7. Mecanismos y origen de la resistencia a antibióticos

1.7.1. Resistencia intrínseca

Como resistencia intrínseca se conoce a la capacidad innata de las especies bacterianas para resistir a un determinado agente antimicrobiano a través de sus características estructurales o funcionales (Cox & Wright, 2013). Entre los mecanismos intrínsecos de resistencia se encuentran las características de la membrana citoplasmática, la cual regula la difusión molecular. Las bacterias Gram positivas constan de una membrana citoplasmática cuya estructura ofrece una pequeña resistencia a la difusión de pequeñas moléculas en un rango entre 30 y 57 kDa, como por ejemplo los antibióticos (Madigan et al., 2000; Scherrer & Gerhardt, 1971). En cambio las bacterias Gram negativas poseen una segunda membrana fuera de la capa de peptidoglicano, la cual otorga una resistencia intrínseca mayor y por ende, una menor permeabilidad frente a moléculas hidrófobas (Vaara et al., 1990).

Otro mecanismo intrínseco son las bombas de flujo, las cuales modulan la actividad de un gran número de sustancias, entre las que se encuentran los antibióticos (Van-Bambeke et al., 2000). Este sistema puede bombear los antibióticos presentes en el citoplasma hacia fuera de la célula por medio de un sistema complejo de regulación, basado en un sistema de extrusión catalizado por proteínas (Borges-Walmsley et al., 2003).

1.7.2. Resistencia adquirida

La resistencia a antibióticos adquirida ocurre cuando existe un cambio en el ADN bacteriano que produce la expresión de un nuevo rasgo fenotípico (McManus, 1997). Los mecanismos que otorgan resistencia a antibióticos pueden ser obtenidos por dos vías: por mutaciones o por adquisición de genes de resistencia por medio de transferencia genética horizontal (del inglés *horizontal gene transfer* o HGT).

1.7.2.1. Factores de resistencia adquiridos por mutación

Las mutaciones son procesos espontáneos que pueden ocurrir independientemente de la presencia de antibióticos. Una bacteria mutante trae

consigo una ventaja frente a las células susceptibles las cuales son rápidamente eliminadas por acción del antibiótico, manteniendo una subpoblación resistente (Hawkey, 1998). Las mutaciones pueden causar resistencia por medio de los siguientes mecanismos (Tenover, 2006):

- Alteración (modificación o eliminación) de la proteína a la cual el agente antibacteriano se fija. .
- Regulando la producción de enzimas que inactivan el agente antimicrobiano.
- Regulando o modificando las proteínas de membrana externa requeridas por los antibióticos para introducirse dentro de la célula.
- Regulando las bombas de flujo que expelen los antibióticos fuera de la célula.

La resistencia desarrollada por medio de mutación cromosómica y selección se transfiere de una célula a su descendencia y forma parte de los mecanismos de **transferencia genética vertical**.

1.7.2.2. Transferencia genética horizontal (HGT).

La HGT es un mecanismo de intercambio genético entre linajes, sean distantes o cercanos. (Gogarten et al., 2009; Zhaxybayeva & Doolittle, 2011). Constituye una de las principales vías de desarrollo evolutivo de todas las especies. Se estima que entre el 0.05-80% de genes de los genomas bacterianos y de arqueas han sido involucrados en procesos de HGT (Lukjancenko et al., 2010; Nakamura et al., 2004; Zhaxybayeva et al., 2006). Los agentes responsables de la HGT son los **elementos genéticos móviles** (en inglés *Mobile genetic elements* o MGEs) (Frost et al., 2005).

1.7.2.2.1. Elementos genéticos móviles.

- **Transposones**

Los transposones son elementos genéticos móviles, con la capacidad de reubicar su posición dentro del genoma, están ampliamente difundidos en la mayoría de organismos, incluyendo a los procariontes y eucariontes (Skipper et al., 2013). Contribuyen a la expresión modular de genes, a la plasticidad genómica y a la evolución (Hayes, 2003). A diferencia de otros sistemas de intercambio genético,

los transposones no requieren extensas áreas de homología entre su secuencia y el punto de destino (Prescott, Harley, & Klein, 2004). Existen transposones de ADN, los cuales codifican a la enzima transposasa, la cual es necesaria para la escisión e inserción. Además, no usan intermediarios de ARN. Los retrotransposones, que se movilizan por medio de ARN intermediarios, y que dentro de su secuencia no codifican transposasas. Por último también encontramos secuencias de inserción (SI), que son secuencias cortas de ADN que no portan genes accesorios y únicamente codifican proteínas que son parte de la transposición. (Pray, 2008; Siefert, 2009).

- **Plásmidos**

Los plásmidos son una colección de módulos genéticos funcionales, los cuales coexisten de manera independiente con respecto a los cromosomas de la célula. Representan los principales transportadores de genes entre bacterias (Jackson et al., 2011). Tienen sus propios orígenes de replicación, son auto-replicativos, presentan estabilidad entre generaciones y usualmente no contienen genes esenciales para las funciones celulares. Los plásmidos pueden portar genes que otorgan una ventaja competitiva al huésped frente a sus competidores (Frost et al., 2005; Prescott et al., 2004). Entre la variedad de genes que transportan, se encuentran genes de resistencia a antibióticos (ARGs, del inglés *antibiotic resistance genes*), genes de resistencia a metales pesados, genes de enzimas que favorecen la capacidad nutricional de la célula, determinantes de virulencia, entre otros (Bennett, 2008).

- **Bacteriófagos**

También denominados fagos, son virus que infectan bacterias. Son las entidades más abundantes de la biósfera, se estima que su concentración global es de 10^{30} - 10^{32} partículas (Sulakvelidze, 2011). Su estructura consta de una cápside proteica que rodea al material genético, el cual puede ser ARN o ADN, de cadena simple o doble (Gogarten et al., 2009). Ecológicamente, representan un grupo muy versátil debido a su capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales extremas (Marks & Sharp, 2000).

Con la finalidad de comprender su rol como vectores de HGT, se detallará brevemente los mecanismos de los bacteriófagos, quienes pueden presentar dos ciclos biológicos durante su proceso de infección. En el primero, denominado ciclo lítico, los fagos líticos (o virulentos), se adhieren a la superficie bacteriana

por medio de un receptor específico, inyectan su ácido nucleico, usando la maquinaria celular bacteriana se multiplican en el citoplasma, y finalmente liberan nuevos fagos por medio de la lisis de la bacteria (Figura 7 a) (Prescott et al., 2004). En el segundo, denominado ciclo lisogénico, los fagos lisogénicos (o atemperados) pueden multiplicar por medio del ciclo lítico, o bien permanecer en un estado latente dentro del cromosoma bacteriano, replicándose conjuntamente con éste. cuando se encuentran integrados en el genoma bacteriano se les considera profagos, y la bacterias que los portan son denominadas lisógenas (Figura 7 b) (Madigan et al., 2000).

Los profagos pueden mantenerse en este estado durante largos períodos. Este estado puede ser interrumpido por condiciones fisicoquímicas adversas, como por ejemplo: desecación, radiaciones, compuestos químicos, etc. Este evento es conocido como inducción, en el cual se cataliza la producción de proteasas; las cuales destruyen a la proteína represora del ciclo lisogénico y favorecen la activación de los genes que inducen la lisis y la expresión de los genes fágicos (Mayer, 2016).

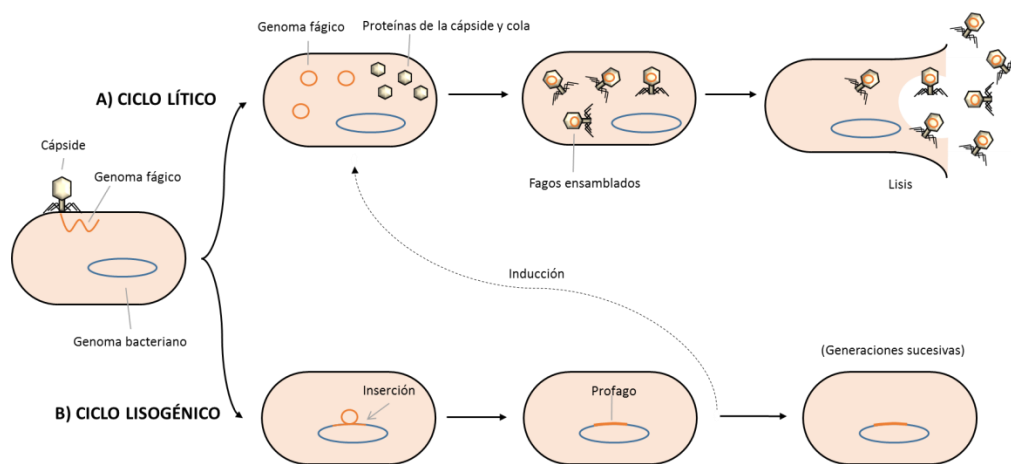


Figura 7. Ciclos de replicación de los bacteriófagos. Ciclo lítico (a) y lisogénico (b). Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Microbiology (Feiner et al., 2015), copyright 2015. License number 3863100130725.

- **Agentes de transferencia genética (GTAs)**

Los agentes de transferencia genética (GTAs: del inglés *gene transfer agents*) son entidades que guardan similitud con los bacteriófagos pero que no pueden ser considerados como tales. Los GTAs son cápsides de fagos cuyos genes están localizados en el cromosoma de la bacteria. Estos genes generan cápsides que portan una sección aleatoria del genoma de la célula huésped. Sin embargo no suelen transportar los propios genes que codifican GTAs (Lang & Beatty, 2007). Los GTAs están constitutivamente presentes en el cromosoma de algunos géneros bacterianos y no se requiere una infección previa por fagos virulentos para formarlos, diferenciándose de los fagos que realizan transducción generalizada.

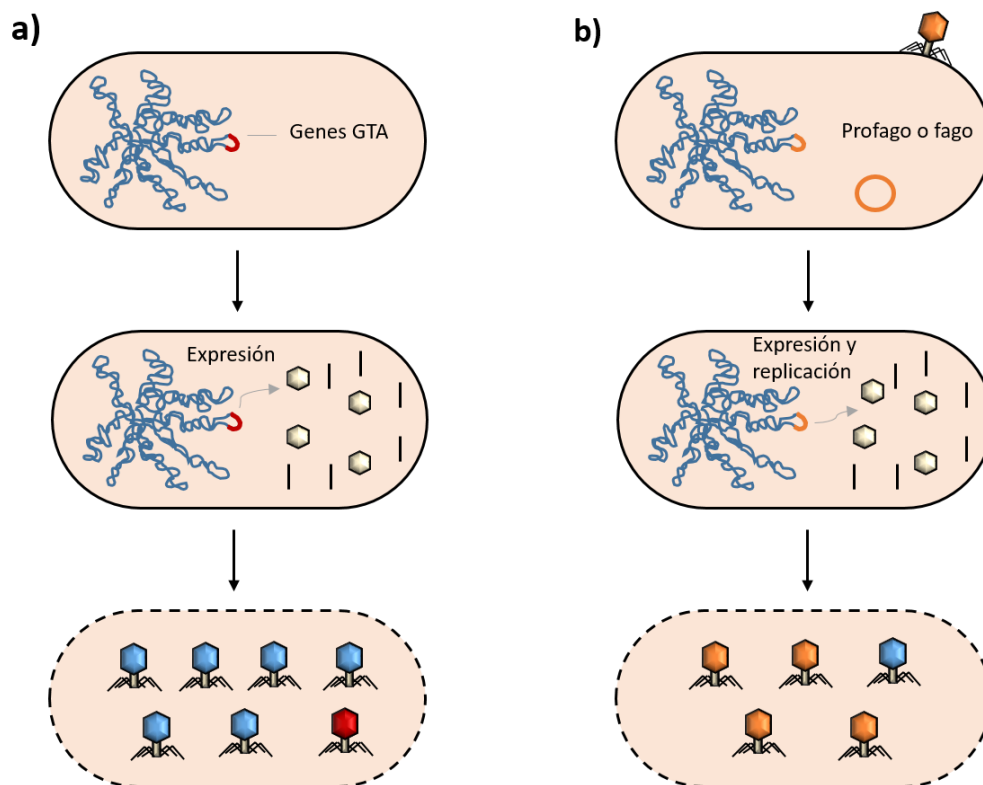


Figura 8. Comparación entre la producción de un agente de transferencia genética y un fago transductante. (a) Los genes que codifican las partículas de GTA están ubicados en el cromosoma, y su expresión implica la producción de partículas de GTA (en negro). Segmentos aleatorios del huésped son empaquetados dentro de las partículas de GTA (partículas azules), de manera ocasional una partícula contiene genes GTA (partícula roja). (b) Durante la expresión de genes de fagos transductantes, fagos o profagos; se producen partículas fágicas (negro) y la replicación del genoma fágico. Posteriormente el genoma fágico es empaquetado (partículas naranjas), con un empaquetado ocasional de ADN no fágico (partícula azul).

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Reviews Microbiology* (Lang, Zhaxybayeva, & Beatty, 2012) copyright 2012. License Number: 3864680146179.

Una vez formados y liberados, los GTAs son capaces de movilizar el ADN de una célula donadora a la receptora ya que la cápside del GTA actúa igual que la cápside de un fago. En investigaciones recientes se ha descrito la importancia de la transferencia de genes por GTAs en bacterias del medio marino (McDaniel et al., 2010). Sin embargo, no hay datos sobre GTAs en otros grupos bacterianos, se desconocen las proporciones de GTAs en el medio ambiente así como los factores que influyen en la transducción por GTAs (McDaniel et al., 2012).

- **Integrones**

Los integrones son elementos genéticos habitualmente asociados a genomas bacterianos, los cuales permiten una eficiente adquisición y expresión de genes externos (Gillings, 2014). Su mecanismo incluye componentes de recombinación específica que les permiten capturar y movilizar genes, en especial determinantes de resistencia a antibióticos (Van Hoek et al., 2011).

Los integrones están compuestos por: (1) El gen de integrasa (*intI*), la cual es una recombinasa específica y (2) un punto de recombinación adyacente (*attI*). La recombinasa facilita la integración y escisión de casetes de genes específicos dentro del *attI*. (Jackson et al., 2011). Los integrones pueden adquirir nuevos genes desde otros casetes de genes, los cuales pueden ser intercambiados entre integrones (Collis & Hall, 1995). Esta estructura hace de los integrones una plataforma muy versátil para la integración específica de nuevo material genético, sin ruptura del genoma del recipiente (Boucher et al., 2007).

- **Elementos de integración conjugativa**

Los elementos de integración conjugativa (ICEs: del inglés *integrative conjugative elements*), son elementos genéticos móviles con capacidad de transferencia autónoma (Zakharova & Viktorov, 2015). Los ICEs son generalmente localizados en el cromosoma del huésped, y contienen los genes necesarios para su conjugación así como sistemas regulatorios que controlan su escisión desde el cromosoma y su posterior transferencia conjugativa (Burrus & Waldor, 2004). Bajo determinadas condiciones, se lleva a cabo la expresión de los genes ICE, provocando la escisión de los ICE desde el cromosoma del huésped. Las células tienen la capacidad de transferir los ICEs u otro material genético por medio del sistema de conjugación a otro huésped (Johnson & Grossman, 2015).

Los ICEs tienen una estructura modular, con genes acoplados de acuerdo al proceso en el que participan. Todos los ICEs contienen tres módulos que catalizan su integración/escisión, conjugación y regulación (Wozniak & Waldor,

2010). Muchos ICEs portan otros genes, los cuales son los que otorgan el beneficio a sus huéspedes. Entre los fenotipos conferidos por estos genes se encuentra la resistencia a antibióticos (Johnson & Grossman, 2015).

- **Islas genómicas**

Las islas genómicas (GIs: del inglés *genomic islands*) son segmentos más o menos largos de ADN. Tienen la capacidad de integrar, escindir y transferirse a un nuevo huésped por medio de transformación, conjugación o transducción (Juhas et al., 2009).

Las GIs contienen un módulo de recombinación, que consiste en una integrasa de la familia de las tirosina recombinasas, un punto de recombinación (*attL* y *attR*), y en muchos casos, un factor de recombinación direccional (Boyd et al., 2009). Las GIs portan genes que codifican funciones metabólicas, de degradación, de resistencia (antibióticos o metales pesados) así como de patogenicidad (Dobrindt et al., 2004a).

1.7.2.2.2. Mecanismos de HGT.

La HGT se lleva a cabo por medio de los mecanismos de transformación (por incorporación de ADN extracelular), conjugación (mediada por plásmidos conjugativos) y transducción (mediada por bacteriófagos), (Brown-Jaque et.al, 2015; Gogarten et.al, 2009; Lupu et.al, 2012). (Ver Figura 9).

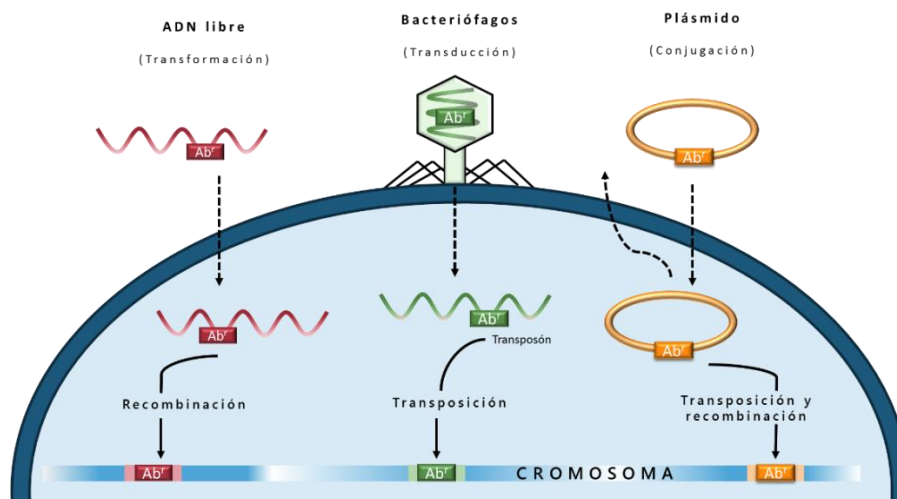


Figura 9. Adquisición de resistencia a antibióticos por transferencia genética horizontal. La bacteria puede adquirir material genético externo incorporando segmentos de ADN libre dentro de su cromosoma (transformación), o catalizado por medio de bacteriófagos (transducción) o por medio de plásmidos y transposones (conjugación)*. *Adapted by permission from Elsevier Ltd: *Cell* (Aleksun & Levy, 2007) copyright 2007. License number 3838241168775.

- **Transformación**

La transformación implica la incorporación de ADN en células competentes, la cual consta de los siguientes pasos (Mazodier & Davies, 1991):

- 1) Liberación o apareamiento del ADN en el medio ambiente.
- 2) Inducción del estado competente en la célula huésped.
- 3) Interacción de las células competentes y el ADN.
- 4) Entrada del ADN y procesamiento dentro de la célula.
- 5) Integración funcional y expresión del ADN foráneo dentro de la célula.

El estado de competencia de la célula puede producirse de forma natural o ser inducido artificialmente en el laboratorio.

- **Conjugación**

El proceso de conjugación bacteriana implica la transferencia de ADN por medio de contacto directo entre dos células. Este proceso se lleva a cabo no sólo entre especies bacterianas relacionadas, sino entre diferentes géneros e incluso entre organismos Gram positivos y negativos (Dreiseikermann, 1994). Por ende, es uno de los mecanismos más eficientes para el intercambio genético entre bacterias. El mecanismo de conjugación es el más habitual y es uno de los que contribuye en mayor grado a los procesos de HGT en procariontes (De la Cruz & Davies, 2000).

El proceso de conjugación se basa en el intercambio genético entre dos células unidas por medio de un aparato llamado pili (elaborado por la célula donadora) (Griffiths et al., 2000). Los elementos genéticos móviles transportados por este mecanismo son plásmidos conjugativos o ICEs insertados en el cromosoma (Smillie et al., 2010; Wozniak & Waldor, 2010). De forma accesoria, otros plásmidos pueden movilizarse por medio del pili conjugativo sintetizado por un plásmido conjugativo.

La transferencia de ADN está mediada por una maquinaria macromolecular asociada a la membrana llamada sistema de secreción tipo IV (T4SS) (Cabezón et al., 2015).

- **Transducción**

La transducción es un proceso de transferencia de material genético mediado por bacteriófagos (fagos). La transducción constituye un mecanismo importante de transferencia genética ya que contribuye a la evolución de los genomas bacterianos (Lupo et al., 2012a). Los bacteriófagos pueden empaquetar segmentos del ADN huésped dentro de su cápside y posteriormente integrar este ADN a una nueva célula a la que infecten. Dentro del segundo huésped el ADN movilizado por el fago puede recombinarse dentro del genoma y ser transferido posteriormente vía transferencia genética vertical (Frost et al., 2005; Gogarten et al., 2009).

La capacidad de transducción de los bacteriófagos se encuentra limitada por el tamaño de su cápside. Por ejemplo, la capacidad de los fagos de ADN de doble cadena es de 50 a 100 kb (Frost et al., 2005). También por el rango de huéspedes susceptibles de ser infectados por un determinado fago. La especificidad viene determinada por el receptor al que el fago se une.

El rol de los bacteriófagos es trascendental para la evolución y virulencia de muchos patógenos (Brüssow et al., 2004; Penades et al., 2015), así como en la regulación de las poblaciones microbianas (Selva et al., 2009). Se estima que, en los ecosistemas marinos, el proceso de transducción entre bacterias se lleva a cabo en una tasa de 2×10^{19} episodios por segundo (Bushman, 2001). Esto convierte a los fagos en elementos importantes de transferencia en el medio ambiente, como veremos más adelante.

Existen dos tipos de transducción:

- **Transducción generalizada**

En este tipo de transducción, los bacteriófagos transductantes pueden movilizar cualquier región del cromosoma del huésped. La transducción generalizada se produce por un “error” durante la fase de encapsidación de ADN del fago dentro de la cápside fágica. Como resultado, ocurre un empaquetamiento de un fragmento aparentemente aleatorio de ADN cromosómico del huésped en lugar del empaquetamiento del ADN del fago (Blot, 2003). Este hecho no disminuye de la capacidad de infección de la partícula resultante, independientemente del ADN que transporta. Así, cuando la partícula transductante reconoce el receptor específico de la bacteria receptora, se fija en la pared bacteriana, el ADN donante

es inyectado dentro de la bacteria y es posteriormente integrado dentro del genoma bacteriano por mecanismos de recombinación (Moat et al., 2002).

La transferencia de ADN cromosómico por medio de transducción generalizada es un mecanismo que ocurre con baja frecuencia, se estima que representa tan sólo un evento por cada 10^7 - 10^9 infecciones por bacteriófagos, sin embargo los números generales de fagos y bacterias existentes hacen de este proceso un suceso significativo (Penades et al., 2015).

Entre las limitaciones para el estudio de los bacteriófagos que realizan transducción generalizada se encuentra la imposibilidad para aislar partículas infecciosas capaces de replicar (Sander & Schmieger, 2001), lo que impide su aislamiento y caracterización. Se han descrito bacteriófagos capaces de realizar transducción generalizada con mayor frecuencia que otros, por ejemplo T4, Mu, ES18, P1, P22, SN-T, UT1 y D3112 (Clokier & Kropinski, 2009; Del Casale et al., 2011; Muniesa, Imamovic, & Jofre, 2011). El espectro de huéspedes de estos bacteriófagos incluyen diferentes subclases de α -*proteobacteria*, β -*proteobacteria* y γ -*proteobacteria* (Beumer & Robinson, 2005; Muniesa et al., 2011), demostrando así la versatilidad de este sistema como mecanismo de HGT.

- **Transducción especializada**

En este tipo de transducción, los bacteriófagos portan su propio ADN e incorporan fragmentos específicos del cromosoma bacteriano. Ocurre en fagos atemperados y la incorporación del fragmento bacteriano tiene lugar durante la escisión del ADN fágico en el momento de inducción del profago. Al escindirse el ADN fágico, se incorpora un fragmento adyacente de ADN del huésped. Todo el genoma fágico, incluyendo este fragmento se encapsida dentro de una partícula fágica (Bushman, 2001; Clokier & Kropinski, 2009). El fragmento se moviliza cuando la partícula resultante infecta una nueva célula huésped. De acuerdo a este sistema, ciertos profagos con bajo contenido de CG en bacterias Gram positivas, contienen genes extra junto al gen *attR* (que es el punto de unión del extremo derecho del fago en el cromosoma bacteriano *attachment right site*). En el caso de bacterias patógenas, estos genes adicionales codifican con frecuencia factores de virulencia, como por ejemplo toxinas bacterianas (Canchaya et al., 2003).

La transducción especializada es probablemente un contribuyente minoritario para la transferencia genética en el medio ambiente en comparación con la transducción generalizada, sin embargo representa una excepcional herramienta para la ingeniería genética (Bushman, 2001).

1.8. Genes de resistencia a antibióticos

La hipótesis de la codificación genética de las resistencias a antibióticos se basó en los trabajos de Benveniste & Davies, 1973; los cuales comprobaron la similitud entre las enzimas que inactivan kanamicina, gentamicina y neomicina en *Streptomyces* y sus análogos presentes en ciertos aislamientos clínicos que portan resistencias a antibióticos. Los trabajos de Chakrabarty, et al., 1990 demostraron la capacidad de transformación de cepas de enterobacterias y vibrios; los cuales a partir de ADN visible en geles de agarosa (aislado en preparaciones farmacéuticas) obtuvieron clones resistentes a antibióticos. Webb & Davies, 1993 confirmaron la presencia de secuencias de ARGs en preparaciones industriales de antibióticos, cuyo origen se atribuyó a la contaminación con ADN del organismo usado en la producción fermentativa de estos compuestos. Este estudio planteó la hipótesis sobre la presencia de ADN responsable de la codificación de resistencias a antibióticos, la cual podría representar un factor para el rápido desarrollo de resistencias múltiples, debido a la ingesta de este ADN catalizado por formas farmacéuticas. La presencia de ARGs en preparaciones de antibióticos comerciales fue confirmada en un estudio de Woegerbauer et al., 2005. Sin embargo, la capacidad de estos fragmentos detectados no fue demostrada *in vivo*, motivo por el cual sugirieron que su presencia no representa una influencia sobre los fenómenos de HGT.

Los adelantos en la investigación genómica han permitido obtener una gran cantidad de secuencias e identificar genes que se encuentran asociados (o potencialmente asociados) con resistencia a antibióticos. Con el objetivo de agrupar la información existente, se han desarrollado algunas bases de datos que unifican la información (Xavier et al., 2016). Como por ejemplo, la desarrollada por la Universidad de Maryland (<http://ardb.cbcb.umd.edu/>), cuyas listas incluyen a alrededor de 20.000 potenciales ARG de alrededor de 400 tipos, presentes en secuencias bacterianas (Davies & Davies, 2010; Liu & Pop, 2009). La Universidad de McMaster desarrolló la CARD *Comprehensive Antibiotic Resistance*

Database (<https://card.mcmaster.ca/>), la cual incluye información que describe a los antibióticos y sus objetivos; así como ARGs, proteínas asociadas y literatura relacionada. Esta base de datos agrupa más de 1.600 ARGs conocidos (McArthur et al., 2013). La información compilada en estas herramientas es de gran utilidad para estudios epidemiológicos así como para investigación y desarrollo, ya que proveen de una rápida visualización del resistoma a antibióticos de nuevas cepas, el descubrimiento de ARGs emergentes o la identificación de fenómenos de HGT.

Una gran cantidad de ARGs fueron detectados en sedimentos del permafrost con 30.000 años de antigüedad (D'Costa et al., 2011). Esto sugiere que la presencia y diseminación de ARGs en el medio ambiente es un proceso natural muy antiguo. Sin embargo, el aumento de presión selectiva por parte del aumento de antibióticos presentes en el medio ambiente en las últimas décadas puede haber influenciado drásticamente la movilidad y adquisición de resistencias por parte de los microorganismos por aumento de la presión selectiva. Un análisis de colecciones de cultivos aislados en la era pre-antibiótica señala que, en los plásmidos presentes en los mismos no se encontraron ARGs (Hughes & Datta, 1983).

De entre todos los grupos bacterianos, las enterobacterias son las mayores responsables de una gran variedad de infecciones nosocomiales y de infecciones adquiridas en el medio ambiente; e incluyen la mayoría de los patógenos causantes de infecciones catalogados por la WHO como de importancia internacional (Paterson, 2006; World Health Organization, 2014). Actualmente, las principales clases de antibióticos usadas para el tratamiento de infecciones por enterobacterias son: β -lactámicos, quinolonas, aminoglicósidos, tetraciclinas y sulfonamidas (Wax et al., 2007). A continuación se detallan las características de la resistencia a estas clases:

1.8.1. Genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos.

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas cuya función es inhibir la síntesis de la pared celular. En la actualidad son los antibióticos comerciales más usados; debido a su eficiencia, bajo coste y efectos secundarios mínimos (Wilke et al., 2005) Los antibióticos β -lactámicos incluyen a: penicilinas y sus derivados semi-sintéticos, cefalosporinas y sus derivados semisintéticos, cefamicinas, monobactámicos (aztreonam), ácido clavulánico y tienamicina (carbapenem)

(Villa & Veiga-Crespo, 2014). Se han descrito cuatro mecanismos de resistencia a los compuestos β -lactámicos: (1) Bombas de flujo. (2) Modificación de las proteínas de anclaje de las penicilinas (PBPs). (3) Disminución de la expresión de las proteínas de membrana exteriores, (4) Producción de β -lactamasas. (Drawz & Bonomo, 2010). La producción de β -lactamasas es el mecanismo más habitual de resistencia, en especial en bacilos Gram negativos (Dallenne et al., 2010).

β -lactamasas

El mecanismo de acción de las β -lactamasas está basado en hidrolizar el anillo β -lactámico, con la finalidad de inactivar el antibiótico (Kong et al., 2010). Hasta el año 2016, han sido identificadas alrededor de 1.300 β -lactamasas (NCBI, 2016); las cuales están catalogadas, de acuerdo al esquema molecular de Ambler dentro de cuatro clases principales (A, B, C y D), en relación a su similitud entre secuencias y su mecanismo de acción. (Majiduddin et al., 2002). La figura 8 presenta un resumen de las características principales de cada clase.

Entre estas diferentes clases de enzimas, las **β -lactamasas de amplio espectro (ESBLs)** son las más perjudiciales. Esta subclase puede degradar la mayoría de penicilinas, monobactámicos y cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación (Bush, 2013a).

Las β -lactamasas de la familia TEM, representan el mecanismo de resistencia a β -lactamasas más prevalente en enterobacterias (Robin et al., 2011). Hasta octubre del 2015, se han descrito 223 variantes de TEM (Lahey Clinic, 2015). Cada una contiene cambios en su secuencia de aminoácidos en comparación con TEM-1. Muchas sustituciones se localizan en una posición cercana al centro activo, otorgándoles una ventaja en la capacidad catalítica frente a los β -lactámicos de amplio espectro (Brown et al., 2010; Gniadkowski, 2008). Sin embargo, esta mejora en su capacidad de degradación es inversamente proporcional a su actividad catalítica frente a las penicilinas, en donde en ciertos casos, es 100 veces menos eficiente (Pimenta et al., 2014). La evolución de este gen es un ejemplo ideal de la respuesta de la presión selectiva por parte de los microorganismos.

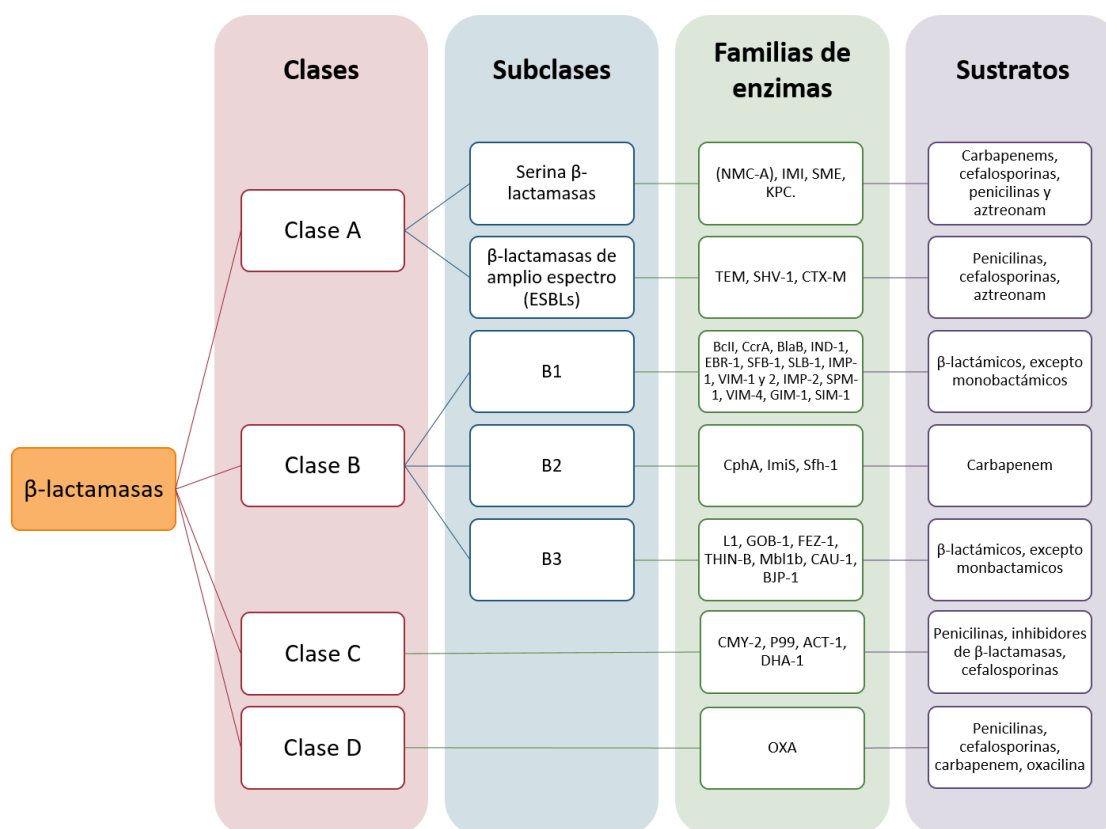


Figura 8. Clasificación de las β -lactamasas de acuerdo a la clasificación de Ambler. El cuadro representa las clases, subclases, familia de enzimas y principales sustratos (Bebrone, 2007; Bush, 2013b; Drawz & Bonomo, 2010; Fisher et al., 2005; Frère et al., 2005).

Las enzimas de la familia **CTX-M** también presentan una considerable diversidad, hasta octubre del 2015 han sido catalogadas 172 variantes (Lahey Clinic, 2015). Se agrupan en 5 clústeres de acuerdo a las similitudes de sus secuencias de aminoácidos, CTX-M-1, 2, 8, 9 y 25 (Bonnet, 2004). El clúster CTX-M-1 incluye 31 variantes y CTX-M-9, 22 variantes, por lo que representan los grupos más diversos (El Salabi et al., 2012). Los mecanismos de movilización de los genes *bla*_{CTX-M} a plásmidos se llevan a cabo con una inusual frecuencia, en comparación con otras β -lactamasas (Barlow et al., 2008). La evolución de su elevada diversidad de variantes es debido a la participación de unidades de movilización genética; como por ejemplo las secuencias de inserción *ISEcp1* o *ISCR1*, y la posterior incorporación en estructuras genéticas complejas, como integrones de clase 1 o transposones (Canton et al., 2012). Por lo tanto, representan genes de importancia ya que pueden contribuir a una acelerada

diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos entre un gran espectro de microorganismos.

Otra familia de especial interés clínico son las **SHV**, cuyas variantes son unas de las más prevalentes de las ESBLs (Jacoby, 1997). La base de datos de Lahey Clinic almacena información de 193 variantes de SHV, hasta octubre del 2015. El origen de estas variantes radica en la acumulación de mutaciones puntuales que afectan al centro activo de la molécula (Heritage, 1999). Por ejemplo: el reemplazo de serina por glicina en la posición 238 es trascendental para hidrolizar ceftazidima. En cambio, el cambio de lisina por glutamato en la posición 240 es crítica para la degradación de cefotaxima (Ghafourian et al., 2015). Otras familias de ESBLs incluyen a las familias **OXA**, **VEB**, **BES** y **PER**. Diferentes artículos de revisión, como por ejemplo el de Paterson & Bonomo, 2005, hacen una completa revisión de las características de estos grupos.

mecA

Otros genes confieren resistencia a los antibióticos β -lactámicos en otros grupos diferentes a las Enterobacterias. Por ejemplo, una de las variedades de *S. aureus*, el *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) posee un mecanismo de resistencia basado en la adquisición de un determinante genético, *mecA*, que codifica una proteína de fijación a la penicilina (PBP2a) la cual reduce la afinidad de la misma por los β -lactámicos (Enright, 2003).

El gen *mec* está localizado en un elemento genético móvil llamado casete cromosómico estafilocócico (SCC_{mec}), que permite el intercambio genético entre especies de estafilococos, (Hanssen & Ericson Sollid, 2006; Katayama et al., 2000). Todos los SCC_{mec} reportados comparten las siguientes características: (1) Poseen el complejo del gen *mec*, (2) poseen el complejo del gen *ccr* -genes recombinantes- (3) Se encuentran flanqueados por secuencias de nucleótidos directas e invertidas características en ambos extremos, y (4) se encuentran integrados en el punto de integración de secuencias (ISS) para SCC (Ito et al., 2014; Jutendo University, 2016). Hasta el mes de abril de 2016, se han caracterizado 11 tipos de SCC (I hasta XI), 8 complejos de genes *ccr* (Tipo 1 hasta 8) y 6 complejos de genes *mec* (Clases A, B, C1, C2, D, E) (IWG-SCC, 2016). El gen *mecA* se detecta en la mayoría de aislamientos que muestran un fenotipo de resistencia a meticilina, y además se detecta en todos los aislamientos de *S. aureus* multirresistentes (Wielders et al., 2002).

1.8.2. Genes de resistencia a aminoglicósidos.

Los aminoglicósidos son usados para el tratamiento de un amplio rango de infecciones por bacterias Gram positivas y negativas. El mecanismo de acción de los aminoglicósidos está basado en la inhibición de la síntesis proteica por medio de su adherencia al altamente conservado sitio A del ARN 16S de la subunidad ribosómica 30S (Magnet & Blanchard, 2005). En la actualidad, su uso está en declive debido a los elevados niveles de resistencia observados (Dougherty & Pucci, 2012).

Se han identificado cuatro mecanismos diferentes usados por bacterias patógenas para la inhibición del efecto de los aminoglicósidos: (1) Basado en la alteración de la permeabilidad celular, (2) modificación enzimática de los aminoglicósidos; (3) captura del antibiótico y (4) basado en la metilación de los nucleótidos del ARN 16S, por medio de metiltransferasas (Galimand et al., 2005; Gonzalez-Zorn et al., 2005). Hasta el momento, han sido descritas siete metiltransferasas del 16S ARN diferentes: *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, y *npmA* (Davis et al., 2010; Doi & Arakawa, 2007; Wachino et al., 2007). Entre las enterobacterias, *armA* y *rmtB* son las más prevalentes (Granier et al., 2011).

El gen *armA* confiere resistencia a las 4, 6-deoxiestreptaminas (kanamicina, amikacina, gentamicina entre otras) y fortimicina. Se detectó inicialmente en *K. pneumoniae* cepa BM4536 (Galimand et al., 2005). Con mucha frecuencia, estos genes se encuentran asociados a plásmidos conjugativos como del tipo IncL/M, en asociación con ESBLs o carbapenemasas como KPC-2 o NDM-1 (Jiang et al., 2010). El gen *armA* también se ha identificado como parte del transposón funcional Tn1548 en el plásmido pIP1204 (Galimand et al., 2005). El estudio de Quirós et al., 2014, confirmó la presencia del gen *armA* dentro de partículas de bacteriófagos en muestras fecales humanas. De acuerdo a estas y otras investigaciones se ha observado que los mecanismos de diseminación de *armA* son muy versátiles y han contribuido a su diseminación mundial (Gonzalez-Zorn et al., 2005; Granier et al., 2011).

1.8.3. Genes de resistencia a quinolonas.

Las quinolonas representan uno de los grupos más importantes de los compuestos antibióticos. El primer miembro de la familia de las quinolonas, el ácido nalidíxico, fue descubierto como subproducto de la síntesis de la cloroquina (un conocido fármaco anti-malaria), el cual mostró poseer actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-negativas (Bisacchi, 2015). La continua manipulación de la molécula por medio de síntesis química permitió obtener compuestos con una potencia significativamente mayor. La modificación más importante fue la adición de la molécula de flúor en la posición 6, las cuales son conocidas como 6-fluoroquinolonas (Dougherty & Pucci, 2012).

El mecanismo de acción de las quinolonas se basa en la interferencia de la síntesis celular a nivel de las enzimas ADN girasa (codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*) y topoisomerasa IV (codificadas por los genes *ParC* y *ParE*), las cuales son fundamentales para la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN (Laponogov et al., 2009; Maruri et al., 2012).

Los mecanismos de resistencia a quinolonas adquirida, se encuentran clasificados en dos grupos:

(1) Mutaciones en las enzimas ADN girasa y/o topoisomerasa IV.

El mecanismo de resistencia se lleva a cabo por medio de sustituciones de aminoácidos, en la subunidad de *gyrA* y/o *parC* conocida como “región determinante de resistencias a quinolonas (QRDR)” (G. Jacoby, 2005). Los trabajos de Morgan-Linnell et al, 2009 determinaron que, la presencia simultánea de dos mutaciones en el gen *gyrA* y una o dos mutaciones en *parC*, conlleva un aumento significativo de la concentración mínima inhibitoria (MICs: del inglés *minimum inhibitory concentration*) de ciertos aislamientos clínicos resistentes a fluoroquinolonas.

(2) Mecanismos de resistencia a quinolonas adquiridos.

El primer determinante de resistencia fue denominado Qnr (luego QnrA, y después QnrA1), fue descubierto dentro de un plásmido de 56-Kb llamado pMG252, el cual porta genes de resistencia a quinolonas, β -lactámicos, aminoglicósidos, sulfonamidas, trimetoprim y cloranfenicol (Martínez-Martínez et al., 1998; Strahilevitz et al., 2009). En la actualidad, tres familias de genes se

asocian con resistencia a quinolonas. (1) **aac(6')-Ib-cr**: Este gen, asociado a un plásmido, codifica una variante de una acetiltransferasa de aminoglicósidos; la cual es responsable de la acetilación y reducción de la actividad de ciertas fluoroquinolonas, desde 1986 han sido reportadas 30 variantes (Robicsek, Strahilevitz, et al., 2006). (2) **Bombas de flujo**: Cuatro tipos de proteínas: OqxAB, QepA1, QepA2 y QepA3; han sido encontradas en aislamientos humanos y animales. Su función se basa en la regulación de la concentración de quinolonas al interior de la célula (Ruiz et al., 2012; Wang et al., 2016). (3) **Qnr**: Codifican proteínas de alrededor de 200 aminoácidos que son parte de la familia de pentapéptidos repetidos (Aldred et al., 2014). Su modo de acción es la interferencia con la acción de las quinolonas en la ADN girasa y la topoisomerasa IV, que confieren cierto grado de resistencia. Hasta abril del 2016, han sido descritas 105 variedades de genes Qnr, los cuales son clasificados dentro de seis familias: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD*, *qnrS* y *qnrVC*. (G. Jacoby et al., 2008; Lahey Clinic, 2016).

1.8.4. Genes de resistencia a sulfonamidas.

El mecanismo de acción de las sulfonamidas frente a bacterias se basa en la competición con el ácido p-aminobenzoico por el centro activo de la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), la cual forma parte de la biosíntesis de folato, cofactor para la biosíntesis de moléculas vitales del metabolismo celular (Hammoudeh et al., 2013; Roland et al., 1979).

Se han descrito dos mecanismos de resistencia bacteriana a sulfonamidas:

(1) Mutación del gen de la enzima DHPS (*folP*). Cambios en el gen cromosómico *folP* ocasionan una reducción de la afinidad de las sulfonamidas por la enzima DHPS (Sköld, 2000). (2) Adquisición de un gen alternativo de la enzima DHPS (*sul*). Hasta el momento, han sido caracterizadas tres enzimas codificadas en plásmidos las cuales codifican variantes de la enzima DHPS: *sul1*, *sul2* y *sul3* (Perreten & Boerlin, 2003). La variante *sul1* está comúnmente asociada a integrones de clase 1, mientras que *sul2* está frecuentemente ligado a pequeños plásmidos multicopia o bien a plásmidos portadores de multirresistencias (Sköld, 2000). La variante *sul3* fue descrita en aislamientos de *E. coli* obtenidos de cerdos en Suiza, la cual se encontraba codificada dentro de un plásmido conjugativo (pVP440) (Perreten & Boerlin, 2003). Los genes *sul* representan el mecanismo de resistencia a sulfonamidas más frecuente en aislamientos clínicos y animales,

siendo los genes *sul1* y *sul2* más prevalentes que *sul3* (Infante et al., 2005; Lanz et al., 2003).

1.9. Resistencia a Antibióticos en el medio ambiente.

La investigación enfocada a los mecanismos de resistencia se ha centrado mayoritariamente, y por razones obvias, en bacterias patógenas. Sin embargo, estos estudios proveen información limitada sobre los orígenes y fuentes de la resistencia a antibióticos (Wright, 2007). Una visión general de los mecanismos de resistencia debería incluir diferentes ambientes, con la finalidad de visualizar de manera global los elementos ecológicos y genéticos que regulan la evolución y la transmisión de las resistencias a antibióticos.

Esta visión global es la que se propone desde la perspectiva “*One Health*”, en que se propone un esfuerzo integrativo de múltiples disciplinas, trabajando a nivel local, nacional y global para conseguir las condiciones de salud óptimas en personas, animales y el medio ambiente. Se considera que sólo se conseguirá afrontar y resolver el problema de las resistencias a antibióticos si se logra atacarlo desde esta perspectiva.

Por otro lado, en cada uno de estos ambientes se ha de determinar la extensión global de ARGs. El término *resistoma* fue planteado por el grupo de G. Wright en 2006, el cual engloba la colección de todos los ARGs presentes en los microorganismos patógenos, productores de antibióticos y bacterias ambientales benignas (D’Costa et al., 2006). El resistoma incluye a los genes de resistencia crípticos, los cuales son una gran variedad de genes que codifican proteínas con una modesta resistencia, o que tienen funciones de anclaje de antibióticos. Estos elementos potenciales de resistencia podrían desarrollarse por medio de una adecuada presión selectiva (Wright, 2007). Así también, el resistoma abarca a los genes precursores denominados elementos de protorresistencia, los cuales codifican determinadas tareas metabólicas (Wright, 2010).

Diversos elementos del resistoma, muy similares entre sí, han sido detectados en una gran diversidad de ambientes. Por ejemplo: en las muestras clínicas humanas y animales, suelo, agua y alimentos; así como en lugares apartados de la

influencia antropogénica, como por ejemplo la selva amazónica, el Ártico o la Antártida (Miller et al., 2009; Motta et al., 2004; Sjölund et al., 2008).

Existen diferentes orígenes de factores de resistencia a antibióticos, los cuales pueden diseminarse en el medio ambiente por diversas rutas. El medio ambiente es una gran fuente de ARGs de las propias bacterias residentes, pero si bien se encuentra una gran diversidad de ARGs en suelos, lagos y ríos sin contaminación antropogénica, las densidades de las poblaciones bacterianas no son excesivamente elevadas (Amábile-Cuevas, 2015; Wellington et al., 2013).

Por el contrario, otros ambientes que presentan mayores densidades de bacterias, aún con una diversidad de ARGs menor, se consideran como importantes fuentes de ARGs. Estos ambientes son:

(1) Microbiota humana y animal: La microbiota intestinal es el ecosistema más densamente poblado en la tierra. Además de proveer funciones metabólicas beneficiosas, la elevada concentración y diversidad de microorganismos presentes facilita la transmisión por HGT (Penders et al., 2013). Estudios de metagenómica revelan que una elevada proporción de ARGs, presentes en bacterias cultivables y no cultivables humanas, son idénticos a los ARGs de patógenos humanos (Sommer et al., 2010; Sommer et al., 2009).

(2) Hospitales: Los hospitales, por su naturaleza, representan la principal fuente de antibióticos y bacterias resistentes que alimentan los sistemas de aguas residuales, y además, son uno de los lugares proclives para contraer infecciones con patógenos resistentes (Kümmerer, 2009b). Las infecciones nosocomiales representan el 3.5-10.5% de pacientes hospitalizados en países industrializados, y más del 25% de pacientes en países en desarrollo (ECDC, 2016b; Gould & van der Meer, 2011). A nivel internacional se han elaborado políticas, con la finalidad de reducir estos porcentajes (CDC, 2012; The Council of the European Union, 2009).

(3) Ganadería: El extensivo uso de antibióticos en animales ha promovido un elevado desarrollo y la presencia de una abundante diversidad de resistencias a antibióticos en el entorno ganadero (Heuer et al., 2011). El estiércol animal, usado desde hace cientos de años como coadyuvante en la nutrición del suelo para la agricultura, es hoy considerado como una vía de diseminación de ARGs y de antibióticos (Binh et al., 2008; Brooks et al., 2014; van den Bogaard et al., 1999).

Los alimentos de origen animal y vegetal podrían, por tanto, ser también fuente de bacterias resistentes y ARGs.

(4) Aguas residuales urbanas, agrícolas y veterinarias: Las estaciones de tratamiento de aguas residuales (WWTP, del inglés *wastewater treatment plant*) representan uno de los principales reservorios de resistencias a antibióticos, ya que sus procesos favorecen la selección de organismos resistentes así como la transferencia de ARGs (Bouki et al., 2013; Rizzo et al., 2013; Zhang et al., 2009). Se ha observado con mucha frecuencia, que los efluentes de las WWTPs contienen un mayor porcentaje de bacterias resistentes a antibióticos que el agua residual. (Da Silva et al., 2006; Novo & Manaia, 2010; Watkinson, et al., 2007).

(5) Suelos, incluyendo sedimentos: Una gran variedad de antibióticos se fijan en las partículas de suelo (Gu & Karthikeyan, 2008; Thiele-Bruhn, 2003), promoviendo la acumulación ambiental de estos compuestos y la potencial aparición de fenómenos de HGT y mutaciones en las poblaciones bacterianas presentes (Cytryn, 2013). Diferentes bacterias aisladas en suelos poseen diferentes elementos de multirresistencias con gran similitud a genes de patógenos humanos, incluyendo regiones no codificadas y secuencias de movilización que sugieren la existencia de fenómenos de HGT (Forsberg et al., 2012; Gudeta et al., 2015).

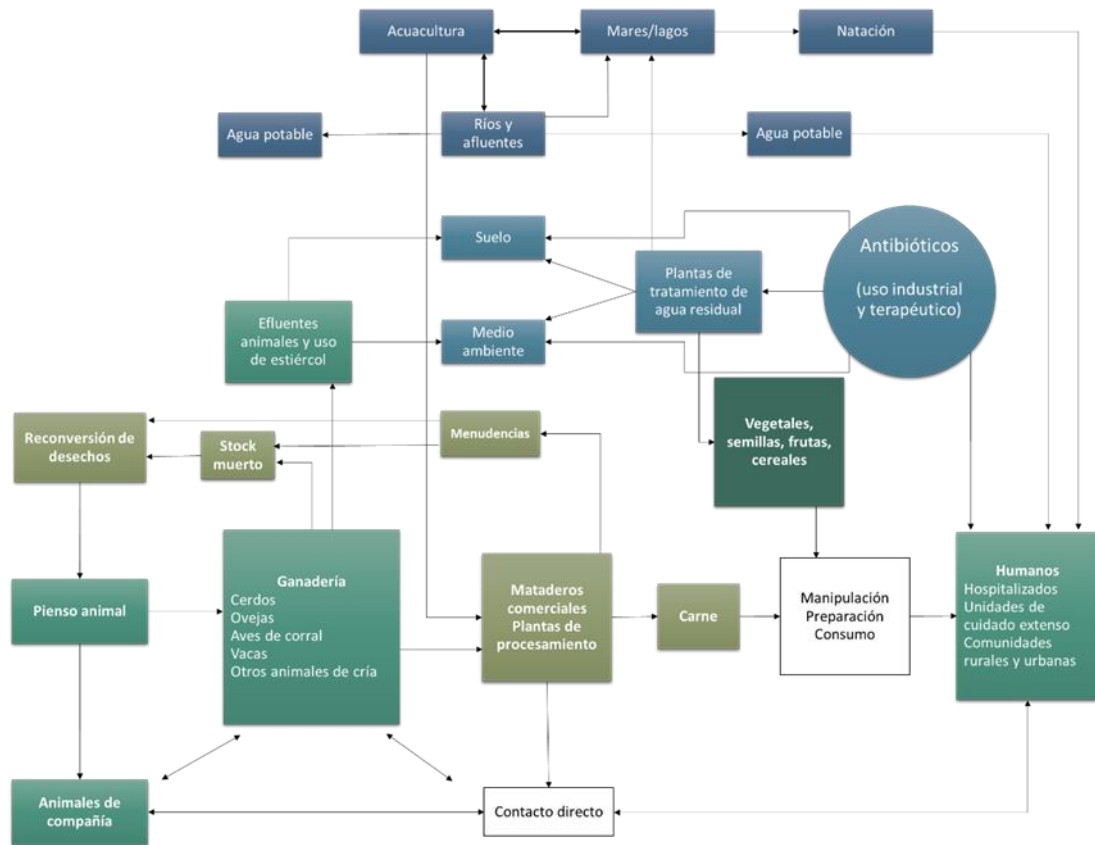


Figura 9. Diseminación de antibióticos y de resistencia a antibióticos por medio de la agricultura, población, hospitales, plantas de tratamiento de aguas residuales, y ambientes asociados. Adaptado de Davies & Davies, 2010, Copyright © 2010 American Society of Microbiology. ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation.

2. OBJETIVOS

La presente tesis es presentada en la modalidad de compendio por publicaciones, los objetivos de esta tesis se distribuyen entre los 4 capítulos de la tesis, que corresponden a los artículos presentados.

2.1. Capítulo 1: Genes de Resistencia a Antibióticos en la fracción bacteriana y fágica de aguas residuales de Túnez y España como marcadores para la comparación de los patrones de resistencia a antibióticos en cada población.

- Detectar y cuantificar genes de resistencia a antibióticos en las fracciones de ADN fágico y bacteriano de aguas residuales humanas y animales de Túnez
- Comparar el contenido de ARGs en las fracciones bacteriana y fágica de Túnez con los datos obtenidos en Barcelona para poder correlacionar los datos con características de las dos zonas geográficas.

2.2. Capítulo 2: Persistencia de los genes de resistencia a antibióticos en las fracciones de bacteria y bacteriófagos en agua residual

- Evaluar la persistencia de ARGs (*sul1*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-1}*) en la fracción bacteriana y fágica, frente a diferentes procesos de desinfección
- Evaluar la persistencia de ARGs en ambas fracciones en mesocosmos que simule procesos de inactivación natural.

2.3. Capítulo 3: Los lodos de depuradora representan una fuente importante de genes de resistencias a antibióticos en las fracciones bacteriana y fágica.

- Optimizar un método de purificación de ADN de bacteriófagos en lodos para el estudio de ARGs.
- Evaluar la presencia y abundancia de cinco ARGs (*bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *qnrA*, *qnrS*, *sul1*) en la fracción bacteriana y fágica de lodos de depuradora.
- Evaluar los cambios en los patrones de ARGs desde las aguas residuales hasta los lodos en la fracción bacteriana y fágica.

2.4. Capítulo 4: Los sedimentos de un río Mediterráneo son un reservorio de genes de resistencia a antibióticos.

- Evaluar la ocurrencia de seis ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrS*, *sul1*, *mecA*) de importancia clínica en las fracciones fágica y bacteriana de agua y sedimentos del río Llobregat.
- Correlacionar las prevalencias y densidades de ARGs en agua de río y sedimentos del río Llobregat con las condiciones climáticas
- Evaluar la persistencia de los ARGs en los sedimentos por medio de mesocosmos *in vitro* que simulen condiciones naturales.

3. PUBLICACIONES

3.1. Listado de publicaciones

La presente tesis doctoral está basada en los siguientes artículos:

- I. Marta Colomer-Lluch, **William Calero-Cáceres**, Sihem Jebri, Fatma Hmaied, Maite Muniesa, Juan Jofre. *Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population*, *Environment International*, 2014, 73, pp 167-175.
- II. **William Calero-Cáceres**, Maite Muniesa. *Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater*. *Water Research*, 2016, 95, pp 11-18.
- III. **William Calero-Cáceres**, Ana Melgarejo, Marta Colomer-Lluch, Francisco Lucena, Juan Jofre, Maite Muniesa. *Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions*. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48 (13), pp 7602–7611.
- IV. **William Calero-Cáceres**, Javier Méndez, Julia Martín-Díaz, Maite Muniesa. *The sediment of a Mediterranean river is a reservoir of antibiotic resistance genes*. (Manuscrito enviado a la revista *Water Research*).

3.2. Informes de participación

Marta Colomer-Lluch, William Calero-Cáceres, Sihem Jebri, Fatma Hmaied, Maite Muniesa, Juan Jofre. *Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population*, Environment International, 2014, 73, pp 167-175.

El doctorando William Ricardo Calero Cáceres participó en la recogida y transporte de las muestras adicionales del área de Barcelona, así como procesamiento de las muestras de las estaciones WWTP3 y SLH1.2 de Túnez.

El doctorando llevó a cabo parte de los experimentos, incluyendo las extracciones de ADN en las fracciones fágica y bacteriana de las muestras de las estaciones WWTP3, SLH1.2, B-WWTP1 y B-SLH1. Su cuantificación y posterior análisis de los datos obtenidos. Finalmente, ha participado en la redacción del artículo y en la elaboración de tablas y figuras.

William Calero-Cáceres, Maite Muniesa. *Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater*. Water Research, 2016, 95, pp 11-18.

El doctorando William Ricardo Calero Cáceres ha colaborado en el diseño experimental y ha realizado la totalidad de los experimentos. Incluyen: la recogida y transporte de muestras, montaje y ejecución de los procesos de desinfección e inactivación natural, bacteriología, extracciones de ADN en las fracciones fágica y bacteriana, cuantificación y análisis de los datos obtenidos. Finalmente, ha participado activamente en la redacción del artículo, en la elaboración de tablas y figuras así como en la difusión en un congreso internacional y en uno nacional.

William Calero-Cáceres, Ana Melgarejo, Marta Colomer-Lluch, Francisco Lucena, Juan Jofre, Maite Muniesa. *Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions*. Environmental Science and Technology, 2014, 48 (13), pp 7602–7611.

El doctorando William Ricardo Calero Cáceres fue responsable de la recogida y transporte de las muestras, así como del análisis de los parámetros microbiológicos y el procesamiento de las muestras. El doctorando llevó a cabo la mayoría de experimentos, incluyendo la puesta a punta del mejor método de extracción de ADN en las fracciones bacteriana y fágica de las muestras, su cuantificación y posterior análisis de los datos obtenidos. Finalmente, ha participado en la redacción del artículo y en la elaboración de tablas y figuras.

William Calero-Cáceres, Javier Méndez, Julia Martín-Díaz, Maite Muniesa.
The sediment of a Mediterranean river is a reservoir of antibiotic resistance genes.
(Manuscrito sometido a la revista *Water Research*).

El doctorando William Ricardo Calero Cáceres ha colaborado en el diseño experimental y ha realizado la totalidad de los experimentos. Incluyen: la recogida y transporte de muestras, bacteriología, extracciones de ADN en las fracciones fágica y bacteriana, cuantificación y análisis de los datos obtenidos. Finalmente, ha participado activamente en la redacción del artículo y en la elaboración de tablas y figuras.

El artículo 1 fue parcialmente utilizado por la Dra. Marta Colomer Lluch en la defensa de su tesis doctoral, el doctorando William R. Calero Cáceres complementó su trabajo de acuerdo a las recomendaciones de los revisores de la revista *Environment International*. Ninguno de los coautores de los artículos 2, 3 y 4 ha utilizado los datos descritos en las publicaciones para la elaboración de su tesis doctoral.

Dra. M. Muniesa

Barcelona, julio 2016

3.3. Informe sobre el factor de impacto

El artículo *Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population* fue publicado online el 13 de agosto de 2014 en la revista *Environment International*. La cual en el año 2014 se encuentra incluida en el primer cuartil (Q1) del área temática: *Environmental Science (miscellaneous)* (5/253).

En el año 2014, la revista *Environment International* presentó un factor de impacto de 5.559.

El artículo *Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater* fue publicado online el 3 de marzo de 2016 en la revista *Water Research*. La cual en el año 2014 se encuentra incluida en el primer cuartil (Q1) de las siguientes áreas temáticas: *Ecological Modeling Pollution* (2/101), *Water Management and Disposal* (1/74), *Water Science and Technology* (3/187).

En el año 2014, la revista *Water Research* presentó un factor de impacto de 5.528.

El artículo *Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions* fue publicado online el 29 de mayo de 2014 en la revista *Environmental Science and Technology*. La cual en el año 2014 se encuentra incluida en el primer cuartil (Q1) de las siguientes áreas temáticas: *Chemistry (miscellaneous)* (16/384), *Environmental Chemistry* (6/93), *Medicine* (60/1775).

En el año 2014, la revista *Environmental Science and Technology* presentó un factor de impacto de 5.330.

El artículo *The sediment of a Mediterranean river is a reservoir of antibiotic resistance genes* se encuentra sometido para publicación en el mes de mayo de 2016 en la revista *Water Research*. La cual en el año 2014 se encuentra incluida en el primer cuartil (Q1) de las siguientes áreas temáticas: *Ecological Modeling Pollution* (2/101), *Water Management and Disposal* (1/74), *Water Science and Technology* (3/187).

En el año 2014, la revista *Water Research* presentó un factor de impacto de 5.528.

Dra. M. Muniesa

Barcelona, julio 2016

4. RESULTADOS

4.1. CAPÍTULO 1:

Genes de resistencia a antibióticos en la fracción bacteriana y fágica de aguas residuales de Túnez y España como marcadores para la comparación de los patrones de resistencia a antibióticos en cada población.

Genes de Resistencia a Antibióticos en la fracción bacteriana y fágica de aguas residuales de Túnez y España como marcadores para la comparación de los patrones de resistencia a antibióticos en cada población.

“Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population”

Autores: Marta Colomer-Lluch, **William Calero-Cáceres**, Sihem Jebri, Fatma Hmaied, Maite Muniesa, Juan Jofre.

Revista: Environment International, 2014, 73, pp 167-175.

Introducción

En la actualidad, las resistencias a antimicrobianos representan uno de los principales problemas de salud pública y animal alrededor del mundo. Sin embargo, se ha observado que cada país y región presentan marcadas variaciones en sus perfiles de resistencia a patógenos bacterianos. Además, los mecanismos de diseminación de resistencias presentan variaciones temporales y geográficas (Klugman, 2002; Kumarasamy et al., 2010; Nübel et al., 2008; Robicsek et al., 2006; Rodríguez-Martínez et al., 2011). Por consiguiente, existe una progresión temporal en la abundancia de ARGs y diferencias geográficas las cuales permitirían conocer los patrones de resistencia a antibióticos de determinada población (Hawkey & Jones, 2009; Paniagua et al., 2010).

Hasta hoy en día, los estudios de la distribución y la epidemiología de resistencias se han basado en patógenos aislados en el ámbito clínico. Sin embargo, la presencia de ARGs así como los mecanismos de transferencia genética no sólo han sido observados en patógenos, sino también en bacterias comensales humanas y animales (Rolain et al., 2011; Salyers et al., 2004; Sommer et al., 2009; Wasyl et al., 2013). Por lo tanto, el estudio de las poblaciones microbianas asociadas a humanos y animales podría ser una buena herramienta epidemiológica. Las bacterias encontradas en aguas residuales (humanas y animales) en su mayoría están asociadas a los microbiomas intestinales. Por lo tanto, es probable que los ARGs encontrados en las poblaciones bacterianas de las aguas residuales, representen los ARGs relacionados con ambientes antropogénicos.

La presencia de ARGs en aguas residuales ha sido ampliamente reportada (Novo et al., 2013; Rizzo et al., 2013; Schwartz, 2003; Szczepanowski et al., 2009; Tennstedt et al., 2003; Volkmann et al., 2004; Weinbauer & Rassoulzadegan, 2003); estos estudios se han enfocado en el ADN bacteriano. Sin embargo, en investigaciones recientes se ha descrito la presencia de ARGs en el viroma de muestras ambientales, del cual los bacteriófagos conforman el grupo principal (Colomer-Lluch et al., 2011; Minot et al., 2011; Parsley et al., 2010; Quirós et al., 2014).

Este estudio fue realizado usando aguas residuales a la entrada de tres plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (WWTP: del inglés *wastewater treatment plant*) y dos mataderos de animales en Túnez (SLHs: del inglés *slaughterhouse*). Con la finalidad de evaluar la abundancia de varios ARGs en las fracciones bacteriana y fágica por medio de qPCR y comparar los resultados obtenidos con los perfiles de resistencia de las aguas residuales del área de Barcelona, España.

Fueron estudiados los siguientes genes: Cuatro genes que confieren resistencia a β -lactámicos: *bla*_{TEM}, el cual incluye más de 145 variantes; *bla*_{CTX-M} grupo 1, el cual incluye las variantes CTX-M-1, 3, 10, 11 y 15; *bla*_{CTX-M} grupo 9, el cual incluye las variantes CTX-M-9, 13, 14, 16-19, 21 y 27; *mecA*, el cual confiere resistencia a meticilina en *S. aureus* (MRSA). Un gen que codifica resistencia a aminoglicósidos, *armA* y el gen *sul1* de resistencia a sulfonamidas.

Los anteriores genes fueron seleccionados debido a que *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} representan parte de los genes más extendidos que otorgan resistencia a β -lactámicos entre bacterias Gram-negativas patógenas. Mientras que la detección de las variantes CTX-M-9 y CTX-M-14 es frecuente en cepas de origen animal (Coque et al., 2008; Patterson, 2000; Rodríguez-Baño et al., 2008). El gen *mecA* fue seleccionado por conferir resistencias en bacterias Gram positivas que mostraron una elevada prevalencia en España (Colomer-Lluch et al., 2011a; Colomer-Lluch et al., 2011b). Se seleccionaron dos genes de resistencia a quinolonas debido a su creciente prevalencia, así como su versatilidad, debido a que han sido detectadas a nivel cromosómico y en elementos genéticos móviles (Colomer-Lluch et al., 2014; Hooper, 2001; Paterson, 2006). El gen *armA* fue incluido debido a su elevada prevalencia en enterobacterias, además es considerado como un gen emergente de diseminación global (Gonzalez-Zorn et al., 2005). Se desarrolló un nuevo

ensayo de cuantificación del gen *sul1*, que representa la primera variante y la más prevalente de las resistencias a sulfonamidas en aguas residuales (Du et al., 2014; Z. Wang et al., 2013).

Objetivos

En el presente estudio se planteó:

- Detectar y cuantificar genes de resistencia a antibióticos en las fracciones de ADN fágico y bacteriano de aguas residuales humanas y animales de Túnez
- Comparar el contenido de ARGs en las fracciones bacteriana y fágica de Túnez con los datos obtenidos en Barcelona, para poder correlacionar los datos con características de las dos zonas geográficas.

Resultados y discusión

Se cuantificaron todos los ARGs en las aguas provenientes de Túnez. Los resultados para *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *mecA*, *qnrA* y *qnrS* en en área de Barcelona fueron previamente descritos (Colomer-Lluch et al., 2011a; Colomer-Lluch et al., 2014; Colomer-Lluch et al., 2011b). Se analizaron muestras de agua residual urbana y agua residuales de mataderos del área de Barcelona para cuantificar la presencia de los genes *armA* y *sul1*.

Se observó una elevada prevalencia y abundancia del gen *sul1* en las fracciones bacteriana y fágica (100-70% positivos) en todas las aguas residuales de Túnez. Así mismo, *sul1* representó el gen más abundante en el área de Barcelona, con valores máximos de 9 log₁₀ CG/mL en aguas residuales urbanas y un valor similar en aguas de origen animal. En la fracción fágica tan sólo pocas muestras fueron negativas (8 de 58). A nivel de densidades, en Barcelona se detectó alrededor de 1 unidad logarítmica más que en las muestras de Túnez, en las fracciones fágica y bacteriana.

Otro gen con una elevada prevalencia en Túnez es *bla*_{TEM}, en las fracciones bacteriana y fágica (100-80% positivos). Una prevalencia similar fue observada en las muestras del área de Barcelona (100% positivos en ambas fracciones). La abundancia de *bla*_{TEM} en las fracciones bacteriana y fágica es similar en ambas zonas, en aguas residuales urbanas y animales.

Los genes *bla*_{CTX-M} muestran una baja prevalencia y una elevada variación entre muestras. En la fracción bacteriana, *bla*_{CTX-M-1} fue detectada entre el 14-60% de muestras de agua residual urbana. En cambio, en las muestras de origen animal se detectó en el 20-40% de muestras. Las densidades de las muestras promediaron los 2 log₁₀ GC/mL en todas las fuentes. En la fracción fágica se detectó una baja prevalencia. El gen *bla*_{CTX-M-9} fue detectado con mayor frecuencia que *bla*_{CTX-M-1} en WWTP2. Sin embargo, se encontraba ausente en otras (WWTP3 o SLH 1.2). En la fracción fágica, el 14% de muestras de WWTP1 y el 25% de WWTP2. Ninguno de las muestras de origen animal contenía este gen en ADN fágico. El clúster 1 de este gen fue previamente reportado en Túnez en el 2005 (Chouchani et al., 2011), nuestras observaciones sugieren que el clúster 9 puede mostrar una prevalencia similar o mayor.

El gen *mecA* fue detectado en baja frecuencia. En la fracción bacteriana, únicamente tres muestras fueron positivas en WWTP1 y WWTP3; mientras que en la fracción fágica fue detectado en dos muestras en WWTP3. Las muestras de origen animal fueron negativas en ambas fracciones. Estos resultados señalan una marcada diferencia con las muestras del área de Barcelona, en donde existe una mayor prevalencia de este gen en aguas residuales humanas y animales, en sus fracciones fágica y bacteriana.

Entre los genes de resistencia a quinolonas, *qnrA* presenta una mayor prevalencia que *qnrS*. El gen *qnrA* en la fracción bacteriana, fue detectado en el 71% de muestras de WWTPs, y en el 73% de muestras de SHLs. De media, las densidades en todos los orígenes se encontraban alrededor de 4,5 log₁₀ GC/mL. Mientras que, en la fracción fágica, únicamente 5 muestras de WWTP 1 y 2 fueron positivas. No se detectó la presencia de este gen en ADN fágico de muestras de origen animal. En comparación, en el área de Barcelona mostró una elevada persistencia de este gen en la fracción fágica (100% en agua residual urbana y 66% en agua residual animal).

El gen *qnrS* en la fracción bacteriana, fue detectado entre el 21-100% de muestras de WWTP y entre el 20-70% de muestras de SLH. La densidad promedio fue de 4-5 log₁₀ GC/mL. En la fracción fágica, el gen *qnrS* estuvo presente en únicamente 3 muestras de WWTP2, con una media de 3.5 log₁₀ GC/mL. En comparación, este gen en Barcelona fue detectado en el 25% de muestras de origen urbano y en el

3.3% de muestras de origen animal. Las densidades de *qnrA* y *qnrS* en el ADN fágico de ambos orígenes son similares.

El gen *armA* no fue detectado en las muestras de Túnez. En el área de Barcelona se observó una baja prevalencia. Alrededor del 5% de muestras de origen urbano, en la fracción fágica y bacteriana fueron positivas para este gen. En cambio en las muestras animales, el 13% de muestras son positivas en el ADN bacteriano y alrededor del 10% muestras en el ADN fágico fueron positivas. Las abundancias promedio fueron inferiores a 3 log₁₀ GC/mL en ambas fracciones y tipos de agua residual.

En general, todos los ARGs cuantificados de muestras del área de Barcelona mostraron densidades más altas en comparación a las muestras de Túnez. Una explicación plausible puede ser el mayor uso de antibióticos en el área de Barcelona, lo cual puede incrementar la diseminación de resistencias. Cabe recalcar que estas diferencias no pueden ser atribuidas a los niveles de contaminación fecal, ya que los niveles de indicadores microbiológicos de ambas zonas son similares.

Conclusiones

- La fracciones fágica y bacteriana de las aguas residuales urbanas y animales contienen cantidades variables de ARGs, los cuales difieren de acuerdo al nivel de diseminación de los mismos. Además, los niveles pueden variar de acuerdo a diferencias geográficas, con diferencias en aspectos económicos y socioculturales.
- Consecuentemente, el análisis de ARGs en aguas residuales es una opción interesante para el estudio de la diseminación de resistencias a antibióticos y podría ser una buena herramienta para la detección de resistencias que puedan ser relevantes antes de su detección en ambientes clínicos.

License Agreement

Reprinted from Environment International. Vol. 73. Marta Colomer-Lluch, William Calero-Cáceres, Sihem Jebri, Fatma Hmaied, Maite Muniesa, Juan Jofre. *Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fraction of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population*. Pages 167-175. Copyright 2014. With permission from Elsevier.



Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envint



Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population



Marta Colomer-Lluch^a, William Calero-Cáceres^a, Sihem Jebri^b, Fatma Hmaied^b, Maite Muniesa^a, Juan Jofre^{a,*}

^a Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona 08028, Spain

^b Unité de Microbiologie et de Biologie Moléculaire, CNSTN, Technopôle de Sidi Thabet, Sidi Thabet 2020, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 February 2014

Accepted 7 July 2014

Available online 13 August 2014

Keywords:

Bacteriophages

Antibiotic resistance

β -lactamases

Quinolones

Sul1

Sewage water

ABSTRACT

The emergence and increased prevalence of antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment may pose a serious global health concern. This study evaluates the abundance of several ARGs in bacterial and bacteriophage DNA via real-time qPCR in samples from five different sampling points in Tunisia; three wastewater treatment plants (WWTP 1, 2 and 3) and wastewater from two abattoirs slaughtering different animals. Results are compared with those obtained in the Barcelona area, in northeast Spain.

Eight ARGs were quantified by qPCR from total and phage DNA fraction from the samples. Three β -lactamases (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} cluster 1 and *bla*_{CTX-M} cluster 9), two quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*), the *mecA* gene that confers resistance to methicillin in *Staphylococcus aureus*, the emerging *armA* gene, conferring resistance to aminoglycosides and *sul1*, the most extended gene conferring resistance to sulfonamides, were evaluated.

Sul1 and *bla*_{TEM} were the most prevalent ARGs detected at all five Tunisian sampling points, similarly with the observations in Barcelona. *bla*_{CTX-M-9} was more prevalent than *bla*_{CTX-M-1} both in bacterial and DNA within phage particles in all samples analysed. *mecA* and *armA* were almost absent in Tunisian waters from human or animal origin in contrast with Barcelona that showed a medium prevalence. *qnrA* was more prevalent than *qnrS* in bacterial and phage DNA from all sampling points.

In conclusion, our study shows that ARGs are found in the bacterial and is reflected in the phage DNA fraction of human and animal wastewaters. The densities of each ARGs vary depending on the ARGs shed by each population and is determined by the characteristics of each area. Thus, the evaluation of ARGs in wastewaters seems to be suitable as marker reflecting the antibiotic resistance patterns of a population.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Antibiotic resistance, both in human and animal pathogens, has emerged since the introduction of antibiotics in anthropogenic environments, compromising public and animal health worldwide. Antimicrobial resistance is a major global health problem, but marked variations in the resistance profiles of bacterial pathogens are found between countries and different geographic areas.

The appearance of antibiotic resistances is modulated by events of co-option, mutation, recombination and/or horizontal gene transfer between strains and, once have occurred, are subjected to natural

selection that allows the widespread dispersal of the strains due to current globalization. The spread of resistance varies both temporally and geographically (Klugman, 2002; Kumarasamy et al., 2010; Nübel et al., 2008; Robicsek et al., 2006; Rodriguez-Martinez et al., 2011). Consequently, there is a temporal progression in the abundance of the corresponding antibiotic resistance genes (ARGs) and their geographical distribution that allows the occurrence of ARGs to be used to analyse the patterns of antibiotic resistance of a given population (Hawkey and Jones, 2009; Paniagua et al., 2010), and could be useful to detect changes on these patterns. To date, studies of the distribution and epidemiology of resistance have mostly been based on, and hence biased towards, the study of pathogens isolated in the clinical environment.

However, it is well known that it is not only pathogens that evolve these ARGs or gene arrangements, but that human and animal commensals also play an important role in the appearance and spread of these genes (Rolain, 2013; Salyers et al., 2004; Sommer et al., 2009;

* Corresponding author at: Department of Microbiology, Faculty of Biology, Av. Diagonal 643, Barcelona 08028, Spain. Tel.: +34 3 4021487; fax: +34 3 4039047.
E-mail address: jjofre@ub.edu (J. Jofre).

Wasył et al., 2013). Therefore, microbial populations associated with humans and animals should be a good setting for searching for information about the epidemiology of resistance. In addition, the microbiological composition of some wastewaters, such as municipal sewage or abattoir wastewaters, is mostly due to human and animal gut microbiomes. It is thus likely that the ARGs found in bacterial populations in wastewaters represent the ARGs dominating in environments in contact with man-made antibiotics. The presence of ARGs and resistant bacteria in wastewaters has been widely reported (Novo et al., 2013; Rizzo et al., 2013; Schwartz et al., 2003; Szczepanowski et al., 2009; Tennstedt et al., 2003; Volkmann et al., 2004).

The potential for detecting these ARGs by genomic techniques makes the characterization of the resistome, total or partial, of the microbial populations present in wastewaters feasible. These sorts of studies are typically focused on bacterial DNA. However, the virome, mostly constituted by bacteriophages, has also recently been reported to contain abundant and diverse ARGs in the human gut (Minot et al., 2011; Quirós et al., 2014) and in human and animal wastewater (Colomer-Lluch et al., 2011a, 2011b; Muniesa et al., 2004; Parsley et al., 2010). Moreover, the fact that genomic studies can be performed independently of culture allows the use of archival sampling. So, although the finding of resistance determinants in a bacterium might not correspond to its phenotypic resistance, the presence of ARGs detected and quantified by molecular techniques will certainly provide relevant information regarding the ARGs circulating in a given environment or geographical area.

This study was conducted using archived and fresh samples from raw sewage entering three municipal and two abattoir wastewater treatment plants (WWTPs) in Tunisia, and aimed to evaluate the abundance of several ARGs in bacterial and bacteriophage DNA via real-time qPCR and to compare this with results of the Barcelona area in Spain.

The following ARGs were studied: three β -lactamases: *bla*_{TEM}, which includes more than 145 variants, *bla*_{CTX-M} cluster 1, which includes variants CTX-M-1, 3, 10, 11 and 15, and *bla*_{CTX-M} cluster 9, which includes variants CTX-M-9, 13, 14, 16 to 19, 21 and 27; two quinolone resistance genes: *qnrA* (including variants *qnrA1* to *qnrA7*) and *qnrS* (including variants *qnrS1* to *qnrS6*); the *mecA* gene, which confers resistance to methicillin in *Staphylococcus aureus* (MRSA); *armA* conferring resistance to aminoglycosides and *sul1* to sulfonamides. Quantification was performed using previously described methodology (Colomer-Lluch et al., 2011a, 2011b) from the same sample volume and by the same analyst, allowing us to compare the distribution of the ARGs in two different areas that differ in socio-economic and cultural characteristics, climate (especially in the southern location sampled in Tunisia) and geographic background.

These ARGs were selected because *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} have been reported to be the most widely distributed extended spectrum β -lactamases (ESBLs) worldwide among Gram-negative pathogenic bacteria, while CTX-M-9 and CTX-M-14 are the most frequent *bla*_{CTX-M} groups in animal isolates (Coque et al., 2008; Patterson, 2003; Rodríguez-Baño et al., 2008). *mecA* was selected because it confers resistance in Gram positive bacteria that showed a high prevalence in our geographical area (Colomer-Lluch et al., 2011a, 2011b). With regard the quinolones and fluoroquinolones, these are antimicrobials that are commonly used in clinical and veterinary medicine. Resistance to quinolones is dramatically increasing and has been described both in chromosome and acquired mobile genetic elements (MGEs) such as plasmids and in phage DNA in wastewater (Colomer-Lluch et al., 2014 Hooper, 2001; Paterson, 2006). *armA* was included because is highly prevalent in *Enterobacteriaceae* and it is considered an emerging gene spreading worldwide (González-Zorn et al., 2005). Finally, a new qPCR assay was developed in this study to evaluate *sul1*, the first described and most prevalent of the three *sul* genes conferring resistance to sulfonamides in raw sewage (Du et al., 2014; Wang et al., 2013).

2. Materials and methods

2.1. Sampling settings

Samples from Tunisia comprise incoming raw sewage to WWTPs sampled in three locations between 2011 and 2014. The first location was a WWTP treating water equivalent to 20,000 inhabitants corresponding to three towns in a pre-desert area (very warm in summer and low yearly rainfall) in South Tunisia (WWTP 1) with contribution of waste from tourist facilities. The second and third locations were municipal medium-load WWTP in a metropolitan area in North Tunisia (WWTP 2 and WWTP 3), the origin of its treated influents being domestic. Concerning animal wastewater samples, these were collected from one abattoir slaughtering mostly sheep and to lesser extent cattle (SLH1). SLH samples were collected in two different periods and were considered as two different set of samples. The first one corresponds to samples collected in 2011 (SLH1.1) and the second in 2014 (SLH1.2) (Fig. 1). Samples from Spain comprise incoming raw sewage to a WWTP treating water equivalent to 500,000 inhabitants in the area of Barcelona between 2011 and 2014 and wastewater from farms from different animals (cattle, poultry and pigs), from the same origin and showed similar microbiological contents as previously described (Colomer-Lluch et al., 2011b)

The fecal load of the samples studied as measured by the concentration of somatic coliphages (Jebri et al., 2012) was similar for samples from Tunisia and Spain showing fecal loads as reported in the Barcelona area for these types of sample (Muniesa et al., 2012). The samples were



Fig. 1. Geographic location of the five Tunisian sampling points: WWTP 1–3 and the two sets of slaughterhouses SLH 1.1 and SLH 1.2. Dotted line shows Tunisian metropolitan area.

collected in sterile conditions, frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stored in dry ice until laboratory analysis. In total, 26 samples were used for total DNA extraction and 28 for DNA extraction from the viral (phage) fraction, followed by quantification by real-time qPCR.

2.2. Purification of bacterial DNA

Five mL of each sample was passed through a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ Durapore membrane filter (Millipore, Bedford, Massachusetts), described by the manufacturer as a low protein-binding membrane. This filter allowed the phages to pass through whilst bacteria were retained on the surface of the filter. The membrane containing retained bacteria was recovered in 5 mL of LB. The suspension was then centrifuged at $3000\times g$ for 10 min. To recover bacterial DNA, the pellet was resuspended in 200 μL of fresh LB. DNA was then extracted using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, USA), following the manufacturer's instructions. Bacterial DNA was resuspended in a final volume of 200 μL and DNA concentration was evaluated using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA).

2.3. Purification of DNA in the phage particles

Recovery of phage particles was performed according to the USEPA protocol (USEPA, 2006). Briefly, 0.05 M AlCl_3 was added to 100 mL of well-mixed samples to a final concentration of 0.0005 M and pH was adjusted to 3.5. After centrifugation, the pellet was resuspended in 100 mL of buffered 10% beef extract (pH 8) (LP029B; Oxoid). Polyethylene glycol (PEG) precipitation was performed by adding 50% (w/v) phosphate solution pH 7.2) PEG 2000 (Sigma) to the resuspended pellet. After rigorous agitation, the mixture was kept at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight and then centrifuged at $8000\times g$ for 90 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The pellet obtained was then resuspended in 5 mL phosphate buffer (pH 7.2) and finally filtered through $0.22\text{ }\mu\text{m}$ nitrocellulose filters. After that, extraction of DNA inside phage particles was performed as previously described (Colomer-Lluch et al., 2011a), with a few modifications, from 1 mL of virus suspension. The viral suspension was treated with chloroform (1:10) in order to avoid the presence of possible vesicles containing DNA, followed by DNase treatment (100 units/mL) for 1 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ to remove any possible

free DNA that might be present outside the phage particles. After that, DNase was heat inactivated at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min. DNA extraction was performed via proteinase K treatment and phenol:chloroform treatment (Colomer-Lluch et al., 2011a; Sambrook and Russell, 2001).

2.4. qPCR procedures

2.4.1. Standard curves

Each ARG under study was amplified by conventional PCR, purified and then cloned into a pGEM-T Easy vector for insertion of PCR products, following the manufacturer's instructions (Promega, Barcelona, Spain), as previously described (Colomer-Lluch et al., 2011a, 2011b). After obtaining and purifying the plasmid construct, the DNA concentration was quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA). Standard curves were generated using serial decimal dilutions of the standard carrying the targeted genes, and the C_T values obtained by qPCR were plotted against log gene copy number (Colomer-Lluch et al., 2011a, 2011b).

2.4.2. Primers and probe design

In brief, the primers and probes for each ARG (Table 1) were designed using the software tool Primer Express 3.0 and commercially synthesized (Applied Biosystems, Spain) and were used in a standardized TaqMan amplification protocol in a Step One Real Time PCR System as previously described (Colomer-Lluch et al., 2011a, 2011b). All probes were Minor groove binding probes with a FAM reporter (FAM: 6-carboxyfluorescein) and a non-fluorescent quencher (NFQ). All samples were run in triplicate, along with the standards, and positive and negative controls. The efficiency (E) of our reactions ranged from 95% to 100%.

sul1, conferring resistance to sulfonamides, was detected in this study by a new qPCR assay designed using the sequence of *sul1* of strain *E. coli* J53, containing plasmid R388. The plasmid containing *sul1* was purified from the strain using the Qiagen Plasmid Midi purification kit (Qiagen Inc., Valencia, USA) and used for the preparation of the standard curves. The *sul1* qPCR assay showed a detection limit of 5.3 gene copies (GC)/ μL (threshold cycle of 33).

Table 1
qPCR primers and probes for qPCR assays used in this study.

Target gene	PCR	Sequence	Amplimer (bp)	Ref.
<i>bla</i> _{TEM} qPCR	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	85	Lachmayr et al. (2009)
	LP	TGCATAATTCTTACTGTTCATG		
	Probe	6FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ		
<i>bla</i> _{CTX-M-1} qPCR	UP	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	Colomer-Lluch et al. (2011a)
	LP	ACATCGGACGGCTTTCT		
	Probe	6FAM-TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ		
<i>bla</i> _{CTX-M-9} qPCR	UP	ACCAATGATATTGCGGTGAT	85	Colomer-Lluch et al. (2011b)
	LP	CTGCGTTCTGTGCGGCT		
	Probe	6FAM-TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ		
<i>mecA</i> qPCR	UP	CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAA	92	Volkmann et al. (2004)
	LP	TGGTCTTTTGCATTCCTGGA		
	Probe	6FAM-AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTCCACA-TAMRA		
<i>armA</i> qPCR	UP	GAAAGAGTCGCAACATTAATGACTT	93	Quirós et al. (2014)
	LP	GATTGAAGCCACAACAAAATCT		
	Probe	FAM-TCAAACATGTCTCATCTATT-MGBNFQ		
<i>qnrA</i> qPCR	UP	AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC	138	Colomer-Lluch et al. (2014)
	LP	TGAACTCTATGCCAAAGCAGTTG		
	Probe	6FAM-TATGCCGATCTGCGCGA-MGBNFQ		
<i>qnrS</i> qPCR	UP	CGACGTGCTAACTTGCGTGA	118	Colomer-Lluch et al. (2014)
	LP	GGCATTGTTGAAACTTGCA		
	Probe	6FAM-AGTTCAITGAACAGGGTGA-MGBNFQ		
<i>sul1</i> qPCR	UP	CCGTTGGCCTTCTGTAAAG	67	Modified from Czekalski et al. (2012)
	LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT		
	Probe	FAM-CGAGCCTTGCAGCGG-MGBNFQ		

3. Results

3.1. Controls

3.1.1. qPCR controls to exclude non-encapsidated DNA

The phage particle DNA extraction protocol used was always accompanied by several controls in order to ensure that the results obtained were only due to the amplification of the DNA contained within the capsid of bacteriophage particles. Additionally to the chloroform and DNase treatments mentioned above, the following steps were performed:

3.1.2. Absence of non-packaged DNA contamination

To rule out the possibility of contamination with free DNA outside the phage particles, an aliquot of the sample taken after DNase treatment and before desencapsidation was evaluated. At this stage, the samples were used as a template for conventional PCR of eubacterial 16S rDNA and as a template for the qPCR assay of each antibiotic resistance gene. Both amplifications should be negative, confirming that DNase has removed all non-encapsidated DNA from the samples.

3.1.3. Confirmation of DNase activity

To verify the success of the DNase treatment, serial decimal dilutions of the construct used for the standards with vector pGEM::antibiotic resistance gene, were treated with DNase followed by the heat inactivation of the enzyme. The reactions containing the DNA corresponding to the dilutions of the standard, theoretically degraded by DNase activity, were amplified by the qPCR set of the respective antibiotic resistance gene. The results showed negative amplification, indicating that the DNase was able to remove the DNA added, even at high DNA concentrations.

3.1.4. Inactivation of DNase by heat treatment

The success of DNase inactivation by heat treatment was evaluated. Without such inactivation, any remaining DNase would degrade the qPCR primers and probe, leading to negative results for the controls caused by DNase activity rather than the absence of non-encapsidated DNA.

To test inactivation, serial decimal dilutions of the construct used for the standards pGEM::antibiotic resistance gene were added to the DNase controls (an aliquot of the sample taken after DNase treatment and before desencapsidation). After DNase heat inactivation, reactions were amplified by the corresponding qPCR assay and the values were compared with the direct evaluation of the same dilution of the standard containing each gene of study with the respective qPCR assay. If the DNase had been inactivated, we would expect the same amplification results in the controls with DNase as in the original dilutions of the standard containing pGEM::antibiotic resistance gene. The results showed almost the same Ct values in the DNase controls compared with the original standards (only one Ct below the Ct of the corresponding dilution of the standard). This confirmed that the DNase was well inactivated by heat treatment and did not interfere in the subsequent qPCR reaction. The slight differences observed in the Ct values obtained could be attributed to a small amount of DNA degradation caused by the heat treatment.

3.2. Densities of ARGs in DNA from bacteria and phage particles

Data for all ARGs was obtained from Tunisian waters. Data for *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-9}, *mecA*, *qnrA* and *qnrS* genes in Barcelona samples was previously reported (Colomer-Lluch et al., 2011a, 2011b, 2014) and comparison with Tunisian waters is done on the basis of the previous results. Since there was no reported data for *armA* and *sul1* genes in Barcelona area, new data from Barcelona waters has been obtained from wastewater collected in a urban WWTP and a sample composed of different slaughterhouses, and the results are compared with the results in Tunisia samples.

3.2.1. *sul1*

An important prevalence of *sul1* was observed in bacterial and in packaged DNA either in Barcelona and in Tunisian samples that allow presentation of data as averaged values (Fig. 2). *sul1* has shown to be the most prevalent ARG detected in Tunisia at all sources and almost all samples (100–70%) were positive in both bacterial DNA and in DNA in phage particles and only WWTP 3 showed slightly lower densities in phage DNA than the other sources. Similarly, *sul1* also showed to be the most abundant gene in Barcelona samples in terms of abundance (reaching maximal values of 9 log₁₀ GC/mL in B-WWTP 1 and similar in animal wastewater B-SLH 1) and only few samples were negative for the gene in DNA of the phage fractions. Comparison between Tunisia and Barcelona indicates a similar distribution with values slightly lower in Tunisia, but again *sul1* was the most prevalent and abundant ARG among all genes studied.

3.2.2. *bla*_{TEM}

*bla*_{TEM} was the second most prevalent ARG detected in Tunisia at all sources and almost all samples (100–80%) were positive in both bacterial DNA and in DNA in phage particles. A similar prevalence was observed in Barcelona area where all samples were *bla*_{TEM} positive either in bacterial or packaged DNA in human or animal wastewater (Colomer-Lluch et al., 2011a, 2011b). The densities of *bla*_{TEM} detected in DNA in the phage fraction of the samples in Tunisia were, as expected, lower than in bacterial DNA, with 0.56–2.0 log₁₀ units of difference on average in Tunisia waters. The abundance of *bla*_{TEM} in phage particles was similar (same order of magnitude) to previous results obtained in Barcelona, in human and animal wastewaters.

The prevalence of *bla*_{TEM}, either in bacterial DNA or in DNA in phage particles in Tunisia waters showed low variability between samples and thus the results are presented as averaged values (Fig. 3). On average, samples from WWTP 1, 2 and 3 contained a similar number of gene copies of *bla*_{TEM} in bacterial DNA at 4.1 and 4.3 and 4.5 log₁₀ units respectively, the densities detected in the two sets of slaughterhouse samples were of the same order (4.3 log₁₀ units) for bacterial DNA but showed lower values in SLH 1.1 in the phage fraction while in SLH 1.2 values were higher (Fig. 3).

3.2.3. *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-9}

*bla*_{CTX-M} genes showed a lower prevalence and a greater heterogeneity between samples than the previous ARGs in the samples analysed. Results are therefore not presented as averages, but indicating ARGs densities of each individual sample. *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-9} showed similar prevalence in all Tunisian samples (Fig. 4), although differences could be observed between plants, with 28.6% of the samples from WWTP 1 being positive for *bla*_{CTX-M-1} in bacterial DNA, along with 14.3% from WWTP 2 or 60% in WWTP 3. From slaughterhouses, a 40% and a 20% of positive samples in SLH 1.1 and 1.2 respectively were detected. The densities in samples from all sources were similar, averaging 2.3 log₁₀ units GC/mL. DNA in phage particles displayed a very low prevalence and only one sample from WWTP 2 and 3 samples in WWTP 3 were positive for *bla*_{CTX-M-1}.

In comparison, *bla*_{CTX-M-9} was more prevalent than *bla*_{CTX-M-1} in some plants (WWTP 2), but absent in others (WWTP 3 or SLH 1.2) (Fig. 4). On average, 2.7 log₁₀ units GC/mL were detected in bacterial DNA from WWTP 1, while 3.2 log₁₀ units were detected on average in the samples from WWTP 2 and none in WWTP 3. The set of samples SLH1.1 was the only showing *bla*_{CTX-M-9}. In terms of DNA in phage particles, 14.3% of the samples from WWTP 1 were positive for this gene, along with 25% from WTP 1, whereas none of the two slaughterhouse set of samples contained *bla*_{CTX-M-9} in encapsidated DNA.

3.2.4. *mecA*

Of all the Tunisian samples analysed, only one from WWTP 1 contained the *mecA* gene in bacterial DNA, with 2.78 log₁₀ units of GC detected. None of the DNA packaged in phage particles isolated from

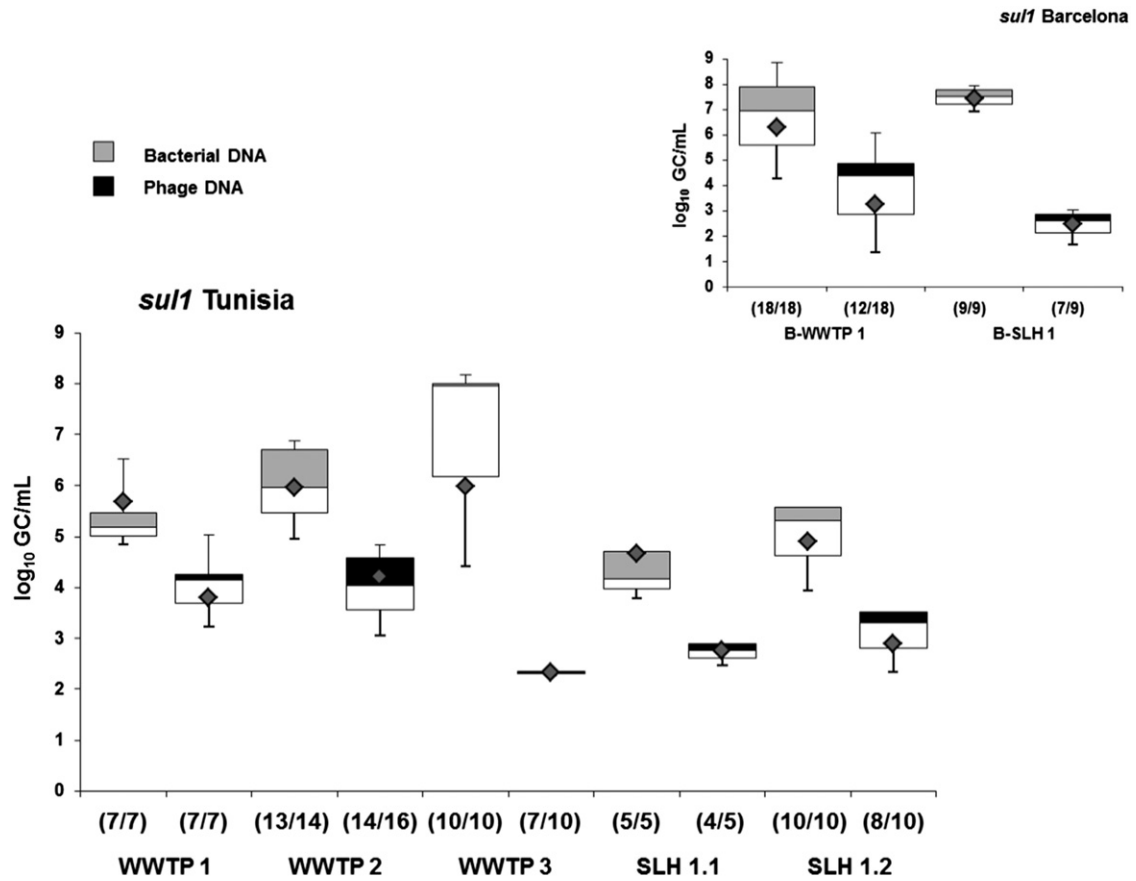


Fig. 2. Box plot of averaged values of *sul1* genes (\log_{10} GC/mL) from Tunisian and Barcelona urban wastewater samples (WWTP) and slaughterhouse wastewater samples (SLH). Each box plot indicates the counts obtained from samples of the same source. The cross-pieces in each box plot represent (from top to bottom) the maximum, upper-quartile, median (black bar), lower-quartile, and minimum values. The colored boxes include samples showing values within the 75th percentile and white boxes samples showing values within the 25th percentile. Grey diamond shows the mean value. In brackets the number of positive samples among the total number of samples analyzed.

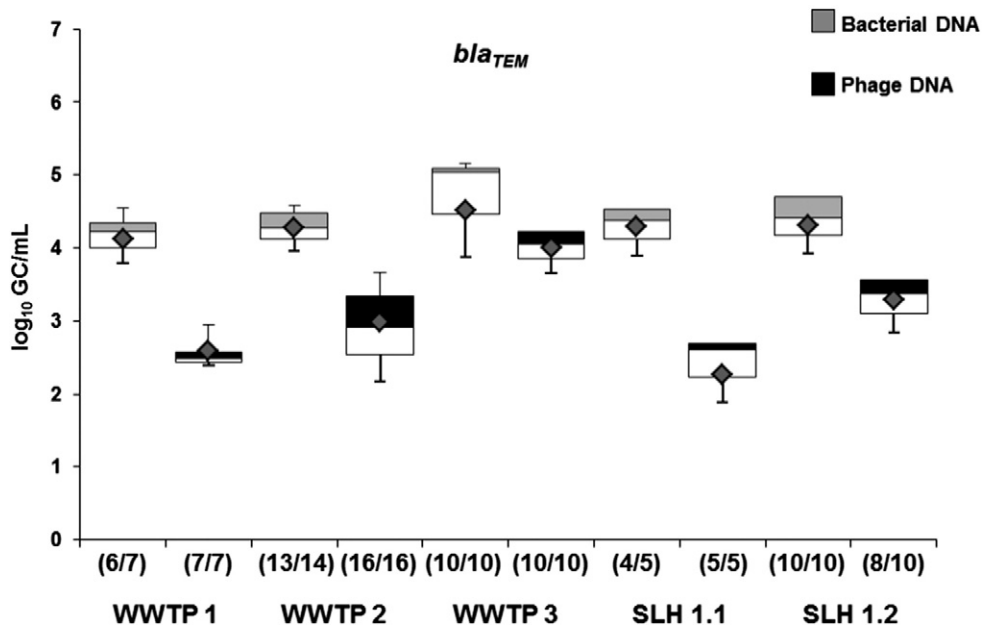


Fig. 3. Box plot of averaged values of *bla_{TEM}* genes (\log_{10} GC/mL) from Tunisian urban wastewater samples (WWTP) and slaughterhouse wastewater samples (SLH). Each box plot indicates the counts obtained from samples from the same source. The cross-pieces in each box plot represent (from top to bottom) the maximum, upper-quartile, median (black bar), lower-quartile, and minimum values. The coloured boxes include samples showing values within the 75th percentile and white boxes samples showing values within the 25th percentile. Grey diamond shows the mean value. In brackets the number of positive samples among the total number of samples analyzed.

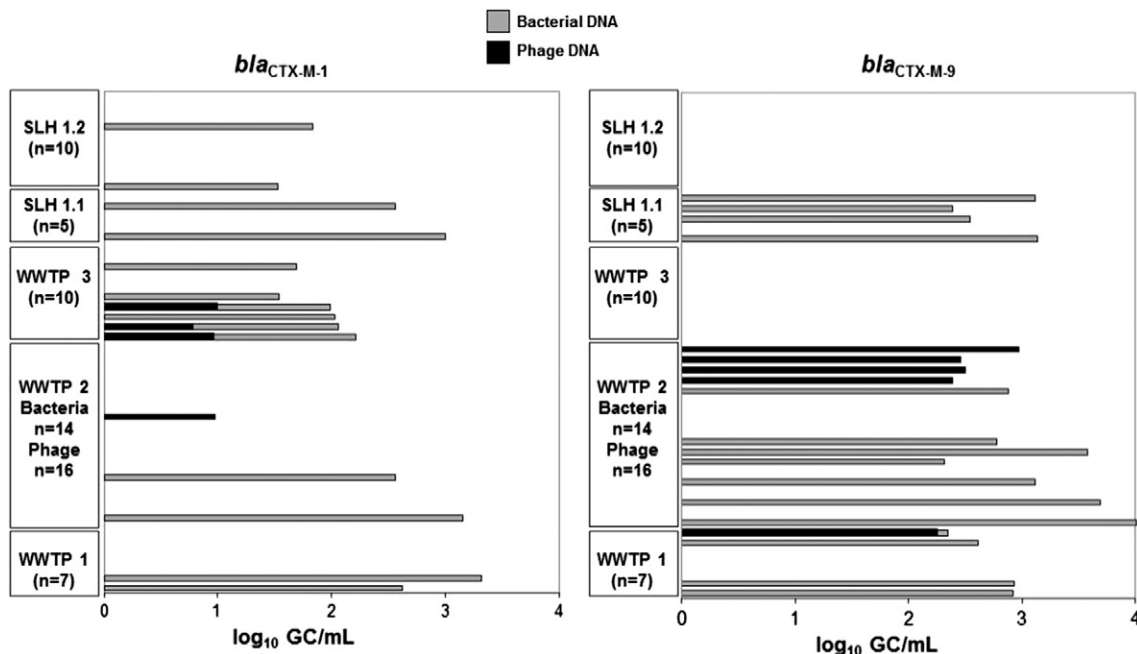


Fig. 4. Densities of *bla*_{CTX-M} cluster 1 and *bla*_{CTX-M} cluster 9 (\log_{10} GC/mL) in bacterial DNA and in DNA of the phage fraction (phage DNA) from Tunisian urban wastewater samples (WWTP) and slaughterhouse wastewater samples (SLH). Values are presented for each individual sample. The number of samples processed for each DNA is indicated in brackets.

the samples contained the *mecA* gene. In WWTP 3, only two samples were positive in DNA of the phage fraction of the samples showing low GC values (1.67 and 2.01 \log_{10} units GC/mL respectively) but none in bacterial DNA fraction. Samples from slaughterhouse were negatives for *mecA* in bacterial or phage DNA fraction. These results showed a marked difference with Barcelona samples that were mostly positive in bacteria and phage DNA in human or animal wastewater (Colomer-Lluch et al., 2011a, 2011b).

3.2.5. *qnrA* and *qnrS*

qnrA was more prevalent in bacterial DNA than *qnrS* in samples from WWTPs 1 and 2 but similarly in WWTP 3 and in the slaughterhouses

(Fig. 5). In bacterial DNA, *qnrA* was detected in 71% of the samples from all three WWTP, and 73% in the samples of animal origin. On average, *qnrA* densities in bacterial DNA were similar regardless of its origin (average of 4.5 \log_{10} units), although densities varied slightly between samples. Regarding *qnrA* in DNA in phage particles, only 5 samples from WWTP 1 and 2 were positive for *qnrA*. No *qnrA* was detected in phage DNA from WWTP 3 and the slaughterhouse samples.

qnrS in bacterial DNA was found in 28.6% of the samples from WWTP 1, 21.4% from WWTP 2, 100% of WWTP 3 and in 20% and 70% from SLH 1.1 and 1.2, respectively. No remarkable differences were detected in the number of gene copies of *qnrS* between sources, with densities ranging from 4 to 4.3 \log_{10} units except in WWTP 3 with densities of more

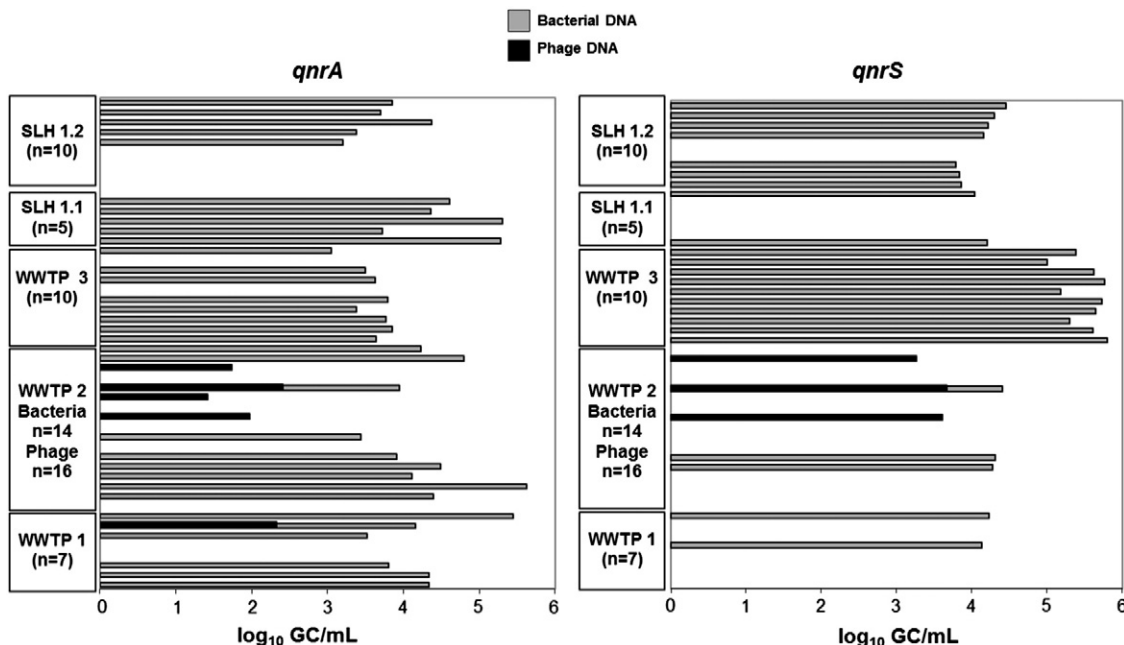


Fig. 5. Densities of *qnrA* and *qnrS* (\log_{10} GC/mL) in bacterial DNA and in DNA of the phage fraction (phage DNA) from Tunisian urban wastewater samples (WWTP) and slaughterhouse wastewater samples (SLH). Values are presented for each individual sample. The number of samples processed for each DNA is indicated in brackets.

than 5.5 log₁₀ units GC/mL. However, in DNA from the phage fraction *qnrS* was only present in three samples from WWTP 2 (18.7%), with 3.5 log₁₀ units of gene copies on average.

In comparison, the Barcelona area (Colomer-Lluch et al., 2014) showed a higher prevalence of *qnrA* in the phage fraction (100% in human wastewater and 66% in animal wastewater), while *qnrS* showed lower prevalence than *qnrA*, but still higher than in Tunisian samples (25% in human wastewater and 3.3% in animal samples). Densities or both ARGs in phage DNA in Barcelona did not differ with the values detected in Tunisia, when present.

3.2.6. *armA*

None of Tunisia samples showed the presence of *armA*, either in the bacterial or in the phage DNA fraction. The prevalence was also low in Barcelona area, but still detectable. 5.6% contained *armA* in bacterial DNA in human wastewater, with 2.61 log₁₀ units of GC/mL detected. In the DNA packaged in phage particles isolated from human wastewater in Barcelona samples, 5.3% contained *armA* gene, with average densities of 1.92 log₁₀ units of GC/mL. In animal wastewater samples, 13.3% of samples were positive in bacterial DNA with 2.9 log₁₀ units GC/mL and in the phage DNA fraction 9.9% of positive samples with average densities of 2.55 log₁₀ GC/mL.

4. Discussion

There was a clear difference in the occurrence and concentrations of the ARGs studied in the Tunisian samples between bacterial DNA and DNA from the phage fraction of the samples. As described in other studies, the density of ARGs detected in bacteriophages was lower than that in bacterial DNA (Colomer-Lluch et al., 2011a, 2011b, 2014) but followed the same trend. Likewise, despite minor differences the ranking in terms of occurrence and concentration of each ARG was similar in the three types of sample studied.

sul1, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} β-lactamases are very prevalent ARGs and widely distributed worldwide (Diaz et al., 2010; Patterson, 2003; Rodriguez-Baño et al., 2008). Particularly *bla*_{CTX-M}, which continues to have a rapidly changing epidemiology (Hawkey and Jones, 2009), has been mobilized from its chromosomal location in *Kluyvera* species, via highly efficient mobile genetic elements, into high-risk multiresistant clones that have spread on a global scale (D'Andrea et al., 2013).

Sulfonamide resistance gene *sul1* had the highest abundance of all ARGs in all samples of study both in bacterial DNA and phage particles DNA. Likewise, metagenomics analysis revealed its high prevalence in a tannery WWTP (Wang et al., 2013). *sul1* has been described in *E. coli* isolates recovered from poultry meat in Tunisia (Soufi et al., 2011) and in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in a university hospital in Tunisia (Dahmen et al., 2010a, 2010b). *sul1* was also the most prevalent and abundant of all the ARGs studied in Barcelona, but densities of the gene were more than one log₁₀ units higher both in bacterial and phage particles DNA compared to the densities registered in Tunisia. In general, all ARGs in Barcelona area showed higher densities compared with Tunisia samples, and this could be a consequence of a more extensive use of antibiotics in Barcelona area than in Tunisia, that could increase the spread of resistances but also to different environmental conditions. The differences could not be accounted to the levels of fecal pollution, since samples from both areas were quite homogeneous and showed similar densities of microbial indicators of fecal pollution.

*bla*_{TEM} was the most prevalent ESBL in the studied samples. In fact, it was the first ESBL to be described in Tunisia in 1994 and it remains the most commonly reported (Chouchani et al., 2011). *bla*_{CTX-M}, were less abundant than *bla*_{TEM} both in terms of occurrence and concentration in the study samples, with cluster 9 being more prevalent than group 1 but with similar concentrations between the two clusters in positive samples. These genes are probably less widespread in strains from Tunisia than *bla*_{TEM}. The first *bla*_{CTX-M} reported in Tunisia in 2005

belonged to group 9, whereas group 1 was first described in 2005; in the last few years the most frequently reported ESBL has been *bla*_{CTX-M-15}, belonging to *bla*_{CTX-M} cluster 1 (Chouchani et al., 2011). Even if cluster 1 has been described as the most prevalent in Tunisia, our observations suggest that cluster 9 could be equally prevalent and even more abundant. The differences could be attributable to the fact that our approach analyzes the ARGs in the whole population, independently of disease, while reported data of prevalence were obtained with isolates from clinical settings that might not reflect the resistance patterns in the total population.

Regarding the *qnr* genes, the occurrence of *qnrA* was significantly higher than that of *qnrS*, although samples containing *qnrS* showed higher concentrations of the latter. This is not due to the detection limit of the method, and thus should be interpreted as rare shedding but of high levels. Again, as in the case of *bla*_{CTX-M}, the frequency of these ARGs is increasing very actively (Rodriguez-Martinez et al., 2011; Strahilevitz et al., 2009), with *qnrA* being the first gene described, but *qnrS* now being the most frequently reported worldwide (Rodriguez-Martinez et al., 2011). Reports of *qnr* genes in Tunisia and neighboring countries do not show much difference between *qnrA* and *qnrS* (Rodriguez-Martinez et al., 2011), with *qnrA* being only slightly more prevalent than *qnrS* (Dahmen et al., 2010a, 2010b).

mecA sequences were absent or quasi-absent in the samples analysed in this study. This is consistent with the low prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* in Tunisian isolates (Kesah et al., 2003).

Therefore, the ranking of abundance, as evaluated by occurrence and concentration, of ARGs in bacterial DNA and in DNA packaged in bacteriophages in Tunisia was *sul1* > *bla*_{TEM} > *qnrA* > *bla*_{CTX-M-9} > *bla*_{CTX-M-1} > *qnrS* > *mecA* > *armA*.

Comparisons with data on the same ARGs in Barcelona revealed both similarities and some remarkable differences. First, the fecal load of the samples tested was similar, so any differences in concentrations of ARGs cannot be attributed to differences in fecal load. There was a clear similarity in occurrence of *sul1* and *bla*_{TEM}, which were present at both locations in all or almost all samples at similar concentrations. This is consistent with the fact that *bla*_{TEM} is the most prevalent β-lactamase worldwide. The similarity in the values of *bla*_{TEM}, together with the concentrations of other ARGs such as *qnrA*, *bla*_{CTX-M} group 9, *bla*_{CTX-M} group 1 and *qnrS* in the positives samples and the low detection limits of all the genes studied, clearly indicates that their prevalence in the Tunisian samples was not significantly influenced by transport, and consequently that the differences found reflect the actual abundance of the studied genes in Tunisia and Barcelona.

The ranking of abundance of *qnrA*, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-1} and *qnrS* genes was similar in the two locations, although with lower occurrence and concentrations in Tunisia. This may be attributed to several differences between the two areas of study. Barcelona, because of its geographical situation, receives a high number of foreign visitors, and intensive animal husbandry is important. This, together with the high consumption of antibiotics in Spain (moderate to high in human medicine (European Centre for Diseases Prevention, 2013)) and veterinary medicine (European Medicines Agency, 2013), make it a good location for the appearance and selection of antibiotic resistant bacteria.

There was also a clear difference regarding *mecA*, which was abundant in samples from Barcelona, but rare in samples from Tunisia. In this case the difference could be attributed to differences in livestock production, mainly involving sheep and goats in Tunisia, and pigs in the Barcelona area. Livestock, and particularly pigs, are viewed as an important source of methicillin-resistant *S. aureus* (De Neeling et al., 2007; Feingold et al., 2012; Khanna et al., 2008), which may further explain this observation. It also reinforces the notion that geographical spread of MRSA over long distances and across cultural borders is a rare event (Nübel et al., 2008).

Concerning *armA*, the absence of the gene in Tunisia waters did not allow to make comparison, although in Barcelona area, the prevalence

of *armA* is not high, still some samples, particularly those of animal origin, show the presence of the gene (data not shown). In studies analyzing the phage fraction of feces of healthy individuals, *armA*, showed a low prevalence (18% in total DNA and 6.3 in phage DNA fraction), but the gene showed remarkably high densities (up to 6 log₁₀ units in total DNA and 4.8 log₁₀ in phage DNA) (Quirós et al., 2014).

The study of a qPCR fragment in the DNA of the bacteriophage fraction of the samples allows quantification of the ARGs in phage particles, but it does not provide enough information to elucidate the nature of these particles. Few ARGs have been described within the genome of temperate bacteriophages (see Muniesa et al., 2013 for review). Without excluding this possibility, previous studies within our group (Colomer-Lluch et al., 2014) suggest that mostly generalized transducing phage particles are the ones detected in the studies analysing the phage fraction of different samples (Minot et al., 2011; Modi et al., 2013; Parsley et al., 2010; Schmieger and Schicklmaier, 1999). The phage particles causing generalized transduction do not contain the phage genome, but fragments of bacterial DNA. As these particles are unable to cause lysis in a host strain, they might not be detectable by plaque assay or leave traces of phage DNA in the recipient cell. Nevertheless, they can infect a susceptible host and transduce the genes that they are mobilizing.

Many bacteriophages have a narrow host range infecting a limited number of strains of a given species, but others (polyvalent bacteriophages) can infect a wide host range that would allow transduction among different taxa. Phages might therefore play a crucial role in the early stages of transfer of the chromosomally located resistomes (and also plasmids) by randomly mobilizing ARGs from environmental bacteria to commensal bacteria or pathogens, probably through generalized transduction.

The environment may provide an ideal setting for the acquisition and dissemination of antibiotic resistance. Moreover, environmental ARGs constitute a reservoir nourished either from environmental bacteria or from pathogens reaching environmental settings. From this pool, ARGs can be responsible of the generation of new pathogens, including uncultured microorganisms, or to provide old ones with an improved resistome. For all these reasons, environmental monitoring of ARGs is essential to increase our understanding of how ARGs spread within a community, particularly assuming that ARGs are “easy to get, but very hard to lose” pollutants.

5. Conclusions

In conclusion, the bacterial and the phage fractions of human and animal wastewater contain variable amounts of ARGs, which differ according to the level of expansion of the different resistance genes, and vary between geographical areas that differ in socio-economic and cultural characteristics, climate and geographic background. Consequently, the study of ARGs in wastewater is an interesting option for studying antibiotic resistance spread and may even be a good instrument for detecting resistance before it appears in clinical settings.

Acknowledgments

This study was supported by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043), the Fundación Ramon Areces and a project funded in the framework of Scientific Cooperation between Tunisia and Spain (AP/037867/11). Marta Colomer-Lluch received an FI grant from the Generalitat de Catalunya and William Calero-Cáceres received a PhD fellowship from SENESCYT 2012–Republic of Ecuador.

References

Chouchani C, Marrakchi R, El Salabi A. Evolution of β -lactams resistance in Gram-negative bacteria in Tunisia. *Crit Rev Microbiol* 2011;37:167–77.

- Colomer-Lluch M, Imamovic L, Jofre J, Muniesa M. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob Agents Chemother* 2011a;55:4908–11.
- Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* 2011b;6:e17549.
- Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage DNA from wastewater samples and the effect of inducing agents on bacteriophage-encoded antibiotic resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:1265–74.
- Coque TM, Baquero F, Cantón R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill* 2008;1347:19044.
- Czekalski N, Berthold T, Caucci S, Egli A, Bürgmann H. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into lake Geneva, Switzerland. *Front Microbiol* 2012;3:106.
- Dahmen S, Poirel L, Mansour W, Bouallègue O, Nordmann P. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* from Tunisia. *Clin Microbiol Infect* 2010a;16:1019–23.
- Dahmen S, Mansour W, Boujaafar N, Arlet G, Bouallègue O. Distribution of cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in a university hospital in Tunisia. *Microb Drug Resist* 2010b;16:43–7.
- D'Andrea MM, Arena F, Pallicchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* 2013;303:305–17.
- De Neeling AJ, van der Broek MJM, Spalburg EC, van Santen-Verheulveel MG, Dam-Deisz WD, Boshuizen HC, et al. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* 2007;122:366–72.
- Diaz MA, Hernandez-Bello JR, Rodriguez-Baño, Martínez-Martínez L, Calvo J, Blanco J, et al. The diversity of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol* 2010;48:2840–5.
- Du J, Ren H, Geng J, Zhang Y, Xu K, Ding L. Occurrence and abundance of tetracycline, sulfonamide resistance genes, and class 1 integron in five wastewater treatment plants. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014;21:7276–84.
- European Centre for Diseases Prevention. Surveillance of antimicrobial consumption in Europe, 2010. Stockholm: ECDC; 2013.
- European Medicines Agency. Sales of veterinary antimicrobial agents in 25EU/EEA countries in 2011. Third ESNAC report. London: European Medicines Agency; 2013.
- Feingold BJ, Silbergeld EK, Curriero FC, van Cleef BAGL, Heck MEOC, Kluytmans JAJW. Livestock density as risk factor for livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1841–9.
- González-Zorn B, Catalan A, Escudero JA, Domínguez L, Teshager T, Porrero C, et al. Genetic basis for dissemination of *armA*. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:583–5.
- Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2009;64(Suppl. 1):3–19.
- Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:337–41.
- Jebri S, Jofre J, Barkallah I, Saidi M, Hmaief F. Presence and fate of coliphages and enteric viruses in three wastewater treatment plants effluents and activated sludge from Tunisia. *Environ Sci Pollut Res* 2012;19:2195–201.
- Kesah C, Ben Redjeb S, Odugbemi TO, Boye CS, Dosso M, Ndinya Achola JO, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:153–6.
- Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol* 2008;128:298–303.
- Klugman KP. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50(S2):1–5.
- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:593–602.
- Lachmayr KL, Kerkhof LJ, Dirienzo AG, Cavanaugh CM, Ford TE. Quantifying nonspecific TEM β -lactamase (*bla*TEM) genes in a wastewater stream. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:203–11.
- Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, et al. The human gut viromes: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res* 2011;21:1616–25.
- Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* 2013;499:219–22.
- Muniesa M, García A, Miró E, Mirelis B, Prats G, Jofre J, et al. Bacteriophages and diffusion of β -lactamase genes. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1134–7.
- Muniesa M, Lucena F, Blanch AR, Payán A, Jofre J. Use of abundance ratios of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for microbial source identification. *Water Res* 2012;46:6410–8.
- Muniesa M, Colomer-Lluch M, Jofre J. Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiol* 2013;8(6):739–51.
- Novo A, André S, Viana P, Nunes OC, Manaia CM. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Res* 2013; 47:1875–87.
- Nübel U, Roumagnac P, Feldkamp M, Son J-H, Ko KS, Huang YC. Frequent emergence and limited geographical dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:14130–5.
- Paniagua R, Valverde A, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* fecal carriers using a chromogenic medium. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67:376–9.
- Parsley LC, Consuegra EJ, Kakirde KS, Land AM, Harper Jr WF, Liles MR. Identification of diverse antimicrobial resistance determinants carried on bacterial, plasmid, or viral metagenomes from an activated sludge microbial assemblage. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:3753–7.

- Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. Am J Med 2006; 119(Suppl. 1):20–8.
- Patterson JE. Extended-spectrum beta-lactamases. Semin Respir Crit Care Med 2003;24: 79–88.
- Quirós P, Colomer-Lluch M, Martínez-Castillo A, Miró E, Argente M, Jofre J, et al. Antibiotic-resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. Appl Environ Microbiol 2014;58:606–9.
- Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment. Sci Total Environ 2013;447:345–60.
- Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. Lancet Infect Dis 2006;6:629–40.
- Rodríguez-Baño J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, et al. Community infections caused by extended spectrum beta-lactamase-producing *E. coli*. Arch Intern Med 2008;168:1897–902.
- Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother 2011;17:149–82.
- Rolain JM. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotics resistance encoding genes. Front Microbiol 2013;4:173.
- Salyers AA, Gupta A, Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. Trends Microbiol 2004;12:412–6.
- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
- Schmieger H, Schicklmaier P. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. FEMS Microbiol Lett 1999;170:251–6.
- Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, Obst U. Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiol Ecol 2003;43:325–35.
- Sommer MO, Dantas G, Church GM. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. Science 2009;325:1128–31.
- Soufi L, Sáenz Y, Vinué L, Abbassi MS, Ruiz E, Zarazaga M, et al. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. Int J Food Microbiol 2011;144:497–502.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. Clin Microbiol Rev 2009;22:664–89.
- Szczepanowski R, Linke B, Krahn I, Gartemann KH, Gützw T, Eichler W, et al. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. Microbiology 2009;155:2306–19.
- Tennstedt T, Szczepanowski R, Braun S, Pühler A, Schlüter A. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. FEMS Microbiol Ecol 2003;45: 239–52.
- USEPA. National primary drinking water regulations: ground water rule; final rule; 40 CFR Parts 9, 141 and 142, 71Washington DC: Federal Register, Environmental Protection Agency; 2006. p. 65574–660.
- Volkman H, Schwartz T, Bischoff P, Kirchen S, Obst U. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). J Microbiol Methods 2004;56:277–86.
- Wang Z, Zhang XX, Huang K, Miao Y, Shi P, Liu B, et al. Metagenomic profiling of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in a tannery wastewater treatment plant. PLoS One 2013;8:e76079.
- Wasył D, Hoszowski A, Zjac M, Szulowski K. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. Front Microbiol 2013;4:221.

4.2. CAPÍTULO 2:

Persistencia de los genes de resistencia a antibióticos en las fracciones de bacteria y bacteriófagos en agua residual.

Persistencia de los genes de resistencia a antibióticos en las fracciones de bacteria y bacteriófagos en agua residual.

Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater

Autores: **William Calero-Cáceres**, Maite Muniesa.

Revista: Water Research, 2016, 95, pp 11-18.

RESUMEN

Introducción

El desarrollo de resistencias a antibióticos es un fenómeno evolutivo común, el cual se ha visto acelerado por el uso y abuso de antibióticos, así como por la presencia de antibióticos en diferentes ambientes. Deficientes condiciones sanitarias, ineficiencia o ausencia de tratamiento de aguas residuales, así como problemas en el control de infecciones veterinarias y humanas han estimulado la generación, y posterior diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos (EFSA, 2015; World Health Organization, 2014).

La presencia de ARGs es abundante en ambientes acuáticos con diversos grados de contaminación fecal (Li et al., 2015; Rodríguez-Mozaz et al., 2014; Xu et al., 2014). La presencia de ARGs en estos ambientes representa un desafío, ya que es necesario evaluar si mantienen su actividad biológica y pueden ser transmitidos por transferencia genética. A pesar de su ocurrencia, los ARGs no están incluidos en el análisis de riesgos de agua de diversos orígenes (Spanish Government, 2007).

En general, los procesos de tratamiento de aguas residuales reducen de manera significativa los microorganismos presentes en el agua residual, (Lucena et al., 2004; Marín et al., 2015). Sin embargo, una considerable cantidad de bacterias resistentes a antibióticos (ARBs: del inglés *antibiotic resistant bacteria*) son aisladas en aguas depuradas (Guardabassi et al., 2002; Huang et al., 2012; LaPara et al., 2011). Además, bajo determinadas condiciones de tratamiento, la concentración de ARBs, y consecuentemente de ARGs, podría incrementarse (Czekalski et al., 2012; Y. Zhang et al., 2009).

Estudios preliminares han evaluado la persistencia de los ARGs en bacterias por medio de diferentes procesos de desinfección. De acuerdo con Auerbach et al., 2007, la radiación UV no influencia el número de genes de resistencia a tetraciclina *tet^R*. En contraste, en otras investigaciones donde usaron diferentes

concentraciones de cloro (Yuan et al., 2015) o altas dosis de UV, superiores a 4000 o 124,770 J/m² (McKinney & Pruden, 2012; Zhuang et al., 2014) observaron un efecto significativo en los niveles de actividad de los ARGs en aguas residuales. Sin embargo, a pesar de esta reducción significativa, los números finales de ARGs continuaban siendo altos después del tratamiento.

Estudios recientes resaltan el rol de los bacteriófagos como vectores de movilización de ARGs en el medio ambiente, de acuerdo a su abundancia en aguas residuales humanas y animales, aguas superficiales y lodos (Calero-Cáceres et al., 2014; Colomer-Lluch et al., 2014; Marti et al., 2014b). Sin embargo, no existe información acerca de cómo los procesos de desinfección e inactivación pueden afectar a los ARGs presentes en la fracción de bacteriófagos, los cuales son conocidos por su elevada persistencia frente a tratamientos fisicoquímicos (Allué-Guardia et al., 2012; Cantalupo et al., 2011; Wommack et al., 1996).

Objetivos

En el presente estudio se planteó:

- Evaluar la persistencia de ARGs (*sul1*, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}) en la fracción bacteriana y fágica, frente a diferentes procesos de desinfección
- Evaluar la persistencia de ARGs en ambas fracciones en mesocosmos que simule procesos de inactivación natural.

Resultados y discusión

La tabla 2 del artículo (pg. 16) muestra un resumen general de los valores de ARGs al tiempo inicial y final de los experimentos, en paréntesis se encuentra la desviación estándar.

El efecto de la temperatura y pH fue evaluado durante 43 días, durante los cuales se observaron diferentes tendencias de inactivación (Figura 1 Pág. 13). A 4°C, con excepción del gen *bla*_{CTX-M-1} en la fracción bacteriana que se redujo 1 log₁₀, el resto de valores de todos los parámetros se mantuvieron constantes. En cambio, a 22°C y 37°C se observó una inactivación general para todos los ARGs en la fracción bacteriana. En la fracción fágica no se observaron diferencias significativas en los niveles de ARGs a las tres temperaturas (t-Student, P <0.05).

La influencia del pH (Figura 1 Pág. 13) no causó reducciones significativas en la fracción bacteriana, en donde se observaron reducciones inferiores a 1 log₁₀. En

la fracción de bacteriófagos, a pH 3 se observó una reducción altamente significativa, y causó grandes reducciones en todos los genes. A pH 7 y 9 no se observaron diferencias ($P < 0.05$).

Cuando las muestras fueron sometidas a tratamiento técnico a 60°C y 80°C, *E. coli* fue completamente inactivada, mientras que los colifagos somáticos (SOMCPH: del inglés *somatic coliphages*) fueron afectados en menor grado, ya que sufrieron una menor reducción (Figura 2 Pág. 13). Esto confirma la elevada persistencia de los fagos en comparación a las bacterias, como se ha descrito previamente (Durán et al., 2003; Durán et al., 2002; Lee & Sobsey, 2011; Moce-Llivina et al., 2003). Las densidades de ARGs se mantuvieron constantes durante el experimento, sin embargo se observó una moderada pero significativa reducción en la fracción bacteriana ($P < 0.01$), pero no significativa en la fracción de bacteriófagos ($P < 0.05$).

Durante el tratamiento de cloración (10 ppm cloro libre), después de 3 minutos, *E. coli* fue totalmente inactivada. Se redujo la densidad de SOMCPH $\geq 1 \log_{10}$ PFU después de 30 minutos. Se observó además una reducción altamente significativa de ARGs en la fracción bacteriana, sin embargo fue inferior a 1 \log_{10} para los tres ARGs en la fracción fágica, y no fue significativa ($P < 0.05$).

Después de 10 minutos de radiación UV (253.7 nm, 0.099-mW/cm²), *E. coli* y SOMCPH fueron totalmente inactivados. En contraste, se observó una reducción inferior para los ARGs. La inactivación en la fracción bacteriana fue igual o inferior a 2 \log_{10} unidades, por lo tanto significativa para todos los genes. No se observaron reducciones significativas en la fracción de bacteriófagos ($P < 0.05$).

Un mesocosmos abierto fue usado para evaluar el efecto de diferentes factores, simulando las condiciones naturales durante verano e invierno. En invierno, los valores de *E. coli* decrecieron por debajo del límite de detección después de 14 días. En contraste, la inactivación de SOMCPH fue más lenta (debajo de 4 $\log_{10}/25$ días). Esta tendencia se repitió a nivel de ARGs, en donde todos los genes en la fracción bacteriana decrecieron significativamente, mientras que en la fracción de bacteriófagos no se observaron cambios ($P < 0.05$). En verano se observó una inactivación mayor y más rápida en comparación al invierno. *E. coli* y SOMCPH decrecieron por debajo del límite de detección a los 15 y 20 días respectivamente. Mientras que en la fracción bacteriana, después de 42 días los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M-1} se encontraban por debajo del límite de detección y el gen *sul1* mostró una considerable reducción. Sin embargo, la fracción de bacteriófagos nuevamente permaneció sin alteración significativa (Fig. 3 pg. 15).

Considerando todos los tratamientos estudiados, la diseminación de ARGs en la fracción bacteriana puede ser minimizada en términos de viabilidad así como en

términos de estructura. El ADN liberado al medio ambiente, podría integrarse a otras células por medio de mecanismos de HGT, o bien degradarse (Nielsen et al., 2007; Pietramellara et al., 2009; Romanowski et al., 1992). De acuerdo a los resultados obtenidos, la inactivación natural podría ser suficiente para reducir significativamente los niveles de ARGs en la fracción bacteriana. Los otros tratamientos fisicoquímicos de inactivación otorgaron resultados discretos, tal como fue detallado en investigaciones relacionadas (Auerbach et al., 2007; McKinney & Pruden, 2012; Yuan et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Sin embargo, estos procesos de desinfección no influenciaron las densidades de ARGs en la fracción fágica. Aparentemente, la cápside confiere cierta protección al ADN en la mayoría de condiciones, con excepción del pH ácido. Esta inestabilidad de los bacteriófagos a pH bajo fue observada en estudios previos (Allué-Guardia et al., 2012; Jończyk et al., 2011; Kerby & Gowdy, 1949; Langlet et al., 2007; Sharp et al., 1946). En éstos, se observó la tendencia de los fagos a agregarse cuando el pH se encuentra cerca del punto isoeléctrico.

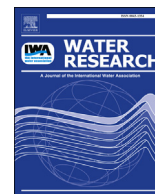
El uso de amplímeros cortos (≈ 100 pb) en la cuantificación de ARGs por qPCR podría ser discutido, ya que la longitud de los mismos podría no ser suficientemente representativa del ARG entero. Los fragmentos analizados podrían no estar completamente degradados por los diferentes tratamientos, pero fragmentos más largos podrían estar afectados y por consiguiente alterar la funcionalidad del gen. Sin embargo, las comparaciones realizadas entre las fracciones fágica y bacteriana muestran una considerable diferencia en persistencia, siendo esto un indicador de una mejor protección del ADN por parte de la cápside.

Conclusiones

- Los ARGs presentes en las fracciones fágica y bacteriana en agua residual persisten durante largos períodos en diferentes condiciones de temperatura y pH, así como frente a procesos de desinfección e inactivación natural.
- Los ARGs encontrados en la fracción fágica de las muestras muestran una elevada persistencia, en general mayor que los ARGs en la fracción bacteriana.
- La estabilidad de los ARGs puede representar una amenaza, debido a que incrementa la posibilidad de transferencia genética.
- Es necesaria la elaboración de políticas públicas con la finalidad de reducir la diseminación de ARGs en el medio ambiente, para evitar en parte la emergencia de nuevos clones resistentes

License Agreement

Reprinted from Water Research. Vol. 95. William Calero-Cáceres, Maite Muniesa. *Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater*. Pages 11-18. Copyright 2016. With permission from Elsevier.



Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater



William Calero-Cáceres, Maite Muniesa*

Department of Microbiology, University of Barcelona, Diagonal 643. Annex. Floor 0, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 November 2015

Received in revised form

22 February 2016

Accepted 1 March 2016

Available online 3 March 2016

Keywords:

Antibiotic resistance

Bacteriophages

Wastewater

Public health

ABSTRACT

The emergence and prevalence of antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment is a serious global health concern. ARGs from bacteria can be mobilized by mobile genetic elements, and recent studies indicate that phages and phage-derived particles, among others, could play a role in the spread of ARGs through the environment. ARGs are abundant in the bacterial and bacteriophage fractions of water bodies and for successful transfer of the ARGs, their persistence in these environments is crucial. In this study, three ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *sul1*) that naturally occur in the bacterial and phage fractions of raw wastewater were used to evaluate the persistence of ARGs at different temperatures (4 °C, 22 °C and 37 °C) and pH values (3, 7 and 9), as well as after various disinfection treatments (thermal treatment, chlorination and UV) and natural inactivation in a mesocosm. Gene copies (GC) were quantified by qPCR; then the logarithmic reduction and significance of the differences between their numbers were evaluated. The ARGs persisted for a long time with minimal reductions after all the treatments. In general, they showed greater persistence in the bacteriophage fraction than in the bacterial fraction. Comparisons showed that the ARGs persisted under conditions that reduced culturable *Escherichia coli* and infectious coliphages below the limit of detection. The prevalence of ARGs, particularly in the bacteriophage fraction, poses the threat of the spread of ARGs and their incorporation into a new bacterial background that could lead to the emergence of new resistant clones.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The development of antibiotic resistance is a common evolutionary process in microorganisms to ensure their survival against other microorganisms. Antibiotic resistance can appear through a process of spontaneous mutation or be acquired via vertical or, more commonly, horizontal gene transfer. The use and misuse of antibiotics over recent decades and the presence of certain concentrations of antibiotics in different environments could have accelerated this phenomenon by exerting a selective pressure. Poor sanitary conditions, inefficient (or the total absence of) sewage treatment, and deficiencies in the control of both human and veterinary infections stimulate the generation and further spread of antibiotic resistant determinants (EFSA-ECDC, 2015; World Health Organization, 2014). The unfortunate consequences are that an estimated 25,000 people in Europe (ECDC/EMEA, 2009) and 23,000 in America die every year because of antibiotic-resistant infections

(The White House, 2014).

Antibiotic resistance genes (ARGs) are abundant in water from different bodies of water with different levels of faecal pollution (Li et al., 2015; Rodriguez-Mozaz et al., 2014; Xu et al., 2014). One challenge we face is to evaluate whether the ARGs retain biological activity and therefore remain available to horizontal gene transfer mechanisms, which could lead to the emergence of new resistant clones. Despite their occurrence, detection of ARGs is not included in the analysis of the risk posed by water from different sources. In accordance with European regulations, water recovered from sewage only has to comply with different levels of quality concerning the presence of *Escherichia coli*, *Legionella*, *Taenia* and nematodes as biological parameters (BOE 1620, 2007).

Wastewater treatment processes normally result in significant reductions in the concentration of microorganisms present in sewage, prior to discharge (Lucena et al., 2004; Marín et al., 2015). However, a considerable amount of resistant bacteria are still found in treated sewage (Guardabassi et al., 2002; Huang et al., 2012; LaPara et al., 2011). In addition, under certain inactivating environmental conditions or disinfection treatment, the overall

* Corresponding author.

E-mail address: mmuniesa@ub.edu (M. Muniesa).

concentration of bacteria decreases, but the percentage of antibiotic resistant bacteria and consequently of ARGs in the total bacterial community could increase during wastewater treatment (Czekalski et al., 2012; Zhang et al., 2009).

Previous studies have evaluated the persistence of ARGs in bacteria following different disinfection processes: chlorination, UV irradiation and ozonation. According to Auerbach et al., 2007, UV irradiation does not affect the number of detectable *tet^R* gene types. In contrast, other authors using different chlorine concentrations (Yuan et al., 2015) or high UV doses up to 4000 or 124,770 J/m² (Zhuang et al., 2014; McKinney and Pruden, 2012), demonstrate a significant effect on the level of activity of ARGs in wastewater. However, despite ARGs being reduced significantly, a large number were still present after treatment.

Recent studies highlight the role of bacteriophage particles as ARG vehicles in the environment, in accordance with their abundance in human and animal wastewater, surface water and sludge (Calero-Cáceres et al., 2014; Colomer-Lluch et al., 2011, 2014b, 2014a; Marti et al., 2014, 2013). Phage particles containing ARGs enter these biomes from autochthonous bacteria or from the fecal source or pollution (Quirós et al., 2014). There is no information about how disinfection treatments and inactivation processes affect the ARGs present in the bacteriophage fraction, but bacteriophages are known to persist more than bacteria after disinfection procedures (Allué-Guardia et al., 2014; Cantalupo et al., 2011; Wommack et al., 1996). Here, we evaluate the presence of ARGs in the bacteriophage fraction and compare it with their presence in the bacterial fraction when affected by different environmental conditions, and also after different disinfection and natural inactivation processes.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Raw urban wastewater samples were collected between autumn 2014 and summer 2015 from the influent of a waste water treatment plant that serves approximately 500,000 people in the Barcelona metropolitan area. All the samples were collected in sterile containers, transported to the laboratory at 5 °C ± 2 °C within 2 h of collection and processed immediately for bacterial counts and further experiments. The samples were used as received for UV irradiation, temperature and pH stability, and natural inactivation; and were 1/10 diluted in deionized water for chlorination.

2.2. Bacterial strains and media

For the detection of *E. coli*, Chromocult[®] Coliform Agar (Merck, Darmstadt, Germany) was used (International Organization for Standardization, 2014). *E. coli* WG5 (ATCC 700078) was used as a host for the evaluation of somatic coliphages. Quality control procedures shadowed each experiment using phage ΦX174 (ATCC 13706-B1) as the reference material, previously prepared in accordance with the corresponding ISO standard 10705-2 (International Organization for Standardization, 2000). Luria-Bertani (LB) agar or broth was used for routine bacterial propagation to prepare the standards for qPCR assays.

2.3. Stability at different temperatures and pH values

Aliquots of wastewater were placed in sterile tubes at 4 °C, 22 °C, and 37 °C. For the pH assays, the medium was adjusted to pH 3, 7, and 9, using hydrochloric acid, 1 N, and sodium hydroxide, 1 N, and placed in sterile tubes at 4 °C. The samples were removed at days 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28 and 42, and the pH was verified after each

incubation time.

2.4. Inactivation experiments

Aliquots of wastewater or dilutions thereof were used for the inactivation experiments. For chlorination, we diluted the samples using deionized water, to 1/10. Then we treated them with 10 ppm chlorine supplied as sodium hypochlorite. Hypochlorite solution was calculated to provide the indicated amounts of total residual chlorine in the mixture as previously reported (Durán et al., 2003). The aliquots (50 mL) were removed after 1, 3, 5, 10 and 30 min. Residual chlorine was neutralized by the addition of sodium thio-sulphate. For thermal treatment, the tubes were placed into a water bath at 60 °C and 80 °C and were removed after 30 and 60 min. For the UV inactivation, an 8-W, germicidal UV lamp (model G30T8; 0.099-mW/cm² irradiance at a 253.7-nm wavelength; Sankyo Denki, Tokyo, Japan) was used. The lamp was warmed up for at least 15 min before starting the experiments. The UV dose was calculated using the equation $D = I \times T$, where D is the dose, T is the exposure time and I is the “fluence rate” (or intensity) of the lamp. The samples (10 mL) were statically placed in open petri dishes of 90 mm diameter at 10 cm from the lamp and were removed after 1, 5, 10 and 30 min that corresponded to estimated UV doses of 5.94, 29.7, 59.4, and 178.2 mJ/cm² at each time. The approach allowed comparison between microorganisms, as shown previously (Allué-Guardia et al., 2014).

To evaluate natural inactivation in a mesocosm, dialysis tubes (cutoff: 14 kDa) were filled with 1/2 diluted wastewater (50 mL). The tubes were sealed and placed in an outdoor artificial pond (60 m³; non-chlorinated water) protected by a cage, at a depth of 10 cm and were removed after 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days (Fig. 3A). The experiments were carried out in winter 2015 (December–February) and summer 2015 (June–August).

Temperatures and irradiation rates were obtained from the regional weather forecast service database (Servei Meteorològic de Catalunya, Spain).

2.5. Microbiological parameters

For *E. coli* enumeration, serial decimal dilutions of the wastewater samples were filtered through 0.45 µm-pore-diameter membrane filters (47 mm, white gridded, EZ-Pak[®] Membrane Filters, Millipore, Bedford, MA). The membranes were placed upside up on Chromocult[®] Coliform Agar for *E. coli* and incubated at 44 °C for 18 h, following the standard procedure ISO 9308-1:2014 (International Organization for Standardization, 2014). To evaluate somatic coliphages, wastewater samples were filtered through low-protein-binding 0.22 µm-pore-size membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA), the filtrates were decimal diluted and assayed using the double agar method following the standard procedure ISO 10705-2 (International Organization for Standardization, 2000). All the samples were analysed in triplicate.

2.6. DNA extraction

To extract bacterial DNA from the wastewater samples, 25 mL of each sample was filtered through 0.45 µm pore-diameter membrane filters (47 mm, white gridded, EZ-Pak[®] Membrane Filters; Millipore). The membranes were rinsed twice in 10 mL PBS filtered through the membranes to reduce viral particles (Muniesa et al., 2005). The bacterial content of the membranes was suspended in LB broth. The suspensions were centrifuged at a 3,000 g for 10 min and the pellet was suspended in 200 µL of LB. Bacterial DNA was extracted using Macherey-Nagel NucleoSpin[®] Blood (Düren, Germany), following the manufacturer's instructions.

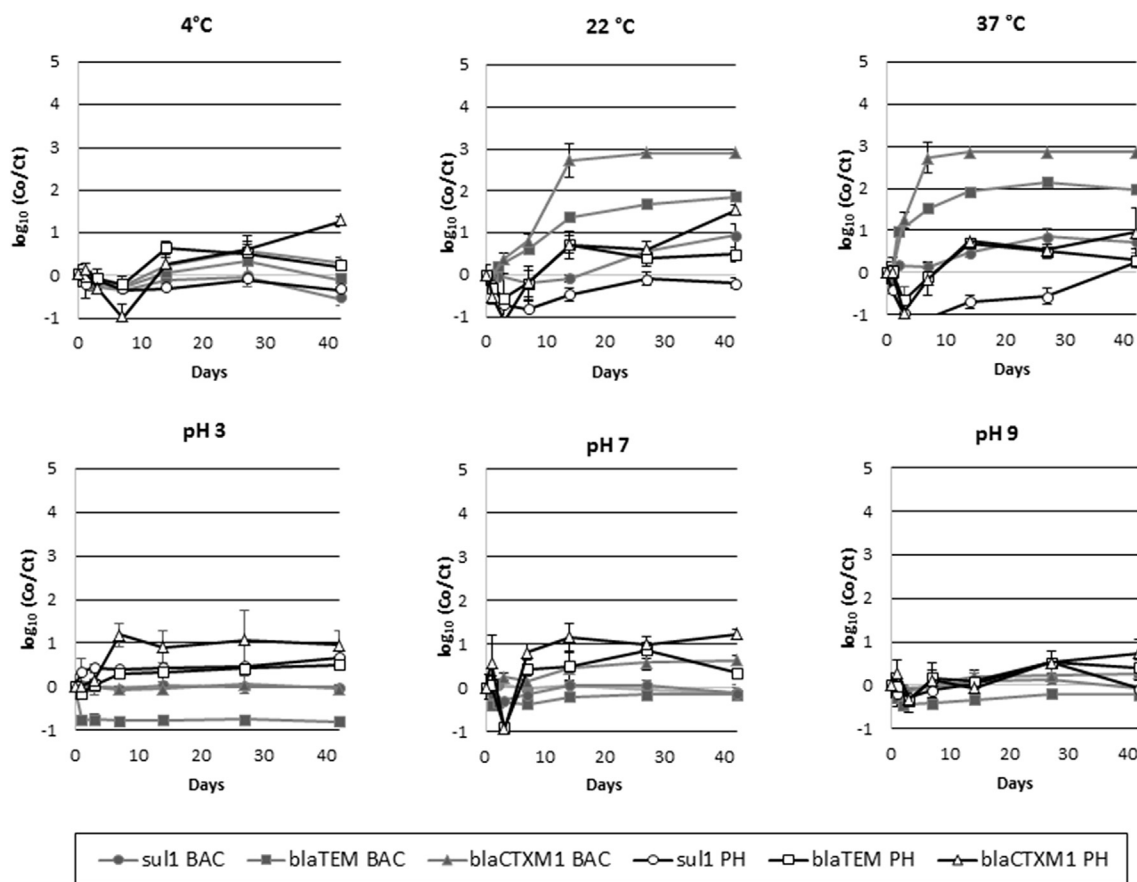


Fig. 1. Stability of ARGs in the bacterial (BAC) and bacteriophage (PH) fractions of wastewater at different temperatures and pH values after 42 days. ARG variations are presented as differences in ARG concentration (\log_{10} of GC/mL) between the beginning of the experiment at time 0 (Co) and each subsequent measurement time (Ct).

Phage DNA was extracted using an internal protocol (Colomer-Lluch et al., 2011) based on filtration of the sample through low-protein-binding 0.22 μm -pore-size membrane filters (Millipore). The filtrate was treated with 1:10 (v:v) chloroform to eliminate the possible presence of vesicles containing DNA. The chloroform-treated samples were vortexed and centrifuged at 16,000 g for 5 min. The supernatant was DNase treated (100 units/mL of the phage lysate at 37 °C for 1 h), to eliminate any non-encapsidated DNA that might be present in the samples. The DNase was heat inactivated at 80 °C for 10 min. Phage DNA was extracted from the phage particles by proteinase K digestion and 1:1 phenol-chloroform (v:v) treatment. The concentration and purity of the phage DNA extracted was determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific S.L., Barcelona). To eliminate any non-packaged DNA that could be present in the sample, the protocol for DNA extraction from the phage fraction of the samples was always accompanied by several controls (Colomer-Lluch et al., 2014a).

2.7. qPCR procedures

To quantify ARGs in the DNA of the bacterial and phage fractions of the samples, TaqMan qPCR assays were performed using the oligonucleotides given in Table 1, and standards and conditions described previously (Calero-Cáceres et al., 2014; Colomer-Lluch et al., 2011). Controls for inhibition and DNA isolation were as previously described (Colomer-Lluch et al., 2014a). The qPCR assays were performed under standard conditions in a Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems). All the samples were assayed in

duplicate, as were the standards, and positive and negative controls (described below). The number of gene copies (GC) was defined as the average of the duplicate data obtained.

2.8. Statistical analysis

Data were compiled and statistical tests performed using Microsoft Office Excel Professional 2010 (Microsoft). Student's t-test with paired differences was used to evaluate the differences between the treatments; evaluations were based on 1% and 5% of significance levels.

3. Results

3.1. Effect of pH and temperature

Storage at 4 °C, 22 °C and 37 °C for 43 days revealed different inactivation rates. At 4 °C, the values of all the parameters were preserved (Fig. 1) and more than 1 \log_{10} unit of inactivation for *bla*_{CTX-M-1} in bacterial DNA was only observed after 43 days. Greater inactivation was observed when comparing ARGs in the bacterial and phage DNA fractions at 22 °C and 37 °C. Inactivation was in general higher for all ARGs in the bacterial fraction than in the phage fraction at both 22 °C and 37 °C (Fig. 1). The inactivation of ARGs in the bacteriophage fraction did not show any significant differences between the two temperatures (Student's t-test, $P > 0.05$).

The three different pH values did not cause a significant ($P > 0.05$) reduction of bacterial ARGs, which always showed

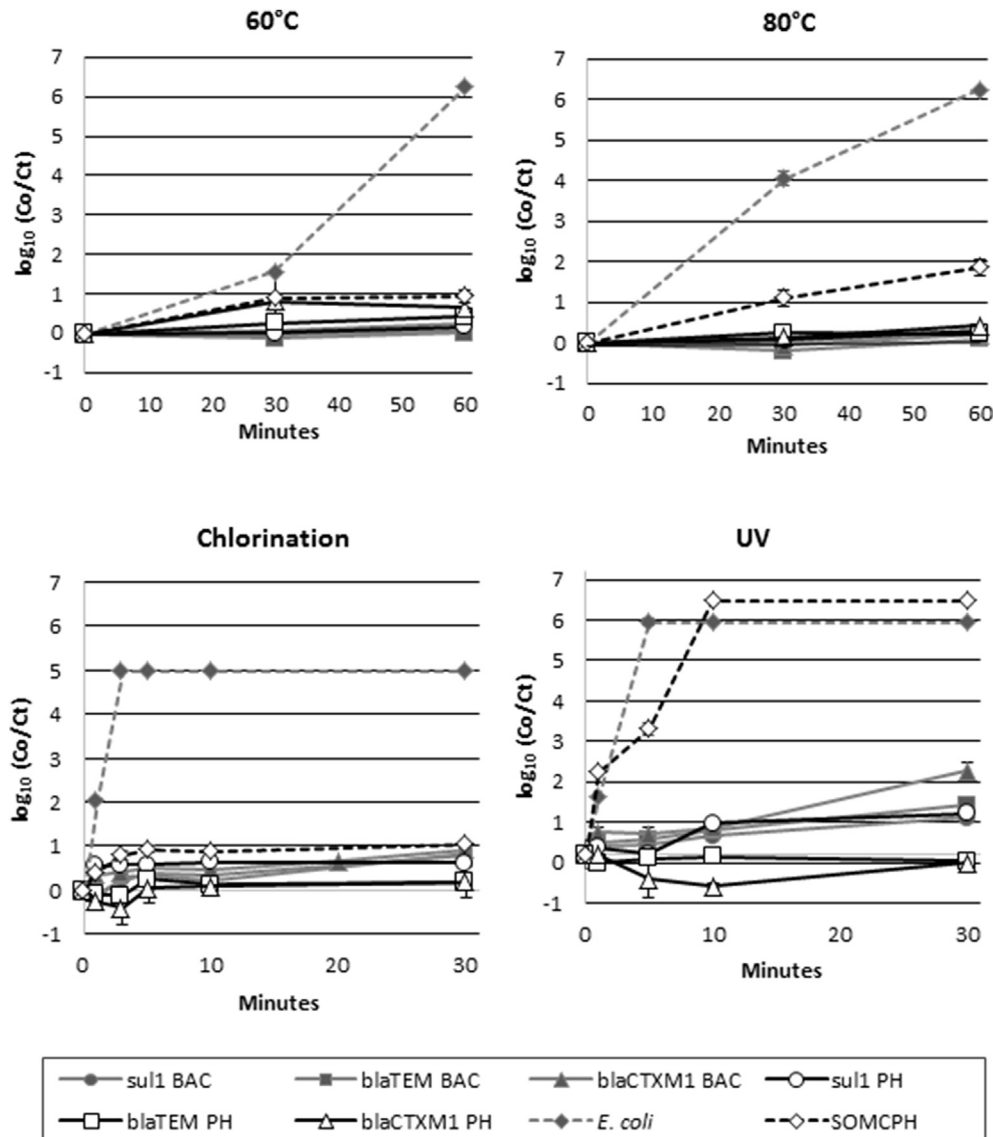


Fig. 2. Influence of thermal treatment (60 °C and 80 °C), chlorination and UV irradiation on the stability of ARGs in the bacterial (BAC) and bacteriophage (PH) fractions of the wastewater samples. ARG variations are presented as differences in ARG concentration (\log_{10} of GC/mL) between the beginning of the experiment at time 0 (C_0) and each subsequent measurement time (C_t). ARG inactivation is compared with values of culturable *E. coli* (\log_{10} CFU/mL) and infectious somatic coliphages (SOMCPH) (\log_{10} PFU/mL).

inactivation equal to or below 1 \log_{10} units (Fig. 1, Table 2). *bla*_{CTX-M-1} was the most inactivated gene and since it was the gene showing the lowest densities in the samples, this could account for the largest reductions. In the bacteriophage fraction, the effect of pH 3 was highly significant ($P < 0.05$) (Table 2) and caused the largest reductions in all genes. At pH 7 and pH 9, no significant differences were found.

At some points, a negative reduction (increase) in ARGs was observed (Fig. 1). This increase was observed just after t_0 , and was attributed to some regrowth of the bacteria or propagation of the viruses during the first few days of the experiments.

3.2. Disinfection processes

In these experiments, in addition to the three ARGs, culturable *E. coli* and infectious somatic coliphages those that infect *E. coli* strain WG5 via the cell membrane (Anonymous, 2000) were used as controls of viable organisms.

3.2.1. Thermal treatment

When treated at 60 °C and 80 °C for 60 min, *E. coli* was completely inactivated; while somatic coliphages were affected much less. This confirmed the greater persistence of phages compared to that of bacteria, as previously reported (Mocé-Ilivina et al., 2003). The ARG numbers were maintained throughout the experiments (Fig. 2). Nevertheless, when comparing ARG values between the two fractions it was observed that a moderate but significant reduction ($P < 0.01$) occurred in the bacterial fraction, but no significant ($P > 0.05$) inactivation took place in the bacteriophage fraction (Fig. 2, Table 2).

3.2.2. Chlorination

After 3 min of contact, 10 ppm free chlorine completely inactivated 4.89 \log_{10} CFU/mL of *E. coli* (Fig. 2); while it reduced somatic coliphages by ≥ 1.00 \log_{10} PFU after 30 min of treatment. A highly significant inactivation of the ARGs in the bacterial fraction was observed (Table 2), although it was below 1 \log_{10} unit for all three ARGs. In contrast, inactivation of ARGs in the bacteriophage fraction

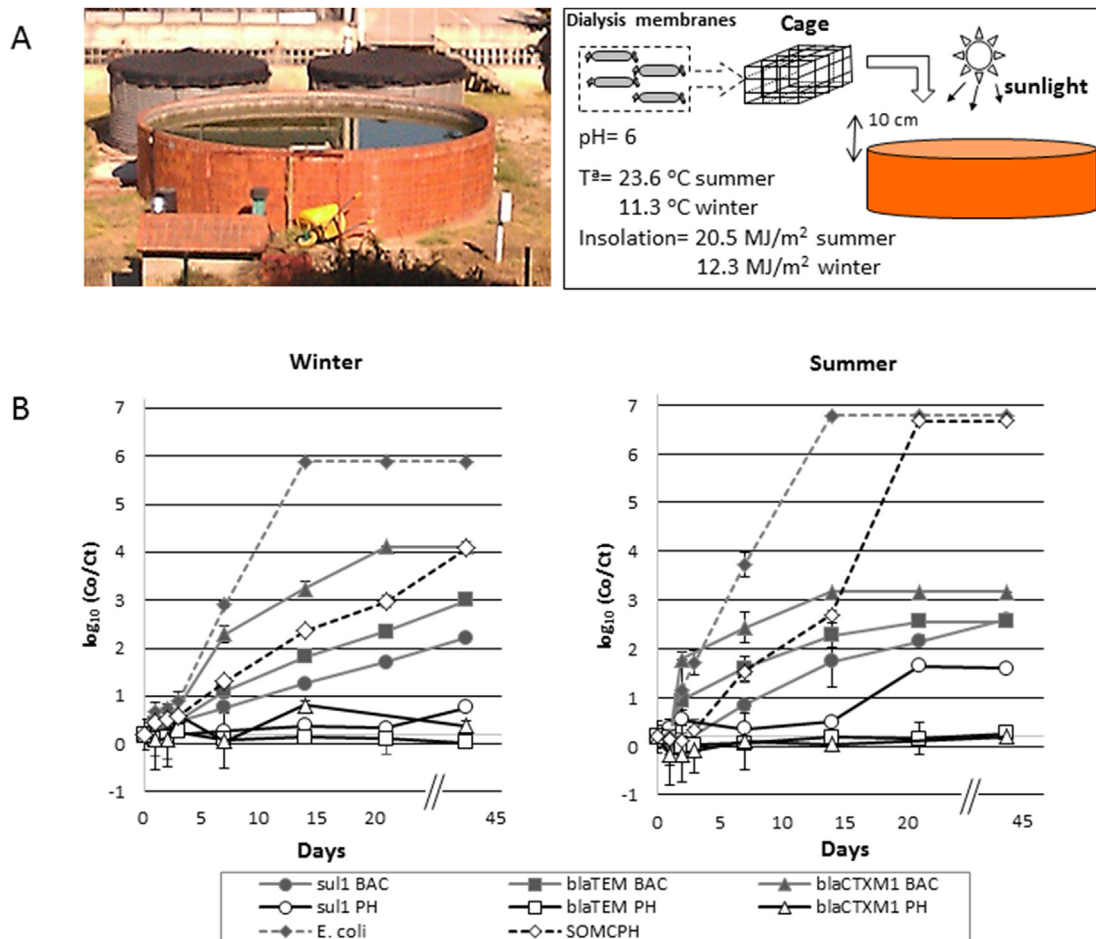


Fig. 3. Influence of natural inactivation of ARGs in the bacterial (BAC) and bacteriophage (PH) fractions of wastewater placed in a mesocosm in winter and summer. **A:** Schematic representation of the mesocosm showing the average pH, temperature and irradiation. **B:** ARG variations presented as differences in ARG concentrations (\log_{10} of GC/mL) between the beginning of the experiment at time 0 (C_0) and each subsequent measurement time (C_t). ARG inactivation is compared with values of culturable *E. coli* (\log_{10} CFU/mL) and infectious somatic coliphages (SOMCPH) (\log_{10} PFU/mL).

Table 1
Oligonucleotides used in this study.

Target gene	Oligonucleotide	Sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)	Reference
<i>bla</i> _{TEM}	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	85	Lachmayr et al., 2009
	LP	TGCATAATTCTTACTGTCATG		
	TaqMan TEM Probe	FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ		
<i>bla</i> _{CTX-M-1-group}	UP CTX-M	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	Colomer-Lluch et al., 2011
	LP CTX-M	ACATCGCGACGGCTTCT		
	TaqMan CTX-M Probe	FAM-TCGTGCGCCGCTG- MGBNFQ		
<i>sul1</i>	UP	CCGTGGCCTTCTGTAAAG	67	Calero-Cáceres et al., 2014
	LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT		
	TaqMan <i>sul1</i> probe	FAM-CGAGCCTTGGCGGG-MGBNFQ		

UP: upper primer, LP: lower primer.

was not significant ($P > 0.05$) (Table 2).

3.2.3. UV irradiation

After 5 and 10 min of UV treatment, culturable *E. coli* and somatic coliphages, respectively, were not detected. In contrast, a lower reduction was observed for ARGs (Fig. 2). Inactivation of ARGs in the bacterial DNA fraction was equal to or below 2 \log_{10} units, but still significant for all genes (Table 2). In contrast, no significant reduction ($P > 0.05$) was observed in the bacteriophage fraction for any of the three ARGs (Table 2).

3.3. Natural inactivation

An open-air mesocosm was used to evaluate the composite effect of different factors mimicking natural conditions. Among these, the most variable were sun light and temperature; with changes in both air and water temperature, and sun irradiation between summer and winter (Table 3). Only small variations of pH were detected in the mesocosm used. Since the samples were sealed in dialysis tubes (Fig. 3A), no grazing effect was expected.

In winter and after 14 days, *E. coli* numbers decreased by more than 5.6 \log_{10} units (Fig. 3B), and fell below the limit of detection. In

Table 2
Raw values of each ARG detected in the bacterial and bacteriophage fraction at the initial time (t0) and at the time at the end of the experiment (tf). In brackets SD. * values with a significant (95% confidence interval (CI), P < 0.05).or ** values with a high significant (CI 95–99%, P < 0.01). Difference between t0 and tf.

Treatment	<i>sul1</i>				<i>bla_{TEM}</i>				<i>bla_{CTX-M-1}</i>			
	Bacteria log ₁₀ GC/mL		Bacteriophage log ₁₀ GC/mL		Bacteria log ₁₀ CG/mL		Bacteriophage log ₁₀ CG/mL		Bacteria log ₁₀ CG/mL		Bacteriophage log ₁₀ CG/mL	
	t0	tf	t0	tf	t0	tf	t0	tf	t0	tf	t0	tf
pH 3	8.25 (0.01)	8.26 (0.07)	3.89 (0.10)	3.22** (0.02)	5.47 (0.08)	6.27 (0.01)	5.22 (0.09)	4.72** (0.01)	4.65 (0.09)	4.69 (0.09)	3.99 (0.29)	3.03** (0.34)
pH 7	7.71 (0.04)	7.83 (0.16)	3.89 (0.10)	4.03 (0.12)	5.47 (0.08)	5.64 (0.05)	5.22 (0.09)	4.90 (0.12)	4.50 (0.09)	3.89 (0.12)	3.99 (0.29)	2.78 (0.11)
pH 9	7.72 (0.01)	7.80 (0.18)	3.89 (0.10)	3.97 (0.20)	5.47 (0.08)	5.68 (0.11)	5.22 (0.09)	4.81 (0.18)	4.37 (0.16)	4.09 (0.08)	3.99 (0.29)	3.25 (0.32)
4 °C	7.12 (0.66)	7.66 (0.15)	3.82 (0.11)	4.15 (0.12)	5.20 (0.11)	5.31 (0.14)	3.89 (0.11)	3.67 (0.20)	4.01 (0.13)	3.71 (0.14)	3.73 (0.26)	2.46 (0.11)
22 °C	7.12 (0.66)	6.18* (0.25)	3.82 (0.11)	4.02 (0.12)	5.20 (0.11)	3.34* (0.11)	3.89 (0.11)	3.39 (0.17)	4.20 (0.09)	1.76* (0.12)	3.73 (0.26)	2.18 (0.10)
37 °C	7.12 (0.66)	6.39* (0.17)	3.82 (0.11)	3.57 (0.31)	5.20 (0.11)	3.22* (0.08)	3.89 (0.11)	3.59 (0.18)	4.15 (0.12)	1.49* (0.47)	3.73 (0.26)	2.77 (0.57)
Thermal 60 °C	7.56 (0.15)	7.48 (0.08)	4.11 (0.17)	3.95 (0.06)	5.57 (0.11)	5.61 (0.03)	5.85 (0.24)	5.44 (0.15)	4.30 (0.10)	4.04 (0.15)	5.24 (0.06)	4.60 (0.27)
Thermal 80 °C	7.56 (0.15)	7.33* (0.10)	4.11 (0.17)	3.84 (0.06)	5.57 (0.11)	5.49* (0.02)	5.85 (0.24)	5.65 (0.30)	4.30 (0.10)	4.06 (0.05)	5.24 (0.06)	4.61 (0.23)
UV	6.73 (0.04)	5.82* (0.08)	3.57 (0.11)	2.55 (0.17)	5.31 (0.06)	4.08* (0.06)	4.54 (0.08)	4.69 (0.12)	5.39 (0.17)	3.32* (0.21)	2.48 (0.10)	2.69 (0.14)
Chlorination	6.92 (0.03)	6.13** (0.03)	3.44 (0.04)	2.81 (0.08)	4.97 (0.17)	4.12** (0.20)	3.15 (0.20)	2.96 (0.02)	5.36 (0.40)	4.44** (0.10)	1.83 (0.09)	1.64 (0.37)
Nat.Inact Winter	7.89 (0.07)	5.87** (0.07)	4.50 (0.08)	3.95 (0.06)	5.48 (0.15)	<2.85** (-)	4.45 (0.11)	4.62 (0.16)	4.66 (0.14)	<0.75** (-)	2.83 (0.33)	2.64 (0.11)
Nat.Inact Summer	7.95 (0.09)	3.13** (0.49)	5.03 (0.38)	3.81 (0.19)	5.21 (0.24)	<2.85** (-)	4.79 (0.13)	4.77 (0.15)	3.72 (0.15)	<0.75** (-)	2.93 (0.33)	2.74 (0.36)

Table 3
Temperature and global daily irradiance (RS24h) during natural inactivation (Information provided by Catalunya Forecast Service © Meteocat 2015).

	Air temperature (°C)			Pond water temperature (°C)			RS24h (MJ/m ²)		
	Max	Min	Mean	Max	Min	Mean	Max	Min	Mean
Winter	23.0	3.7	11.3	11.7	3.8	7.2	19.0	2.8	12.3
Summer	31.0	19.0	23.6	30.8	16.9	21.8	26.0	15.0	20.5

contrast, the decay of somatic coliphages was slower (3.89 log₁₀ units after 25 days). This trend was also observed when analysing ARGs, since all of the genes declined significantly in the bacterial fraction, but in the bacteriophage fraction no significant changes (P > 0.05) were detected (Fig. 3; Table 2).

In summer, with higher temperatures and irradiation, we observed faster decay of viable *E. coli* and somatic coliphages, which fell below the limit of detection after 15 and 20 days respectively. This trend was also observed for ARGs in the bacterial fraction; which, after 42 days, fell below the limit of detection for *bla_{TEM}* and *bla_{CTX-M-1}* and close to it for *sul1*. However, the ARGs in the bacteriophage fraction did not show significant decay (Fig. 3B, Table 2).

4. Discussion

Some ARG transfer mechanisms do not require direct cell-to-cell contact, since the mobile genetic element harbouring the bacterial DNA can be spread outside the donor cell and stretch out to reach a suitable recipient. So, the persistence of such an element in the extracellular milieu is critical for successful transfer of the ARG. Some DNA fragments, including plasmids, could be released from the donor cell and become incorporated into the recipient by natural transformation, a mechanism that does not require physical cell contact, but natural transformation does not seem to be widespread among bacterial species (Syvanen and Kado, 2002). Moreover, the stability of naked DNA, either free DNA or plasmids, in the extracellular environment will be compromised by several environmental factors (Nielsen et al., 2007; Pietramellara et al., 2009; Romanowski et al., 1992).

A protective coating during extracellular transport would at least guarantee longer persistence and provide increased chances of the ARG reaching a recipient cell that could acquire the resistance. Thus, the resistance of gene transfer vehicles to environmental factors and their stability when faced with different inactivation conditions could play an important role in the

successful horizontal gene transfer of ARGs; and of other genes.

For this reason this study focuses on bacteriophages as an unexplored vehicle of ARG mobilization; or more exactly, on phage-derived particles, since they could all be isolated by the methods used here (as well as by using metagenome analysis of the viromes of different environments, including wastewater) (Aw et al., 2014; Norman et al., 2015). The prevalence of ARGs in bacterial DNA is also evaluated here, because even if bacterial cells are not culturable, including if they are non-viable, their DNA could remain circulating for some time and its prevalence could be sufficient for it to spread.

In view of our results, ARGs, and among them, those packaged within phage particles, showed the highest persistence to all treatments that do not critically damage their protein capsid. The higher prevalence of phages compared to that of bacteria has been reported previously on many occasions. The results of this study closely match those of studies of infectious viruses and phages used as indicators of the effectiveness of different treatments, such as chlorination, thermal treatment or natural inactivation (Durán et al., 2002, 2003; Lee and Sobsey, 2011; Mocé-llivina et al., 2003; Yuan et al., 2015). Those studies aimed to evaluate microorganisms occurring in raw sewage when it is treated with different processes. Nevertheless, numerous studies highlight the differences that should be considered between the infectivity of the organisms and their molecular detection; since detection by molecular methods, by itself, does not provide any information about the viability and infectivity of a given pathogen or about the host they infect (Aw and Rose, 2012; Botes et al., 2013).

When studying ARGs, the situation is more complex. The main concern is obviously the presence of resistant viable bacteria that cause serious problems in clinical settings. However, together with this is concern regarding the apparently uncontrollable spread of resistance genes that suddenly appear a short time after the introduction of a new antibiotic. There seems to be an alarming capacity to transfer resistances among the bacterial population (Cantón, 2009; Davies, 1997). These observations suggest there may be a pool of ARGs present in different environments that could (potentially) be integrated into a new host (Cantón, 2009). When the environment is aggressive, due to natural or artificial factors, the stability of the genes is important to ensure this mobilization and subsequent integration. Moreover, studies to discover the best treatment for reducing ARGs could be a useful first step in blocking their transfer.

Considering all the treatments studied, the spread of ARGs from the bacterial fraction can be minimized, since cells are sensitive to

many treatments in terms of viability, but also in terms of structure. Clearly, once cells break, the DNA remains free in the environment. Even if under certain environmental conditions free DNA could remain stable for a certain period and be incorporated by transformation, as described above, free DNA is quite susceptible to environmental degradation (Nielsen et al., 2007; Pietramellara et al., 2009; Romanowski et al., 1992). Thus, the multifactorial inactivation produced in natural systems should be enough to reduce the GC. Other treatments do not break the cell so clearly and therefore only discrete reductions were observed by chlorination, UV or thermal treatment (Auerbach et al., 2007; McKinney and Pruden, 2012; Yuan et al., 2015; Zhang et al., 2015). Nevertheless, when evaluating the results of previous studies it should be considered that the application of different intensities of the treatments could account for different reductions.

However, these disinfection processes do not affect the densities of ARGs in the phage fraction. The capsid apparently provides the DNA with enough protection in almost all conditions; perhaps with the exception of low pH. The reported instability of the bacteriophage capsid at low pH values (<4) (Jończyk et al., 2011; Kerby and Gowdy, 1949) could be the main cause of the differences between results at pH 3 and at pH 7 or 9. This is also in agreement with the results of previous studies with other phages (Allué-Guardia et al., 2012; Langlet et al., 2007; Sharp et al., 1946). In those studies, the phages tended to show aggregation when the pH was less than or equal to the phage isoelectric point. Neither were the genes contained within the phage particles significantly reduced when subjected to the same, or very similar, treatments to those used here (Allué-Guardia et al., 2012, 2014).

Inactivation of phages in a mesocosm provides the opportunity for simultaneous analysis of different factors. Among these factors, grazing could probably be excluded, because of the method used. Furthermore, although protozoa grazing could have an effect on bacteria, it does not seem to affect viruses (Gonzalez et al., 1990). Since pH was not a variable factor in the pond used in our experiments, light and temperature seemed to us the most plausible factors influencing inactivation. The differences observed between winter and summer, with most microorganisms becoming inactivated more quickly in summer, provide some insight. Although the main differences in the physical factors between summer and winter were temperature and solar irradiation, the temperature was not a highly influential factor in terms of inactivation. Although our UV experiments cannot be compared with solar UV doses, UV light is a recognized inactivating factor (Davies-Colley et al., 1999; Lee and Sobsey, 2011). Nevertheless, the phage DNA fraction was not greatly affected by natural inactivation.

It could be argued that the detection of a short amplicon by the TaqMan qPCR in the assays conducted in this study is not completely representative of the total ARG length. One might further claim that even if the ca 100 bp fragment (Table 1) was not completely degraded, the total gene could be affected and consequently inactivated. Be that as it may, the comparison between the two fractions (phage and bacteria) shows that there is a significant difference in persistence; and this is indicative of better protection of DNA by the protein coating, which means there is potentially an increased threat from ARG transference. Moreover, phage capsids could display a potential for DNA transfer between different cells, and even between different bacterial genera (Evans et al., 2010; Khan et al., 2002), thereby enabling wider dissemination.

5. Conclusions

- ARGs that naturally occur in bacterial and bacteriophage fractions of wastewater persist for long periods at different

temperatures and pH values, despite some disinfection processes and suffering natural inactivation.

- The ARGs found in the bacteriophage fraction of the samples, identified because they are coated by a protein capsid, show longer persistences.
- The stability of such ARGs poses a threat, because by increasing the period of stability in the environment, the possibility of the gene being transferred to a suitable host also increases.
- Policies aimed at eliminating ARGs from some natural environments would reduce the spread of ARGs and could halt the emergency of new clones.

Acknowledgements

This study was supported by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043), by the Ramon Areces Foundation and the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB). W. Calero-Cáceres is recipient of PhD fellowship SENESCYT 2012 from the Republic of Ecuador Government.

References

- Allué-Guardia, A., Jofre, J., Muniesa, M., 2012. Stability and infectivity of cytolethal distending toxin type V gene-carrying bacteriophages in a water mesocosm and under different inactivation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5818–5823. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00997-12>.
- Allué-Guardia, A., Martínez-Castillo, A., Muniesa, M., 2014. Persistence of infectious Shiga toxin-encoding bacteriophages after disinfection treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2142–2149. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.04006-13>.
- Anonymous, 2000. ISO 10705-2: Water Quality. Detection and Enumeration of Bacteriophages -part 2: Enumeration of Somatic Coliphages.
- Auerbach, E.A., Seyfried, E.E., McMahon, K.D., 2007. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Res.* 41, 1143–1151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.045>.
- Aw, T.G., Howe, A., Rose, J.B., 2014. Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater. *J. Virol. Methods* 210, 15–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviro.2014.09.017>.
- Aw, T.G., Rose, J.B., 2012. Detection of pathogens in water: from phylochips to qPCR to pyrosequencing. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 422–430. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.016>.
- Boletín Oficial del Estado, 2007. Real Decreto 1620/2007 de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. BOE núm 294 (21092), 46932–46946.
- Botes, M., De Kwaadsteniet, M., Cloete, T.E., 2013. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 91–108. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-012-6399-3>.
- Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., Muniesa, M., 2014. Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7602–7611. <http://dx.doi.org/10.1021/es501851s>.
- Cantalupo, P.G., Calgua, B., Zhao, G., Hundesa, A., Wier, A.D., Katz, J.P., Grabe, M., Hendrix, R.W., Girones, R., Wang, D., Pipas, J.M., 2011. Raw sewage harbors diverse viral populations. *MBio* 2, e00180–11. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00180-11>.
- Cantón, R., 2009. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (Suppl. 1), 20–25. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x>.
- Colomer-Lluch, M., Calero-Cáceres, W., Jebri, S., Hmaied, F., Muniesa, M., Jofre, J., 2014a. Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environ. Int.* 73, 167–175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.07.003>.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2014b. Quinolone resistance genes (qnrA and qnrS) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1265–1274. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt528>.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2011. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* 6.
- Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., Bürgmann, H., 2012. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into lake Geneva. *Switz. Front. Microbiol.* 3, 106. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00106>.
- Davies, J.E., 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found. Symp.* 207, 15–27 discussion 27–35.
- Davies-Colley, R.J., Donnison, A.M., Speed, D.J., Ross, C.M., Nagels, J.W., 1999. Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilisation ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water Res.* 33, 1220–1230.

- [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00321-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00321-2).
- Durán, A.E., Muniesa, M., Mocé-Llivina, L., Campos, C., Jofre, J., Lucena, F., 2003. Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination. *J. Appl. Microbiol.* 95, 29–37. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.t01-1-01948.x>.
- Durán, A.E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F., Jofre, J., 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* 92, 338–347.
- ECDC/EMA, 2009. The bacterial challenge: time to react [WWW document]. *Eur. Cent. Dis. Prev. Control.* http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf.
- EFSA-ECDC, 2015. EU Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2013.
- Evans, T.J., Crow, M.A., Williamson, N.R., Orme, W., Thomson, N.R., Komitopoulou, E., Salmond, G.P.C., 2010. Characterization of a broad-host-range flagellum-dependent phage that mediates high-efficiency generalized transduction in, and between, *Serratia* and *Pantoea*. *Microbiology* 156, 240–247. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.032797-0>.
- Gonzalez, J.M., Sherr, E.B., Sherr, B.F., 1990. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 583–589.
- Guardabassi, L., Lo, D.M.A., Wong, F., Dalsgaard, A., 2002. The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water Res.* 36, 1955–1964.
- Huang, J.-J., Hu, H.-Y., Lu, S.-Q., Li, Y., Tang, F., Lu, Y., Wei, B., 2012. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environ. Int.* 42, 31–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.001>.
- International Organization for Standardization, 2014. ISO 9308-1:2014–Water Quality – Enumeration of *Escherichia coli* and Coliform Bacteria – Part 1: Membrane Filtration Method for Waters with Low Bacterial Background Flora.
- International Organization for Standardization, 2000. ISO 10705-2:2000–Water quality – detection and enumeration of bacteriophages – Part 2: enumeration of somatic coliphages [WWW Document]. *Int. Organ. Stand.*
- Jończyk, E., Kiak, M., Międzybrodzki, R., Górski, a., 2011. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol. (Praha)* 56, 191–200. <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>.
- Kerby, G.P., Gowdy, R.A., 1949. Purification pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of *Escherichia coli*. *J. Immunol.* 63, 93–107.
- Khan, M.A., Satoh, H., Katayama, H., Kurisu, F., Mino, T., 2002. Bacteriophages isolated from activated sludge processes and their polyvalency. *Water Res.* 36, 3364–3370.
- Lachmayr, K.L., Kerkhof, L.J., Dirienzo, A.G., Cavanaugh, C.M., Ford, T.E., 2009. Quantifying nonspecific TEM beta-lactamase (blaTEM) genes in a wastewater stream. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 203–211. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01254-08>.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Gantzer, C., 2007. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1632–1638. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03396.x>.
- LaPara, T.M., Burch, T.R., McNamara, P.J., Tan, D.T., Yan, M., Eichmiller, J.J., 2011. Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-Superior Harbor. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9543–9549. <http://dx.doi.org/10.1021/es202775r>.
- Lee, H.S., Sobsey, M.D., 2011. Survival of prototype strains of somatic coliphage families in environmental waters and when exposed to UV low-pressure monochromatic radiation or heat. *Water Res.* 45, 3723–3734. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.024>.
- Li, B., Yang, Y., Ma, L., Ju, F., Guo, F., Tiedje, J.M., Zhang, T., 2015. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *ISME J.* 1–13. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2015.59>.
- Lucena, F., Duran, A.E., Morón, a., Calderón, E., Campos, C., Gantzer, C., Skraber, S., Jofre, J., 2004. Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting faecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1069–1076. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02397.x>.
- Marín, I., Goñi, P., Lasheras, A.M., Ormad, M.P., 2015. Efficiency of a Spanish wastewater treatment plant for removal potentially pathogens: characterization of bacteria and protozoa along water and sludge treatment lines. *Ecol. Eng.* 74, 28–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.027>.
- Marti, E., Jofre, J., Balcázar, J.L., 2013. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PLoS One* 8, e78906. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078906>.
- Marti, E., Variatza, E., Balcázar, J.L., 2014. Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O456–O459. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12446>.
- McKinney, C.W., Pruden, A., 2012. Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 46, 13393–13400. <http://dx.doi.org/10.1021/es303652q>.
- Mocé-Llivina, L., Muniesa, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F., Jofre, J., Moce, L., Muniesa, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F., Jofre, J., 2003. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1452–1456. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.3.1452>.
- Muniesa, M., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J., 2005. Bacteriophages may bias outcome of bacterial enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4269–4275.
- Nielsen, K.M., Johnsen, P.J., Bensasson, D., Daffonchio, D., 2007. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Biosafety Res.* 6, 37–53. <http://dx.doi.org/10.1051/ebr:2007031>.
- Norman, J.M., Handley, S., a, Parkes, M., Virgin, H.W., Norman, J.M., Handley, S.A., Baldrige, M.T., Droit, L., Liu, C.Y., Keller, B.C., 2015. Disease-specific alterations in the enteric virome in article disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 160, 447–460. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>.
- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M.T., Guerri, G., Nannipieri, P., 2009. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biol. Fertil. Soils* 45, 219–235. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>.
- Quirós, P., Colomer-Lluch, M., Martínez-Castillo, A., Miró, E., Argente, M., Jofre, J., Navarro, F., Muniesa, M., 2014. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 606–609. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01684-13>.
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Barceló, D., Balcázar, J.L., 2014. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Res.* 69C, 234–242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>.
- Romanowski, G., Lorenz, M.G., Saylor, G., Wackernagel, W., 1992. Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3012–3019.
- Sharp, D.G., Hook, A.E., Taylor, A.R., Beard, D., Beard, J.W., 1946. Sedimentation characters and pH stability of the T2 bacteriophage of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 165, 259–270.
- Syvanen, M., Kado, C.I. (Eds.), 2002. *Horizontal Gene Transfer*, second ed. Academic Press, San Diego.
- The White House, 2014. *National Strategy for Combating Antibiotic-Resistant*.
- Wommack, K.E., Hill, R.T., Muller, T.A., Colwell, R.R., 1996. Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1336–1341.
- World Health Organization, 2014. *Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance 2014* (Geneva).
- Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., Zhang, Y., Li, X., Meng, W., 2014. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere* 119, 1379–1385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040>.
- Yuan, Q.-B., Guo, M.-T., Yang, J., 2015. Fate of antibiotic resistant bacteria and genes during wastewater chlorination: implication for antibiotic resistance control. *PLoS One* 10, e0119403. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0119403>.
- Zhang, Y., Marrs, C.F., Simon, C., Xi, C., 2009. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Sci. Total Environ.* 407, 3702–3706. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.02.013>.
- Zhang, Y., Zhuang, Y., Geng, J., Ren, H., Zhang, Y., Ding, L., Xu, K., 2015. Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by chlorination and sequential UV/chlorination disinfection. *Sci. Total Environ.* 512–513, 125–132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.028>.
- Zhuang, Y., Ren, H., Geng, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Ding, L., Xu, K., 2014. Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater by chlorination, ultraviolet, and ozonation disinfection. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3919-z>.

4.3. CAPÍTULO 3:

Los lodos de depuradora representan una fuente importante de genes de resistencias a antibióticos en las fracciones bacteriana y fágica.

Los lodos de depuradora representan una fuente importante de genes de resistencias a antibióticos en las fracciones bacteriana y fágica.

Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions.

Autores: **William Calero-Cáceres**, Ana Melgarejo, Marta Colomer-Lluch, Francisco Lucena, Juan Jofre, Maite Muniesa.

Revista: Environmental Science and Technology, 2014, 48 (13), pp 7602–7611.

Introducción

Los procesos bioquímicos involucrados en la generación de resistencia a antibióticos en bacterias se han visto acelerados debido al uso y sobreuso de antimicrobianos. Las bacterias causantes de infecciones son cada vez más resistentes a los tratamientos clínicos comunes, hasta tal punto que la resistencia a antibióticos representa una de las principales preocupaciones de salud pública del siglo XXI (Laxminarayan et al., 2013; World Health Organization, 2015).

A pesar de la magnitud de la emergencia global, la información relacionada con la diseminación de los genes de resistencia en el medio ambiente es limitada. Diferentes ambientes (aguas o suelos) actúan como reservorios de resistencias a antibióticos (Baquero et al., 2008; Finley et al., 2013) los cuales podrían ser el ambiente adecuado para la generación de nuevas resistencias, debido a la presencia de antibióticos en concentraciones subinhibitorias (Gullberg et al., 2011). Además, pueden presentar las condiciones adecuadas que permiten el desarrollo de episodios de intercambio genético horizontal (Stoll et al., 2012; Taylor et al., 2011; Zhang et al., 2009).

La influencia antropogénica puede tener una relación directa con la generación de episodios de transferencia genética, debido a la mayor densidad de las poblaciones de fagos y bacterias (Brabban et al., 2005; Lupo et al., 2012). En este fenómeno, hay una importante influencia de las plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTP), ya que son consideradas como una de las principales fuentes de diseminación de genes de resistencia en el medio ambiente (Iwane et al., 2001; Rizzo et al., 2013).

Entre los subproductos de las WWTP se encuentran los lodos activados, que representan una fuente concentrada de bacterias y fagos, los mismos que han sido retirados durante la depuración. Un proceso habitual de tratamiento de los lodos es la digestión anaerobia, en donde parte de la materia orgánica se transforma en biogás y la concentración de patógenos disminuye (Appels et al., 2008). Sin embargo, la información referente a los procesos de selección y desarrollo de bacterias resistentes y ARGs durante el tratamiento de los lodos en las WWTP es poco conocido. El uso agrícola de los lodos de depuradora podría significar una potencial diseminación de bacterias resistentes así como de ARGs.

Objetivos

En el presente estudio se planteó:

- Optimizar un método de purificación de ADN de bacteriófagos en lodos para el estudio de ARGs.
- Evaluar la presencia y abundancia de cinco ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrS*, *sul1*) en la fracción bacteriana y fágica de lodos de depuradora.
- Evaluar los cambios en los patrones de ARGs desde las aguas residuales hasta los lodos en la fracción bacteriana y fágica.

Resultados y discusión

La concentración de *E. coli* y de colifagos somáticos (SOMCPH: del inglés *somatic coliphages*) presentes en el agua residual cruda y en los lodos, así como los niveles de *E. coli* resistente a antibióticos en agua residual, son similares a los detectados en estudios anteriores (Colomer-Lluch et al., 2014; Guzmán et al., 2007). Las muestras de lodos analizadas presentan concentraciones de microorganismos/g superiores a las detectadas en el agua residual.

Se evaluaron dos métodos de purificación de ADN a partir de las muestras de lodos, el método de floculación orgánica (USEPA, 2003) y un método basado en la homogenización de los lodos. El método de homogenización permitió extraer alrededor de 150 veces más ADN, en comparación al método de floculación orgánica. Además, por medio del análisis de tres ARGs, con el método de

homogenización se detectaron un mayor porcentaje de positivos, así como un número de copias genómicas (CG) significativamente más alto.

Por medio del análisis de controles negativos durante la extracción de ADN fágico, se verificó la ausencia de ADN no empaquetado. Los controles negativos fueron tomados después del tratamiento con ADNasa.

En la fracción de ADN bacteriano todas las muestras de agua residual y de lodos fueron positivas para uno o más ARGs. En la fracción de ADN fágico todas las muestras de agua residual y 26/30 muestras de lodos fueron positivas para uno o más ARGs. La prevalencia de ARGs en las fracciones bacteriana y fágica muestra un patrón similar de acuerdo a la matriz analizada (ver Fig. 1 pg. 7606 Calero-Cáceres et al., 2014).

Sin embargo, las prevalencias entre agua residual y lodos muestran claras diferencias, demostrando una variación de las poblaciones bacterianas y de fagos desde el agua residual a los lodos después de la digestión. Estos resultados sugieren que las prevalencias de ARGs en agua residual están influenciadas por la contaminación fecal, con una considerable proporción de genes con relevancia clínica y de uso antropogénico (*qnrA* y *bla_{CTX-M}*). No obstante, en los lodos, los cuales están compuestos de una mezcla de lodos primarios (alto porcentaje de bacterias entéricas) y secundarios (bacterias heterótrofas autóctonas) se denota un claro desplazamiento por parte de los genes más abundantes en el agua residual (*bla_{TEM}* y *sul1*). Sugiriendo que las poblaciones autóctonas de los lodos ganan prevalencia en comparación con las proporciones detectadas en agua residual. Un efecto similar se observó en la investigación de Ma et al., 2011, los cuales determinaron la influencia de las comunidades bacterianas presentes durante la digestión de los lodos, la cual probablemente tiene más importancia que la composición de ARGs de los influentes.

Los valores de cuantificación de ARGs en agua residual y en lodos se visualizan en la figura 2 y 3 página 7607 (Calero-Cáceres et al., 2014). Las concentraciones de ARGs detectadas en la fracción bacteriana son más altas que en la fracción fágica; resultados que se encuentran en concordancia con estudios previos (Colomer-Lluch et al., 2011; Muniesa et al., 2013; Quirós et al., 2014). Los genes con mayor prevalencia y concentración fueron *sul1* y *bla_{TEM}*. *qnrS* se encuentra en números elevados, sin embargo su prevalencia en lodos es menor, en especial en

la fracción fágica. *qnrA*, *qnrS*, y *bla_{CTX-M}* son los genes menos prevalentes así como los menos abundantes en las muestras estudiadas.

Conclusiones

- Los lodos de depuradora contienen una elevada cantidad de bacterias resistentes a antibióticos y ARGs, en la fracción bacteriana y fágica. Por lo tanto, representan un potencial reservorio de resistencias, con un elevado riesgo de diseminación ambiental.
- Las condiciones operacionales de las WWTPs favorecen la selección de ARGs durante la digestión anaerobia de los lodos, en especial de los genes más abundantes (*sul1* y *bla_{TEM}*).
- El método de homogenización para la extracción de ADN fágico mostró una mayor eficiencia en comparación al método de floculación orgánica.

License Agreement

Reprinted with permission from: William Calero-Cáceres, Ana Melgarejo, Marta Colomer-Lluch, Claudia Stoll, Francisco Lucena, Juan Jofre, Maite Muniesa. *Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions*. Environmental Science and Technology. 48 (13) Pages 7602-7611. Copyright 2014. American Chemical Society.

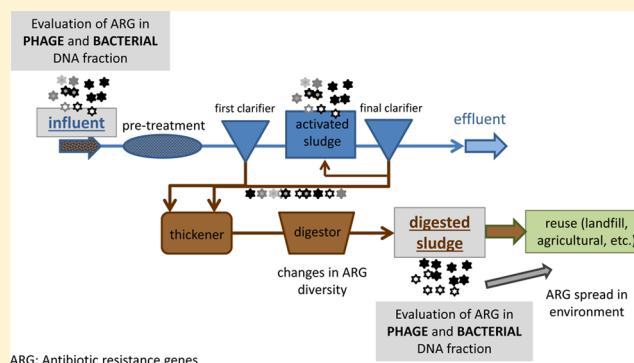
Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions

William Calero-Cáceres,[†] Ana Melgarejo,[†] Marta Colomer-Lluch,[†] Claudia Stoll,[‡] Francisco Lucena,[†] Juan Jofre,[†] and Maite Muniesa^{*,†}

[†]Department of Microbiology, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, E-08028 Barcelona, Spain

[‡]DVGW-Technologiezentrum Wasser (TZW), Karlsruher Street 84, D-76139 Karlsruhe, Germany

ABSTRACT: The emergence and prevalence of antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment is a serious global health concern. ARGs found in bacteria can become mobilized in bacteriophage particles in the environment. Sludge derived from secondary treatment in wastewater treatment plants (WWTPs) constitutes a concentrated pool of bacteria and phages that are removed during the treatment process. This study evaluates the prevalence of ARGs in the bacterial and phage fractions of anaerobic digested sludge; five ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrS*, and *sul1*) are quantified by qPCR. Comparison between the wastewater and sludge revealed a shift in the prevalence of ARGs (*bla*_{TEM} and *sul1* became more prevalent in sludge), suggesting there is a change in the bacterial and phage populations from wastewater to those selected during the secondary treatment and the later anaerobic mesophilic digestion of the sludge. ARGs densities were higher in the bacterial than in the phage fraction, with high densities in both fractions; particularly for *bla*_{TEM} and *sul1* (5 and 8 log₁₀ gene copies (GC)/g, respectively, in bacterial DNA; 5.5 and 4.4 log₁₀ GC/g, respectively, in phage DNA). These results question the potential agricultural uses of treated sludge, as it could contribute to the spread of ARGs in the environment and have an impact on the bacterial communities of the receiving ecosystem.



INTRODUCTION

Microorganisms that cause infections are becoming resistant to the most common antibiotic treatments. Thus, antibiotic resistance has become a serious and growing problem in contemporary medicine and has emerged as one of the primary public health concerns of the 21st century.^{1,2} An estimated 25 000 people die every year in Europe directly from antibiotic-resistant bacterial infections, while many more die from other conditions that are complicated by an antibiotic-resistant infection.³

Antibiotic resistance occurs as a natural phenomenon but can be enhanced by human activities; in medicine, the major causes of such enhancement are incorrect diagnosis, and inappropriate prescription of antibiotics or their improper use by patients. The spread of antibiotic resistance can also be attributed to certain practices in the pharmaceutical industry or to the nontherapeutic use of antibiotics in animals intended for human consumption.

Despite the urgent need for a global system to monitor antibiotic resistance and the health and economic burden it causes, information concerning the expansion of resistance in the environment is still remarkably limited. Different environments (bodies of water or soils) are suitable locations for the emergence of new bacterial resistance, including those that can cause infection in both humans and animals.^{4,5} Several studies

suggest that antibiotic resistance occurs in nature and has an ancient origin which is not always linked to the use of antibiotics. However, the presence of antibiotics in the environment, even at subinhibitory concentrations, could have favored the selection of some types of resistance,⁶ as well as the dissemination of resistant clones.

In addition, aquatic environments (including surface water and groundwater) provide ideal settings for the horizontal exchange of mobile genetic elements (MGEs) that encode antibiotic resistance.^{7–9} The elements that mobilize antibiotic resistance genes (ARGs) can be insertion sequences, transposons, intragenic chromosomal elements, plasmids, pathogenicity islands, chromosome cassettes, or as recently reported, bacteriophage particles.^{10–12}

The horizontal transfer occurring anywhere at random and the assembly of genetically mobile platforms is more likely to occur in environments where there is a selective pressure, such as human and animal biomes or wastewater,^{13,14} where phages and bacteria are abundant but there is antibiotic exposure. Wastewater treatment plants (WWTPs) are therefore a

Received: April 14, 2014

Revised: May 22, 2014

Accepted: May 29, 2014

Published: May 29, 2014

Table 1. Oligonucleotides Used in This Study^a

target gene	reaction	oligonucleotide name	sequence 5'-3'	amplicon size (bp)	reference
<i>bla</i> _{TEM}	TEM PCR	UP	CTCACCCAGAAACGCTGGTG	569	30
		LP	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA		
	TEM qPCR	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	85	30
		LP	TGCATAATTCTCTTACTGTCATG		
	TaqMan TEM Probe		FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ		
<i>bla</i> _{CTX-M-1-group}	CTX-M-1 PCR	UP	ACGTTAAACACCGCCATTCC	356	11
		LP	TCGGTGACGATTTTAGCCGC		
	CTX-M-1 qPCR	UP CTX-M	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	11
		LP CTX-M	ACATCGCGACGGCTTTCT		
		TaqMan CTX-M Probe	FAM-TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ		
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> PCR	UP	ACGCCAGGATTTGAGTGAC	565	60
		LP	CCAGGCACAGATCTTGAC		
	<i>qnrA</i> qPCR	UP <i>qnrA</i>	AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC	138	25
		LP <i>qnrA</i>	TGAACTCTATGCCAAAGCAGTTG		
	TaqMan <i>qnrA</i> probe		FAM-TATGCCGATCTGCGCGA-MGBNFQ		
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> PCR	UP	TTAAGTCTGACTCTTTCAGTGATG	425	25
		LP	CAAGCGGTGAAGGTGAGATCACTT		
	<i>qnrS</i> qPCR	UP <i>qnrS</i>	CGACGTGCTAACTTGCGTGA	118	25
		LP <i>qnrS</i>	GGCATTGTTGGAAACTTGCA		
	TaqMan <i>qnrS</i> probe		FAM-AGTTCATTGAACAGGGTGA-MGBNFQ		
<i>Sul1</i>	<i>sul1</i> PCR	UP	TTCATGGGCAAAGCTTGATG	964	Modified from61
		LP	GGCCGGAAGGTGAATGCTA		
	<i>sul</i> qPCR	UP	CCGTTGGCCTTCTGTAAAG	67	Modified from62
		LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT		
	TaqMan <i>sul1</i> probe		FAM-CGAGCCTTGCGGCGG-MGBNFQ		
16S rDNA	PCR	28f	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGA	1503	63
eubacteria		1492r	TACGGCTACCTTGTTACGACTT		

^aPCR: conventional PCR. qPCR: quantitative real time PCR. UP: upper primer, LP: lower primer.

plentiful source of ARGs from which they spread into the environment.^{11,15-17} Activated sludge derived from secondary treatment at WWTPs represents a concentrated pool of bacteria and phages that infect these bacteria, which have been removed during the treatment process. A common treatment of activated sludge includes anaerobic digestion; this further transforms organic matter into biogas, reduces the final amount of sludge solids for disposal and destroys most of the pathogens present in the sludge.^{18,19} The mechanisms by which biological processes in WWTPs influence the development/selection of resistant bacteria and ARGs transfer are still poorly understood. The potential agricultural use of WWTP sludge may result not only in the transfer of resistant bacteria into the environment, but also in the dissemination of ARGs.

To gain insight into these questions, the present study evaluates the abundance of five ARGs in the bacterial and bacteriophage DNA fractions of sludge obtained following anaerobic digestion in an urban WWTP.

MATERIALS AND METHODS

Samples. Thirty raw urban wastewater samples were collected weekly between autumn 2012 and spring 2013 from

the influent of a WWTP in the Barcelona metropolitan area which serves approximately 500 000 people. The same plant was the source of 30 wastewater sludge samples collected from the digester. Sludge samples comprised a mixture of raw primary sludge (about two-thirds) and secondary sludge (about one-third) that was thickened and subjected to anaerobic mesophilic (35 °C) digestion for 20–25 days. Dry weight of sludges was 25% in average.

All the samples were collected in sterile containers, transported to the laboratory at 5 °C ± 2 °C within 2 h of collection and processed immediately for bacterial counts and further experiments.

Bacterial Strains and Media. *Escherichia coli* strain C600 containing the pGEM vector with the *bla*_{TEM} gene was used as a control for *bla*_{TEM}. *E. coli* strains isolated from the urban wastewater during this study were used as controls for *bla*_{CTX-M} genes carrying types CTX-M. The clinical *E. coli* strain 266 was used as a control for *qnrA*, the environmental *Enterobacter cloacae* strain 565 was used as a control for *qnrS* and *E. coli* J53 R388²⁰ was used as a control for *sul1*. *E. coli* WG5 (ATCC 700078) was used as a host for the evaluation of somatic coliphages.²¹

Luria–Bertani (LB) agar or broth were used for routine bacterial propagation to prepare the standards for qPCR assays. For the detection of heterotrophic bacteria, Tryptic Soy Agar (TSA) media or Chromocult Coliform Agar (Merck, Darmstadt, Germany) were used. Media were supplemented with 32 mg/L of ampicillin (AMP); 25 mg/L of nalidixic acid (NAL); or 350 mg/L of sulfamethoxazole (SUL), all from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). These antibiotic concentrations were chosen based on previous studies that analyze environmental resistant bacteria.^{22,23}

Microbiological Parameters. The extent of faecal contamination in the wastewater and sludge samples was established by counting total heterotrophic bacteria and *E. coli* as bacterial indicators and somatic coliphages as viral indicators. The latter were included to indicate the levels of virulent bacteriophages in the samples.²¹ This method allows detection of many virulent infectious phages from a faecal sample with a single host strain (*E. coli* WGS) through the double agar layer plaque assay.

For bacterial assays, serial decimal dilutions (1/100, 1/1000, and 1/10 000) of the wastewater samples were filtered through 0.45- μm -pore-diameter membrane filters (47 mm, white gridded, EZ-Pak Membrane Filters, Millipore, Bedford, MA). The membranes were placed upside up on TSA for heterotrophic bacteria and Chromocult Coliform Agar for *E. coli*, and incubated at 37 °C for 18 h. To evaluate somatic coliphages, serial decimal dilutions of the wastewater samples were filtered through low protein-binding 0.22- μm -pore-size membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA) and assayed by the double agar method, as described in the standard ISO methods.²¹ Samples were analyzed in triplicate.

For the analysis of microbiological parameters in sludge, 5 g of sludge sample was homogenized 1/10 (w:v) with sterile phosphate saline buffer (PBS) and suspended by magnetic stirring at room temperature for 30 min. This suspension was used to prepare 10-fold dilutions as described in the U.S. Environmental Protection Agency standard procedures.²⁴

To evaluate the presence of bacteria resistant to antibiotics, samples were processed as described above and incubated in TSA or Chromocult coliform agar for 2 h at 37 °C. The membranes were then transferred to TSA or Chromocult coliform agar containing the respective antibiotics and incubated at 37 °C for a further 18 h.

PCR Procedures. Standard PCR Procedures. Conventional PCRs were performed for ARGs (Table 1). All the PCRs were performed with a GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). Five μL of each PCR product was analyzed by agarose (0.8%) gel electrophoresis and bands were viewed using ethidium bromide staining. When the amplicons were used for cloning, PCR products were purified using a PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA).

qPCR Procedures. For the quantification of each ARG in phage DNA, TaqMan qPCR assays were performed using standards prepared as described in the next section. Conditions for each qPCR assay were as described previously.^{11,25} Limits of detection were calculated by performing 8–10 replicates of each dilution of the standard for each gene, in three independent qPCR reactions and by triplicate. We considered as limit of detection the higher threshold cycle (Ct) that showed positive amplification in all replicates. Calculating the gene copies (GC) for each Ct value, the limit of detection of each qPCR assay was 7.6 GC/ μL for *bla*_{TEM}, 8.4 gene copies

GC/ μL for *bla*_{CTX-M-1}, 3.1 GC/ μL for *qnrA* and 8.3 gene copies GC/ μL for *qnrS*.

A new real-time qPCR assay for *sulI* was developed to detect the most common sulphonamide resistance gene in the DNA of the bacterial and bacteriophage fractions of the samples.

sulI primers and a probe set were designed using the Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems); primers and probes were selected to be used in a standardized TaqMan amplification protocol. Their specificity was determined via sequence alignments using 21 sequences of *sulI* available in NCBI nucleotide database. A FAM-labeled fluorogenic probe was commercially synthesized by Applied Biosystems. The *sulI* probe was minor-groove binding (MGB) with an FAM reporter (FAM: 6-carboxyfluorescein) and an NFQ quencher (non-fluorescent quencher). The *sulI* qPCR assay showed a limit of detection of 5.9 GC/ μL (a threshold cycle of 35).

Preparation of Standard Curves. For the generation of standards for all qPCR assays, a plasmid construct was used containing the inset of each ARG amplified by conventional PCR (Table 1). Each fragment was purified using Pure LINK Quick Gel Extraction and a PCR Purification Combo Kit (Invitrogen Carlsbad, CA) and was cloned in a pGEM-T Easy vector following the manufacturer's instructions (pGEM-T-Easy Vector, Promega, Barcelona, Spain). The construct was transformed by electroporation into *E. coli* DH5 α electro-competent cells. The cells were electroporated at 2.5 kV, 25 F capacitance and 200 Ω resistance in a BTX ECM 600 Electroporation System (Harvard Apparatus, Inc. Holliston, MA). Colonies containing the vector were screened by conventional PCR to evaluate the presence of the inset in the vector and its orientation, and the amplicons were sequenced. For *sulI*, plasmid R388 obtained from *E. coli* J53 was used. The vector containing the inset was purified from the positive colonies using the Qiagen Plasmid Midi purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) and its concentration was quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Scientific, Wilmington, DE). The reaction product was linearized by digestion with *XmnI* restriction endonuclease (Promega Co., Madison, WI). The restricted product was purified and quantified for use in the qPCR assays.

The GC/ μL of the stock prepared for each gene was calculated and the standard curve for qPCR was calculated as described previously.¹¹ Three replicates of each dilution were added to each qPCR reaction.

All the qPCR assays were performed under standard conditions, as indicated by the manufacturer, in a Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The assays were tested for cross-reactions with the respective susceptible strains. They were amplified in a 20 μL reaction mixture with the TaqMan Environmental Real-Time PCR Master Mix 2.0 (Applied Biosystems). The reaction contained 9 μL of the DNA sample or quantified plasmid DNA. All the samples were assayed in duplicate, as were the standards, and positive and negative controls (described below). The GC was defined as the average of the duplicate data obtained.

To screen for PCR inhibition, dilutions of the standard were spiked with environmental DNA and the experimental difference was compared to the true copies of the target genes in the standards. No inhibition of PCR by environmental DNA extracts was detected.

Extraction of Bacterial DNA. To extract bacterial DNA from the wastewater samples, 50 mL of each sample was filtered

through 0.45- μm -pore-diameter membrane filters (47 mm, white gridded, EZ-Pak Membrane Filters (Millipore, Bedford, MA). The bacterial content of the membranes was suspended in Luria–Bertani broth (LB). The samples were centrifuged at a 3000 \times g for 10 min. The pellet was suspended in 200 μL of LB and bacterial DNA was obtained using the QIAamp DNA blood Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) following the manufacturer's instructions.

For DNA extraction from sludge, 0.25 g of sample was processed using the PowerSoil DNA isolation kit (MO BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions.

Purification of Phage Particles. To purify the bacteriophage fraction of the water samples, a previously described method was used with minor modifications.¹¹ Briefly, 50 mL of each sample was centrifuged at 3000g for 10 min, passed through low protein-binding 0.22- μm -pore-size membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA) and then 100-fold concentrated at 3000g by means of protein concentrators (100 kDa Amicon Ultra centrifugal filter units, Millipore, Bedford, MA), following the manufacturer's instructions.

To purify the bacteriophage fractions from the sludge, the following two protocols were assayed.

Organic flocculation based on the protocol proposed by the US EPA for elution of enteroviruses.²⁴ Briefly, liquid raw sludge was conditioned by the addition of AlCl_3 to a final concentration of 0.0005 mol/L, and thoroughly mixed by shaking and centrifugation. From this point on, the pellet was eluted with 10% beef extract and viruses were concentrated by organic flocculation according to Katzenelson et al.²⁶

Homogenization, as described previously by Lasobras et al.,²⁷ was performed here with minor modifications. The samples were mixed in a 1:10 (w/v) ratio with PBS pH = 7.4 and homogenized by magnetic stirring for 30 min at room temperature. The suspension was then centrifuged at 10 000g for 30 min at 4 °C. The supernatant was subsequently filtered through low protein-binding 0.22- μm -pore-size membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA) and then 100-fold concentrated at 3000g by means of protein concentrators as described above.

The concentrated phage fraction from wastewater and sludge samples was recovered and treated with chloroform to rule out the presence of possible vesicles containing DNA. DNase treatment (100 units/mL of the phage lysate) was performed to eliminate any free DNA that might be present in the samples outside the phage particles. After that, DNase was heat inactivated at 80 °C for 10 min.

Controls. Negative controls included controls of the DNA extraction with sterile water. In addition, to exclude non-packaged DNA, the protocol for DNA extraction from the phage fraction of the samples was always accompanied by several controls. To rule out the possibility of contamination with free DNA, an aliquot of the sample taken after DNase treatment and before desencapsidation was processed. At this stage, the samples were used as a template for conventional PCR of eubacterial 16S rDNA and for the qPCR assay of each ARG. Both amplifications should be negative to confirm that DNase has removed all nonpackaged DNA from the samples.

To verify the DNase treatment, the samples were spiked with serial decimal dilutions of the standards (DNA concentrations from 222 to 2.2×10^{-2} ng/ μL , containing from 10^9 – 10^5 GC/ μL) and then treated with DNase followed by the heat inactivation of the enzyme and amplified.

To confirm that the DNase was correctly inactivated by the heat treatment and that no degradation of the qPCR primers or probe occurred, the samples were spiked with serial decimal dilutions of the standard after the DNase heat inactivation and then amplified.

Extraction of DNA from Phage Particles. Phage DNA was extracted from the purified phage particles as previously described.¹¹ The concentration and purity of the extracted phage DNA were determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Sequencing. The ARGs amplified from the strains used as controls and the amplimers used to prepare the qPCR standards were sequenced with an ABI PRISM Big Dye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions and with the primers shown in Table 1. All sequences were performed at least in duplicate.

Statistical Analysis. Data were compiled and statistical tests performed using the Statistical Package for Social Science software (SPSS). One-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the differences between the two methods used to extract phages from sludge and to compare the occurrence of ARGs detected in DNA from the bacterial and phage fractions. Evaluations were based on a 5% significance level in both cases: a *P* value of <0.05 was considered to denote a significant difference.

RESULTS AND DISCUSSION

Microbiological Parameters. Our values for *E. coli* and somatic coliphages (Table 2) were in accordance with previous

Table 2. Bacterial and Bacteriophage Indicators in Urban Wastewater and in Sludges

	urban wastewater (cfu or pfu/mL)	sludges (cfu or pfu/g)
heterotrophic bacteria	2.1×10^7 (6.5×10^6) ^a	9.4×10^8 (4.2×10^7)
AMP ^R heterotrophic bacteria	1.3×10^7 (9.1×10^6)	6.7×10^7 (2.2×10^7)
NAL ^R heterotrophic bacteria	9.8×10^6 (6.8×10^6)	8.9×10^7 (2.6×10^7)
SUL ^R heterotrophic bacteria	3.0×10^6 (6.6×10^5)	2.4×10^7 (5.0×10^6)
<i>E. coli</i>	3.8×10^5 (1.6×10^5)	1.4×10^7 g (1.6×10^7)
AMP ^R <i>E. coli</i>	1.3×10^5 (5.9×10^4)	3.4×10^5 (4.7×10^4)
NAL ^R <i>E. coli</i>	9.5×10^4 (2.8×10^4)	3.3×10^5 (5.1×10^4)
SUL ^R <i>E. coli</i>	1.8×10^5 (2.1×10^4)	1.1×10^6 (3.0×10^5)
somatic coliphages	5.4×10^4 (3.2×10^1)	2.5×10^7 (1.5×10^6)

^aSD in brackets. AMP^R: ampicillin-resistant NAL^R: nalidixic acid resistant; SUL^R: sulfonamide resistant

urban wastewater and sludge values from the same site.²⁸ Among these, antibiotic resistant bacteria were detected in high densities in wastewater, at levels similar to those found previously.²⁵ In accordance with this, antibiotic resistant bacteria were found at high densities in sludge samples, with values per g of sludge significantly (*P* < 0.05) higher than in the wastewater. All 30 wastewater and sludge samples showed consistent densities of each microorganism and the relative proportions in wastewater and in sludge appeared consistent with minor differences, such as a slight increase in the values of sul^R *E. coli*. It should be considered that the resistance shown by the microorganisms detected in this section could be due to

different mechanisms, others than the ARGs analyzed in the following sections. Somatic coliphages were used as indicators of phages and monitored since they have been shown to remain the most detectable indicator by feasible procedures in sludge where viruses may persist.²⁸ When comparing their densities in wastewater and sludge, somatic coliphages showed a higher increase than bacteria. This could be attributed to increased persistence through the digestion process and it suggests that other bacteriophages or viruses in the same matrix could persist similarly.

Comparison of Methods for the Purification of Phage Particles. The organic flocculation method (EPA/625/R-92/013, Revised protocol)²⁴ used to purify viruses from sludge samples was compared with a method based on the homogenization of sludge. DNA isolated from the purified phages was quantified and the results showed that for the same weight of sample analyzed, the homogenization method allowed extraction of a DNA concentration 150-fold greater than the organic flocculation method. Accordingly, analysis of three ARGs indicated a higher percentage of positive samples and the number of GC detected was significantly higher ($P < 0.05$) after homogenization than after organic flocculation (Table 3).

Table 3. Comparison of Organic Flocculation and Homogenization Methods for the DNA Extraction from the Bacteriophage Fraction in Sludge

		organic flocculation	homogenization
N ^o of samples		7	7
<i>bla</i> _{TEM}	% positives	71.43%	100.00%
	average log ₁₀ GC/g	4.60 (0.30) ^a	5.64 (0.41)
<i>qnrA</i>	% positives	14.29%	28.57%
	average log ₁₀ GC/g	2.58	4.22 (0.54)
<i>qnrS</i>	% positives	0%	42.86%
	average log ₁₀ GC/g	ND	5.33 (0.71)

^aSD in brackets. ND: not detected.

Although other methods for elution of viruses from sludges have been proposed, we assayed the method proposed in U.S. EPA regulation for viruses because it is a well standardized method already established in our laboratory.²⁸ Nevertheless, since our goal was the detection and quantification of ARGs in the phage fraction of sludges, we wanted to evaluate whether a protocol simpler than the U.S. EPA (as other procedures for recovery of viruses from sludges) could be applied, even if with a lower efficiency of recovery. When comparing the difficulty and time required performing both protocols, it appeared that the organic flocculation method was more delicate, required many steps that could cause the loss of viral particles, and took 2 days to perform; meanwhile homogenization was simpler and could be performed in one working day. These facts, together with the data on the recovery of DNA from the phage fraction, prompted us to use the homogenization protocol for the remaining sludge samples.

Using homogenization protocol, the average of DNA extracted from the phage fraction in wastewater samples was 30.3 ng/mL and 2.9 μg/g in sludge.

Antibiotic Resistance Genes in DNA from the Bacterial and Phage Fractions. Bacterial DNA extracted from the samples was analyzed, as a reference for comparison with the bacteriophage fraction. The average of bacterial DNA extracted in wastewater samples was 150.7 ng/mL and 1.1 μg/g in sludge. The protocol used allows extraction of bacterial DNA from the sample; however, despite filtration being applied to eliminate phages, it does not totally exclude the extraction of viral or free DNA present in the samples.

In contrast, phage DNA was extracted following a protocol designed to exclude nonpackaged DNA. Controls of DNA extraction from phage particles confirmed that only packaged DNA was detected and amplification performed after DNase treatment was negative for all samples.

Good inactivation of the DNase by heat treatment was confirmed since qPCR amplification showed the same threshold cycle (Ct) in the DNase controls as in the original standards (at most only one Ct below the Ct of the corresponding dilution of the standard). It was therefore concluded that inactive DNase did not interfere with the

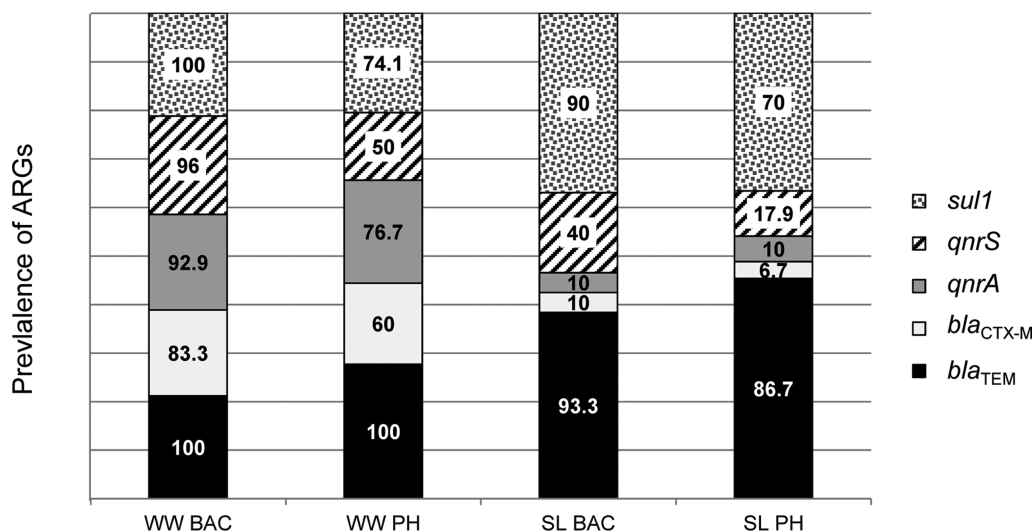


Figure 1. Distribution of the ARGs in the DNA of the bacterial (BAC) and phage (PH) DNA fraction from raw urban wastewater (WW) and sludges (SL). Results are presented in a stacked column chart that compares the percentage of positive samples among the total number of samples analyzed for each category.

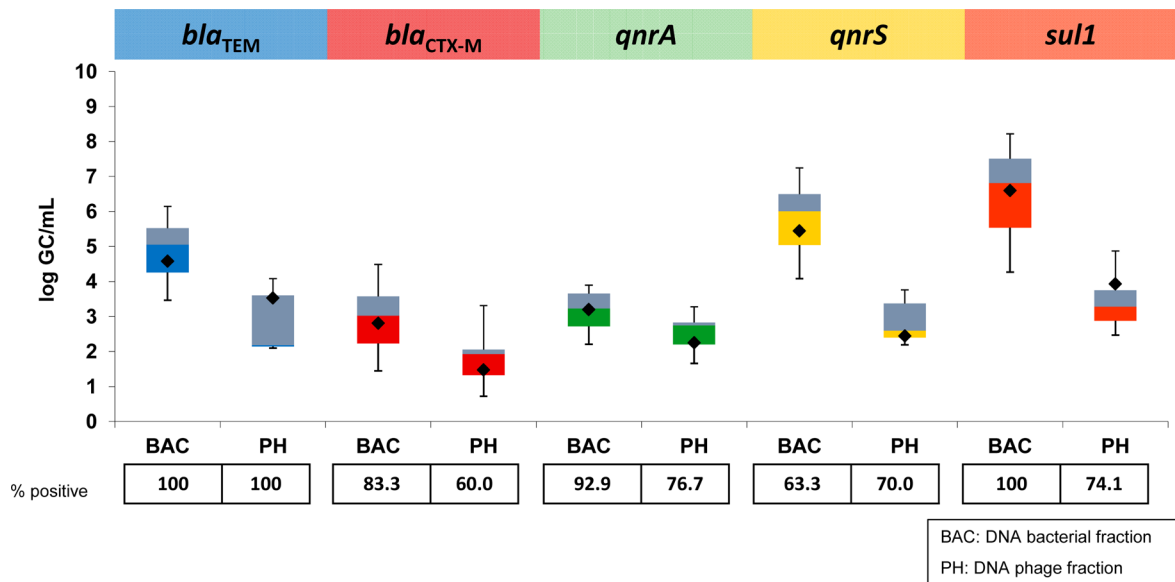


Figure 2. Box plot chart with the averaged values (\log_{10} GC/mL) obtained from all ARGs in positive samples in the DNA of the bacterial (BAC) and phage (PH) DNA fraction from raw urban wastewater. Within the box plot chart, the cross-pieces of each box plot represent (from top to bottom) maximum, upper-quartile, median (black bar), lower-quartile and minimum values. The black diamond shows the mean value. The white boxes in the box plot chart include samples showing values within the 75th percentile and gray box samples show values within the 25th percentile. In the x-axis, the percentage of positive samples/total of samples analyzed is indicated.

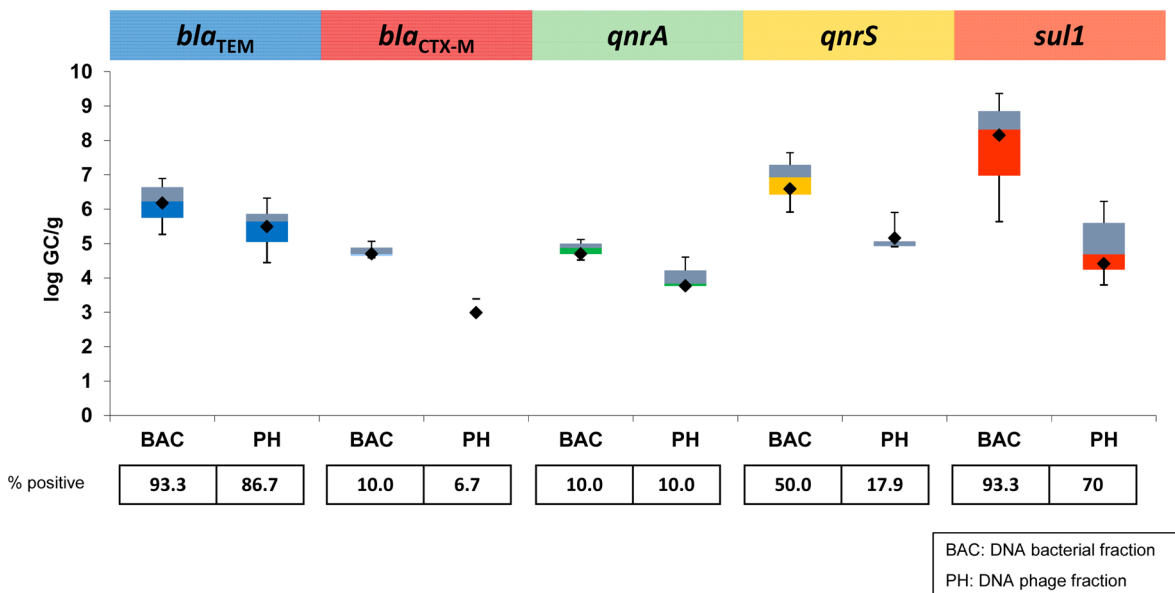


Figure 3. Box plot chart with the averaged values (\log_{10} GC/g) obtained from all ARGs in positive samples in the DNA of the bacterial (BAC) and phage (PH) DNA fraction from sludge. Within the box plot chart, the cross-pieces of each box plot represent (from top to bottom) maximum, upper-quartile, median (black bar), lower-quartile and minimum values. The black diamond shows the mean value. The white boxes in the box plot chart include samples showing values within the 75th percentile and gray box samples show values within the 25th percentile. In the x-axis, the percentage of positive samples/total of samples analyzed is indicated.

subsequent qPCR and the slight differences observed in the Ct values could be attributed to a small amount of DNA degradation caused by the heat treatment.

All the samples were positive for one or more ARG when analyzing the DNA from the bacterial fraction of the raw urban wastewater and sludge samples. When using purified DNA from phage particles, all the wastewater samples were positive for one or more ARG; while 26 out of 30 sludge samples were positive for at least one ARG. *bla_{TEM}* and *qnrA* were only detected in packaged DNA, not in bacterial DNA, in some

samples; both for wastewater and sludge samples. However, the differences in the extraction methods could have accounted for these differences. In general, all the ARGs evaluated by qPCR from the wastewater bacteria and phage fractions showed similar prevalence (Figure 1). The prevalence of ARGs in DNA from bacterial and phage fractions of sludge also showed similar trends (Figure 1). However, comparison between wastewater and sludge showed a shift in the prevalence of ARGs, with the *bla_{TEM}* and *sul1* genes being more prevalent in sludge while the prevalence of *bla_{CTX-M}* and *qnrA* decreased. *qnrS* showed no

differences in bacterial DNA, but decreased in DNA from the phage fraction.

These results suggest a change in the populations of bacteria and phages from wastewater to sludge after digestion. It appears that prevalences of ARG in wastewater are influenced by the faecal contamination; that is allochthonous (faecal) bacteria, showing a similar distribution of all ARGs and correspondingly mirrored in the phage fraction. In contrast, the sludge showed a larger prevalence of the most abundant ARGs in wastewater (*bla*_{TEM} and *sul1*). Although all ARGs could be considered to have an environmental origin, *bla*_{TEM} and *sul1* have been reported to be widely distributed in the bacterial populations, including environmental bacteria,^{29–31} while the ARGs showing lower densities (*qnr* and *bla*_{CTX-M}) are very much related with clinically relevant resistance mechanisms and anthropogenic use of antibiotics, with a strong emergence in clinics.¹⁴ Sludges in this study were taken after the digester and were composed by a mixture of raw primary (2/3) and secondary sludge (1/3). It is understood that the microbial community of primary sludges is predominantly composed of enteric organisms, whereas autochthonous heterotrophic bacteria are a significant component of the microbial community of secondary sludges as a result of the growth of microbial “flocs” and biofilms in the secondary biological stage. This suggests that sludge autochthonous populations have gained prevalence compared with those of the wastewater, probably because of a greater contribution of autochthonous bacteria that develop during the secondary biological treatment at the WWTP, but also by bacterial populations that have been selected during the anaerobic mesophilic digestion. Concomitantly, this is reflected in the ARGs distribution in the phage fraction. In accordance with our observations, wastewater treatment processes have been reported to selectively influence some ARGs.³² The bacterial community composition of the sludge digestion processes has been shown to drive the distribution of ARGs present in the biosolids produced, probably more than the influent ARG composition.³³

Quantification of ARGs. When quantifying the different ARGs found per mL of wastewater (Figure 2), or per g of sludge, (Figure 3) in positive samples the highest values were for bacterial DNA, as expected and in accordance with previous reports.^{11,25,34,35} Since the goal of the study was to evaluate the presence and densities of ARGs in the samples, rather than their microbiological quality, only positive samples have been considered. The different extractions methods and the different matrices do not allow performing a comparison of the densities between wastewater and sludges. The differences in log₁₀ units observed between the bacterial and the phage fraction in wastewater were 1.5 for *bla*_{TEM}, 1.3 for *bla*_{CTX-M-group1}, 0.9 for *qnrA*, 3.0 for *qnrS* and 2.7 for *sul1*. The differences observed between the bacterial and phage fractions in sludge were (in log₁₀ units) 0.7 for *bla*_{TEM}, 1.7 for *bla*_{CTX-M-group1}, 0.9 for *qnrA*, 1.4 for *qnrS*, and the highest difference of 3.7 log₁₀ units was observed for *sul1*. Despite the densities of ARGs in phage particles being in general significantly lower ($P < 0.05$) than those in bacterial DNA, the densities were not negligible.

The largest GC numbers, as well as the highest percentage of positive samples, were found for *sul1* and *bla*_{TEM}. *qnrS* also showed high densities (significantly higher ($P < 0.05$) than *bla*_{TEM}), but its prevalence in sludge was lower, in accordance with previous results from the same area, or nearby.^{12,25} *qnrA*, *qnrS*, and *bla*_{CTX-M-group1} were the least prevalent as well as the least abundant in the samples studied. As indicated before,

these three ARGs, are more related with clinically relevant resistance mechanisms and anthropogenic use of antibiotics,¹⁴ but less distributed among environmental bacteria, that could explain their lower prevalence although in some samples the densities could be still quite high (Figure 3).

Wastewater sludge production has significantly increased in the European Union (EU) in recent years. The total amount of wastewater sludge produced in the EU is expected to reach 13 million tons in 2020; 44% of this will be recycled to land.³⁶ Wastewater sludge is generally produced as a result of the sedimentation processes in primary and secondary wastewater treatment. These biosolids, containing more than 95% moisture, can be subjected to different processes (thickening, aerobic or thermophilic treatments, pasteurization, anaerobic stabilization, dewatering, incineration, etc.) in order to prepare the sludge for other uses, as agricultural uses. According to Spanish regulations,³⁷ only sludge which has undergone biological, chemical, or heat treatment, long-term storage or has been subjected to any other appropriate process that significantly reduces its fermentability and the health hazards resulting from its use, can be used in agriculture. Efforts have been made to monitor abiotic pollutants in sludge, such as heavy metals. However, there is no legislation to limit other potential hazards.

Previous studies have shown a high prevalence of ARGs in the bacterial and phage DNA fractions of faecally polluted water environments such as raw urban wastewater, river water or animal wastewater.^{11,12,25,38,39} Free phages encoding ARGs could be directly excreted from healthy individuals via faeces^{34,40} and reach faecally contaminated waters. Phages, plausibly through generalized transduction,²⁵ could produce phage particles containing ARGs inside their capsid. The phage particles could be infectious to a given host or not, but the genes harbored by the phages are functional and able to confer resistance to a given antibiotic in a proper bacterial host strain.¹¹ Therefore, it is possible, although it is unknown to what extent, that a phage harboring ARGs will infect a new host and introduce its DNA, including the ARG, into the new cell, thereby conferring resistance to a given antibiotic. This DNA from phages could either be incorporated in the host chromosome or as plasmids. Some phages harbor conjugative plasmids, and the polyvalence of some transducing phages would allow the transfer of plasmids to bacterial hosts that would otherwise not be recipients if the transfer would take place by conjugation. This would lead to simultaneous transmission of ARGs and even virulence determinants, commonly found in plasmids.⁴¹

Bacteriophages could play a role as reservoirs of ARGs and in their mobilization, particularly in the environment. Phages are prevalent in the viral fraction of the human gut microbiome^{40,42} and this is related to the presence of phages shown by metagenomic studies of wastewater and sludge.^{43,44} Sludge analyzed at different stages is reported to contain high phage titers,^{27,45,46} and in addition, several phages found in sludge present broad host ranges.⁴⁵

Phages show considerable environmental persistence.^{47,48} Among other treatments, they can persist during the anaerobic digestion of sludge.^{28,49–53} Since it is probable that phages mobilize ARGs in the activated sludge process, these will later be collected in the raw sludge. The results of the present study confirm the presence of phage particles harboring ARGs in treated sludge, even after the anaerobic digestion.

Despite calls to focus attention on the role of the environment in the transmission of ARGs (see for a review^{54–56}), environmental reservoirs of antibiotic resistance determinants and their contribution to resistance in clinical settings have only started to be considered in the past decade.

According to this and other studies,^{57–59} the ARGs removed from raw wastewater by the WWTP move to the sludge. In addition, the conditions in WWTPs are favorable for the proliferation of resistant bacteria as well as for mobilization of ARGs. If phages are the genetic elements mobilizing ARGs, they could propagate in the host bacteria in the system, but only if they persist successfully through the sludge treatment. Then, there is a possibility that WWTP discharges, which include treated sludge for agricultural uses, could contribute to the spread of ARGs into the environment and might have an impact on the bacterial communities of the receiving ecosystem.

However, application of treated municipal sludge to land in Europe and elsewhere is currently considered to be among the best practicable environmental options available. To continue guaranteeing the safety of these practices, it would be useful to evaluate different hazards. Among others, if there is any added risk of transmission of ARGs to the environment. If so, to assess the degree to which ecosystems really could serve as pools of resistance genes and to their transfer to pathogens, to take measures to minimize ARGs transference to natural ecosystems.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +34934039386; fax: +34934039047; e-mail: mmuniesa@ub.edu.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043), by the Ramon Areces Foundation and the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB). M. Colomer has a grant FI from the Generalitat de Catalunya, Catalonia, Spain. W.C.-C. is recipient of PhD fellowship SENESCYT 2012 from the Republic of Ecuador Government.

REFERENCES

- (1) *Use of Antimicrobials Outside Human Medicine and Resultant Antimicrobial Resistance in Humans*, Highlights of Fact Sheet No. 268; WHO World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2002.
- (2) Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A. K.; Wertheim, H. F.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G. L.; Gould, I. M.; Goossens, H.; Greko, C.; So, A. D.; Bigdeli, M.; Tomson, G.; Woodhouse, W.; Ombaka, E.; Peralta, A. Q.; Qamar, F. N.; Mir, F.; Kariuki, S.; Bhutta, Z. A.; Coates, A.; Bergstrom, R.; Wright, G. D.; Brown, E. D.; Cars, O. The Lancet Infectious Diseases Commission. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13* (12), 1057–1098, DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.
- (3) *The Bacterial Challenge: Time to React*, Highlights of EMEA/576176/2009; European Centre for Disease Prevention and Control: Stockholm, 2009; http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf.
- (4) Baquero, F.; Martínez, J. L.; Cantón, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 260–265, DOI: 10.1016/j.copbio.2008.05.006.

- (5) Finley, R. L.; Collignon, P.; Larsson, D. G.; McEwen, S. A.; Li, X. Z.; Gaze, W. H.; Reid-Smith, R.; Timinouni, M.; Graham, D. W.; Topp, E. The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *57*, 704–710, DOI: 10.1093/cid/cit355.

- (6) Gullberg, E.; Cao, S.; Berg, O. G.; Ilbäck, C.; Sandegren, L.; Hughes, D.; Andersson, D. I. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* **2011**, *7* (7), e1002158 DOI: 10.1371/journal.ppat.1002158.

- (7) Zhang, X. X.; Zhang, T.; Fang, H. H. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82* (3), 397–414, DOI: 10.1007/s00253-008-1829-z.

- (8) Taylor, N. G.; Verner-Jeffreys, D. W.; Baker-Austin, C. Aquatic systems: Maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? *Trends Ecol. Evol.* **2011**, *26* (6), 278–284, DOI: 10.1016/j.tree.2011.03.004.

- (9) Stoll, C.; Sidhu, J. P.; Tiehm, A.; Toze, S. Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (17), 9716–9726, DOI: 10.1021/es302020s.

- (10) Alekshun, M. N.; Levy, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* **2007**, *128* (6), 1037–1050, DOI: 10.1016/j.cell.2007.03.004.

- (11) Colomer-Lluch, M.; Jofre, J.; Muniesa, M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One.* **2011**, *6*, e17549 DOI: 10.1128/AAC.00535-11.

- (12) Marti, E.; Variatza, E.; Balcázar, J. L. Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clin. Microbiol. Infect.* **2013**, DOI: 10.1111/1469-0691.12446.

- (13) Brabban, A. D.; Hite, E.; Callaway, T. R. Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne Pathog. Dis.* **2005**, *2* (4), 287–303, DOI: 10.1089/fpd.2005.2.287.

- (14) Lupo, A.; Coyne, S.; Berendonk, T. U. Origin and evolution of antibiotic resistance: The common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 18 DOI: 10.3389/fmicb.2012.00018.

- (15) Iwane, T.; Urase, T.; Yamamoto, K. Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water. *Water Sci. Technol.* **2001**, *43* (2), 91–99.

- (16) Rizzo, L.; Manaia, C.; Merlin, C.; Schwartz, T.; Dagot, C.; Ploy, M. C.; Michael, I.; Fatta-Kassinos, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. Total Environ.* **2013**, *447*, 345–460, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.

- (17) Su, H. C.; Ying, G. G.; He, L. Y.; Liu, Y. S.; Zhang, R. Q.; Tao, R. Antibiotic resistance, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes and ampC gene in two typical municipal wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Process. Impacts.* **2014**, *16* (2), 324–332, DOI: 10.1039/c3em00555k.

- (18) Metcalf, L.; Eddy, H. P. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse*; McGraw Hill: New York, 1979.

- (19) Appels, L.; Baeyens, J.; Degève, J.; Dewil, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog. Energy Combust.* **2008**, *34*, 755–757, DOI: 10.1016/j.pecc.2008.06.002.

- (20) Czekalski, N.; Gascón Díez, E.; Bürgmann, H. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *ISME J.* **2014**, DOI: 10.1038/ismej.2014.8.

- (21) *Water Quality. Detection and Enumeration of Bacteriophages—Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages*, ISO 10705-2; International Organisation for Standardisation: Geneva, Switzerland, 2000.

- (22) Watkinson, A. J.; Micalizzi, G. B.; Graham, G. M.; Bates, J. B.; Costanzo, S. D. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (17), 5667–5670, DOI: 10.1128/AEM.00763-07.

- (23) Novo, A.; André, S.; Viana, P.; Nunes, O. C.; Manaia, C. M. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Res.* **2013**, *47* (5), 1875–1887, DOI: 10.1016/j.watres.2013.01.010.
- (24) *Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge*, USEPA 625/R-92/013; United States Environmental Protection Agency: Cincinnati, OH, 2003.
- (25) Colomer-Lluch, M.; Jofre, J.; Muniesa, M. Quinolone resistance genes (qnrA and qnrS) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69* (5), 1265–1274, DOI: 10.1093/jac/dkt528.
- (26) Katzenelson, E.; Fattal, B.; Hostovesky, T. Organic flocculation: An efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* **1976**, *32* (4), 638–639.
- (27) Lasobras, J.; Dellundé, J.; Jofre, J.; Lucena, F. Occurrence and levels of phages proposed as surrogate indicators of enteric viruses in different types of sludges. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *86* (4), 723–729, DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00722.x.
- (28) Guzmán, C.; Jofre, J.; Montemayor, M.; Lucena, F. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103* (6), 2420–2429, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03487.x.
- (29) Hu, J.; Shi, J.; Chang, H.; Li, D.; Yang, M.; Kamagata, Y. Phenotyping and genotyping of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from a natural river basin. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (9), 3415–3420, DOI: 10.1021/es7026746.
- (30) Lachmayr, K. L.; Kerkhof, L. J.; Dirienzo, A. G.; Cavanaugh, C. M.; Ford, T. E. Quantifying nonspecific TEM beta-lactamase (blaTEM) genes in a wastewater stream. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75* (1), 203–211, DOI: 10.1128/AEM.01254-08.
- (31) Pruden, A.; Arabi, M.; Storteboom, H. N. Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (21), 11541–11549, DOI: 10.1021/es302657r.
- (32) Zhang, Y.; Marrs, C. F.; Simon, C.; Xi, C. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407* (12), 3702–3706, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.02.013.
- (33) Ma, Y.; Wilson, C. A.; Novak, J. T.; Riffat, R.; Aynur, S.; Murthy, S.; Pruden, A. Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (18), 7855–7861, DOI: 10.1021/es200827t.
- (34) Marti, E.; Jofre, J.; Balcazar, J. L. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PLoS One.* **2013**, *8* (10), e78906 DOI: 10.1371/journal.pone.0078906.
- (35) Quirós, P.; Colomer-Lluch, M.; Martínez-Castillo, A.; Miró, E.; Argente, M.; Jofre, J.; Navarro, F.; Muniesa, M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (1), 606–609, DOI: 10.1128/AAC.01684-13.
- (36) *Environmental, Economic and Social Impacts of the Use of Sewage Sludge on Land*, Final Report Part I; EC. European Commission Overview Report: Brussels, 2008; <http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge>.
- (37) *Real Decreto 1310/1990, de 29 de Octubre, Por El Que Se Regula La Utilización De Los Lodos De Depuración En El Sector Agrario*, Highlights of BOE (Boletín Oficial del Estado); Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: Spain, 1990 (in Spanish).
- (38) Muniesa, M.; García, A.; Miró, E.; Mirelis, B.; Prats, G.; Jofre, J.; Navarro, F. Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10* (6), 1134–1137, DOI: 10.3201/eid1006.030472.
- (39) Colomer-Lluch, M.; Imamovic, L.; Jofre, J.; Muniesa, M. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (10), 4908–4911, DOI: 10.1128/AAC.00535-11.
- (40) Modi, S. R.; Lee, H. H.; Spina, C. S.; Collins, J. J. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature.* **2013**, *499* (7457), 219–222, DOI: 10.1038/nature12212.
- (41) Mann, B. A.; Schlauch, J. M. Transduction of low copy numbers of plasmids by bacteriophages by bacteriophage P22. *Genetics.* **1997**, *146*, 447–456.
- (42) Minot, S.; Sinha, R.; Chen, J.; Li, H.; Keilbaugh, S. A.; Wu, G. D.; Lewis, J. D.; Bushman, F. D. The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* **2011**, *21* (10), 1616–1625, DOI: 10.1101/gr.122705.111.
- (43) Cantalupo, P. G.; Calgua, B.; Zhao, G.; Hundesa, A.; Wier, A. D.; Katz, J. P.; Grabe, M.; Hendrix, R. W.; Girones, R.; Wang, D.; Pipas, J. M. Raw sewage harbors diverse viral populations. *MBio.* **2011**, *2*, e00180–11, DOI: 10.1128/mBio.00180-11.
- (44) Parsley, L. C.; Consuegra, E. J.; Thomas, S. J.; Bhavsar, J. L.; Land, A. M.; Bhuiyan, N. N.; Mazher, M. A.; Waters, R. J.; Wommack, K. E.; Harper, W. F., Jr.; Liles, M. R. Census of the viral metagenome within an activated sludge microbial assemblage. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76* (8), 2673–2677, DOI: 10.1128/AEM.02520-09.
- (45) Hantula, J.; Kurki, A.; Vuoriranta, P.; Bamford, D. H. Ecology of bacteriophages infecting activated sludge bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57* (8), 2147–2151.
- (46) Otawa, K.; Lee, S. H.; Yamazoe, A.; Onuki, M.; Satoh, H.; Mino, T. Abundance, diversity, and dynamics of viruses on microorganisms in activated sludge processes. *Microb. Ecol.* **2007**, *53* (1), 143–152, DOI: 10.1007/s00248-006-9150-9.
- (47) Duran, A. E.; Muniesa, M.; Méndez, X.; Valero, F.; Lucena, F.; Jofre, J. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *92* (2), 338–347, DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01536.x.
- (48) Ogunseitán, O. A.; Sayler, G. S.; Miller, R. V. Dynamic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and bacteriophages in lake water. *Microb. Ecol.* **1990**, *19* (2), 171–185, DOI: 10.1007/BF02012098.
- (49) Chauvet, C.; Springthorpe, S.; Sattar, S. Fate of Cryptosporidium oocysts, Giardia cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. *Can. J. Microbiol.* **1999**, *45* (3), 257–262, DOI: 10.1139/w99-001.
- (50) Rounsefell, B. D.; O'Sullivan, C. A.; Chinivasagam, N.; Batstone, D.; Clarke, W. P. Fate of pathogen indicators in a domestic blend of food waste and wastewater through a two-stage anaerobic digestion system. *Water Sci. Technol.* **2013**, *67* (2), 366–373, DOI: 10.2166/wst.2012.573.
- (51) Mocé-Llivina, L.; Muniesa, M.; Pimenta-Vale, H.; Lucena, F.; Jofre, J. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69* (3), 1452–1456.
- (52) Nappier, S. P.; Aitken, M. D.; Sobsey, M. D. Male-specific coliphages as indicators of thermal inactivation of pathogens in biosolids. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72* (4), 2471–2475, DOI: 10.1128/AEM.72.4.2471-2475.2006.
- (53) De Luca, G.; Sacchetti, R.; Leoni, E.; Zanetti, F. Removal of indicator bacteriophages from municipal wastewater by a full-scale membrane bioreactor and a conventional activated sludge process: Implications to water reuse. *Bioresour. Technol.* **2013**, *129*, 526–531, DOI: 10.1016/j.biortech.2012.11.113.
- (54) Marti, E.; Variatza, E.; Balcazar, J. L. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* **2014**, *22* (1), 36–41, DOI: 10.1016/j.tim.2013.11.001.
- (55) Martínez, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* **2009**, *157* (11), 2893–2902, DOI: 10.1016/j.envpol.2009.05.051.
- (56) Perry, J. A.; Wright, G. D. The antibiotic resistance “mobilome”: Searching for the link between environment and clinic. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 138 DOI: 10.3389/fmicb.2013.00138.
- (57) Szczepanowski, R.; Linke, B.; Krahn, I.; Gartemann, K. H.; Gützkow, T.; Eichler, W.; Pühler, A.; Schlüter, A. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid meta-

genome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology*. **2009**, *155* (7), 2306–2319, DOI: 10.1099/mic.0.028233-0.

(58) Auerbach, E. A.; Seyfried, E. E.; McMahon, K. D. Tetracycline resistance. Genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Res.* **2007**, *41*, 1143–1151, DOI: 10.1016/j.watres.2006.11.045.

(59) Zhang, Y.; Snow, D. D.; Parker, D.; Zhou, Z.; Li, X. Intracellular and extracellular antimicrobial resistance genes in the sludge of livestock waste management structures. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (18), 10206–10213, DOI: 10.1021/es401964s.

(60) Lavilla, S.; González López, J. J.; Sabaté, M.; García-Fernández, A.; Larrosa, M. N.; Bartolomé, R. M.; Carattoli, A.; Prats, G. Prevalence of qnr genes among extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61* (2), 291–295, DOI: 10.1093/jac/dkm448.

(61) Heuer, H.; Smalla, K. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ. Microbiol.* **2007**, *9* (3), 657 DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x.

(62) Czekalski, N.; Berthold, T.; Caucci, S.; Egli, A.; Bürgmann, H. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into lake Geneva, Switzerland. *Front Microbiol.* **2012**, *3*, 106 DOI: 10.3389/fmicb.2012.00106.

(63) Sander, M.; Schmieger, H. Method for host-independent detection of generalized transducing bacteriophages in natural habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (4), 1490–1493.

4.4. CAPÍTULO 4:

**Los sedimentos de un río Mediterráneo son un
reservorio de genes de resistencia a antibióticos.**

Los sedimentos de un río Mediterráneo son un reservorio de genes de resistencia a antibióticos.

The sediment of a Mediterranean river is a reservoir of antibiotic resistance genes

Autores: **William Calero-Cáceres**, Javier Méndez, Julia Martín-Díaz, Maite Muniesa.

Revista: Water Research (sometido).

RESUMEN

Introducción

Las resistencias a antibióticos pueden generarse por medio de mutaciones, o bien pueden ser adquiridas por medio de HGT. En diversos ambientes se han encontrado una considerable cantidad de determinantes de resistencia (Davies & Davies, 2010); los cuales pueden provocar una presión selectiva de larga duración entre las poblaciones ambientales, resistentes y no resistentes (Baquero et al., 2008; Cantón, 2009).

En los últimos años han sido estudiados una diversa cantidad de ambientes en donde se han detectado una elevada diversidad y cantidad de ARGs; por ejemplo: reservorios de agua y aguas superficiales (Czekalski et al., 2012; Marti et al., 2014a; Stoll et al., 2012), aguas residuales (Michael et al., 2013; Munir et al., 2011), residuos fecales animales (Colomer-Lluch et al., 2011; Economou & Gousia, 2015), agua residual regenerada (Fahrenfeld et al., 2013; Huang et al., 2011), lodos de depuradora (Auerbach et al., 2007; Calero-Cáceres et al., 2014), sedimentos de río (Berglund et al., 2014; Luo et al., 2010; Pei et al., 2006) y suelos (Nesme & Simonet, 2015).

Una gran cantidad de estudios están enfocados en la codificación de ARGs en plásmidos o transposones. Sin embargo, en investigaciones recientes se resalta la contribución de los fagos en la diseminación de ARGs. Esto puede ser de interés particular en el medio ambiente, en donde los fagos pueden proteger al ADN de la degradación ambiental, además del hecho de que no se requiere el contacto directo entre células (Colomer-Lluch et al., 2011a; Marti et al., 2014b). Los factores que contribuyen a la diseminación de ARGs, por medio de cualquier vehículo de transmisión, desde los reservorios ambientales a ambientes clínicos deberían ser investigados.

Las variaciones climáticas son consideradas como factores potenciales que pueden influir en la diseminación de ARGs (Laxminarayan et al., 2013) y la

región Mediterránea es muy vulnerable a estos cambios. De acuerdo a estudios climáticos, se ha observado un decrecimiento en las tendencias temporales y modificaciones en los períodos de precipitaciones durante las últimas décadas (Agència Catalana de l'Aigua, 2009a; Turco & Llasat, 2011). Se estima que la región Mediterránea continuará siendo afectada por lluvias torrenciales y sequías (IPCC, 2008). Dentro de la zona, el río Llobregat es un río Mediterráneo el cual ha sido seleccionado en este estudio debido a que sufre un moderado impacto de efluentes industriales y urbanos (Sabater et al., 2015) y contiene una cantidad significativa de antibióticos (Cabeza et al., 2012; Osorio et al., 2012). En la evaluación de riesgos para la salud, sería importante identificar diferentes reservorios ambientales de ARGs, así como su persistencia y la influencia de los eventos climáticos en la movilización de ARGs.

Objetivos

En el presente estudio se planteó:

- Evaluar la ocurrencia de seis ARGs (*bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *qnrA*, *qnrS*, *sul1*, *mecA*) de importancia clínica en las fracciones fágica y bacteriana de agua y sedimentos del río Llobregat.
- Correlacionar las prevalencias y densidades de ARGs en agua de río y sedimentos del río Llobregat con las condiciones climáticas
- Evaluar la persistencia de los ARGs en los sedimentos por medio de mesocosmos *in vitro* que simulen condiciones naturales.

Resultados y discusión

Este estudio fue realizado el período septiembre 2012-diciembre 2014, en el cual se tomaron 69 muestras de agua de río y 70 muestras de sedimentos. Para la evaluación del efecto de las condiciones ambientales en la densidad de ARGs, se obtuvieron en las bases de datos de la Agència Catalana de l'Aigua, 2015 y la Generalitat de Catalunya, 2015 los registros de caudal, temperatura promedio, precipitación acumulada y radiación solar (ver Tabla 2 pg. 25). Todas las muestras de agua de río y sedimentos fueron positivas para uno o más genes. La figura 3 del artículo sometido, muestra las densidades en log₁₀/mL o g de cada gen en las fracciones bacteriana y fágica.

En el agua de río, los genes más prevalentes fueron *sul1* y *bla_{TEM}*, cuyas abundancias fueron cercanas al 100% en las fracciones bacteriana y fágica. Los genes de resistencia a quinolonas, *qnrA* y *qnrS* también mostraron una elevada prevalencia, en especial en la fracción bacteriana. *qnrS* mostró densidades promedio superiores a *qnrA*, sin embargo presentó una mayor variabilidad entre puntos de muestreo. *bla_{CTX-M}* tuvo una prevalencia inferior al 50% de las muestras de agua en ambas fracciones. *mecA* fue el gen menos prevalente en las fracciones bacteriana y fágica, sin embargo su densidad, cuando estaba presente, fue mayor que *qnrA* y *bla_{CTX-M}*.

En las muestras de sedimentos observamos una tendencia similar a las prevalencias del agua de río, aunque son considerablemente superiores. *sul1* y *bla_{TEM}* fueron positivos en el 100% de muestras y fracciones, sin embargo sus abundancias son heterogéneas. Los genes de resistencia a quinolonas presentan una prevalencia que ronda el 90% en la fracción bacteriana, mientras que en la fracción fágica es menor. El gen *bla_{CTX-M}* fue detectado en cerca del 80% de muestras en la fracción bacteriana y con una menor prevalencia en la fracción de bacteriófagos. Nuevamente, el gen con menor tasa de detección fue *mecA*, con un 47% de positivos en ADN bacteriano. Únicamente 4 de 70 muestras contenían este gen en la fracción de fagos.

Basándonos en la hipótesis que los cambios climáticos pueden influenciar las densidades de ARGs en ambas fracciones, en este estudio analizamos las concentraciones de ARGs y buscamos encontrar una correlación con episodios de lluvia y sequía. Sin embargo, no encontramos correlaciones significativas entre las densidades y ocurrencia de determinados ARGs y condiciones ligadas a estos eventos climáticos ($P=0,05$; Test de Wilcoxon), tales como lluvias o insolación, en agua y sedimentos, ni analizando separadamente las fracciones bacteriana y fágica. Adicionalmente, analizamos el efecto del caudal del río, el cual está sometido a factores estacionales como deshielo y lluvia. Sin embargo, únicamente detectamos diferencias significativas en el gen *sul1* de la fracción bacteriana ($P=0,05$).

La temperatura media de la cuenca del Llobregat fluctúa unos 15 °C al año, por lo que analizamos la relación ARGs-temperatura. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en aguas y sedimentos, ni en las fracciones bacteriana y fágica ($P=0,05$).

Por último, analizamos el efecto de la estacionalidad, fenómeno climático ligado a factores ambientales combinados. Por medio de esta agrupación, sí se detectaron correlaciones significativas ($P >0,05$) en las prevalencias de ARGs entre estaciones (ver Fig. 4). En agua, los ARGs bacterianos mostraron elevadas

prevalencias en invierno, y valores significativamente más bajos en verano y otoño. En la fracción de bacteriófagos, las prevalencias no variaron para *bla*_{TEM}, mientras que para *sul1 mecA* y *qnrS* fueron más altas en invierno, y variables en otoño, primavera o verano según el gen. . Además, diferencias estadísticas en los valores medios de ARGs/mL o g fueron encontradas entre estaciones (Test de Mood). Se observó un incremento en las densidades en la fracción bacteriana en invierno, y durante verano y otoño en la fracción fágica. Sin embargo, se observaron resultados diferentes según el ARG en estudio.

De acuerdo a los niveles analizados en la primera parte del estudio, se considera a los sedimentos como un potencial reservorio de ARGs en la cuenca del río; el análisis de la prevalencia en éstos es relevante para la evaluación de su posible movilización desde los sedimentos al agua del río. Por ello, evaluamos la persistencia de los genes más abundantes (*sul1* y *bla*_{TEM}) en ambas fracciones (bacteriana y fágica) (Fig. 5 artículo sometido) de tres tipos de sedimentos del río. Estos experimentos fueron desarrollados en tres mesocosmos (A: correspondiente al sedimento en el fondo del río mesocosmo exterior en agua, B: sedimento en la ribera (semiseco) y C: sedimento seco), los detalles se encuentran en la figura 2 del artículo. En el mesocosmos A, se observó una reducción de 4 log₁₀ unidades de *E. coli*, en cambio SOMCPH y los ARGs muestran una clara estabilidad durante 14 días, sin diferencias significativas (P>0.05, t-Student). En el mesocosmos B, a los 35 días no se detectó la presencia de *E. coli* y SOMCPH; sin embargo los ARGs mostraron una baja reducción en la fracción bacteriana (<0.8 log₁₀), en la fracción fágica se observó una reducción entre 0.1 y 2 log₁₀ unidades. En el mesocosmos C, *E. coli* y SOMCPH fueron inactivados a los 3 días; mientras que los ARGs mostraron una baja inactivación en ambas fracciones, desde 0.1 a 2 log₁₀ unidades.

Diferentes autores han encontrado correlaciones significativas entre episodios de lluvias extremas y un incremento en la concentración de indicadores microbiológicos en ríos (Shehane et al., 2005; Tilburg et al., 2015; Tornevi et al., 2014), sin embargo nuestros resultados no muestran variaciones en los niveles de ARGs como consecuencia de las precipitaciones acumuladas ni por incrementos en el caudal del río. Una explicación plausible a estas diferencias puede ser el efecto de la dilución del agua, la indeterminada influencia de la descarga de agua residual tratada de las 63 WWTPs en la cuenca del Llobregat (Sabater et al., 2012), así como la contaminación incidental por parte de industrias (Boleda et al., 2007; La Vanguardia, 2015a, 2015b; Sabater et al., 2015).

Los otros factores ambientales (temperatura y radiación solar) considerados por separado, no mostraron correlaciones con las densidades de ARGs. Sin embargo

se observó una marcada diferencia en las prevalencias y densidades de acuerdo a las estaciones. A pesar de esto, el efecto multifactorial de las estaciones no permitió determinar porqué todos los ARGs no mostraron las mismas diferencias estacionales en ambas fracciones. Como se mencionó anteriormente, el río Llobregat lleva consigo una influencia antropogénica indeterminada, por consiguiente las correlaciones observadas entre estaciones incluyen una incertidumbre considerable. Sin embargo, nuestros hallazgos resaltan el rol de los sedimentos como un reservorio importante de ARGs en las fracciones bacteriana y fágica.

Conclusiones

- Se detectaron elevadas densidades de ARGs en las fracciones bacteriana y fágica en el agua y sedimentos del río Llobregat.
- El sedimento es un reservorio de ARGs en ambas fracciones.
- Se observaron diferencias estacionales en los niveles de ARGs, en especial en la fracción fágica de agua de río y sedimentos.
- Los ARGs presentes en sedimentos mostraron una elevada persistencia durante largos períodos de tiempo, en ambientes húmedos, semi-secos y secos. Confirmando su rol como reservorios ambientales de ARGs.

1 **The sediment of a Mediterranean river is a reservoir of antibiotic resistance genes**

2 William Calero-Cáceres, Javier Méndez, Julia Martín-Díaz and Maite Muniesa*

3

4 Department of Microbiology. University of Barcelona. Diagonal 643. Annex. Floor 0.

5 E-08028 Barcelona. Spain.

6

7 *corresponding author

8 Maite Muniesa

9 Phone: +34934039386

10 Fax: +34934039047

11 E-mail: mmuniesa@ub.edu

12

13 **Running title:** antibiotic resistance genes in river and sediment

14

15

16 **ABSTRACT**

17 The spread of antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment is a serious
18 concern. Bacterial ARGs can spread via different mobile genetic elements, among
19 others, phage particles emerge as novel vectors for environmental dissemination. To
20 assess how changes in climate events, like heavy rains or water scarcity, could affect the
21 spread of ARG, it is necessary to generate data in water environments. This study
22 evaluates the occurrence of ARGs in water and sediment in a Mediterranean river. Six
23 clinically relevant ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrS*, *mecA* and *sulI*) were quantified
24 by qPCR in the bacterial and phage fractions of 69 water and 70 sediment samples from
25 River Llobregat (NE Spain). *bla*_{TEM} and *sulI* were the most prevalent and abundant

26 ARGs while others were more variable. Significant seasonal differences in ARG
27 prevalence and abundance were detected. Since the sediment could be considered as
28 possible reservoir for ARGs, their persistence was evaluated. Results showed that ARG
29 persisted where microbial indicators inactivated. No ARG inactivation occurred in fresh
30 sediment over 14 days and declined by less than 2 log₁₀ units over 35 days in semi-dry
31 and dry sediments. River sediment can be then considered as a natural reservoir of
32 ARGs, from where they can move to the water, influenced by seasonal conditions, and
33 might cause the emergence of new resistant bacteria.

34

35 **Keywords:** antibiotic resistance, bacteriophages, persistence, seasonal, river, sediment.

36

37

38 **1.- Introduction**

39 Since their introduction, the misuse and overuse of antibiotics has played a crucial role
40 in the development of antibiotic resistances (Hall, 2004; Roca et al., 2015; Rodríguez-
41 Rojas et al., 2013). The emergence of multiresistant bacteria poses a threat to the
42 treatment of bacterial infections. Antibiotic resistance can be generated by mutation or
43 acquired via antibiotic resistance genes (ARGs) that can mobilize through horizontal
44 gene transfer (HGT) across bacterial populations. The mobile genetic elements for
45 ARGs dissemination most commonly studied are plasmids, transposons and phages
46 (Muniesa et al., 2013).

47 Given that many genera found in diverse environments carry resistance determinants
48 (Davies and Davies, 2010), it is feasible that many antibiotic resistance genes originate
49 in the environment and persist in environmental reservoirs. This phenomenon may
50 provide long-term selective pressure for the emergence of resistance in antibiotic-

51 producing as well as non-producing organisms (Cantón, 2009, Baquero et al., 2008).
52 Studies conducted in freshwater reservoirs and surface water (Czekalski et al., 2012;
53 Marti et al., 2014; Stoll et al., 2012), human sewage (Michael et al., 2013; Munir et al.,
54 2011), animal faecal waste (Colomer-Lluch et al., 2011a; Economou and Gousia, 2015;
55 Hsu et al., 2014), reclaimed water (Fahrenfeld et al., 2013; Huang et al., 2011), sewage
56 sludge (Auerbach et al., 2007; Calero-Cáceres et al., 2014) and river sediments
57 (Berglund et al., 2014; Luo et al., 2010; Pei et al., 2006) and soil (Nesme and Simonet,
58 2015) support the hypothesis of the environmental origin of ARGs.

59

60 Many studies have focused on ARG codification in plasmids or transposons, but recent
61 studies highlight the contribution of phages to dissemination of ARGs. These might be
62 particularly relevant in the environment, where phage capsids could better protect the
63 DNA from degradation and where no direct cell-to-cell contact is required (Colomer-
64 Lluch et al., 2011b; Marti et al., 2014). The factors contributing to the spread of ARGs
65 by any vehicle from their environmental reservoirs to clinical settings should be further
66 explored.

67

68 Climatic variations are considered as potential factors influencing ARGs dissemination
69 (Laxminarayan et al., 2013) and the Mediterranean region, with its seasonal
70 fluctuations, is vulnerable to these variations. The Mediterranean basins constitute one
71 of the most water-stressed areas in the world, with regard to the possible consequences
72 of climate change. Although records indicate a decrease in temporal trends and stable
73 long-term precipitation patterns in the last decades (Agència Catalana de l'Aigua, 2009;
74 Turco and Llasat, 2011). The region will continue to be affected by heavy rain events
75 and droughts (IPCC, 2008). The River Llobregat is a Mediterranean river that has been

76 used as model for this study because it suffers a moderate impact of humans and
77 industrial effluents (Sabater et al., 2015) and contains a significant amount of antibiotic
78 drugs products (Cabeza et al., 2012; Osorio et al., 2012).

79

80 For the quantification of health risks, it is important to identify different environmental
81 reservoirs of ARGs, how well ARGs can persist there and how climate events can affect
82 the mobilization of ARGs from these reservoirs. Here we evaluate the occurrence of six
83 clinical relevant ARGs in the bacteria and bacteriophage fractions of the water and
84 sediments from the River Llobregat and evaluates the persistence of ARGs in the
85 sediment using *in vitro* mesocosms that simulate natural conditions.

86

87 **2.- Material and Methods**

88 **2.1- Samples.**– 69 water and 70 sediment samples were collected between September
89 2012 and December 2014 from an influent of the River Llobregat (WSG84: 41.347861,
90 2.048154) (FIG 1). The river presents strong seasonal variability related to temperature
91 and precipitation, and the streamflow shows prolonged periods below 5 m³/s with rapid
92 transitions related to runoff episodes that can increase the flow to 400 m³/s in just one
93 day. The mean annual precipitation in the river catchment area is 3330 hm³, and the
94 average annual discharge is 693 hm³ (Agència Catalana de l'Aigua 2015a; Köck-
95 Schulmeyer et al. 2011; Muñoz et al. 2009).

96 All the samples were collected in sterile containers, transported to the laboratory at 5°C
97 ± 2°C within two hours of collection, and processed immediately for bacterial counts
98 and further experiments.

99

100 **2.2- Evaluation of *E. coli* and somatic coliphages.-** To provide controls of culturable
101 bacteria and infectious phages in the samples, *E. coli* and somatic coliphages were
102 quantified. *E. coli* was enumerated following standardized methods (ISO 9308)
103 (Anonymous, 2014). Briefly, serial decimal dilutions of the samples were filtered
104 through membrane filters with a 0.45 µm pore diameter (47 mm, white gridded, EZ-
105 Pak® Membrane Filters, Millipore, Bedford, MA). The membranes were placed upside
106 up on Chromocult® Coliform Agar for *E. coli*, and incubated at 44°C for 18 h. Somatic
107 coliphages were quantified following ISO 10705-2 (Anonymous, 2000). To this end,
108 river water samples were filtered through low protein-binding membrane filters with a
109 0.22 µm pore size (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA), decimal diluted and processed
110 following the standard procedure using *E. coli* WG5 (ATCC 700078) as the host. All
111 the samples were analysed in triplicate.

112

113 **2.3.- Bacterial DNA extraction.-** To extract bacterial DNA from water, 100 mL of the
114 water samples was filtered through membrane filters with 0.45 µm pore diameter (47
115 mm, white gridded, EZ-Pak® Membrane Filters, Millipore, Bedford, MA, USA). The
116 membranes were rinsed twice with 10 mL PBS that was filtered through them to reduce
117 the number of viral particles as much as possible (Muniesa et al., 2005). The bacterial
118 content of the membranes was recovered in Luria Bertani broth (LB). The suspensions
119 were centrifuged at 3,000xg for 10 min and the pellet was suspended in 200 µl of LB.
120 Bacterial DNA was extracted using Macherey-Nagel NucleoSpin® Blood (Düren,
121 Germany) following the manufacturer's instructions. For bacterial DNA from
122 sediments, samples were homogenized using phosphate buffered solution (PBS) at pH
123 7.4 (1:10 w:v) in a vertical shaker for 30 min at 900 osc/ min. The suspension was then
124 centrifuged at 3,000xg. The bacterial DNA was extracted from the pellet using the

125 PowerSoil® DNA extraction kit from Mobio Laboratories Inc (Carlsbad, CA, USA) and
126 following the manufacturer's instructions.

127

128 **2.4.- Bacteriophage DNA extraction.-** To purify the bacteriophage fraction of the
129 water samples, 100 mL of each was centrifuged at 3,000xg for 10 min and the
130 supernatant was filtered, concentrated, extracted and purified following the method
131 described above.

132 Phages from sediment samples were extracted using previously validated protocol for a
133 similar matrix (Calero-Cáceres et al., 2014). Briefly, sediments were homogenized
134 using phosphate buffered solution (PBS) at pH 7.4 (1:10 w:v) in a vertical shaker for 30
135 min at 900 osc/ min. The suspension was then centrifuged at 3,000xg and the
136 supernatant was filtered through low protein binding membrane filters with a 0.22 µm
137 pore size (Millex-GP, Millipore, Bedford, USA). Viral particles were 100-fold
138 concentrated by means of protein concentrators (100 kDa Amicon Ultra centrifugal
139 filter units, Millipore, Bedford MA, USA) to a final volume of 1 ml. The phage
140 suspension was treated with chloroform 1:10 (v:v) to eliminate possible membrane
141 vesicles containing DNA that might be present in the samples. The chloroform-treated
142 samples were vortexed and centrifuged at 16,000 xg for 10 min, and the aqueous phase
143 was recovered. The supernatant was DNase treated (100 units/mL of the phage lysate at
144 37°C for 1 h), to rule out the presence of non-packaged DNA. The DNase was heat
145 inactivated at 80°C for 10 minutes. Phage DNA was extracted using proteinase K
146 digestion and phenol-chloroform (1:1, v:v) (Calero-Cáceres et al., 2014). The
147 concentration and purity of the phage DNA extracted was determined using a NanoDrop
148 ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). To verify the absence of non-
149 packaged DNA, the protocol for DNA extraction from the phage fraction of the samples

150 was always accompanied by several controls as described previously (Colomer-Lluch et
151 al., 2014a).

152

153 **2.5.- qPCR procedures.-** This study focused on six relevant ARGs that were previously
154 detected and known to be abundant in our area (Colomer-Lluch et al., 2011a) which
155 differ in their resistance mechanisms and clinical significance. Two genes that confer
156 resistance to β -lactam antibiotics were evaluated (*bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} cluster 1); as
157 were two quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*), one gene conferring resistance to
158 methicillin (*mecA*), commonly found in *Staphylococcus*, and *sull* conferring resistance
159 to sulfonamides (Calero-Cáceres et al., 2014).

160 TaqMan qPCR assays were performed for the quantification of the genes (*bla*_{TEM},
161 *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrS*, *sull*, *mecA*) in the DNA from the bacterial and phage fractions of
162 the water and sediment samples (Table 1); the standards and conditions were as
163 described previously (Calero-Cáceres et al., 2014; Colomer-Lluch et al., 2014a, 2011b).
164 The qPCR assays were performed under standard conditions in a Step One Real-Time
165 PCR System (Applied Biosystems). All the samples were assayed in duplicate, as were
166 the standards, and positive and negative controls. The GC was defined as the average of
167 the duplicate data obtained.

168

169 LB agar or broth was used for routine bacterial propagation and to prepare the standards
170 for qPCR assays.

171

172 **2.6.- ARG persistence in sediments.-** Fresh river sediment was used for the persistence
173 experiments carried out in summer 2015 (June-August). We evaluated three simulations
174 of three riverbank sediment scenarios: in the river, A; on the edge (semi-dry), B; and

175 dry, C. A was analysed using an outdoor artificial pond (60 m³; non-chlorinated water)
176 protected by a cage, in which dialysis tube containing the sediment were placed and
177 which was immersed at a depth of 100 cm in the pond (Fig. 2. A1-3). Because of the
178 loss of integrity of the dialysis tubes, these experiments lasted 15 days. To simulate
179 sediment at the river edge, B, sediment was placed in trays on filter paper that was
180 continuously kept humid with distilled water (Fig. 2. B). Dry sediment, C, was studied
181 as the semi-dry sediment was, but without maintaining the humidity of the sample. B
182 and C were both placed outdoors, exposed to sunlight radiation and aliquots of the
183 samples were removed after 1, 3, 7, 14, 21, 28 and 35 days.

184 *E. coli* and somatic coliphages were used as control of culturable bacteria and infectious
185 phages and the two most abundant ARG (*sull* and *bla*_{TEM}) in the bacterial and phage
186 fractions were quantified.

187

188 Temperatures and irradiation rates on these days were obtained from the database of the
189 regional weather forecast service (*Servei Metereològic de Catalunya*).

190

191 **2.7.- Statistical analysis.-** Statistical analysis was carried out using the R software
192 packages (R Team 2014). Non-parametric analysis was performed using the Wilcoxon
193 rank-sum and signed rank tests, as well as the Kruskal-Wallis rank-sum test. Student's-t
194 analysis with equal variances was used to evaluate ARG persistence in the mesocosms;
195 the evaluations were based on a 1% and a 5% significance level. Mood's median tests
196 were carried out using the package RVAideMemoire ([https://CRAN.R-](https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire)
197 [project.org/package=RVAideMemoire](https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire)); variables were grouped when required,
198 according Sturges' rule.

199

200

201 **3.- RESULTS**

202 **3.1.- Densities of ARGs in water samples.**

203 River water samples showed an averaged *E. coli* density of 2.0 log₁₀ cfu/mL and of 2.4
204 log₁₀ pfu/mL of somatic coliphages with small variability (SD of 0.6 and 0.4
205 respectively). All the samples analysed were positive for one or more ARGs. Generally,
206 the number of copies of *bla*_{TEM}, *qnrA*, *qnrS*, *mecA* and *sulI* detected in the bacterial
207 fraction of the samples was equal or higher than in the bacteriophage DNA (Fig. 3A).

208

209 The highest prevalence was of *sulI*; detected in 100% of the samples in bacterial
210 fraction and 94% in the bacteriophage DNA fraction. The abundance of *sulI* in bacteria
211 varied between samples in bacteria and bacteriophage fraction (Fig. 3A). A similar trend
212 was observed in *bla*_{TEM}: (97% of samples) and in the bacteriophage fraction (100% of
213 samples).

214

215 The quinolone resistant genes *qnrS* and *qnrA* were the third (93% of samples) and
216 fourth (80% of samples) most prevalent genes in the bacterial fraction respectively.
217 *qnrS* was also the fourth most prevalent in the bacteriophage fraction (54%) with an
218 average concentration of 1.4 log₁₀ GC/mL. *qnrA* averaged densities in bacteria were 1
219 log₁₀ unit lower than for *qnrS*, but the *qnrS* values were more variable and some samples
220 showed higher densities of *qnrA*. In comparison, *qnrA* was the third most prevalent gene
221 in the bacteriophage fraction (70% of samples), but at low densities (<1 log₁₀ GC/mL).

222

223 *bla*_{CTX-M} genes showed a low prevalence in both the bacterial (48% of samples) and the
224 bacteriophage (41% of samples) fraction. On average, 1.4 log₁₀ GC/mL were detected in

225 the bacterial fraction with low variability; while in the bacteriophage fraction, the
226 average was slightly higher (Fig. 3A). The prevalence of *mecA* was the lowest in all the
227 samples: 36% of samples in bacteria and 12% of samples in phage DNA. Despite this,
228 its density in both fractions was higher than *bla*_{CTX-M} and *qnrA* (Fig. 3A).

229

230 **3.2.- Densities of ARGs in river sediment samples.**

231 The method used here to purify bacteria and phages from the sediments fraction was
232 previously evaluated and confirmed to allow specific purification of bacterial and phage
233 fraction in a similar matrix (Calero-Cáceres et al., 2014). Even if it cannot be
234 completely excluded a minor DNA contamination from other fractions, or some loss of
235 particles during the extraction procedure, the contribution of this DNA to the total
236 numbers should be negligible.

237

238 Sediments samples showed an averaged *E. coli* density of 3.9 log₁₀ cfu/g and of 4.3
239 log₁₀ pfu/g of somatic coliphages and SD of 0.96 and 0.85 respectively. All the
240 sediments analysed were positive for one or more ARGs in both fractions. Higher
241 values were found in the bacterial fraction than the bacteriophage fraction for all the
242 genes (Fig. 3B).

243

244 Again, the greatest prevalence and abundance in both fractions were for *sulI* and *bla*_{TEM}
245 (100% of samples). In the bacterial fraction, the average *sulI* value was 6.5 log₁₀ GC/g
246 with a maximum value of 9 log₁₀ units GC/g. In the phage fraction, the average value
247 was lower; however, greater variation was observed in the phage DNA, with maximum
248 a value of 9.6 log₁₀ units. This gene showed the most heterogeneous densities in
249 sediment samples (Fig. 3B). The quinolone resistance genes in sediments presented

250 similar incidences: 91% positive for *qnrA* and 90% positive for *qnrS*. The average
251 concentrations were 5.6 log₁₀ GC/g for *qnrA* and 6.5 log₁₀ GC/g for *qnrS* in bacteria
252 respectively. These were less in the bacteriophage fraction (27% and 54% respectively)
253 and with lower densities. *bla*_{CTX-M} was detected in 79% of samples in the bacterial
254 fraction with an average of 4.6 log₁₀ GC/g; and a lower prevalence in the bacteriophage
255 fraction (40% of samples) also in lower densities. Again, the least prevalent gene in the
256 bacterial fraction was *mecA*, with 47% of positive samples, but with a considerable
257 concentration when present (up to 4.0 log₁₀ GC/g). Only 4 of the 70 samples contained
258 *mecA* in the bacteriophage fraction, with varying densities.

259

260 **3.3.- Influence of rainfall and runoff on the prevalence of ARGs in the river.**

261 Based in the hypothesis that different climate events could modify the densities of
262 ARGs in either river or sediments in both fractions, we analyzed the ARG data and
263 searched for a correlation with rainfall and runoff. However, to clearly define these
264 events we used the variations in the river streamflow at to different points. Since in the
265 Mediterranean area, spring and autumn use to be the seasons with higher level of
266 rainfall, we distributed the data in the four seasons.

267

268 The river streamflow data was collected from the Sant Joan Despí station (UTM: 31T
269 420339 4578455), 100 meters from the sampling point. For the evaluation of the
270 influence of precipitation on the streamflow, two different points were selected in
271 accordance with the subsurface zonation of the Llobregat basin: P1. Castellbisbal
272 (UTM: 414555 4592635), dry sub-humid climate, 12 km from the sampling point; and
273 P2. Guardiola de Berguedà (UTM: 407253 4676590), sub-humid climate, 130 km from
274 the sampling point (Generalitat de Catalunya, 2015; Sabater et al., 2012) (Table 2).

275

276 For the period from autumn 2012 to autumn 2014, the Llobregat streamflow showed a
277 regular seasonal pattern (Table 2). During winter and summer, the flow was stable, with
278 the median season flow between 6 and 10 m³/s. Spring and autumn were more variable,
279 with streamflow averages between 5 and 25 m³/s, and dissimilar amplitudes, as a result
280 of the differences between seasonal precipitation and the effect of snowfall in the
281 Pyrenees. This suggests that rainfall was the most important factor that influenced the
282 abrupt streamflow transitions.

283

284 To evaluate variations in ARG load between rainfall and runoff episodes, the samples
285 were classified according the amount of precipitation (PPT24h, mm) at P1 (Water: 0,
286 20, 40, 60, 80; sediment: 0, 10, 20, 30, 40). No significant differences were identified
287 during rainfall and runoff (p=0.05; Wilcoxon test) in water and sediment, in either the
288 bacterial or bacteriophage fraction. In addition, to evaluate the effect of water load, the
289 samples were classified into 5 groups according to the streamflow (m³/s) at the
290 sampling point (Water: 0, 2.69, 32.69, 62.69 and 92.69; sediment: 0, 3.18, 10.18, 17.18
291 and 24.18); a significant difference was only observed in bacterial *sull* in sediments
292 (p=0.05; Wilcoxon test).

293

294 **3.4.- Seasonal influence on the prevalence of ARGs in the river.**

295 The mean temperature in the Llobregat basin fluctuates by 15°C annually (Table 2). The
296 temperatures at P1 and P2 are clearly similar. According to the temperature, the samples
297 were classified into 11 groups (Water: 5.98, 7.98, 9.98, 11.98, 13.98, 15.98, 17.98,
298 19.98, 21.98, 23.98 and 25.98; Sediments: 6.13, 8.13, 10.13, 12.13, 14.13, 16.13, 18.13,

299 20.13 and 22.13). No significant differences were found for any ARGs in the bacterial
300 or phage fractions with regard to temperature ($p=0.05$; Wilcoxon test).

301

302 Similarly, the samples were classified into 14 groups according to the solar irradiation,
303 to evaluate its effect on the densities of ARGs. No significant differences were observed
304 between groups in either fraction ($p=0.05$; Wilcoxon test).

305

306 To evaluate the effect of seasonality, the samples were classified into the seasons when
307 they were collected (Table 2). Even if a longer monitoring study would show better
308 correlations, there were significant ($P>0.05$; Wilcoxon test), differences in the
309 prevalences of ARGs between seasons. In water, bacterial ARGs showed the highest
310 prevalences in winter, and were significantly lower in summer and autumn (Fig. 4). In
311 the bacteriophage fraction, the prevalences did not vary for *bla*_{TEM}, were higher in
312 autumn and winter for *sull*, higher for *mecA* in winter, higher in winter and spring for
313 *qnrS*, and were significantly higher in summer and autumn for the least abundant genes:
314 *qnrA* and *bla*_{CTX-M} (Fig. 4). When looking at the sediments, the bacterial fraction showed
315 a stable prevalence for all the genes and a statistically significant reduction in
316 abundance in winter for *qnrA*, *qnrS* *mecA* and *bla*_{CTX-M}. However, when looking at the
317 phage fraction, it is clear that the most abundant genes did not display differences, but
318 the relative proportions of *qnrS*, *qnrA* and *bla*_{CTX-M}, and to a lesser extent *mecA*,
319 increased in summer and autumn (Fig. 4).

320

321 As for prevalence, statistical differences in the median values of ARGs/ml or ARG/g
322 were also found between seasons (Mood's test) for many, but not all, the ARGs. In
323 water, (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *mecA* and *sull* in bacteria; and *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *mecA*, *qnrS*

324 and *sulI* in phages) and in sediments (*bla*_{TEM}, *mecA*, *qnrA*, *qnrS* and *sulI* in bacteria;
325 and *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *qnrA*, *qnrS* and *sulI* in phages) showed statistical differences
326 between seasons, with an increase in the average densities in winter in the bacterial
327 fraction and in summer and autumn in the phage fraction.

328

329 **3.5.- ARGs persistence in river sediments.**

330 Considering that sediments appear to be an important ARG reservoir in the river basin,
331 the next set of experiments aimed to evaluate the persistence of these genes in both
332 fractions. As targets, the most abundant ARGs in the sediments, *sulI* and *bla*_{TEM} in both
333 the bacterial and bacteriophage fraction, were selected. qPCR values of these ARGs
334 were compared with culturable *E. coli* and infectious somatic coliphages as
335 microbiological controls. These experiments were conducted in summer when the
336 highest inactivation was expected. The outside temperature was 31.0°C-19.0°C, the
337 water temperature in the pond was between 30.8°C and 16.9°C, and the daily solar
338 irradiation averaged 15.0 mJ/m².

339

340 In mesocosm A, after 14 days, the numbers of *E. coli* had fallen more than 4 log₁₀ units
341 (Fig. 5A). In contrast, somatic coliphages showed a clear stability with a small
342 reduction of just 0.4 log₁₀ units. The ARG analysis showed no significant changes in the
343 bacterial or phage fraction for most of them (P>0.05, Student's-t test) with the exception
344 of *sulI* in the bacteriophage fraction, which showed a reduction of only 0.8 log₁₀ units.

345

346 In the semi-dry mesocosm (Fig. 5B), after 28 and 35 days, no presence of somatic
347 coliphages or *E. coli* was detected. The ARGs showed a much lower reduction: 0.8 log₁₀
348 units in bacteria and from 0.1 to 2 log₁₀ units for the phage fraction.

349

350 For the dry mesocosm (Fig. 5C), culturable *E. coli* and infectious somatic coliphages
351 were inactivated after 3 days, as expected. Again, lower inactivation was observed for
352 the ARGs in both the phage and bacterial fractions: from 0.1 to less than 2 log₁₀ units.
353 Again, *sull* in the phage fraction reduced the most rapidly (P>0.05, Student's-t test) and
354 *bla*_{TEM} in the phage fraction was the most persistent, with a reduction of just 0.4 log₁₀
355 units after 35 days. The bacterial *sull* and *bla*_{TEM} decay were equal at 1 log₁₀.

356

357

358 **4.- DISCUSSION**

359 Climate change projections for Mediterranean countries predict several changes in
360 hydrological cycles, in particular, the aggravation of water scarcity and both locally
361 concentrated heavy rain events and droughts is expected (IPCC, 2008; Palmer et al.,
362 2008). The period 2012-2014 showed heterogeneous precipitation with significant
363 variation between seasons and the consequent river streamflow shifts.

364

365 In this study, the six ARG were selected because of their clinical significance. However,
366 it should be noted that the goal of this study is not the quantification of specific ARGs,
367 but to elucidate whether the riverbed and its sediment could be a reservoir of any ARG.
368 This has been confirmed here, together with the fact that phage particles carrying ARGs
369 occur abundantly in this reservoir and play a predominant role.

370

371 Another objective was to estimate those factors that could cause ARG mobilization
372 from the sediment to the water and within the water along the river. Different authors
373 have reported a significant correlation between rainfall events and an increment in the

374 concentration of microbial indicators in river water (Shehane et al., 2005; Tilburg et al.,
375 2015; Tornevi et al., 2014). However, our results suggest that the variations in the
376 ARGs in the Llobregat River do not depend on the accumulated precipitations, which
377 are variable when comparing the same seasons in different years. For instance, the
378 highest value of bacterial *bla*_{TEM} in river water was found on 30/01/2014 (5.08 log₁₀
379 GC/mL) after a rainfall event of 8.1 mm in a 48 h period in Castellbisbal; however, after
380 one month of runoff at the same point, we found bacterial *bla*_{TEM} values in the same
381 quartile (4.64 log₁₀ GC/mL). The behavior of the of concentrations of bacteriophage
382 ARGs was observed to be similar: after a rainfall event of 38.7 mm over 4 days, the
383 highest value for *bla*_{TEM} was detected (4.92 log₁₀ GC/mL); while after 43 days with just
384 1.6 mm of accumulated precipitation, a similar concentration of bacteriophage *bla*_{TEM}
385 was found (4.84 log₁₀ GC/mL). Similar behavior was also observed for the other genes
386 and fractions.

387

388 The shifts in the Llobregat streamflow were not associated with increments in the ARG
389 load. The upper-quartile value distribution according to the streamflow shows no
390 regular trends. In the bacterial fraction, *bla*_{TEM}, *sull* and *mecA* present their highest
391 values with a river flow of 2.9-30.4 m³/s; while for *qnrA*, *qnrS* and *bla*_{CTX-M} it is
392 between 2.9 and 54.5 m³/s. The upper quartile values in the bacteriophage fraction
393 show even larger differences than for the bacterial fraction. For example, maximum
394 *bla*_{TEM} values were 2.9-92.9 m³/s and *qnrA* 2.9-66.3 m³/s.

395

396 One plausible explanation for these differences could be the effect of water dilution and
397 the undetermined influence of the continuous discharge of treated sewage into the River
398 Llobregat from 63 WWTPs (Sabater et al., 2012). According to several findings, the

399 WWTPs removal of ARBs and ARGs from sewage is still inefficient, as shown by the
400 considerable amount of ARGs detected in treated wastewater (Bouki et al., 2013;
401 LaPara et al., 2011). Furthermore, despite governmental efforts to control industrial
402 spills into the river, incidental pollution is still present today (Boleda et al., 2007; La
403 Vanguardia, 2015a, 2015b; Sabater et al., 2015) with a potential influence on the
404 microbiome and the physicochemical stability of the river.

405

406 However, even if flow, temperature or irradiation when considered separately do not
407 show any significant correlation with the different densities of ARGs in water or
408 sediments, we did observe a marked seasonal effect in the ARG concentrations and their
409 occurrence in samples from both fractions. Unfortunately, there is no clear explanation
410 as yet why all the ARGs did not show the same seasonal differences in both fractions. A
411 factor that should be considered though is the heterogeneity in occurrence and
412 abundance of the different ARGs in the samples, which influences statistical results.
413 Moreover, we tried to group samples by seasons to provide a group of samples with
414 statistical significance, but there is also considerable seasonal variability of conditions
415 in a Mediterranean river, with precipitation and streamflow the most variable factors in
416 the same season of different years (Table 2).

417

418 In general terms, the ARGs in the bacterial fraction in water showed higher prevalence
419 and abundance in winter; while in sediments, the opposite was the case. When looking
420 at phages, no clear trend could be observed in water, but there is a clear increase in the
421 prevalence and abundance of ARGs in phages in summer and autumn. One
422 interpretation of these observations could be a potential transmission of bacterial ARGs
423 to bacteriophages when temperatures and solar radiation increase. This would affect the

424 bacterial populations in the water more than the phages, considering the greater
425 persistence of phages than their bacterial hosts, when faced with natural inactivation
426 conditions (Allué-Guardia et al., 2012; Durán et al., 2002). In sediments, low
427 temperatures in winter reduce the prevalence of ARGs in bacteria and in phages, but the
428 prevalence in phages increases in summer and remains high in autumn. These changes
429 seem to affect the most abundant and prevalent *sull* and *bla*_{TEM} to a lesser extent, or the
430 differences are not so visible. Considering *mecA*, the general low prevalence in phages
431 made the evaluation of differences difficult.

432

433 As noted above, a major source of unreliability in the River Llobregat is the
434 anthropogenic influence. Consequently, the observed correlations between seasons and
435 the persistence of ARGs include a considerable uncertainty. Nevertheless, our findings
436 would seem to highlight sediments as an important reservoir of ARGs in both the
437 bacterial and bacteriophage fraction. If the climatic predictions for the Llobregat are
438 realized, the aggravation of water scarcity and the probable increase in dependence on
439 reclaimed water and water reservoirs to feed the streamflows could be negatively
440 affected by the presence of emerging contaminants, such as ARGs, released from these
441 reservoirs; particularly if they are mobilized by relatively persistent mobile genetic
442 elements.

443

444 **5.- Conclusions**

- 445 • ARGs can be detected in the bacterial and bacteriophage fractions of River Llobregat
446 water samples.
- 447 • ARGs can be detected in the bacterial and bacteriophage fractions of sediment from
448 the River Llobregat.

- 449 • Seasonal variations can be detected, particularly in the bacteriophage fractions of
450 river water and sediments.
- 451 • Those differences could be due to the spread of ARGs from bacteria via phage
452 particles.
- 453 • Naturally occurring ARGs in both the bacterial and phage fractions of sediment
454 persist for long periods in wet, semi-dry and dry conditions, confirming the role of
455 sediments as ARG reservoirs.
- 456 • The occurrence of ARGs in the environment poses the threat of the emergence of
457 new resistant bacterial clones.

458

459

460 **Acknowledgements:** This study was supported by the Generalitat de Catalunya
461 (2014SGR7), by the Ramon Areces Foundation and by the Xarxa de Referència en
462 Biotecnologia (XRB). W.Calero-Cáceres is recipient of PhD fellowship SENESCYT
463 2012 from the Republic of Ecuador Government.

464

465

466 **References**

467 Agència Catalana de l'aigua, 2016. Aigua en temps real [WWW Document]. URL [aca-](http://aca-web.gencat.cat/aetr/aetr2)
468 [web.gencat.cat/aetr/aetr2](http://aca-web.gencat.cat/aetr/aetr2) (accessed 1.26.16).

469 Agència Catalana de l'Aigua, 2009. Aigua i canvi climàtic [WWW Document].
470 Diagnosi dels impactes Previs. a Catalunya. URL [http://aca-](http://aca-web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?_nfpb=true&_pageLabel=P17200198371242729159775&_nfls=false)
471 [web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?_nfpb=true&_pageLabel=P172001983712](http://aca-web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?_nfpb=true&_pageLabel=P17200198371242729159775&_nfls=false)
472 [42729159775&_nfls=false](http://aca-web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?_nfpb=true&_pageLabel=P17200198371242729159775&_nfls=false) (accessed 12.18.15).

473 Allué-Guardia, A., Jofre, J., Muniesa, M., 2012. Stability and infectivity of cytolethal
474 distending toxin type V gene-carrying bacteriophages in a water mesocosm and
475 under different inactivation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5818–5823.
476 doi:10.1128/AEM.00997-12

477 Anonymous, 2014. ISO 9308-1:2014 - Water quality -- Enumeration of *Escherichia coli*
478 and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method for waters with low
479 bacterial background flora.

- 480 Anonymous, 2000. ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of
481 bacteriophages -part 2: Enumeration of somatic coliphages.
- 482 Auerbach, E.A., Seyfried, E.E., McMahon, K.D., 2007. Tetracycline resistance genes in
483 activated sludge wastewater treatment plants. *Water Res.* 41, 1143–51.
484 doi:10.1016/j.watres.2006.11.045
- 485 Baquero, F., Martínez, J.-L., Cantón, R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in
486 water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 260–265.
487 doi:10.1016/j.copbio.2008.05.006
- 488 Berglund, B., Khan, G.A., Lindberg, R., Fick, J., Lindgren, P.-E., 2014. Abundance and
489 dynamics of antibiotic resistance genes and integrons in lake sediment
490 microcosms. *PLoS One* 9, e108151. doi:10.1371/journal.pone.0108151
- 491 Boleda, M.R., Diaz, A., Marti, I., Martín, J., Matia, L., Romero, J., Ventura, F., 2007. A
492 review of taste and odour events in Barcelona's drinking water area (1990-2004).
493 *Water Sci. Technol.* 55, 217–221.
- 494 Bouki, C., Venieri, D., Diamadopoulos, E., 2013. Detection and fate of antibiotic
495 resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicol. Environ.*
496 *Saf.* 91, 1–9.
- 497 Cabeza, Y., Candela, L., Ronen, D., Teijon, G., 2012. Monitoring the occurrence of
498 emerging contaminants in treated wastewater and groundwater between 2008 and
499 2010. The Baix Llobregat (Barcelona, Spain). *J. Hazard. Mater.* 239-240, 32–39.
500 doi:10.1016/j.jhazmat.2012.07.032
- 501 Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J.,
502 Muniesa, M., 2014. Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic
503 Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions. *Environ. Sci.*
504 *Technol.* doi:10.1021/es501851s
- 505 Cantón, R., 2009. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective
506 through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting.
507 *Clin. Microbiol. Infect.* 15 Suppl 1, 20–25. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x
- 508 Colomer-Lluch, M., Calero-Cáceres, W., Jebri, S., Hmaied, F., Muniesa, M., Jofre, J.,
509 2014a. Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of
510 Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance
511 patterns in each population. *Environ. Int.* 73, 167–75.
512 doi:10.1016/j.envint.2014.07.003
- 513 Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., Muniesa, M., 2011a. Bacteriophages
514 carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry.
515 *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4908–11. doi:10.1128/AAC.00535-11
- 516 Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2014b. Quinolone resistance genes (qnrA
517 and qnrS) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of
518 inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J. Antimicrob.*
519 *Chemother.* 69, 1265–74. doi:10.1093/jac/dkt528
- 520 Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2011b. Antibiotic resistance genes in the
521 bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* 6, e17549.
522 doi:10.1371/journal.pone.0017549
- 523 Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., Bürgmann, H., 2012. Increased levels
524 of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their
525 dissemination into lake geneva, Switzerland. *Front. Microbiol.* 3, 106.

- 526 doi:10.3389/fmicb.2012.00106
- 527 Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol.*
528 *Mol. Biol. Rev.* 74, 417–33. doi:10.1128/MMBR.00016-10
- 529 Durán, A.E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F., Jofre, J., 2002. Removal
530 and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* 92,
531 338–47.
- 532 Economou, V., Gousia, P., 2015. Agriculture and food animals as a source of
533 antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug Resist.* 8, 49–61.
534 doi:10.2147/IDR.S55778
- 535 Fahrenfeld, N., Ma, Y., O'Brien, M., Pruden, A., 2013. Reclaimed water as a reservoir
536 of antibiotic resistance genes: Distribution system and irrigation implications.
537 *Front. Microbiol.* 4, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2013.00130
- 538 Generalitat de Catalunya, 2015. Meteocat. El temps a Catalunya [WWW Document].
539 Dades EMA Castellbisbal i Guard. Berguedà. URL <http://www.meteo.cat/>
540 (accessed 1.26.16).
- 541 Hall, B.G., 2004. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. *Nat. Rev.*
542 *Microbiol.* 2, 430–435. doi:10.1186/1741-7007-11-14
- 543 Hsu, C.-Y., Hsu, B.-M., Ji, W.-T., Chang, T.-Y., Kao, P.-M., Tseng, S.-F., Shen, T.-Y.,
544 Shih, F.-C., Fan, C.-W., Liu, J.-H., 2014. A Potential Association Between
545 Antibiotic Abuse and Existence of Related Resistance Genes in Different Aquatic
546 Environments. *Water, Air, Soil Pollut.* 226, 2235. doi:10.1007/s11270-014-2235-z
- 547 Huang, J.J., Hu, H.Y., Tang, F., Li, Y., Lu, S.Q., Lu, Y., 2011. Inactivation and
548 reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of
549 a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 45, 2775–2781.
550 doi:10.1016/j.watres.2011.02.026
- 551 IPCC, 2008. Climate change and water: IPCC Technical Paper VI, Climate change and
552 water. doi:10.1016/j.jmb.2010.08.039
- 553 Köck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., Postigo, C., López-Serna, R., Pérez, S., Brix, R.,
554 Llorca, M., de Alda, M.L., Petrović, M., Munné, A., Tirapu, L., Barceló, D., 2011.
555 Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: The impact of discharges of
556 tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat river
557 (NE Spain). *Chemosphere* 82, 670–8. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.005
- 558 La Vanguardia, 2015a. El misterioso mal olor persiste en Barcelona.
- 559 La Vanguardia, 2015b. Agbar, en “alerta” tras 40 días sin captar agua del Llobregat por
560 vertidos contaminantes.
- 561 Lachmayr, K.L., Kerkhof, L.J., Dirienzo, A.G., Cavanaugh, C.M., Ford, T.E., 2009.
562 Quantifying nonspecific TEM beta-lactamase (blaTEM) genes in a wastewater
563 stream. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 203–11. doi:10.1128/AEM.01254-08
- 564 LaPara, T.M., Burch, T.R., McNamara, P.J., Tan, D.T., Yan, M., Eichmiller, J.J., 2011.
565 Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic
566 resistance genes into Duluth-Superior Harbor. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9543–9.
567 doi:10.1021/es202775r
- 568 Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K.M., Wertheim, H.F.L., Sumpradit,
569 N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D.,
570 Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar,

- 571 F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D.,
572 Brown, E.D., Cars, O., 2013. Antibiotic resistance-the need for global solutions.
573 *Lancet Infect. Dis.* 13, 1057–98. doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9
- 574 Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., Alvarez, P.J.J., 2010. Trends
575 in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environ. Sci.*
576 *Technol.* 44, 7220–7225. doi:10.1021/es100233w
- 577 Marti, E., Variatza, E., Balcázar, J.L., 2014. Bacteriophages as a reservoir of extended-
578 spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment.
579 *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O456–9. doi:10.1111/1469-0691.12446
- 580 Michael, I., Rizzo, L., Mc Ardell, C.S., Manaia, C.M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot,
581 C., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the
582 release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res.* 47, 957–95.
583 doi:10.1016/j.watres.2012.11.027
- 584 Muniesa, M., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J., 2005. Bacteriophages may bias
585 outcome of bacterial enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4269–
586 4275. doi:10.1128/AEM.71.8.4269-4275.2005
- 587 Muniesa, M., Colomer-Iluch, M., Jofre, J., 2013. Potential impact of environmental
588 bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiol.* 8, 739–
589 751. doi:10.2217/fmb.13.32
- 590 Munir, M., Wong, K., Xagorarakis, I., 2011. Release of antibiotic resistant bacteria and
591 genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water*
592 *Res.* 45, 681–93. doi:10.1016/j.watres.2010.08.033
- 593 Muñoz, I., López-Doval, J.C., Ricart, M., Villagrasa, M., Brix, R., Geiszinger, A.,
594 Ginebreda, A., Guasch, H., de Alda, M.J.L., Romaní, A.M., Sabater, S., Barceló,
595 D., 2009. Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological
596 community structure in the Llobregat River basin (northeast Spain). *Environ.*
597 *Toxicol. Chem.* 28, 2706–14. doi:10.1897/08-486.1
- 598 Nesme, J., Simonet, P., 2015. The soil resistome: a critical review on antibiotic
599 resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environ.*
600 *Microbiol.* 17, 913–30. doi:10.1111/1462-2920.12631
- 601 Osorio, V., Pérez, S., Ginebreda, A., Barceló, D., 2012. Pharmaceuticals on a sewage
602 impacted section of a Mediterranean River (Llobregat River, NE Spain) and their
603 relationship with hydrological conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19, 1013–
604 25. doi:10.1007/s11356-011-0603-4
- 605 Palmer, M.A., Liermann, C.A.R., Nilsson, C., Flörke, M., Alcamo, J., Lake, P.S., Bond,
606 N., 2008. Climate change and the world's river basins: anticipating management
607 options.
- 608 Pei, R., Kim, S.C., Carlson, K.H., Pruden, A., 2006. Effect of River Landscape on the
609 sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance
610 genes (ARG). *Water Res.* 40, 2427–2435. doi:10.1016/j.watres.2006.04.017
- 611 Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavalieri, M., Coenen, S., Cohen, J.,
612 Findlay, D., Gyssens, I., Heur, O.E., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R.,
613 Liébana, E., López-Cerero, L., MacGowan, A., Martins, M., Rodríguez-Baño, J.,
614 Rolain, J.-M., Segovia, C., Sigauque, B., Taconelli, E., Wellington, E., Vila, J.,
615 2015. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New*
616 *Microbes New Infect.* doi:10.1016/j.nmni.2015.02.007

- 617 Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Blázquez, J., 2013. Antibiotics
618 and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *Int. J. Med. Microbiol.*
619 303, 293–297. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.004
- 620 Sabater, S., Ginebreda, A., Barceló i Cullerés, D., Acuña, V., 2012. *The Llobregat : the*
621 *story of a polluted Mediterranean river.* Springer, Heidelberg :
- 622 Sabater, S., Muñoz, I., García-Berthou, E., Barceló, D., 2015. Multiple stressors in
623 Mediterranean freshwater ecosystems: The Llobregat River as a paradigm. *Contrib.*
624 *to Sci.* doi:10.2436/cs.v10i2.139204
- 625 Shehane, S.D., Harwood, V.J., Whitlock, J.E., Rose, J.B., 2005. The influence of
626 rainfall on the incidence of microbial faecal indicators and the dominant sources of
627 faecal pollution in a Florida river. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1127–1136.
628 doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02554.x
- 629 Stoll, C., Sidhu, J.P.S., Tiehm, A., Toze, S., 2012. Prevalence of clinically relevant
630 antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and
631 Australia. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9716–26. doi:10.1021/es302020s
- 632 Team, R.C., 2014. *R: A language and environment for statistical computing.* Vienna,
633 Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013.
- 634 Tilburg, C.E., Jordan, L.M., Carlson, A.E., Zeeman, S.I., Yund, P.O., 2015. The effects
635 of precipitation, river discharge, land use and coastal circulation on water quality in
636 coastal Maine. *R. Soc. open Sci.* 2, 140429. doi:10.1098/rsos.140429
- 637 Tornevi, A., Bergstedt, O., Forsberg, B., 2014. Precipitation effects on microbial
638 pollution in a river: lag structures and seasonal effect modification. *PLoS One* 9,
639 e98546. doi:10.1371/journal.pone.0098546
- 640 Turco, M., Llasat, M.C., 2011. Trends in indices of daily precipitation extremes in
641 Catalonia (NE Spain), 1951-2003. *Nat. Hazards Earth Syst. Sci.* 11, 3213–3226.
642 doi:10.5194/nhess-11-3213-2011
- 643 Volkmann, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., Obst, U., 2004. Detection of
644 clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-
645 time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods* 56, 277–86.
- 646



ARGs in river water

ARGs in environment



ARGs in river sediment



ARGs: Antibiotic resistance genes

Prevalence Influenced by climate events



phage



bacteria



Persistence of ARGs in Sediment



Humid



Semi-dry



Dry

Sediment is ARGs reservoir

Table 1. Oligonucleotides used in this study.

Target gene	Oligonucleotide name	Sequence 5'-3'	Amplicon	Reference
<i>bla</i> _{TEM}	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	85	(Lachmayr et al., 2009)
	LP	TGCATAATTCTCTTACTGTCATG		
	TaqMan TEM Probe	FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ		
<i>bla</i> _{CTX-M-1-group}	UP CTX-M	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	(Colomer-Lluch et al., 2011b)
	LP CTX-M	ACATCGCGACGGCTTTCT		
	TaqMan CTX-M Probe	FAM-TCGTGCGCCGCTG- MGBNFQ		
<i>mecA</i>		CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAA	92	(Volkman et al., 2004)
		TGGTCTTTCTGCATTCCTGGA		
		FAM-AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTTCCACA- T ^A M ^B D ^A		
<i>qnrA</i>	UP <i>qnrA</i>	AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC	138	(Colomer-Lluch et al., 2014b)
	LP <i>qnrA</i>	TGAACTCTATGCCAAAGCAGTTG		
	TaqMan <i>qnrA</i> probe	FAM-TATGCCGATCTGCGCGA- MGBNFQ		
<i>qnrS</i>	UP <i>qnrS</i>	CGACGTGCTAACTTGCGTGA	118	(Colomer-Lluch et al., 2014b)
	LP <i>qnrS</i>	GGCATTGTTGGAACTTGCA		
	TaqMan <i>qnrS</i> probe	FAM-AGTTCATTGAACAGGGTGA-MGBNFQ		
<i>sulI</i>	UP	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	67	(William Calero-Cáceres et al., 2014)
	LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT		
	TaqMan <i>sulI</i> probe	FAM-CGAGCCTTGCGGCGG-MGBNFQ		

Table 2.- Parameters of the river Llobregat at each season in the sampling point and temperature and accumulated precipitation obtained from two points upstream the sampling point

Season	Number of samples		Sampling point	P1 (Castellbisbal)			P2 (Guardiola de Berguedá)	
	River water	Sediment	Streamflow (m ³ /s)	Solar irradiance (mJ/m ²)	Average Temperature (°C)	Accumulated precipitation (mm)	Average Temperature (°C)	Accumulated precipitation (mm)
Autumn 2012	4	-	6.2 (5.5)	8.1 (2.7)	13.4 (4.9)	177.8	8.0 (5.2)	195.3
Winter 2012	7	5	6.8 (9.1)	8.3 (1.5)	8.4 (2.5)	128.4	3.4 (2.7)	136.3
Spring 2013	11	-	23.8 (19.4)	20.8 (7.4)	15.5 (3.5)	256.1	11.0 (3.9)	263.2
Summer 2013	8	-	9.1 (8.4)	23.9 (3.1)	23.3 (2.5)	55.0	17.9 (2.4)	382.5
Autumn 2013	6	3	6.0 (10.5)	12.0 (4.3)	13.9 (6.2)	162.6	8.6 (5.9)	86.4
Winter 2013	2	6	7.0 (2.9)	7.4 (3.6)	9.4 (2.4)	65.7	3.9 (3.2)	133.9
Spring 2014	7	14	8.0 (3.0)	22.1 (6.1)	16.7 (3.5)	157.8	12.4 (3.7)	228.1
Summer 2014	10	18	10,1 (8.2)	20.2 (5.5)	23.3 (1.6)	154.7	18.2 (2.0)	295.5
Autumn 2014	14	24	25.4 (56.3)	10.2 (6.2)	14.6 (4.4)	253.5	9.3 (4.4)	280.1

1 **Figures Legend**

2 **Figure 1.-** Map showing the sampling point on the River Llobregat. A and B:
3 Downstream and upstream views of the river, respectively. C: Sampling of sediment.
4 (© Instituto Geográfico Nacional| Dirección General del Agua. Ministerio de
5 Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA).

6 **Figure 2.-** Persistence experiments. A) Fresh sediment in an outdoor mesocosm. A1:
7 Cage where dialysis tubes (A2) were kept. A3: Outdoor pond used for the 15-day
8 experiments. B) Semi-dry sediment left outdoors with continuous humidity. B1:
9 Beginning of the experiment. B2: End of the experiment (day 35). C) As B, but
10 without added humidity.

11 **Figure 3.-** Densities (\log_{10} GC/mL or g) of each ARG in the bacterial (BAC) and phage
12 (PH) DNA fraction of river water (RW) and sediment (S) samples. In the box-plot
13 chart, the crosspieces of each box plot represent (from top to bottom) maximum,
14 upper-quartile, median (black bar), lower-quartile and minimum values. The black
15 diamond shows the mean value. The white boxes in the box-plot chart include
16 samples showing values within the 75th percentile and the coloured boxes show
17 values within the 25th percentile.

18 **Figure 4.-** Distribution of the ARGs in the DNA of the bacterial and bacteriophage
19 DNA fraction from river water (RW) and sediments (S). Results are presented in a
20 stacked column chart that compares the percentage of positive samples for each
21 category.

22 **Figure 5.-** Studies of inactivation of *bla*_{TEM} and *sull* (\log_{10} CG/g) in the bacteriophage
23 and bacterial fractions, culturable *E. coli* (\log_{10} CFU/g) and infectious somatic
24 coliphages (SOMCPH) (\log_{10} PFU/g) occurring naturally in sediments subjected to a
25 wet (A), semidry (B) and dry (C) mesocosm simulating the conditions of a riverbank.

Figure
[Click here to download high resolution image](#)



Figure. 1

Figure

[Click here to download high resolution image](#)



Figure 2

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

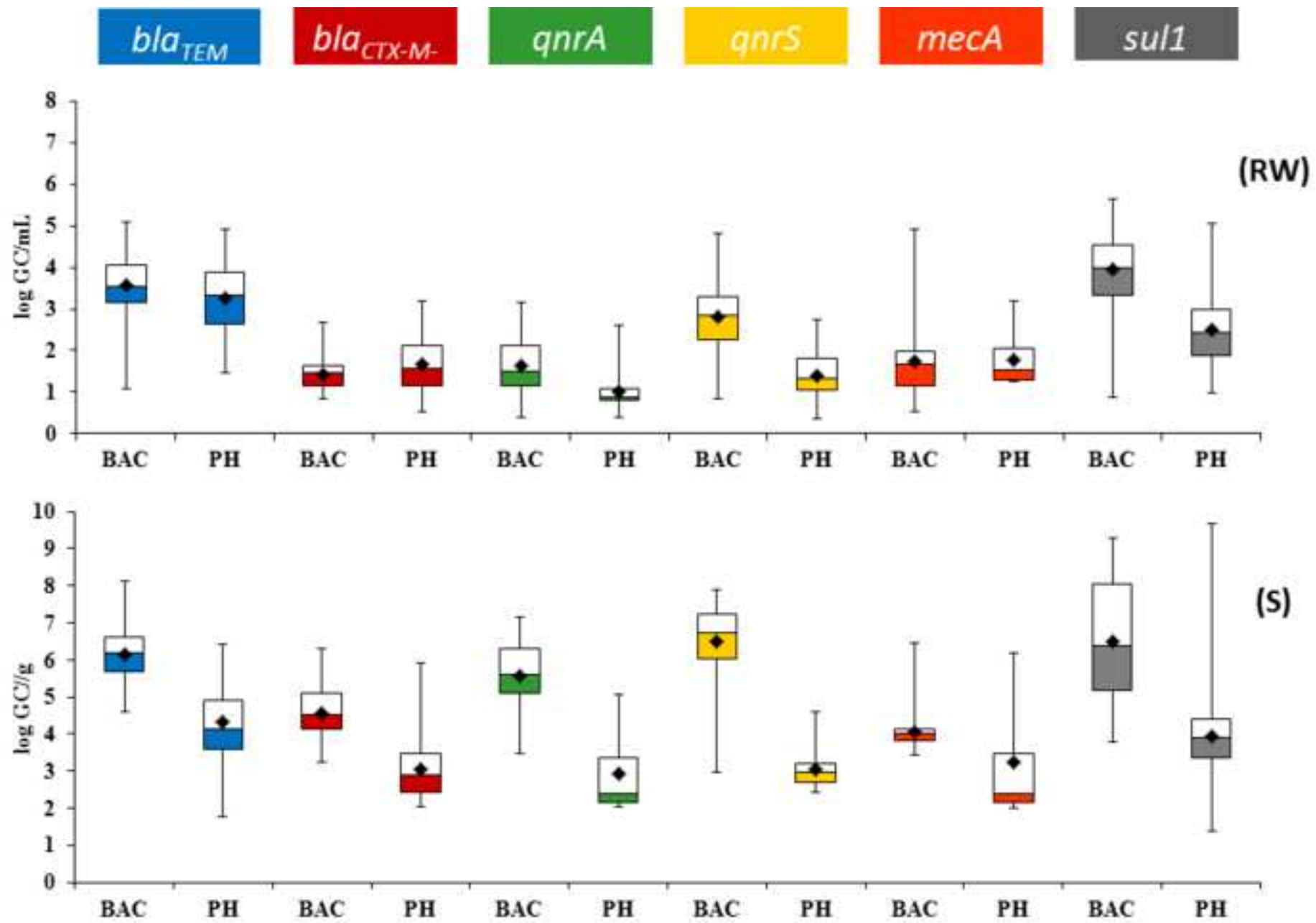


Figure 3

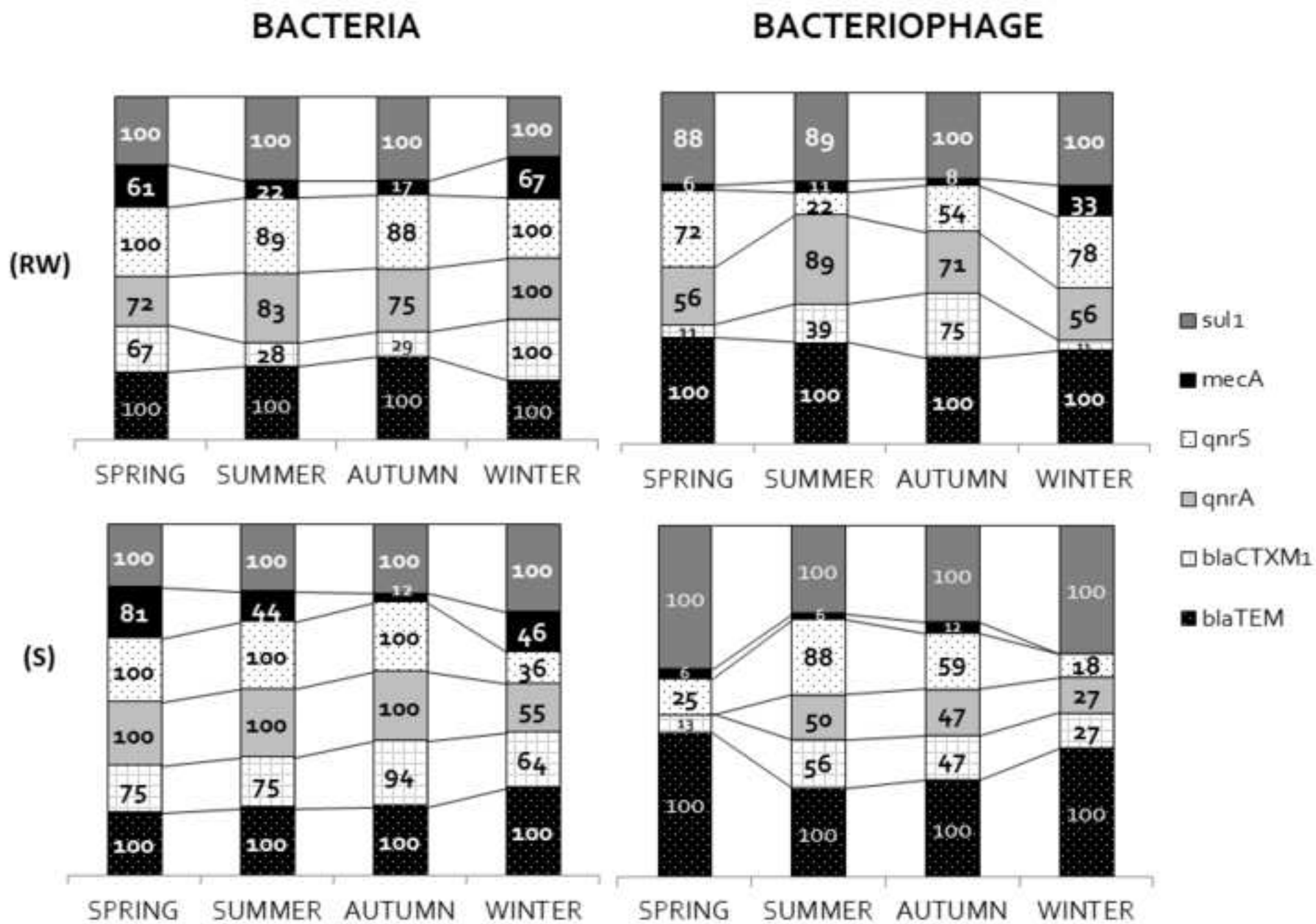


Figure 4

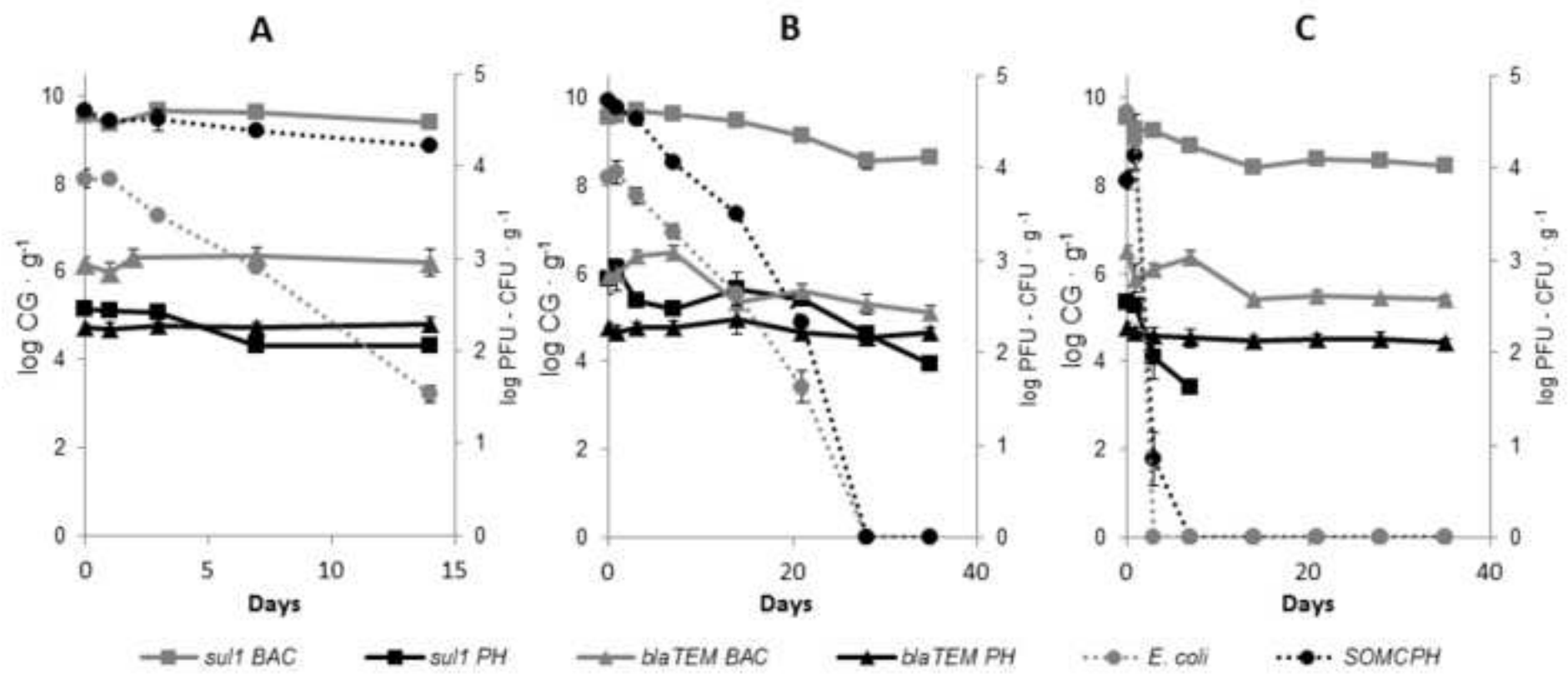


Figure 5

5. DISCUSIÓN GENERAL

Los antibióticos y las resistencias a antibióticos han coexistido durante miles de años en la naturaleza (D'Costa et al., 2011). Sin embargo, una aceleración del ritmo evolutivo bacteriano, causado por el uso y abuso del consumo de antibióticos, ha provocado una mayor diseminación de las resistencias, causando una emergencia de bacterias resistentes que generan un problema de salud pública de escala global (Shlaes, 2010; World Health Organization, 2015).

Tradicionalmente, el problema de las resistencias a antibióticos ha sido enfocado desde el aspecto clínico. No obstante, en los últimos años se ha resaltado el rol del medio ambiente en el origen y la evolución de ARGs (Berglund, 2015). El uso de antibióticos en diversos ambientes como: hospitales, industrias farmacéuticas, granjas, acuicultura, agricultura y en la población en general, favorece la selección de organismos resistentes y promueve la transmisión de genes de resistencia (Berendonk et al., 2015; Lupo et al., 2012). Los ambientes acuáticos como: ríos, efluentes de aguas residuales, lagos, etc., han recibido una especial atención ya que pueden facilitar el transporte y consiguiente diseminación de antibióticos y de ARGs (Aminov & Mackie, 2007; Czekalski et al., 2014; Czekalski et al., 2015; Xu et al., 2014).

Los genes presentes en el resistoma ambiental tienen el potencial de ser transferidos a organismos patógenos por medio de vehículos de HGT (Wright, 2010). Los nichos compartidos por patógenos y microorganismos ambientales son los ambientes ideales para el intercambio genético (Wiedenbeck & Cohan, 2011). Existen diversos ejemplos de detección de enzimas clínicas de resistencia a aminoglicósidos (Benveniste & Davies, 1973), β -lactamasas de amplio espectro como CTX-M (Humeniuk et al., 2002) o genes de resistencia a quinolonas (Baquero et al., 2008; Poirel et al., 2005a; Poirel et al., 2005b), que representan un ejemplo de movilización reciente desde el resistoma ambiental al clínico.

La microbiota intestinal posee una elevada diversidad microbiana, la cual está altamente influenciada por factores ambientales. La elevada densidad de microorganismos en el intestino favorece la generación de episodios de HGT (Aminov, 2011; Zoetendal et al., 2008). Diversos estudios confirman el rol de la microbiota intestinal como un reservorio importante de ARGs (Salyers et al., 2004; Sommer et al., 2009). Por consiguiente, las aguas residuales, que reciben un aporte fecal humano o animal, además de representar una potencial vía de diseminación ambiental de ARGs, podrían usarse para estudiar el perfil de resistencia a antibióticos de una determinada población. En la actualidad, las aguas residuales son usadas como herramienta epidemiológica aplicada al estudio de drogas ilícitas (Daughton, 2001; Kasprzyk-Hordern et al., 2014) cuyos resultados son prometedores en el análisis de patrones relacionados con la salud pública.

En el **artículo #1**, proponemos el estudio de la prevalencia de ARGs en aguas residuales como una opción para el estudio de la diseminación de resistencias, así como una potencial herramienta epidemiológica que pueda detectar resistencias circulantes en la población sana antes de que aparezcan en el sector clínico. En este estudio se analizaron dos áreas geográficas diferentes (Túnez y Barcelona, España). El motivo de estudio fue comparar los resultados previamente obtenidos en nuestra área y observar si eran extensibles a otras zonas geográficas.

En general, los ARGs en el área de Barcelona muestran una mayor densidad en comparación a las muestras de Túnez. Sin embargo, la carga fecal de las muestras es similar en las muestras de agua residual de ambos orígenes, por lo que las concentraciones de ARGs no pueden ser atribuidas a estas diferencias.

Existe una clara similitud en el patrón de prevalencias de los genes *sul1* y *bla_{TEM}*, los cuales están presentes en la mayoría de muestras a similares concentraciones. En las muestras de Túnez, el gen *sul1* tuvo la abundancia más alta de todos los ARGs analizados en ambas fracciones y orígenes. En estudios relacionados realizados en Túnez, *sul1* fue detectado en aislamientos de carne de aves así como en aislamientos clínicos (Dahmen et al., 2010; Soufi et al., 2011). Este gen de resistencia a sulfonamidas también mostró una elevada prevalencia y abundancia en el área de Barcelona, cuyas densidades promedio fueron superiores en ambas fracciones.

bla_{TEM} fue el más prevalente de los ARGs en las muestras analizadas. *bla_{TEM}* fue el primer ESBL descrito en Túnez en el año 1994, y en la actualidad se encuentra presente en un alto porcentaje de muestras clínicas (Chouchani et al., 2011; Dahmen et al., 2010). El grupo clonal 9 de *bla_{CTX-M}* presenta una mayor prevalencia que el grupo clonal 1, sin embargo las concentraciones medias en ambas fracciones es muy similar. En aislamientos clínicos de Túnez, la presencia y difusión de *bla_{CTX-M-1}* a lo largo de su territorio está documentada desde el 2005 (Chouchani et al., 2011). Nuestras observaciones sugieren que *bla_{CTX-M-9}* podría presentar una abundancia igual o superior.

El ranking de abundancia de *qnrA*, *bla_{CTX-M-9}*, *bla_{CTX-M-1}* y *qnrS*, coincide en ambas áreas, con una menor prevalencia y abundancia en el país africano. Estas variaciones pueden ser atribuidas a las diferencias geográficas, económicas y culturales existentes. Por ejemplo, Barcelona recibe un alto número de visitantes extranjeros, además su industria de ganadería intensiva es considerable. Estos factores, unidos al elevado consumo de antibióticos en España en los sectores clínico y, hasta hace poco, ganadero (ECDC et al., 2015; European Medicines Agency, 2013), generan las condiciones ideales para la aparición y selección de resistencias.

Una marcada diferencia entre ambas áreas fue la cuasi ausencia del gen *mecA* en Túnez, el cual es abundante en el área de Barcelona. Este resultado se correlaciona con la baja prevalencia de *S. aureus* meticilina resistente en aislamientos de Túnez (Kesah et al., 2003). Estas diferencias pueden ser atribuidas a la ganadería predominante en cada área (ovejas y cabras en Túnez y cerdos en Barcelona). Ya que a la ganadería porcina en general se le atribuye una alta probabilidad de detectar *S. aureus* meticilina resistente (de Neeling et al., 2007; Feingold et al., 2012; Khanna et al., 2008), lo cual podría explicar estas diferencias.

Con respecto a *armA*, la ausencia de este gen en Túnez no permite realizar comparaciones. La prevalencia de este gen en el área de Barcelona no es alta, sin embargo se han detectado el gen en muestras fecales de individuos sanos (Quirós et al., 2014).

Existen muchos estudios en ambientes acuáticos con diferentes niveles de contaminación fecal, donde se ha detectado una elevada abundancia de ARGs (Berglund, 2015; Pruden et al., 2006). Sus autores sugieren la necesidad de establecer políticas de usos del agua destinadas a la reducción de la diseminación ambiental de los ARGs. En la actualidad, a pesar de su elevada prevalencia ambiental y de ser considerados como contaminantes emergentes (Smital, 2008), no se analiza la presencia de ARGs en aguas (BOE, 1990). Los procesos de tratamiento de aguas residuales por lo general reducen de manera significativa la concentración bacteriana existente. Sin embargo, diferentes estudios han descrito la presencia de elevadas concentraciones de bacterias resistentes (ARBs) en aguas después de ser tratadas (Guardabassi et al., 2002; Huang et al., 2012; LaPara et al., 2011). Además, bajo determinadas condiciones, la prevalencia de

ARBs; y por tanto de ARGs, tiende a incrementarse durante el tratamiento de aguas residuales (Czekalski et al., 2012; Zhang et al., 2009).

Además del papel de otros MGEs, en recientes estudios se resalta el rol de los bacteriófagos como vectores de ARGs en el medio ambiente (Colomer-Lluch, et al., 2011b; Marti et al., 2014b; Muniesa et al., 2013). Sin embargo, no existía información acerca de cómo los tratamientos de desinfección e inactivación afectan a los ARGs presentes en la fracción de bacteriófagos. Por lo tanto, en el **artículo #2**, nuestro objetivo fue evaluar la persistencia de ARGs, con especial atención en la fracción fágica, frente a procesos de desinfección fisicoquímicos y de inactivación natural.

En base a nuestros resultados, los ARGs presentes en las partículas fágicas presentaron una mayor persistencia en comparación a los localizados dentro de células bacterianas. La cápside fágica actúa como una eficiente barrera frente a factores ambientales y fisicoquímicos. Estos resultados guardan relación con estudios realizados con virus infecciosos y fagos usados como indicadores de la eficacia de diferentes tratamientos de inactivación, como cloración, tratamiento térmico o inactivación natural (Durán et al., 2003; Duran et al., 2002; Lee & Sobsey, 2011; Mocé-llivina et al., 2003; Yuan et al., 2015).

Considerando todos los tratamientos estudiados, la diseminación de ARGs en bacterias podría ser minimizada debido a que las células bacterianas son sensibles a muchos tratamientos en términos de viabilidad y estructura. El ADN liberado en la ruptura celular, podría permanecer estable durante un cierto período de tiempo y podría ser integrado por medio de transformación. Sin embargo, el ADN sin protección sería más susceptible a una rápida degradación en el medio ambiente. La protección conferida por la cápside fágica garantiza una mayor permanencia ambiental. Por su parte, la especificidad de unión de la

cápside a su receptor correspondiente en la superficie de la bacteria, permitiría una diseminación más específica del ARG.

Los factores y condiciones de inactivación en ambientes naturales tienen un papel determinante. Las diferencias observadas en la inactivación natural durante verano e invierno señalan a la temperatura y a la radiación solar acumulativa como los principales factores que influyen la reducción de los organismos viables y de los genes presentes. La radiación solar puede influenciar la inactivación de los microorganismos por diferentes mecanismos que pueden actuar de manera sinérgica: Mediante procesos de fotooxidación a través de la radiación UV-B (Davies-Colley et al., 1999; Sinton et al., 2002), por mutaciones originadas por la radiación UV-A (Arimoto-Kobayashi et al., 1999; DeMarini et al., 1995), por reacciones fotoquímicas producidas por la absorción de radiación UV por parte de la materia orgánica disuelta, la cual puede formar compuestos derivados del oxígeno con potencial degradador de la materia orgánica (Haag & Hoigné, 1985; Shon et al., 2009) o bien por medio de un incremento en la temperatura del medio por la absorción de la radiación solar, el cual tiene un efecto directamente proporcional a las tasas de inactivación de bacterias y virus (McGuigan et al., 1999; Wegelin et al., 1994).

Respecto a otros tratamientos analizados en el laboratorio (UV, cloración, tratamiento térmico), éstos causan reducciones discretas de ARGs, cuyas densidades al final del tratamiento continúan siendo altas (Auerbach et al., 2007; McKinney & Pruden, 2012; Yuan et al., 2015; Zhang et al., 2015). Es necesario continuar investigando en nuevas tecnologías de tratamiento de aguas residuales; las cuales puedan causar reducciones más significativas de estos contaminantes, y sobre todo considerando la naturaleza y dinámica de los distintos vectores de ARGs, sean células bacterianas, fágicas o ADN libre.

La información disponible hasta hoy coincide en que las estaciones de tratamiento de aguas residuales (WWTPs) influyen de manera positiva en la selección y diseminación de ARBs, y por ende de ARGs (Michael et al., 2013; Rizzo et al., 2013b). Por su naturaleza, las WWTPs son ambientes con una elevada complejidad y por lo visto, requieren de nuevos indicadores que permitan controlar la eficiencia de sus procesos. En el **artículo #3** evaluamos la presencia de ARGs en la fracción fágica y bacteriana en lodos de depuradora, los cuales representan un importante subproducto de las WWTPs.

Los lodos de depuradora se originan a partir de los procesos de tratamiento de aguas residuales. Representan un concentrado de materia orgánica y tienden a acumular metales pesados, compuestos recalcitrantes; así como organismos con potencial patogénico, como virus y bacterias. (European Commission, 2016). Debido a su contenido alto en nutrientes (nitrógeno y fósforo), se aplican en suelos empobrecidos o con tendencia a la erosión. La directiva del Consejo Europeo N° 86/278/CEE regula el uso de los lodos de depuradora en agricultura, con la finalidad de asegurar la seguridad de personas, animales, vegetales y medio ambiente. Sin embargo, la regulación se limita a estipular los valores máximos de concentración de metales pesados y al pH (CEE, 1986). Esta directiva, hasta mayo del 2016, permanece vigente en la Unión Europea. Actualmente, la Comisión Europea se encuentra trabajando en la actualización de los parámetros y los niveles de contaminantes a analizar de esta directiva, sin embargo, dentro de los mismos no se incluyen a antibióticos ni a bacterias resistentes y sus determinantes (European Commission, 2000; Milieu Ltd., 2010).

En la actualidad, se estima que en la Unión Europea se producen anualmente 10,13 millones de toneladas (peso seco) de lodos de depuradora. De los cuales en España, aproximadamente el 65% tuvo como destino al sector agrícola (Milieu Ltd., 2010). Sin embargo, esta práctica trae consigo efectos indeseados en las

propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos (Singh & Agrawal, 2008). A nivel de resistencia a antibióticos, los lodos contienen una alta tasa de ARGs (Reinthal et al., 2003) y su aplicación a largo plazo tiende a incrementar las densidades de ARGs en los suelos (Binh et al., 2009; Chen et al., 2016).

En nuestra investigación detectamos altos niveles de 5 ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrS* y *sul1*) en las fracciones fágica y bacteriana en lodos tratados por digestión anaeróbica mesófila. Las abundancias relativas de ARGs en ambas fracciones mostraron tendencias características de acuerdo a sus matrices. En el agua residual las prevalencias están influenciadas por la contaminación fecal. Los genes de resistencia a quinolonas y *bla*_{CTX-M}, que son los genes relacionados con el uso antropogénico de antibióticos, presentan una elevada prevalencia en el agua residual. En cambio, los genes más abundantes en lodos son *sul1* y *bla*_{TEM}, muy comunes en bacterias ambientales (Hu et al., 2008; Lachmayr et al., 2009; Pruden et al., 2012). Estos resultados sugieren un cambio en las poblaciones de microorganismos durante la digestión anaeróbica de los lodos, en donde las poblaciones predominantes de los lodos cambian frente a las del agua residual. Como un reflejo del patrón de ARGs en estas poblaciones bacterianas, el perfil de ARGs en partículas fágicas cambia de la misma manera desde el agua residual a los lodos.

Las altas densidades de ARG en los lodos, son un indicador de la potencial persistencia y proliferación de estos genes en las poblaciones bacterianas durante el proceso de digestión anaeróbica de lodos. Por ende, su uso posterior podría contribuir a la diseminación de ARB y ARGs en el medio ambiente y provocar impactos en las comunidades bacterianas receptoras.

Dejando a un lado la posibilidad de que las ARB de los lodos se transfieran al medio ambiente, hay que tener en cuenta que las concentraciones de fagos

portadores de ARGs en lodos de depuradora también son considerables. Dado que éstos presentan una elevada persistencia, superior en ocasiones a la bacteriana, podrían mantener la funcionalidad de estos genes durante largos períodos de tiempo y transferirlos a bacterias receptoras. En general, es necesario garantizar la seguridad del uso de lodos de depurados en el sector agrícola por medio del análisis de diferentes peligros, así como analizar los potenciales orígenes de estas resistencias, con la finalidad de tomar medidas que minimicen su impacto ambiental.

Uno de los principales ambientes influenciados por la contaminación antropogénica son las cuencas fluviales. Como se mencionó anteriormente, existen vastas evidencias que relacionan las descargas de aguas residuales y aguas depuradas con los altos niveles de antibióticos y de ARGs detectados en aguas (Hernando et al., 2006; Kristiansson et al., 2011; Pruden et al., 2012). La presencia de estos contaminantes se agrava con el problema mundial de acceso a fuentes de agua, en especial en países como España. La escasez de agua incrementa la dependencia de uso de agua regenerada con la finalidad de suplir la creciente demanda de agua, así como para paliar los períodos de sequías (Agència Catalana de l'Aigua, 2009b; Proyecto aWare, 2016).

El río Llobregat es un río Mediterráneo que se usa como fuente de agua en industrias, el sector agrícola y para la población en general. Este río recibe el continuo impacto de aguas residuales humanas y en menor medida animales, algunos efluentes industriales y agua residual tratada proveniente de diversas estaciones depuradoras (Sabater et al., 2015). Debido a la presión humana, durante el siglo XX el río Llobregat fue considerado uno de los ríos más contaminados de Europa (Sabater et al., 2012). Con la entrada en operación de WWTPs en la cuenca de este río, la calidad de sus aguas ha mejorado considerablemente, aunque una significativa cantidad de contaminantes,

incluyendo antibióticos, son aún detectables (Cabeza et al., 2012; Osorio et al., 2012). La presencia de estos contaminantes promueve la selección y mantenimiento de ARBs en el medio ambiente y su posterior movilización y adsorción a las partículas de sedimento.

Por lo tanto, en base a estas evidencias, en el **artículo #4** planteamos la evaluación de la presencia de ARGs en las aguas del río Llobregat. Además, pretendimos analizar los sedimentos como potenciales reservorios de los genes en el agua. Como se pudo apreciar en los resultados, los niveles de ARGs en el agua de río y en sedimentos son considerables y presentan marcadas variaciones. Además, es notable la abundancia de ARGs dentro de partículas fágicas, las cuales pueden jugar un rol predominante.

Otro objetivo del estudio fue el análisis de diversos factores que podrían influenciar la movilización de los ARGs desde los sedimentos al agua, y dentro del agua a lo largo del río. Diferentes investigaciones relacionadas han encontrado una correlación significativa entre episodios de lluvia e incrementos en la concentración de indicadores microbianos en agua de río (Shehane et al., 2005; Tilburg et al., 2015; Tornevi et al., 2014). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que las variaciones en las densidades de ARGs en el río Llobregat no dependen de las precipitaciones acumuladas, las cuales son variables de acuerdo a las estaciones. Por ejemplo: El valor más alto para *bla*_{TEM} (5,08 log₁₀ GC/mL) fue detectado el 30/01/2014 después de un episodio de lluvia de 8,1 mm. Sin embargo, concentraciones similares de este gen (4,64 log₁₀ GC/mL) son detectadas después de un mes de ausencia de lluvias. El patrón es similar en la fracción de bacteriófagos y en los otros genes analizados.

Los incrementos en el caudal del río Llobregat, asociados a lluvias o al derretimiento de la nieve de los Pirineos, tampoco ejercen influencia destacable

en las densidades de ARGs. La distribución del cuartil superior de las concentraciones de los genes analizados presenta rangos considerables. Por ejemplo: Los valores más altos de los genes *sul1*, *bla_{TEM}* y *mecA* en la fracción bacteriana se encuentran en un rango de caudal de entre 2,9 a 30.4 m³/s. Una explicación plausible para estas diferencias puede ser el efecto contrario entre el factor de dilución del agua, que reduciría las densidades, contra el factor de resuspensión del sedimento, que las incrementaría. Además, existe una indeterminada influencia de las descargas de 63 WWTPs presentes a lo largo de la cuenca del Llobregat (Sabater et al., 2012b).

Se analizaron las influencias de la temperatura y radiación solar en las densidades de ARGs, sin encontrar tampoco correlaciones significativas. Los factores ambientales analizados de manera individual no mostraron una correlación estadísticamente significativa con variaciones en las densidades de ARGs. Sin embargo, cuando se evaluó el efecto estacional, el cual engloba diferentes parámetros ambientales, sí se vieron marcadas diferencias en las concentraciones de ARGs en ambas fracciones tanto en aguas como en sedimentos. En términos generales, los ARGs en la fracción bacteriana en agua mostraron mayor prevalencia y abundancia en invierno; en cambio, se observó el efecto contrario en los sedimentos. En la fracción fágica no se observó una tendencia clara en agua, sin embargo se observa un incremento en las abundancias de ARGs durante verano y otoño. Una interpretación plausible de estas observaciones puede ser una potencial dispersión de los ARGs desde las bacterias por medio de bacteriófagos cuando las temperaturas y la radiación solar se incrementan y la viabilidad bacteriana se ve amenazada.

Diversos factores ambientales que puedan activar la respuesta SOS bacteriana favorecen la inducción de fagos atemperados y de otros elementos genéticos móviles (Beaber et al., 2004; Úbeda et al., 2005). Estos factores pueden afectar en

mayor grado a las poblaciones bacterianas presentes en el agua en comparación a los fagos, los cuales muestran una elevada persistencia frente a las condiciones naturales. Por tanto ante una mayor inactivación bacteriana, la prevalencia y abundancia de ARGs en fagos se vería incrementada. En los sedimentos, las bajas temperaturas en invierno reducen la prevalencia de ARGs en bacteria y fagos, sin embargo la presencia de partículas fágicas con ARG aumenta durante verano y permanece alta durante otoño. A pesar de estas observaciones, estos cambios no son homogéneos en todos los genes y por tanto, aunque se observa una tendencia, no se pueden sacar conclusiones rotundas.

Como se mencionó anteriormente, la influencia antropogénica en este río es considerable e indeterminada, por lo que correlaciones observadas entre estaciones guardan un cierto grado de incertidumbre. A pesar de la variabilidad, nuestras observaciones confirman a los sedimentos de río como un importante reservorio de ARGs en las fracciones bacteriana y fágica. La elevada persistencia de los ARG en mesocosmos de sedimento *in-vitro* simulando tres escenarios naturales diferentes confirmó el papel de reservorio de los sedimentos.

De acuerdo a nuestros estudios, postulamos el potencial uso epidemiológico del análisis del perfil de resistencia a antibióticos en aguas residuales. El cual como se observó en el estudio 1, guarda relación con las características geográficas, económicas y culturales de la región analizada. En el estudio 2, demostramos los altos niveles de persistencia de los ARGs, en especial en la fracción fágica, la cual presentó la mayor estabilidad frente a diferentes factores fisicoquímicos. En el estudio 3 detectamos altas densidades de ARGs en lodos de depuradora, los mismos que continúan siendo aplicados como fertilizantes en la Unión Europea. Los niveles de ARGs en los lodos en las fracciones bacteriana y fágica pueden representar un potencial vehículo de diseminación ambiental de resistencias. Finalmente, en el estudio 4 detectamos altos niveles de ARGs en la fracción

bacteriana y fágica en los sedimentos del río Llobregat, que representa una fuente de agua prioritaria para alrededor de 5 millones de personas. Los niveles de ARGs detectados, la elevada persistencia ambiental y diversidad que presentan sus vectores, hacen prioritario el análisis y la inclusión de estos contaminantes emergentes en los análisis de aguas, aguas residuales y de ambientes marcados por la influencia antropogénica con la finalidad de detectar reservorios de resistencias y minimizar el riesgo de generación y transmisión de nuevos clones resistentes.

Este tipo de estudios se engloban dentro de una estrategia "*One Health*", propuesta para atacar el problema de resistencias a antibióticos desde diferentes ambientes y de forma multidisciplinar, dado que se considera que sólo estudiando el problema desde diferentes perspectivas se podrán obtener soluciones viables para minimizar el alarmante crecimiento de resistencias.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de estos estudios son las siguientes:

- Las fracciones fágica y bacteriana de agua residual humana y animal contienen cantidades variables de ARGs.
- Las densidades de ARGs en aguas residuales varían de acuerdo al nivel de expansión de los diferentes genes de resistencia, así como entre áreas geográficas con diferencias climáticas, socioeconómicas y culturales.
- El estudio de ARGs en el agua residual puede representar un buen instrumento para detectar resistencias circulantes entre la población sana antes de que aparezcan en ambientes clínicos.
- Los ARGs presentes de manera natural en las fracciones bacteriana y fágica del agua residual pueden persistir durante largos períodos de tiempo a diferentes temperaturas y pH, así como frente a algunos procesos de desinfección fisicoquímica y frente a la inactivación natural.
- Los ARGs encontrados en la fracción de bacteriófagos de las muestras muestran una mayor persistencia en comparación a los detectados en la fracción bacteriana. La persistencia de los ARGs representa una amenaza, debido a que se incrementa su período de estabilidad en el medio ambiente y por ende la probabilidad de transferencia genética aumenta.
- Los lodos de depuradora representan una potencial fuente de ARGs en las fracciones bacteriana y fágica.
- Se ha evidenciado una movilización de los ARGs, presentes en las fracciones bacteriana y fágica en las aguas residuales, hacia los lodos durante los procesos de depuración.
- Considerando la presencia de ARGs en los lodos, su aplicación como fertilizantes en el sector agrícola necesita ser evaluada para evitar la diseminación de factores de resistencia en el medio ambiente.
- En el río Llobregat se detectaron elevados niveles de ARGs en las fracciones bacteriana y fágica en muestras de agua de río y sedimentos.

No se identificó un factor ambiental que individualmente pudiera causar variaciones significativas en la prevalencia y abundancia de los ARGs en ninguna de las fracciones en agua o sedimentos.

- Fueron detectadas variaciones estacionales en los niveles de ARGs, en particular en la fracción de bacteriófagos de sedimentos y agua de río.
- Los ARGs presentes de forma natural en las fracciones bacteriana y fágica de los sedimentos pueden persistir por largos períodos de tiempo en condiciones húmeda, semi-húmeda y seca. Ésto confirma el papel de los sedimentos de río como reservorios de ARGs.
- La ocurrencia y abundancia de ARGs en el medio ambiente y su persistencia representa una amenaza que incrementa la probabilidad de generación de nuevos clones resistentes.
- Los bacteriófagos representan un relevante elemento genético que puede contribuir a la diseminación de ARGs en el medio ambiente

7. BIBLIOGRAFÍA

A

- 1) **Agència Catalana de l'Aigua. (2009a).** Aigua i canvi climàtic. Diagnosi dels impactes previstos a Catalunya, from <http://aca-web.gencat.cat/aca>
- 2) **Agència Catalana de l'Aigua. (2009b).** Programa de Reutilització d'Aigua a Catalunya. from <http://aca-web.gencat.cat/aca>
- 3) **Agència Catalana de l'Aigua. (2015).** Aigua en temps real. Retrieved December 15, 2015, from http://aca-web.gencat.cat/aetr/UII/aetr_app?TAB=hist
- 4) **Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014).** Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565–1574. <http://doi.org/10.1021/bi5000564>
- 5) **Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007).** Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037–50. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
- 6) **Allué-Guardia, A., Jofre, J., & Muniesa, M. (2012).** Stability and infectivity of cytolethal distending toxin type V gene-carrying bacteriophages in a water mesocosm and under different inactivation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5818–5823. <http://doi.org/10.1128/AEM.00997-12>
- 7) **Amábile-Cuevas, C. F. (2015).** Antibiotics and Antibiotic Resistance in the Environment. CRC Press.
- 8) **Aminov, R. I. (2010).** A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1(DEC), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- 9) **Aminov, R. I. (2011).** Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 2(JULY), 1–19. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00158>
- 10) **Aminov, R. I., & Mackie, R. I. (2007).** Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 271(2), 147–161. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x>
- 11) **Appels, L., Baeyens, J., Degrève, J., & Dewil, R. (2008).** Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(6), 755–781. <http://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>
- 12) **Arimoto-Kobayashi, S., Tracey, B. M., Asao, M., Hayatsu, H., & Farmer, P. B. (1999).** Mutation and DNA modification in *Salmonella* exposed to N-nitrosodimethylamine under UVA- and sunlight-irradiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 444(2), 413–419. [http://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00113-8](http://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00113-8)
- 13) **Auerbach, E. A., Seyfried, E. E., & McMahon, K. D. (2007).** Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Research*, 41(5), 1143–51. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.045>

B

- 14) **Baquero, F., Martínez, J.-L., & Cantón, R. (2008).** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–5. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
- 15) **Barlow, M., Reik, R. A., Jacobs, S. D., Medina, M., Meyer, M. P., McGowan, J. E., & Tenover, F. C. (2008).** High rate of mobilization for blaCTX-MS. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 423–428. <http://doi.org/10.3201/eid1403.070405>
- 16) **Beaber, J. W., Hochhut, B., & Waldor, M. K. (2004).** SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427(January), 72–74. <http://doi.org/10.1038/nature02241>
- 17) **Bebrone, C. (2007).** Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*, 74(12), 1686–701. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.05.021>
- 18) **Bennett, P. M. (2008).** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153 Suppl (January), S347–S357. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607>
- 19) **Benveniste, R., & Davies, J. (1973).** Aminoglycoside Antibiotic-Inactivating Enzymes in Actinomycetes Similar to Those Present in Clinical Isolates of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(8), 2276–2280. <http://doi.org/10.1073/pnas.70.8.2276>
- 20) **Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huonivén, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., Martínez, J. L. (2015).** Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 310–317. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- 21) **Berglund, B. (2015).** Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infection Ecology & Epidemiology*, 5, 28564. <http://doi.org/10.3402/iee.v5.28564>
- 22) **Berglund, B., Khan, G. A., Lindberg, R., Fick, J., & Lindgren, P.-E. (2014).** Abundance and dynamics of antibiotic resistance genes and integrons in lake sediment microcosms. *PloS One*, 9(9), e108151. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0108151>
- 23) **Berkner, S., Konradi, S., & Schönfeld, J. (2014).** Antibiotic resistance and the environment-There and back again. *EMBO Reports*, 15(7), 740–744. <http://doi.org/10.15252/embr.201438978>
- 24) **Beumer, A., & Robinson, J. B. (2005).** A broad-host-range, generalized transducing phage (SN-T) acquires 16S rRNA genes from different genera of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8301–8304. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8301-8304.2005>
- 25) **Binh, C. T. T., Heuer, H., Kaupenjohann, M., & Smalla, K. (2008).** Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 25–37. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00526.x>

- 26) **Bisacchi, G. S. (2015).** Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded “Discovery Story.” *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(12), 4874–4882. <http://doi.org/10.1021/jm501881c>
- 27) **Blot, M. (Ed.). (2003).** *Prokaryotic Genomics*. Basel: Birkhäuser Basel. <http://doi.org/10.1007/978-3-0348-8963-6>
- 28) **BOE. (1990).** BOE.es - Documento BOE-A-1990-26490. Retrieved July 29, 2014, from <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1990-26490>
- 29) **Boleda, M. R., Diaz, A., Marti, I., Martín, J., Matia, L., Romero, J., & Ventura, F. (2007).** A review of taste and odour events in Barcelona’s drinking water area (1990-2004). *Water Science and Technology*, 55(5), 217–221. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=18714440>
- 30) **Bonnet, R. (2004).** Growing group of extended spectrum: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agent Chemother*, 48(1), 1–14. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1>
- 31) **Borges-Walmsley, M. I., McKeegan, K. S., & Walmsley, A. R. (2003).** Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *The Biochemical Journal*, 376(Pt 2), 313–338. <http://doi.org/10.1042/BJ20020957>
- 32) **Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J. E., & Stokes, H. W. (2007).** Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends in Microbiology*, 15(7), 301–309. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2007.05.004>
- 33) **Bouki, C., Venieri, D., & Diamadopoulos, E. (2013).** Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.016>
- 34) **Boyd, E. F., Almagro-Moreno, S., & Parent, M. A. (2009).** Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. *Trends in Microbiology*, 17(2), 47–53. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.003>
- 35) **Brabban, A. D., Hite, E., & Callaway, T. R. (2005).** Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(4), 287–303. <http://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.287>
- 36) **Brooks, J. P., Adeli, A., & McLaughlin, M. R. (2014).** Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems. *Water Research*, 57, 96–103. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.017>
- 37) **Brown, N. G., Pennington, J. M., Huang, W., Ayvaz, T., & Palzkill, T. (2010).** Multiple Global Suppressors of Protein Stability Defects Facilitate the Evolution of Extended-Spectrum TEM β -Lactamases. *Journal of Molecular Biology*, 404(5), 832–846. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.10.008>
- 38) **Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., & Muniesa, M. (2015).** Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid*, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.01.001>
- 39) **Brüssow, H., Canchaya, C., Hardt, W., & Bru, H. (2004).** Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens : from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion

- Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens : from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion, 68(3). <http://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.560>
- 40) **Burrus, V., & Waldor, M. K. (2004)**. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Research in Microbiology*, 155(5), 376–386. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.012>
- 41) **Bush, K. (2013a)**. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277(1), 84–90. <http://doi.org/10.1111/nyas.12023>
- 42) **Bush, K. (2013b)**. The ABCD's of B-lactamase nomenclature. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19(4), 549–559. <http://doi.org/10.1007/s10156-013-0640-7>
- 43) **Bushman, F. (2001)**. *Lateral DNA Transfer: Mechanisms and Consequences*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

C

- 44) **Cabeza, Y., Candela, L., Ronen, D., & Teijon, G. (2012)**. Monitoring the occurrence of emerging contaminants in treated wastewater and groundwater between 2008 and 2010. The Baix Llobregat (Barcelona, Spain). *Journal of Hazardous Materials*, 239-240, 32–39. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.07.032>
- 45) **Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., & Arechaga, I. (2015)**. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(1), 81–95. <http://doi.org/10.1111/1574-6976.12085>
- 46) **Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014)**. Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions. *Environmental Science & Technology*. <http://doi.org/10.1021/es501851s>
- 47) **Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L., & Brüssow, H. (2003)**. Phage as agents of lateral gene transfer. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 417–424. [http://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00086-9](http://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00086-9)
- 48) **Cantalupo, P. G., Calgua, B., Zhao, G., Hundesa, A., Wier, A. D., Katz, J. P., Grabe, M., Hendrix, R., Girones, R., Wang, D., Pipas, J. M. (2011)**. Raw sewage harbors diverse viral populations. *mBio*, 2(5), e00180–11–. <http://doi.org/10.1128/mBio.00180-11>
- 49) **Cantón, R. (2009)**. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15 Suppl 1, 20–25. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x>

- 50) **Cantón, R., Gonzalez-Alba, J., & Galan, J. C. (2012).** CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3(APR). <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
- 51) **CDC. (2012).** Policies for eliminating Healthcare-Associated Infections. Retrieved from <http://www.cdc.gov/hai/pdfs/toolkits/HAI-policy-case-studies-lessons-learned.pdf>
- 52) **CDC. (2016).** About Antimicrobial Resistance | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC. Retrieved March 21, 2016, from <http://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- 53) **CEE.** Directiva 86/278/CEE del Consejo de 12 de junio de 1986 relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura (1986). European Union: EU-Lex. Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX:31986L0278>
- 54) **Chain, E., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Orr-Ewing, J., & Sanders, A. G. (1940).** Penicillin as a chemotherapeutic agent. *The Lancet*, 236(6104), 226–228. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)08728-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)08728-1)
- 55) **Chakrabarty, A. N., Dastidar, S. G., Ganguli, M., & Chattopadhyay, D. (1990).** “DNA” as contaminants in antibiotics and its capacity to transform bacteria to drug resistance. *Indian Journal of Experimental Biology*, 28(1), 58–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2365408>
- 56) **Chen, Q., An, X., Li, H., Su, J., Ma, Y., & Zhu, Y. G. (2016).** Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environment International*, 92-93, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.026>
- 57) **Chouchani, C., Marrakchi, R., & El Salabi, A. (2011).** Evolution of β -lactams resistance in Gram-negative bacteria in Tunisia. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(3), 167–77. <http://doi.org/10.3109/1040841X.2011.552880>
- 58) **Ciba Foundation Symposium. (1997).** Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread No. 207. John Wiley & Sons. Retrieved from <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470515368.html>
- 59) **Clokie, M. R. J., & Kropinski, A. M. (2009).** Bacteriophages: methods and protocols Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. *Methods in molecular biology*. <http://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6>
- 60) **Coates, A. S., Hu, Y., Bax, R., & Page, C. (2002).** The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1(11), 895–910. <http://doi.org/10.1038/nrd940>
- 61) **Colebrook, L., & Kenny, M. (1936).** Treatment of Human Puerperal Infections, and of Experimental infections in mice, with Prontosil. *The Lancet*, 1, 1279–1286.
- 62) **Collis, C. M., & Hall, R. M. (1995).** Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1), 155–162. <http://doi.org/10.1128/AAC.39.1.155>. Updated
- 63) **Colomer-Lluch, M., Calero-Cáceres, W., Jebri, S., Hmaied, F., Muniesa, M., & Jofre, J. (2014).** Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions

- of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environment International*, 73, 167–175. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2014.07.003>
- 64) **Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011a).** Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4908–11. <http://doi.org/10.1128/AAC.00535-11>
- 65) **Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011b).** Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PloS One*, 6(3), e17549. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017549>
- 66) **Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014).** Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5), 1265–74. <http://doi.org/10.1093/jac/dkt528>
- 67) **Coque, T. M., Baquero, F., & Canton, R. (2008).** Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 13(47), 1–11. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2693-2700.2005>
- 68) **Cox, G., & Wright, G. D. (2013).** Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 287–292. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
- 69) **Cytryn, E. (2013).** The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biology and Biochemistry*, 63, 18–23. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.03.017>
- 70) **Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., & Bürgmann, H. (2012).** Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Frontiers in Microbiology*, 3, 106. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00106>
- 71) **Czekalski, N., Gascón Díez, E., & Bürgmann, H. (2014).** Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *The ISME Journal*, 1381–1390. <http://doi.org/10.1038/ismej.2014.8>
- 72) **Czekalski, N., Sigdel, R., Birtel, J., Matthews, B., & Bürgmann, H. (2015).** Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environment International*, 81, 45–55. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2015.04.005>

D

- 73) **D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G., Poinar, H. & Wright, G. D. (2011).** Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/nature10388>

- 74) **D'Costa, V. M., McGrann, K., Hughes, D., & Wright, G. (2006).** Sampling the Antibiotic Resistome. *Science*, 311(5759), 374–377. <http://doi.org/10.1126/science.1120800>
- 75) **Da Silva, M., Tiago, I., Veríssimo, A., Boaventura, R. A. R., Nunes, O. C., & Manaia, C M. (2006).** Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 55(2), 322–329. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00032.x>
- 76) **Dahmen, Mansour, W., Boujaafar, N., Arlet, G., & Bouallègue, O. (2010).** Distribution of cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a university hospital in Tunisia. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 16(1), 43–7. <http://doi.org/10.1089/mdr.2009.0091>
- 77) **Dahmen, Poirel, L., Mansour, W., Bouallègue, O., & Nordmann, P. (2010).** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae from Tunisia. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(7), 1019–23. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03010.x>
- 78) **Dallenne, C., da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010).** Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 490–495. <http://doi.org/10.1093/jac/dkp498>
- 79) **Daughton, C. (2001).** Illicit Drugs in Municipal Sewage: Proposed New Nonintrusive Tool to Heighten Public Awareness of Societal Use of Illicit/Abused Drugs and Their Potential for Ecological Consequences, in *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scien. Environment - Scientific and Regulatory Issues*. American Chemical Society. Washington. Retrieved from https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryId=65847
- 80) **Davies, J. (2006).** Where have All the Antibiotics Gone? *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien Des Maladies Infectieuses et de La Microbiologie Médicale / AMMI Canada*, 17(5), 287–90.
- 81) **Davies, J., & Davies, D. (2010a).** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 74(3), 417–33. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- 82) **Davies, J., & Davies, D. (2010b).** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 74(3), 417–33. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- 83) **Davies-Colley, R. J., Donnison, a. M., Speed, D. J., Ross, C. M., & Nagels, J. W. (1999).** Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilisation ponds: Interactions of environmental factors with sunlight. *Water Research*, 33(5), 1220–1230. [http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00321-2](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00321-2)
- 84) **Davis, M. A., Baker, K. N. K., Orfe, L. H., Shah, D. H., Besser, T. E., & Call, D. R. (2010).** Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in

- Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6), 2666–2669. <http://doi.org/10.1128/AAC.01743-09>
- 85) **De la Cruz, F., & Davies, J. (2000)**. Horizontal gene transfer and the origin of species: Lessons from bacteria. *Trends in Microbiology*, 8(3), 128–133. [http://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01703-0](http://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01703-0)
- 86) **de Neeling, A. J., van den Broek, M. J. M., Spalburg, E. C., van Santen-Verheuevel, M. G., Dam-Deisz, W. D. C., Boshuizen, H. C., van den Giessen, A.W., van Duijkeren, E., Huijsdens, X. W. (2007)**. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary Microbiology*, 122(3-4), 366–372. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.027>
- 87) **Del Casale, A., Flanagan, P. V., Larkin, M. J., Allen, C. C. R., & Kulakov, L. A. (2011)**. Analysis of transduction in wastewater bacterial populations by targeting the phage-derived 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(1), 100–108. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01034.x>
- 88) **DeMarini, D. M., Shelton, M. L., & Stankowski, L. F. (1995)**. Mutation spectra in *Salmonella* of sunlight, white fluorescent light, and light from tanning salon beds: induction of tandem mutations and role of DNA repair. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 327(1-2), 131–149. [http://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)00179-9](http://doi.org/10.1016/0027-5107(94)00179-9)
- 89) **Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., & Hacker, J. (2004)**. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(5), 414–424. <http://doi.org/10.1038/nrmicro884>
- 90) **Doi, Y., & Arakawa, Y. (2007)**. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clinical Infect Dis*, 45(1), 88–94. <http://doi.org/10.1086/518605>
- 91) **Dougherty, T., & Pucci, M. (2012)**. *Antibiotic Discovery and Development* (Vol. 1). Springer. <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1>
- 92) **Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010)**. Three decades of B-lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160–201. <http://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>
- 93) **Dreiseikermann, B. (1994)**. Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiological Reviews*, 58(3), 293–316.
- 94) **Drlica, K., & Zhao, X. (2007)**. Mutant Selection Window Hypothesis Updated. *Clinical Infectious Diseases*, 44(5), 681–688. <http://doi.org/10.1086/511642>
- 95) **Du, J., Ren, H., Geng, J., Zhang, Y., Xu, K., & Ding, L. (2014)**. Occurrence and abundance of tetracycline, sulfonamide resistance genes, and class 1 integron in five wastewater treatment plants. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(12), 7276–84. <http://doi.org/10.1007/s11356-014-2613-5>
- 96) **Durán, a. E., Muniesa, M., Mocé-Llivina, L., Campos, C., Jofre, J., & Lucena, F. (2003)**. Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 29–37. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.t01-1-01948.x>

- 97) **Duran, A. E., Muniesa, M., Mendez, X., Valero, F., Lucena, F., & Jofre, J. (2002).** Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *Journal of Applied Microbiology*, 92(2), 338–347. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01536.x>

E

- 98) **ECDC. (2016a).** Antimicrobial resistance interactive database (EARS-Net). Retrieved March 24, 2016, from http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx
- 99) **ECDC. (2016b).** Healthcare-associated infections. Retrieved May 2, 2016, from http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Healthcare-associated_infections/Pages/index.aspx
- 100) **ECDC, EFSA, & EMA. (2015).** ECDC / EFSA / EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals 1 Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resi. *EFSA Journal*, 13(January), 1–114. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4006>
- 101) **ECDC/EMEA. (2009).** The Bacterial Challenge: Time to React. Retrieved July 29, 2014, from <http://www.ecdc.europa.eu/>
- 102) **Economou, V., & Gousia, P. (2015).** Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 8, 49–61. <http://doi.org/10.2147/IDR.S55778>
- 103) **EFSA. (2015).** EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal* (Vol. 13).
- 104) **El Salabi, A., Walsh, T. R., & Chouchani, C. (2012).** Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(January 2012), 1–10. <http://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691870>
- 105) **Emmerson, A. M., & Jones, A. M. (2003).** The quinolones: decades of development and use. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51 Suppl 1(suppl 1), 13–20. <http://doi.org/10.1093/jac/dkg208>
- 106) **Enright, M. C. (2003).** The evolution of a resistant pathogen - The case of MRSA. *Current Opinion in Pharmacology*, 3(5), 474–479. [http://doi.org/10.1016/S1471-4892\(03\)00109-7](http://doi.org/10.1016/S1471-4892(03)00109-7)
- 107) **European Commission. (2000).** Working document on Sludge 3rd draft Retrieved from <http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/>
- 108) **European Commission. (2016).** Sewage sludge - Waste - Environment. Retrieved May 27, 2016, from <http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/>

- 109) **European Medicines Agency. (2013).** Sales of veterinary antimicrobial agents in 25 EU / EEA countries in Third ESVAC report. European Medicines Agency, 57. <http://doi.org/EMA/236501/2013>

F

- 110) **Fahrenfeld, N., Ma, Y., O'Brien, M., & Pruden, A. (2013).** Reclaimed water as a reservoir of antibiotic resistance genes: Distribution system and irrigation implications. *Frontiers in Microbiology*, 4(May), 1–10. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00130>
- 111) **Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., & Herskovits, A. A. (2015).** A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 641–650. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3527>
- 112) **Feingold, B. J., Silbergeld, E. K., Curriero, F. C., Cleef, B. a G. L. Van, Heck, M. E. O. C., & Kluytmans, J. a J. W. (2012).** Livestock Density as Risk Factor for Resistant *Staphylococcus aureus*, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 18(11), 1841–1849. <http://doi.org/10.3201/eid1811.111850>
- 113) **Fernandes, P. (2006).** Antibacterial discovery and development--the failure of success? *Nature Biotechnology*, 24(12), 1497–503. <http://doi.org/10.1038/nbt1206-1497>
- 114) **Figueira, V., Serra, E., & Manaia, C. M. (2011).** Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *The Science of the Total Environment*, 409(6), 1017–23. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.12.011>
- 115) **Finch, R. G., Greenwood, D., Whitley, R. J., & Norrby, S. R. (2010).** Antibiotic and Chemotherapy (Vol. 2010). Retrieved from <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=DE4Mxc3aesEC&pgis=1>
- 116) **Finley, R. L., Collignon, P., Larsson, D. G. J., McEwen, S. A., Li, X.-Z., Gaze, W. H., Reid-Smith, R., Timinouni, M., Graham, D., Topp, E. (2013).** The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(5), 704–10. <http://doi.org/10.1093/cid/cit355>
- 117) **Fisher, J. F., Meroueh, S. O., & Mobashery, S. (2005).** Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical Reviews*, 105(2), 395–424. <http://doi.org/10.1021/cr030102i>
- 118) **Fleming, A. (1945).** Speech: "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1945." The Nobel Prize Org. Retrieved from http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/

- 119) **Florey, H. W. (1945)**. Use of Micro-organisms for Therapeutic Purposes. *British Medical Journal*, 2(4427), 635–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2060276/>
- 120) **Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O. A., & Dantas, G. (2012)**. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* (New York, N.Y.), 337(6098), 1107–11. <http://doi.org/10.1126/science.1220761>
- 121) **Frère, J.-M., Galleni, M., Bush, K., & Dideberg, O. (2005)**. Is it necessary to change the classification of {beta}-lactamases? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(6), 1051–3. <http://doi.org/10.1093/jac/dki155>
- 122) **Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005)**. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat.Rev.Microbiol.*, 3(1740-1526 (Print)), 722–732. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1235>

G

- 123) **Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (2005)**. Worldwide Disseminated armA Aminoglycoside Resistance Methylase Gene Is Borne by Composite Transposon Tn1548. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2949–2953. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2949>
- 124) **Gapminder Foundation. (2015)**. Total number of maternal deaths. Retrieved from <http://www.gapminder.org/data/documentation/gd010/>
- 125) **Generalitat de Catalunya. (2015)**. Meteocat. El temps a Catalunya. Retrieved January 26, 2016, from <http://www.meteo.cat/>
- 126) **Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., & Sekawi, Z. (2015)**. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 17, 11–22.
- 127) **Gillings, M. R. (2014)**. Integrons: past, present, and future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 78(2), 257–77. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>
- 128) **Gniadkowski, M. (2008)**. Evolution of extended-spectrum b-lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1), 11–32. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01854.x>
- 129) **Gogarten, M. B., Gogarten, J. P., & Olendzenski, L. (2009)**. Horizontal Gene Transfer: Genomes in flux (Vol. 532). Humana press. <http://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9>
- 130) **Gonzalez-Zorn, B., Catalan, A., Dominguez, L., Teshager, T., Porrero, C., & Moreno, M. A. (2005)**. Genetic basis for dissemination of armA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(3), 583–585. <http://doi.org/10.1093/jac/dki246>
- 131) **Gould, I., & van der Meer, J. (2011)**. *Antibiotic Policies*. Springer. <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-1734-8>

- 132) **Granier, S. A., Hidalgo, L., Millan, A. S., Escudero, J. A., Gutierrez, B., Brisabois, A., & Gonzalez-Zorn, B. (2011).** ArmA methyltransferase in a monophasic *Salmonella enterica* isolate from food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5262–5266. <http://doi.org/10.1128/AAC.00308-11>
- 133) **Griffiths, A. J., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., & Gelbart, W. M. (2000).** Transduction. W. H. Freeman. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21760/>
- 134) **Gu, C., & Karthikeyan, K. G. (2008).** Sorption of the antibiotic tetracycline to humic-mineral complexes. *Journal of Environmental Quality*, 37(2), 704–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18396558>
- 135) **Guardabassi, L., Lo Fo Wong, D. M., & Dalsgaard, A. (2002).** The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water Research*, 36(8), 1955–1964. [http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00429-8](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00429-8)
- 136) **Gudeta, D. D., Bortolaia, V., Amos, G., Wellington, E. M. H., Brandt, K. K., Poirel, L., Boye Nielsen, J., Guardabassi, L. (2015).** The Soil Microbiota Harbors a Diversity of Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamases of Potential Clinical Relevance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(1), 151–60. <http://doi.org/10.1128/AAC.01424-15>
- 137) **Gullberg, E. (2014).** Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 1053. Uppsala Universitet. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24694026>
- 138) **Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011).** Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens*, 7(7), e1002158. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>
- 139) **Guzmán, C., Jofre, J., Montemayor, M., & Lucena, F. (2007).** Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2420–9. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03487.x>

H

- 140) **Haag, W. R., & Hoigné, J. (1985).** Photo-sensitized oxidation in natural water via .OH radicals. *Chemosphere*, 14(11-12), 1659–1671. [http://doi.org/10.1016/0045-6535\(85\)90107-9](http://doi.org/10.1016/0045-6535(85)90107-9)
- 141) **Halling-Sorensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhof, H.C., Jorgensen, S.E. (1998).** Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals

- substance in the environment - A review. *Chemosphere*, 36(2), 357–393.
[http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00354-8](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8)
- 142) **Hammoudeh, D. I., Zhao, Y., White, S. W., & Lee, R. E. (2013)**. Replacing sulfa drugs with novel DHPS inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*, 5(11), 1331–40.
<http://doi.org/10.4155/fmc.13.97>
- 143) **Hanssen, A. M., & Ericson Sollid, J. U. (2006)**. SCCmec in staphylococci: Genes on the move. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 46(1), 8–20.
<http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2005.00009.x>
- 144) **Hawkey, P. M. (1998)**. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 317(7159), 657–660.
<http://doi.org/10.1136/bmj.317.7159.657>
- 145) **Hawkey, P. M., & Jones, A. M. (2009)**. The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(SUPPL.1).
<http://doi.org/10.1093/jac/dkp256>
- 146) **Hayes, F. (2003)**. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annual Review of Genetics*, 37(1), 3–29.
<http://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.142807>
- 147) **Heritage, J. (1999)**. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(3), 309–318. <http://doi.org/10.1093/jac/44.3.309>
- 148) **Hernando, M. D., Mezcua, M., Fernández-Alba, A. R., & Barceló, D. (2006)**. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69(2), 334–42.
<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.037>
- 149) **Heuer, H., Schmitt, H., & Smalla, K. (2011)**. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 236–43. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.009>
- 150) **Heuer, H., & Smalla, K. (2007)**. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology*, 9(3), 657–66. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x>
- 151) **Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., & Kratz, K. L. (1999)**. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 225(1-2), 109–118.
[http://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00337-4](http://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00337-4)
- 152) **Hollis, A., & Ahmed, Z. (2014)**. The path of least resistance: paying for antibiotics in non-human uses. *Health Policy (Amsterdam, Netherlands)*, 118(2), 264–70.
<http://doi.org/10.1016/j.healthpol.2014.08.013>
- 153) **Hooper, D. C. (2001)**. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), 337–41. <http://doi.org/10.3201/eid0702.700337>
- 154) **Hu, J., Shi, J., Chang, H., Li, D., Yang, M., & Kamagata, Y. (2008)**. Phenotyping and Genotyping of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolated from a Natural River Basin. *Environmental Science & Technology*, 42(9), 3415–3420.
<http://doi.org/10.1021/es7026746>

- 155) **Huang, J.-J., Hu, H.-Y., Lu, S.-Q., Li, Y., Tang, F., Lu, Y., & Wei, B. (2012).** Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environment International*, 42, 31–6. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.001>
- 156) **Huang, J.-J., Hu, H.-Y., Tang, F., Li, Y., Lu, S.-Q., & Lu, Y. (2011).** Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 45(9), 2775–81. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2011.02.026>
- 157) **Hughes, V. M., & Datta, N. (1983).** Conjugative plasmids in bacteria of the “pre-antibiotic” era. *Nature*, 302(5910), 725–726. <http://doi.org/10.1038/302725a0>
- 158) **Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., & Philippon, A. (2002).** B-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 3045–3049. <http://doi.org/10.1128/AAC.46.9.3045-3049.2002>

I

- 159) **Infante, B., Grape, M., Larsson, M., Kristiansson, C., Pallecchi, L., Rossolini, G. M., & Kronvall, G. (2005).** Acquired sulphonamide resistance genes in faecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(4), 308–312. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.12.004>
- 160) **International Organization for Standardization. (2000).** ISO 10705-2:2000 - Water quality -- Detection and enumeration of bacteriophages -- Part 2: Enumeration of somatic coliphages. Retrieved July 29, 2014, from http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=20127
- 161) **International Organization for Standardization. (2014)** ISO 9308-1:2014 - Water quality -- Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. Retrieved from http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=55832
- 162) **IPCC. (2008).** Climate change and water: IPCC Technical Paper VI. Climate change and water (Vol. 403). <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.08.039>
- 163) **Ito, T., Kuwahara-Arai, K., Katayama, Y., Uehara, Y., Han, X., Kondo, Y., & Hiramatsu, K. (2014).** Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis of MRSA. *Methods in Molecular Biology*, 1085, 131–148. <http://doi.org/10.1007/978-1-62703-664-1-8>
- 164) **Iwane, T., Urase, T., & Yamamoto, K. (2001).** Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 43(2), 91–9.

- 165) **IWG-SCC. (2016).** International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) Elements (IWG-SCC). Retrieved April 14, 2016, from <http://www.sccmec.org>.

J

- 166) **Jackson, R. W., Vinatzer, B., Arnold, D. L., Dorus, S., & Murillo, J. (2011).** The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mobile Genetic Elements*, 1(1), 55–65. <http://doi.org/10.4161/mge.1.1.16432>
- 167) **Jacoby, G. (2005).** Mechanisms of bacterial resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41(Suppl 2), S120–126. <http://doi.org/10.1086/428052>
- 168) **Jacoby, G. A. (1997).** Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. *Infectious Disease Clinics of North America*, 11(4), 875–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9421705>
- 169) **Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martínez-Martínez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel, L., Wang, M. (2008).** Qnr Gene Nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), 2297–2299. <http://doi.org/10.1128/AAC.00147-08>
- 170) **Jayachandran, S., Lleras-Muney, A., & Smith, K. V. (2009).** Modern Medicine and the 20th Century Decline in Mortality: Evidence on the Impact of Sulfa Drugs. Retrieved from <http://www.nber.org.sire.ub.edu/papers/w15089>
- 171) **Jiang, Y., Yu, D., Wei, Z., Shen, P., Zhou, Z., & Yu, Y. (2010).** Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying blaKPC-2, blaDHA-1, qnrB4, and armA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9), 3967–9. <http://doi.org/10.1128/AAC.00137-10>
- 172) **Johnson, C. M., & Grossman, A. D. (2015).** Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annual Review of Genetics*, 49(1), <http://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055018>
- 173) **Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, a. (2011).** The influence of external factors on bacteriophages--review. *Folia Microbiologica*, 56(May), 191–200. <http://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>
- 174) **Juhas, M., Van Der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., & Crook, D. W. (2009).** Genomic islands: Tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 376–393. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x>
- 175) **Jutendo University. (2016).** SCCmec Home. Retrieved April 14, 2016, from <http://www.staphylococcus.net/>

K

- 176) **Kalant, H. (1965)**. The pharmacology of semisynthetic antibiotics. *Canadian Medical Association Journal*, 93(16), 839–43.
- 177) **Kasprzyk-Hordern, B., Bijlsma, L., Castiglioni, S., Covaci, A., de Voogt, P., Emke, E., Hernández, F., Ort, C., Reid, M., van Nuijs, A., & Thomas, K. V. (2014)**. Wastewater-based epidemiology for public health monitoring. *Water and Sewerage Journal*, (4), 25–26. <http://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2014-051553.7>.
- 178) **Katayama, Y., Ito, T., & Hiramatsu, K. (2000)**. A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome mec , Encodes Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus A New Class of Genetic Element , Staphylococcus Cassette Chromosome mec , Encodes Methicillin Resistance in Staphylococcus au. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1549–1555. <http://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1549-1555.2000>. Updated
- 179) **Kerby, G. P., & Gowdy, R. a. (1949)**. Purification pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of Escherichia coli. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 63, 93–107.
- 180) **Kesah, C., Ben Redjeb, S., Odugbemi, T. O., Boye, C. S.-B., Dosso, M., Ndinya Achola, J. O., Koulla-Shiro, S., Benbachir, M., Rahal, K & Borg, M. (2003)**. Prevalence of methicillin–resistant Staphylococcus aureus in eight African hospitals and Malta. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(2), 153–156. <http://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00531.x>
- 181) **Khanna, T., Friendship, R., Dewey, C., & Weese, J. S. (2008)**. Methicillin resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers. *Veterinary Microbiology*, 128(3-4), 298–303. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.006>
- 182) **Klugman, K. P. (2002)**. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in Streptococcus pneumoniae. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50 Suppl S, 1–5. <http://doi.org/10.1093/jac/dkf500>
- 183) **Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, RL., Struelens, MJ., Tacconelli, E., Navarro-Torné, A., Witte, W. & Friedrich, A. W. (2010)**. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 15(41), 19688.
- 184) **Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010)**. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(6), 423–435. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2333>
- 185) **Kong, K. F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010)**. Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. *Apmis*, 118(1), 1–36. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>
- 186) **Kreuzig, R., & Höltge, S. (2005)**. Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: laboratory experiments and test plot studies. *Environmental*

- Toxicology and Chemistry / SETAC, 24(4), 771–776. <http://doi.org/10.1897/03-582R.1>
- 187) **Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegård, B. Söderström, H., & Larsson, D. G. J. (2011).** Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PloS One*, 6(2), e17038. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017038>
- 188) **Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudary, U., Doumith, M., Giske, C., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A... Woodford, N. (2010).** Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet. Infectious Diseases*, 10(9), 597–602. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70143-2](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2)
- 189) **Kumazawa, J., & Yagisawa, M. (2002).** The history of antibiotics: the Japanese story. *Journal of Infection and Chemotherapy : Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 8(2), 125–33. <http://doi.org/10.1007/s101560200022>
- 190) **Kümmerer, K. (2009a).** Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75(4), 417–434. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
- 191) **Kümmerer, K. (2009b).** Antibiotics in the aquatic environment--a review--part II. *Chemosphere*, 75(4), 435–41. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.006>
- 192) **Kümmerer, K. (2009c).** The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 90(8), 2354–2366. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.023>

L

- 193) **La Vanguardia. (2015a).** Agbar, en “alerta” tras 40 días sin captar agua del Llobregat por vertidos contaminantes. Retrieved from <http://www.lavanguardia.com/natural/20150306/54427938066/agba-alerta-agua-lobregat.html>
- 194) **La Vanguardia. (2015b).** El misterioso mal olor persiste en Barcelona. Retrieved from <http://www.lavanguardia.com/local/barcelona/20151120/30273768719/olor-misterioso-barcelona.html>
- 195) **Lachmayr, K. L., Kerkhof, L. J., Dirienzo, A. G., Cavanaugh, C. M., & Ford, T. E. (2009).** Quantifying nonspecific TEM beta-lactamase (blaTEM) genes in a wastewater stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 203–11. <http://doi.org/10.1128/AEM.01254-08>
- 196) **Lahey Clinic. (2015).** β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Retrieved April 13, 2016, from <http://www.lahey.org/studies/temtable.asp>

- 197) **Lahey Clinic. (2016).** qnr Numbering and Sequence. Retrieved April 19, 2016, from <http://www.lahey.org/qnrstudies/>
- 198) **Lang, A. S., & Beatty, J. T. (2007).** Importance of widespread gene transfer agent genes in α -proteobacteria. *Trends in Microbiology*, 15(2), 54–62. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2006.12.001>
- 199) **Lang, A. S., Zhaxybayeva, O., & Beatty, J. T. (2012).** Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nature Reviews Microbiology*, 10(7), 472–482. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2802>
- 200) **Langlet, J., Gaboriaud, F., & Gantzer, C. (2007).** Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1632–1638. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03396.x>
- 201) **Lanz, R., Kuhnert, P., & Boerlin, P. (2003).** Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary Microbiology*, 91(1), 73–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12441233>
- 202) **LaPara, T. M., Burch, T. R., McNamara, P. J., Tan, D. T., Yan, M., & Eichmiller, J. J. (2011a).** Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-Superior Harbor. *Environmental Science & Technology*, 45(22), 9543–9. <http://doi.org/10.1021/es202775r>
- 203) **Laponogov, I., Sohi, M. K., Veselkov, D. A., Pan, X.-S., Sawhney, R., Thompson, A. W., McAuley, K., Fisher, L & Sanderson, M. R. (2009).** Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), 667–9. <http://doi.org/10.1038/nsmb.1604>
- 204) **Lasobras, J., Dellunde, J., Jofre, J., & Lucena, F. (1999).** Occurrence and levels of phages proposed as surrogate indicators of enteric viruses in different types of sludges. *Journal of Applied Microbiology*, 86(4), 723–723. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00722.x>
- 205) **Lavilla, S., González-López, J. J., Sabaté, M., García-Fernández, A., Larrosa, M. N., Bartolomé, R. M., Caratolli, A. & Prats, G. (2008).** Prevalence of qnr genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(2), 291–5. <http://doi.org/10.1093/jac/dkm448>
- 206) **Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., ... Cars, O. (2013).** Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057–98. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)
- 207) **Lee, H. S., & Sobsey, M. D. (2011).** Survival of prototype strains of somatic coliphage families in environmental waters and when exposed to UV low-pressure monochromatic radiation or heat. *Water Research*, 45(12), 3723–34. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.024>
- 208) **Levy, S. B. (1998).** The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American*, 278(3), 46–53. <http://doi.org/10.1038/scientificamerican0398-46>

- 209) **Levy, S. B. (2001).** Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction. *Clinical Infectious Diseases*, 33(s3), S124–S129. <http://doi.org/10.1086/321837>
- 210) **Levy, S. B., & Marshall, B. (2004).** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12s), S122–S129. <http://doi.org/10.1038/nm1145>
- 211) **Lewis, K. (2013).** Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 12(5), 371–87. <http://doi.org/10.1038/nrd3975>
- 212) **Li, B., Yang, Y., Ma, L., Ju, F., Guo, F., Tiedje, J. M., & Zhang, T. (2015).** Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *The ISME Journal*. <http://doi.org/10.1038/ismej.2015.59>
- 213) **Liu, B., & Pop, M. (2009).** ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D443–7. <http://doi.org/10.1093/nar/gkn656>
- 214) **Loudon, I. (2008).** The use of historical controls and concurrent controls to assess the effects of sulphonamides, 1936-1945. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 101(3), 148–55. <http://doi.org/10.1258/jrsm.2008.081005>
- 215) **Lucena, F., Duran, a E., Morón, a, Calderón, E., Campos, C., Gantzer, C., ... Jofre, J. (2004).** Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting faecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), 1069–76. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02397.x>
- 216) **Lukjancenko, O., Wassenaar, T. M., & Ussery, D. W. (2010).** Comparison of 61 Sequenced *Escherichia coli* Genomes. *Microbial Ecology*, 60(4), 708–720. <http://doi.org/10.1007/s00248-010-9717-3>
- 217) **Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., & Alvarez, P. J. J. (2010).** Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environmental Science and Technology*, 44(19), 7220–7225. <http://doi.org/10.1021/es100233w>
- 218) **Lupo, A., Coyne, S., & Berendonk, T. U. (2012).** Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Frontiers in Microbiology*, 3, 18. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00018>

M

- 219) **Ma, Y., Wilson, C. A., Novak, J. T., Riffat, R., Aynur, S., Murthy, S., & Pruden, A. (2011).** Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons. *Environmental Science & Technology*, 45(18), 7855–61. <http://doi.org/10.1021/es200827t>
- 220) **Madigan, M. T., Martinko, J., & Parker, J. (2000).** *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=p7DuAAAAMAAJ&pgis=1>

- 221) **Magnet, S., & Blanchard, J. S. (2005).** Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chemical Reviews*, 105(2), 477–98. <http://doi.org/10.1021/cr0301088>
- 222) **Majiduddin, F. K., Materon, I. C., & Palzkill, T. G. (2002).** Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 292, 127–137. <http://doi.org/10.1078/1438-4221-00198>
- 223) **Marín, I., Goñi, P., Lasheras, A. M., & Ormad, M. P. (2015).** Efficiency of a Spanish wastewater treatment plant for removal potentially pathogens: Characterization of bacteria and protozoa along water and sludge treatment lines. *Ecological Engineering*, 74, 28–32. <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.027>
- 224) **Marks, T., & Sharp, R. (2000).** Bacteriophages and biotechnology: A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 75(1), 6–17. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(200001\)75:1<6::AID-JCTB157>3.0.CO;2-A](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(200001)75:1<6::AID-JCTB157>3.0.CO;2-A)
- 225) **Marti, E., Jofre, J., & Balcazar, J. L. (2013).** Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PloS One*, 8(10), e78906. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0078906>
- 226) **Marti, E., Variatza, E., & Balcazar, J. L. (2014a).** The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 22(1), 36–41. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.001>
- 227) **Marti, E., Variatza, E., & Balcázar, J. L. (2014b).** Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(7), O456–9. <http://doi.org/10.1111/1469-0691.12446>
- 228) **Martínez-Martínez, L., Pascual, A., & Jacoby, G. A. (1998).** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351(9105), 797–799. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07322-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07322-4)
- 229) **Maruri, F., Sterling, T. R., Kaiga, A. W., Blackman, A., van der Heijden, Y. F., Mayer, C., ... Aubry, A. (2012).** A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), 819–31. <http://doi.org/10.1093/jac/dkr566>
- 230) **Mayer, G. (2016).** Bacteriology-Chapter seven: Bacteriophage. Retrieved May 6, 2016, from <http://www.microbiologybook.org/mayer/phage.htm>
- 231) **Mazodier, P., & Davies, J. (1991).** Gene transfer between distantly related bacteria. *Annual Review of Genetics*, 25(27), 147–171. <http://doi.org/10.1146/annurev.genet.25.1.147>
- 232) **McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., ... Wright, G. D. (2013).** The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3348–3357. <http://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>

- 233) **McDaniel, L. D., Young, E. C., Ritchie, K. B., & Paul, J. H. (2012).** Environmental factors influencing gene transfer agent (GTA) mediated transduction in the subtropical ocean. *PLoS ONE*, 7(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043506>
- 234) **McDaniel, L. D., Young, E., Delaney, J., Ruhнау, F., Ritchie, K. B., & Paul, J. H. (2010).** High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6000), 50. <http://doi.org/10.1126/science.1192243>
- 235) **McGuigan, K. G., Joyce, T. M., & Conroy, R. M. (1999).** Solar disinfection: Use of sunlight to decontaminate drinking water in developing countries. *Journal of Medical Microbiology*, 48(9), 785–787. <http://doi.org/10.1099/00222615-48-9-785>
- 236) **McKinney, C. W., & Pruden, A. (2012).** Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. *Environmental Science & Technology*, 46(24), 13393–400. <http://doi.org/10.1021/es303652q>
- 237) **McManus, C. (1997).** Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 54(12), 1420–1433. Retrieved from http://ovidsp.tx.ovid.com.sire.ub.edu/sp-3.18.0b/ovidweb.cgi?&S=PMMNFPAGLIDDEAEINCJKLFDCKKFEAA00&Link+Set=S.sh.22.23.26.29%7c14%7csl_10
- 238) **Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C. S., Manaia, C. M., Merlin, C., Schwartz, T., ... Fatta-Kassinos, D. (2013).** Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Research*, 47(3), 957–95. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.027>
- 239) **Milieu Ltd. (2010).** Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land Final Report Part I: Overview Report. Brussels. Retrieved from <papers2://publication/uuid/AB3C559F-2A0E-47EC-A0EA-9BB295FFF90B>
- 240) **Miller, R. V., Gammon, K., & Day, M. J. (2009).** Antibiotic resistance among bacteria isolated from seawater and penguin fecal samples collected near Palmer Station, Antarctica. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(1), 37–45. <http://doi.org/10.1139/W08-119>
- 241) **Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S. A., Wu, G. D., ... Bushman, F. D. (2011).** The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Research*, 21(10), 1616–25. <http://doi.org/10.1101/gr.122705.111>
- 242) **Moat, A. G., Foster, J. W., & Spector, M. P. (2002).** *Microbial Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/0471223867>
- 243) **Moce-Llivina, L., Muniesa, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F., & Jofre, J. (2003).** Survival of Bacterial Indicator Species and Bacteriophages after Thermal Treatment of Sludge and Sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1452–1456. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1452-1456.2003>
- 244) **Morgan-Linnell, S. K., Boyd, L. B., Steffen, D., & Zechiedrich, L. (2009).** Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), 235–241. <http://doi.org/10.1128/AAC.00665-08>

- 245) **Motta, A. S., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2004).** Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(4), 307–310. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300007>
- 246) **Muniesa, M., Colomer-Iluch, M., & Jofre, J. (2013).** Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiology*, 8(6), 739–751. <http://doi.org/10.2217/fmb.13.32>
- 247) **Muniesa, M., Imamovic, L., & Jofre, J. (2011).** Bacteriophages and genetic mobilization in sewage and faecally polluted environments. *Microbial Biotechnology*, 4(6), 725–734. <http://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00264.x>
- 248) **Munir, M., Wong, K., & Xagorarakis, I. (2011).** Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Research*, 45(2), 681–93. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.033>

N

- 249) **Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H., & Gojobori, T. (2004).** Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nature Genetics*, 36(7), 760–766. <http://doi.org/10.1038/ng1381>
- 250) **NCBI. (2016).** Beta Lactamase Data Resources. Retrieved April 12, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/>
- 251) **Nelson, K. E., & Williams, C. F. (2007).** Early History of Infectious Disease. *Infectious Disease Epidemiology: Theory and Practice*. (3rd ed., Vol. Chapter On). Jones & Bartlett Learning.
- 252) **Nesme, J., & Simonet, P. (2015).** The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environmental Microbiology*, 17(4), 913–30. <http://doi.org/10.1111/1462-2920.12631>
- 253) **Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D., & Daffonchio, D. (2007).** Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research*, 6, 37–53. <http://doi.org/10.1051/ebr:2007031>
- 254) **Novo, A., André, S., Viana, P., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2013).** Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Research*, 47(5), 1875–87. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.010>
- 255) **Novo, A., & Manaia, C. M. (2010).** Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 1157–1166. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-2583-6>
- 256) **Nübel, U., Roumagnac, P., Feldkamp, M., Song, J.-H., Ko, K. S., Huang, Y.-C., ... Achtman, M. (2008).** Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America, 105(37), 14130–5.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0804178105>

O

- 257) **O'Connell, K. M. G., Hodgkinson, J. T., Sore, H. F., Welch, M., Salmond, G. P. C., & Spring, D. R. (2013).** Combating multidrug-resistant bacteria: Current strategies for the discovery of novel antibacterials. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(41), 10706–10733. <http://doi.org/10.1002/anie.201209979>
- 258) **One Health ministerial conference. (2016).** Antimicrobial Resistance, from intentions to action! In AMR Next. Dutch Ministry of Health Welfare and Sport and the Dutch Ministry of Agriculture.
- 259) **Osorio, V., Pérez, S., Ginebreda, A., & Barceló, D. (2012).** Pharmaceuticals on a sewage impacted section of a Mediterranean River (Llobregat River, NE Spain) and their relationship with hydrological conditions. *Environmental Science and Pollution Research International*, 19(4), 1013–25. <http://doi.org/10.1007/s11356-011-0603-4>

P

- 260) **Paniagua, R., Valverde, A., Coque, T. M., Baquero, F., & Cantón, R. (2010).** Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae fecal carriers using a chromogenic medium. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(4), 376–379. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.03.012>
- 261) **Parsley, L. C., Consuegra, E. J., Kakirde, K. S., Land, A. M., Harper, W. F., & Liles, M. R. (2010).** Identification of diverse antimicrobial resistance determinants carried on bacterial, plasmid, or viral metagenomes from an activated sludge microbial assemblage. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3753–7. <http://doi.org/10.1128/AEM.03080-09>
- 262) **Paterson, D. L. (2006).** Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine*, 119(6 Suppl 1), S20–8; discussion S62–70. <http://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.013>
- 263) **Paterson, D. L., & Bonomo, R. a. (2005).** Extended-Spectrum β -Lactamases : a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686. <http://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
- 264) **Patterson, J. (2000).** Extended-spectrum β -lactamases. *Seminars in Respiratory Infections*, 15(4), 299–307. <http://doi.org/10.1053/srin.2000.20934>

- 265) **Pei, R., Kim, S. C., Carlson, K. H., & Pruden, A. (2006).** Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research*, 40, 2427–2435. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.017>
- 266) **Penades, J. R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., & Novick, R. P. (2015).** Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 171–178. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.019>
- 267) **Penders, J., Stobberingh, E. E., Savelkoul, P. H. M., & Wolfs, P. F. G. (2013).** The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4(APR), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00087>
- 268) **Perlman, D. (1975).** *Advances in applied microbiology*, Volumen 18. Academic Press Inc.
- 269) **Perreten, V., & Boerlin, P. (2003).** A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 1169–1172. <http://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1169-1172.2003>
- 270) **Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G., & Nannipieri, P. (2009).** Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45, 219–235. <http://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>
- 271) **Pimenta, A. C., Fernandes, R., & Moreira, I. S. (2014).** Evolution of drug resistance: insight on TEM β -lactamases structure and activity and β -lactam antibiotics. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(2), 111–22. <http://doi.org/10.2174/1389557514666140123145809>
- 272) **Poirel, L., Liard, A., Nordmann, P., & Mammeri, H. (2005).** Origin of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3523–3525. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3523>
- 273) **Poirel, L., Liard, A., Rodriguez-Martinez, J. M., & Nordmann, P. (2005).** Vibrionaceae as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1118–1121. <http://doi.org/10.1093/jac/dki371>
- 274) **Porter, J. R. (1976).** Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40(2), 260–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=413956&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 275) **Pray, L. (2008).** Transposons: The Jumping Genes. *Nature Education*, 1(1), 204. Retrieved from <http://www.nature.com/scitable/topicpage/transposons-the-jumping-genes-518>
- 276) **Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2004).** *Microbiología*. McGraw-Hill/Interamericana.
- 277) **Proyecto aWare. (2016).** Plan de reutilización de agua del Área Metropolitana de Barcelona | Aware. Retrieved May 30, 2016, from <http://www.life-aware.eu/>

- 278) **Pruden, A., Arabi, M., & Storteboom, H. N. (2012).** Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. *Environmental Science & Technology*, 46(21), 11541–9. <http://doi.org/10.1021/es302657r>
- 279) **Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., & Carlson, K. H. (2006).** Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environmental Science & Technology*, 40(23), 7445-7450.

Q

- 280) **Qadir, M., Wichelns, D., Raschid-Sally, L., McCornick, P. G., Drechsel, P., Bahri, A., & Minhas, P. S. (2010).** The challenges of wastewater irrigation in developing countries. *Agricultural Water Management*, 97(4), 561–568. <http://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.11.004>
- 281) **Quirós, P., Colomer-Lluch, M., Martínez-Castillo, A., Miró, E., Argente, M., Jofre, J., Navarro, F & Muniesa, M. (2014).** Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 606–9. <http://doi.org/10.1128/AAC.01684-13>

R

- 282) **Reinthal, F. F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckebauer, G., Mascher, F & Marth, E. (2003).** Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*, 37(8), 1685–1690. [http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00569-9](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00569-9)
- 283) **Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., Michael, I & Fatta-Kassinos, D. (2013).** Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of The Total Environment*, 447, 345–360. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>
- 284) **Robicsek, A., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2006a).** The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*, 6(10), 629–640. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70599-0](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70599-0)
- 285) **Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. a, Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., Bush, K & Hooper, D. C. (2006b).** Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12(1), 83–88. <http://doi.org/10.1038/nm1347>
- 286) **Robin, F., Delmas, J., Machado, E., Bouchon, B., Peixe, L., & Bonnet, R. (2011).** Characterization of the Novel CMT Enzyme TEM-154. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 1262–5. <http://doi.org/10.1128/AAC.01359-10>

- 287) **Rodríguez-Baño, J., Alcalá, J. C., Cisneros, J. M., Grill, F., Oliver, A., Horcajada, J. P., ... Pascual, A. (2008).** Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Archives of Internal Medicine*, 168(17), 1897–902. <http://doi.org/10.1001/archinte.168.17.1897>
- 288) **Rodríguez-Martínez, J. M., Cano, M. E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L., & Pascual, Á. (2011).** Plasmid-mediated quinolone resistance: An update. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17(2), 149–182. <http://doi.org/10.1007/s10156-010-0120-2>
- 289) **Rodríguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Martí, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C., Barceló, D & Balcázar, J. L. (2014).** Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69C, 234–242. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- 290) **Rolain, J. M., Fancello, L., Desnues, C., & Raoult, D. (2011).** Bacteriophages as vehicles of the resistome in cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(11), 2444–2447. <http://doi.org/10.1093/jac/dkr318>
- 291) **Roland, S., Ferone, R., Harvey, R., Styles, V., & Morrison, R. (1979).** The Characteristics and Significance of Sulfonamides as Substrates for *Escherichia coli* Dihydropteroate Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(20), 10337–10345.
- 292) **Romanowski, G., Lorenz, M. G., Sayler, G., & Wackernagel, W. (1992).** Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 3012–9.
- 293) **Ruiz, J., Pons, M. J., & Gomes, C. (2012).** Transferable mechanisms of quinolone resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(3), 196–203. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.02.011>

S

- 294) **Sabater, S., Ginebreda, A., Barceló i Cullerés, D., & Acuña, V. (2012).** The Llobregat: the story of a polluted Mediterranean river. Heidelberg : Springer. Retrieved from http://catalog.ub.edu/record=b2071287~S1*cat
- 295) **Sabater, S., Muñoz, I., García-Berthou, E., & Barceló, D. (2015).** Multiple stressors in Mediterranean freshwater ecosystems: The Llobregat River as a paradigm. *Contributions to Science*. <http://doi.org/10.2436/cs.v10i2.139204>
- 296) **Salyers, A. A., Gupta, A., & Wang, Y. (2004).** Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology*, 12(9), 412–416. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2004.07.004>
- 297) **Sandegren, L. (2014).** Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 103–7. <http://doi.org/10.3109/03009734.2014.904457>

- 298) **Sander, M., & Schmieger, H. (2001)**. Method for host-independent detection of generalized transducing bacteriophages in natural habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1490–3. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1490-1493.2001>
- 299) **Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006)**. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725–59. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>
- 300) **Scherrer, R., & Gerhardt, P. (1971)**. Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *Journal of Bacteriology*, 107(3), 718–35. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=246993&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 301) **Schwartz, T. (2003)**. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms, 43.
- 302) **Selva, L., Viana, D., Regev-Yochay, G., Trzcinski, K., Corpa, J. M., Lasa, I., ... Penadés, J. R. (2009)**. Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 106(1091-6490 (Electronic)), 1234–1238. <http://doi.org/10.1073/pnas.0809600106>
- 303) **Serra-Moreno, R., Jofre, J., & Muniesa, M. (2008)**. The CI Repressors of Shiga Toxin-Converting Prophages Are Involved in Coinfection of *Escherichia coli* Strains, Which Causes a Down Regulation in the Production of Shiga Toxin 2. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4722–4735. <http://doi.org/10.1128/JB.00069-08>
- 304) **Sharp, D. G., Hook, A. E., Taylor, A. R., Beard, D., & Beard, J. W. (1946)**. Sedimentation characters and pH stability of the t2 bacteriophage of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 165(1), 259–270.
- 305) **Shehane, S. D., Harwood, V. J., Whitlock, J. E., & Rose, J. B. (2005)**. The influence of rainfall on the incidence of microbial faecal indicators and the dominant sources of faecal pollution in a Florida river. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1127–1136. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02554.x>
- 306) **Shlaes, D. M. (2010)**. Antibiotics: The perfect storm. *Antibiotics: The perfect storm*. Springer. <http://doi.org/10.1007/978-90-481-9057-7>
- 307) **Shon, H. K., Phuntsho, S., Vigneswaran, S., Kandashamy, J., Cho, J., & Kim, J. H. (2009)**. *Waste Water Treatment Technologies - Volume I*. EOLSS Publications.
- 308) **Siefert, J. L. (2009)**. Defining the mobilome. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 532, 13–27. http://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9_2
- 309) **Singh, R. P., & Agrawal, M. (2008)**. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management*, 28(2), 347–358. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.010>
- 310) **Sinton, L. W., Hall, C. H., Lynch, P. a., & Davies-Colley, R. J. (2002)**. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1122–1131. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1122-1131.2002>

- 311) **Sjölund, M., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Bengtsson, S., Cederbrant, G., Pinhassi, J., ... Olsen, B. (2008).** Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerging Infectious Diseases*. Retrieved from <http://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A158442&dswid=7071>
- 312) **Skipper, K. A., Andersen, P. R., Sharma, N., & Mikkelsen, J. G. (2013).** DNA transposon-based gene vehicles - scenes from an evolutionary drive. *Journal of Biomedical Science*, 20, 92. <http://doi.org/10.1186/1423-0127-20-92>
- 313) **Sköld, O. (2000).** Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 3(3), 155–160. <http://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>
- 314) **Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & de la Cruz, F. (2010).** Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 434–452. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- 315) **Smital, T. (2008).** Acute and Chronic Effects of Emerging Contaminants. In D. Barceló & M. Petrovic (Eds.), *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste* (Vol. 5 / 5S / 5, p. 105–). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-540-74795-6>
- 316) **Sommer, M. O. A., Church, G. M., & Dantas, G. (2010).** The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Virulence*, 1(4), 299–303. <http://doi.org/10.4161/viru.1.4.12010>
- 317) **Sommer, M. O., Dantas, G., & Church, G. M. (2009).** Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, 325(5944), 1128–1131. <http://doi.org/10.1126/science.1176950>
- 318) **Soufi, L., Sáenz, Y., Vinué, L., Abbassi, M. S., Ruiz, E., Zarazaga, M., ... Torres, C. (2011).** *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 497–502. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.008>
- 319) **Spanish Government. Real Decreto 1620/2007**, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, 21092 BOE núm. 294 50639–50661 (2007).
- 320) **Stoll, C., Sidhu, J. P. S., Tiehm, A., & Toze, S. (2012).** Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environmental Science & Technology*, 46(17), 9716–26. <http://doi.org/10.1021/es302020s>
- 321) **Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., & Robicsek, A. (2009).** Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 664–689. <http://doi.org/10.1128/CMR.00016-09>
- 322) **Sulakvelidze, A. (2011).** Safety by Nature: Potential Bacteriophage Applications. *Microbe*, 6(3), 122–126.
- 323) **Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K.-H., Gützkow, T., Eichler, W., ... Schlüter, A. (2009).** Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing

reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology* (Reading, England), 155(Pt 7), 2306–19. <http://doi.org/10.1099/mic.0.028233-0>

T

- 324) **Taylor, N. G. H., Verner-Jeffreys, D. W., & Baker-Austin, C. (2011).** Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? *Trends in Ecology & Evolution*, 26(6), 278–84. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.004>
- 325) **Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Pühler, A., & Schlüter, A. (2003).** Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 45(3), 239–52. [http://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00164-8](http://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00164-8)
- 326) **Tenover, F. C. (2006).** Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *American Journal of Medicine*, 119(6 SUPPL. 1). <http://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>
- 327) **The Council of the European Union. (2009).** Council Recommendation of 9 June 2009 on patient safety, including the prevention and control of healthcare associated infections. *Official Journal of the European Union*, (1982), 1–6. <http://doi.org/10.1097/HCR.0b013e31823be0bc>
- 328) **Thiele-Bruhn, S. (2003).** Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166(2), 145–167. <http://doi.org/10.1002/jpln.200390023>
- 329) **Tilburg, C. E., Jordan, L. M., Carlson, A. E., Zeeman, S. I., & Yund, P. O. (2015).** The effects of precipitation, river discharge, land use and coastal circulation on water quality in coastal Maine. *Royal Society Open Science*, 2(7), 140429. <http://doi.org/10.1098/rsos.140429>
- 330) **Tornevi, A., Bergstedt, O., & Forsberg, B. (2014).** Precipitation effects on microbial pollution in a river: Lag structures and seasonal effect modification. *PLoS ONE*, 9(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0098546>
- 331) **Turco, M., & Llasat, M. C. (2011).** Trends in indices of daily precipitation extremes in Catalonia (NE Spain), 1951-2003. *Natural Hazards and Earth System Science*, 11, 3213–3226. <http://doi.org/10.5194/nhess-11-3213-2011>

U

- 332) **Úbeda, C., Maiques, E., Knecht, E., Lasa, Í., Novick, R. P., & Penadés, J. R. (2005).** Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of

pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Molecular Microbiology*, 56(3), 836–844. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04584.x>

- 333) **USEPA. EPA/625/R-92/013 (2003).** Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge Control of Pathogens and Vector Attraction, Environmental Regulations and Technology 498–504 [http://doi.org/10.1016/S0015-1882\(99\)80035-4](http://doi.org/10.1016/S0015-1882(99)80035-4)

V

- 334) **Vaara, M., Plachy, W. Z., & Nikaido, H. (1990).** Partitioning of hydrophobic probes into lipopolysaccharide bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1024(1), 152–158. [http://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90218-D](http://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90218-D)
- 335) **van den Bogaard, A. E., & Stobberingh, E. E. (1999).** Antibiotic Usage in Animals. *Drugs*, 58(4), 589–607. <http://doi.org/10.2165/00003495-199958040-00002>
- 336) **Van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. M. (2011).** Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Frontiers in Microbiology*, 2(SEP), 1–27. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
- 337) **Van-Bambeke, F., Balzi, E., & Tulkens, M. (2000).** Antibiotic Efflux Pumps. *Franc. Biochemical Pharmacology*, 60(00), 457–470. <http://doi.org/10.1093/jac/dki171>
- 338) **Villa, T., & Veiga-Crespo, P. (2014).** Antimicrobial Compounds. Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-40444-3>
- 339) **Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., & Obst, U. (2004).** Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 277–286. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.014>

W

- 340) **Wachino, J., Shibayama, K., Kurokawa, H., Kimura, K., Yamane, K., Suzuki, S., ... Arakawa, Y. (2007).** Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(12), 4401–9. <http://doi.org/10.1128/AAC.00926-07>
- 341) **Waksman, S. A., & Woodruff, H. B. (1940).** Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomyces. *Experimental Biology and Medicine*, 45(2), 609–614. <http://doi.org/10.3181/00379727-45-11768>
- 342) **Waksman, S. A., & Woodruff, H. B. (1942).** Selective Antibiotic Action of Various Substances of Microbial Origin. *Journal of Bacteriology*, 44(3), 373–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16560575>

- 343) **Walsh, C. (2003)**. Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews. Microbiology*, 1(1), 65–70. <http://doi.org/10.1038/nrmicro727>
- 344) **Wang, D., Huang, X., Chen, J., Mou, Y., & Qi, Y. (2016)**. Characterization of a novel *qepA3* variant in *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 1–4. <http://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.01.001>
- 345) **Wang, Z., Zhang, X.-X., Huang, K., Miao, Y., Shi, P., Liu, B., ... Li, A. (2013)**. Metagenomic profiling of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in a tannery wastewater treatment plant. *PloS One*, 8(10), e76079. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0076079>
- 346) **Wasył, D., Hoszowski, A., Zajac, M., & Szulowski, K. (2013)**. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. *Frontiers in Microbiology*, 4(AUG), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00221>
- 347) **Watanabe, T. (1963)**. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriology Reviews*, 27, 87.
- 348) **Watkinson, A. J., Micalizzi, G. B., Graham, G. M., Bates, J. B., & Costanzo, S. D. (2007)**. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5667–70. <http://doi.org/10.1128/AEM.00763-07>
- 349) **Wax, R. G., Lewis, K., Salyers, A. A., & Taber, H. (2007)**. *Bacterial Resistance to Antimicrobials*. CRC Press. Retrieved from <https://www.crcpress.com/>
- 350) **Webb, V., & Davies, J. (1993)**. Antibiotic preparations contain DNA : a source of drug resistance genes ? *Antibiotic Preparations Contain DNA : a Source of Drug Resistance Genes ?*, 37(11), 2379–2384. <http://doi.org/10.1128/AAC.37.11.2379>. Updated
- 351) **Wegelin, M., Canonica, S., Mechsner, K., Fleischmann, T., Pesaro, F., & Metzler, A. (1994)**. Solar water disinfection: scope of the process and analysis of radiation experiments. *Journal of Water Supply: Research and Technology*.
- 352) **Weinbauer, M. G., & Rassoulzadegan, F. (2003)**. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*, 6(1), 1–11. <http://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00539.x>
- 353) **Wellington, E. M. H., Boxall, A. B. A., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., ... Williams, A. P. (2013)**. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2), 155–165. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1)
- 354) **Wessjohann, L. A. (2000)**. Synthesis of natural-product-based compound libraries. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(3), 303–309. [http://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00093-4](http://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00093-4)
- 355) **Wiedenbeck, J., & Cohan, F. M. (2011)**. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 957–976. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x>
- 356) **Wielders, C. L. C., Fluit, A. C., Brisse, S., Verhoef, J., & Schmitz, F. J. (2002)**. *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *Journal of*

- Clinical Microbiology, 40(11), 3970–3975. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.11.3970-3975.2002>
- 357) **Wilke, M. S., Lovering, A. L., & Strynadka, N. C. J. (2005).** b-Lactam antibiotic resistance: A current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 8(5), 525–533. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.016>
- 358) **Woegerbauer, M., Lagler, H., Graninger, W., & Burgmann, H. (2005).** DNA in Antibiotic Preparations: Absence of Intact Resistance Genes DNA in Antibiotic Preparations: Absence of Intact Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2490–4. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2490-2494.2005>
- 359) **Wommack, K. E., Hill, R. T., Muller, T. a., & Colwell, R. R. (1996).** Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1336–1341.
- 360) **World Health Organization. (2011).** Complacency kills. Antibiotic resistance still on the rise in Europe. Retrieved March 18, 2016, from <http://www.euro.who.int>
- 361) **World Health Organization. (2014).** Antimicrobial resistance Global Report on Surveillance 2014. Geneva.
- 362) **World Health Organization. (2015).** Antimicrobial resistance. Retrieved March 17, 2016, from <http://www.who.int/>
- 363) **Wozniak, R. A. F., & Waldor, M. K. (2010).** Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(8), 552–63. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2382>
- 364) **Wright, G. D. (2007).** The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat.Rev.Microbiol.*, 5 (1740-1534 (Electronic)), 175–186. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1614>
- 365) **Wright, G. D. (2010a).** Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 589–594. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.005>
- 366) **Wright, G. D. (2010b).** The antibiotic resistome. *Exp. Opin. Drug Disc.*, 5(8), 779–788. <http://doi.org/10.1517/17460441.2010.497535>

X

- 367) **Xavier, B. B., Das, A. J., Cochrane, G., De Ganck, S., Kumar-Singh, S., Aarestrup, F. M., ... Malhotra-Kumar, S. (2016).** Consolidating and exploring antibiotic resistance gene data resources. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(4), JCM.02717–15. <http://doi.org/10.1128/JCM.02717-15>
- 368) **Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., ... Meng, W. (2014).** Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*, 119, 1379–1385. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040>

Y

- 369) **Yuan, Q.-B., Guo, M.-T., & Yang, J. (2015).** Fate of Antibiotic Resistant Bacteria and Genes during Wastewater Chlorination: Implication for Antibiotic Resistance Control. *PloS One*, 10(3), e0119403. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0119403>

Z

- 370) **Zakharova, I. B., & Viktorov, D. V. (2015).** Integrative conjugative elements (ICEs) of microorganisms. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 30(3), 114–123. <http://doi.org/10.3103/S0891416815030076>
- 371) **Zhang, X.-X., Zhang, T., & Fang, H. H. P. (2009).** Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), 397–414. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1829-z>
- 372) **Zhang, Y., Marrs, C. F., Simon, C., & Xi, C. (2009).** Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *The Science of the Total Environment*, 407(12), 3702–6. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.02.013>
- 373) **Zhang, Y., Zhuang, Y., Geng, J., Ren, H., Zhang, Y., Ding, L., & Xu, K. (2015).** Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by chlorination and sequential UV/chlorination disinfection. *Science of The Total Environment*, 512-513, 125–132. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.028>
- 374) **Zhaxybayeva, O., & Doolittle, W. F. (2011).** Lateral gene transfer. *Current Biology*, 21(7), R242–R246. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.045>
- 375) **Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., Charlebois, R. L., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., Charlebois, R. L., ... Papke, R. T. (2006).** Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: Quantification of horizontal gene transfer events. *Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: Quantification of horizontal gene transfer events*, (902), 1099–1108. <http://doi.org/10.1101/gr.5322306>
- 376) **Zhuang, Y., Ren, H., Geng, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Ding, L., & Xu, K. (2014).** Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater by chlorination, ultraviolet, and ozonation disinfection. *Environmental Science and Pollution Research International*. <http://doi.org/10.1007/s11356-014-3919-z>
- 377) **Zoetendal, E. G., Rajilic-Stojanovic, M., & de Vos, W. M. (2008).** High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*, 57(11), 1605–1615. <http://doi.org/10.1136/gut.2007.133603>

8. ANEXOS

ANEXO 1. OTRAS PUBLICACIONES

Se detalla a continuación las publicaciones no incluidas en la tesis:

- 1) Brown-Jaque, M., **Calero-Cáceres, W.**, Muniesa, M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid* (79), 2015, 1-7.
- 2) Ovejero, C, Delgado-Blas, JF; **Calero-Cáceres, W.**, Muniesa, M, Gonzalez-zorn, B. High prevalence of mcr-1 in sewage water from Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016. Submitted.

Ponencias orales en congresos:

- 1) "Persistence of Antibiotic Resistance Genes After Disinfection Techniques and Natural Inactivation in Both the Bacterial and Bacteriophage Fraction of Wastewater Samples" 18th International Symposium on Health Related Water Microbiology WaterMicro 2015, September 13th-19th 2015, Lisbon, Portugal.
- 2) "Persistencia de genes de resistencia a antibióticos en las fracciones bacteriana y fágica de aguas residuales", 1st Young Researchers Seminar, Water Research Institute (IdRA), 13 Mayo 2016, Barcelona, España.

Ponencias modalidad póster en congresos:

- 1) "Genes de resistencia a antibióticos en la fracción de bacteriófagos aislados de heces humanas "XIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Volumen 33, Especial Congreso 1, Mayo 2015, Sevilla, 28-30 de mayo de 2015.
- 2) "Sediments are an Important Reservoir of Antibiotic Resistance Genes" 18th International Symposium on Health Related Water Microbiology WaterMicro 2015, September 13th-19th 2015, Lisbon, Portugal.

- 3) 16S methyltransfer in the environment and waste water treatment plants, 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 9-12 April 2016, Amsterdam, Netherlands.

- 4) Caracterización molecular de enterobacterias productoras de carbapenemasas en el río Llobregat, XX Congreso Nacional Seimc Barcelona, 26-28 Mayo 2016, Barcelona, España.

License Agreement

Reprinted from Plasmid. Vol. 79. Maryury Brown-Jaque, William Calero-Cáceres, Maite Muniesa Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements Pages 1-7. Copyright 2015. With permission from Elsevier.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Plasmid

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yplas



Review

Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements



Maryury Brown-Jaque, William Calero-Cáceres, Maite Muniesa *

Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2014

Accepted 13 January 2015

Available online 15 January 2015

Communicated by Saleem Khan

Keywords:

Bacteriophages

MGE

Antibiotic resistance

ICE

GTA

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a major concern for society because it threatens the effective prevention of infectious diseases. While some bacterial strains display intrinsic resistance, others achieve antibiotic resistance by mutation, by the recombination of foreign DNA into the chromosome or by horizontal gene acquisition. In many cases, these three mechanisms operate together. Several mobile genetic elements (MGEs) have been reported to mobilize different types of resistance genes and despite sharing common features, they are often considered and studied separately. Bacteriophages and phage-related particles have recently been highlighted as MGEs that transfer antibiotic resistance. This review focuses on phages, phage-related elements and on composite MGEs (phages-MGEs) involved in antibiotic resistance mobility. We review common features of these elements, rather than differences, and provide a broad overview of the antibiotic resistance transfer mechanisms observed in nature, which is a necessary first step to controlling them.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	1
2. Classic elements involved in ARG transfer	2
2.1. MGEs that mediate ARG transfer with cell–cell contact	2
2.2. MGEs that mediate ARG transfer without cell–cell contact	4
3. MGEs composed by phages or phage-related elements	5
3.1. Plasmid-phage	5
3.2. Transposon-phage	5
3.3. GI-phage	5
3.4. Gene transfer agents (GTA)	5
4. Concluding remarks	6
Acknowledgments	6
References	6

1. Introduction

Bacterial genomes exhibit dynamic plasticity and are shaped by horizontal gene transfer (HGT), genome re-arrangement, and the activities of mobile DNA elements (Darmon and Leach, 2014). The number of reports of HGT mechanisms between distinct organisms has

* Corresponding author. Department of Microbiology, Faculty of Biology, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. Fax: +34 3 4039047. E-mail address: mmuniesa@ub.edu (M. Muniesa).

ANEXO 2: MEDIOS DE CULTIVO

Medios de cultivo

Caldo LB (Luria-Bertani):

10 g triptona

5 g extracto de levadura

10 g NaCl

1 L agua destilada

Esterilizar a 121°C por 15 minutos y guardar a temperatura ambiente.

LB ss (semisólido):

10 g triptona

5 g extracto de levadura

10 g NaCl

7 g Agar Bacteriológico Europeo

1 L agua destilada

Esterilizar a 121°C por 15 minutos y guardar a temperatura ambiente.

LB agar:

10 g triptona

5 g extracto de levadura

10 g NaCl

15 g Agar Bacteriológico Europeo

1 L agua destilada

Esterilizar a 121°C por 15 minutos, dispensar en placas de Petri y guardar las placas a 4°C. Nota: Si el medio va suplementado con algún antibiótico, después de esterilizar en el autoclave se deja enfriar hasta unos 50°C y se añade el antibiótico a la concentración adecuada antes de plaquear.

TSA (*Trypticasein soy agar*):

40 g de TSA

1 L agua destilada

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min, dispensar en placas de Petri y guardar a 4°C.

Caldo TSB (*trypticasein soy broth*):

17 g caseína peptona

3 g peptona de soja

5 g cloruro sódico

2,5 g fosfato di potásico

2,5 g dextrosa

1 L de agua destilada

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a 4°C.

Chromocult® (Merck):

26,5 g Chromocult

1 L agua destilada

Calentar y remover hasta que quede bien disuelto. Cuando empiece a hervir, sacar del fuego y esperar hasta que se enfríe a 45-50°C. Entonces añadir el suplemento (2 viales de suplemento selectivo para *E. coli*/ coliformes) y plaquear.

Soluciones y tampones

PBS (*Phosphate buffered saline*):

8 g cloruro sódico

0,2 g cloruro de potasio

0,2 g hidrofosfato de potasio

1,15 g hidrofosfato de sodio heptahidratado

1 L agua bidestilada

Ajustar el pH a 7,1-7,2.

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a T^a ambiente.

Ringer ¼:

2.5 g medio Ringer, en polvo

1 L agua destilada

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a T^a ambiente.

ADNasa y ARNasa:

10 mg de ADNasa o ARNasa

1 mL agua bidestilada estéril

Una vez preparado, conservar a -20°C.

Proteinasa K:

20 mg proteinasa K
1 mL agua bidestilada estéril
Conservar a -20°C.

Tampón proteinasa K:

2 mL Tris HCl 1M pH 8
2 mL EDTA 0,5 M pH 8
10 mL SDS 10%
Hasta 100 mL de agua bidestilada

Acetato sódico 3M:

24,6 g de acetato sódico
100 mL agua bidestilada
Ajustar el pH a 4,5- 5,5 con HCl 37% y esterilizar en autoclave.

Etanol 70%:

70 mL de EtOH 100%
30 mL de agua bidestilada

TBE 10X (Tris Boric EDTA Buffer):

109 g Tris Base
55,6 g ácido bórico
9,2 g EDTA
Hasta 1 L de agua bidestilada
Esterilizar a 121°C 15 min y guardar a T^a ambiente.

TBE 1X:

100 mL TBE 10X
900 mL agua bidestilada estéril

Gel de agarosa:

150 mL TBE 1X
Agarosa al 0.8%, 1%, 2% (p/v) o en el porcentaje adecuado en cada caso.

Bromuro de etidio para tinción de geles de DNA/RNA:

Añadir 200 µl de la solución stock (1% en p/v) de bromuro de etidio (Merck®) a un litro de agua bidestilada.

Tampón de lavado (membranas de diálisis):

20 g Na₂CO₃

5 mL EDTA 0.2M (pH 8-8.5)

995 mL agua bidestilada estéril

Disolver por agitación. Preparar antes de usar.

Tampón EDTA (membranas de diálisis):

5 mL EDTA 0.2M (pH 8-8.5)

995 mL agua bidestilada estéril. Disolver por agitación. Preparar antes de usar.

ANEXO 3: PROTOCOLOS USADOS EN ESTE ESTUDIO

1. MUESTRAS

Se utilizaron diferentes matrices en estos estudios: aguas residuales de origen animal, humano, agua de río, sedimentos y lodos. Las cantidades de muestra varían de acuerdo al método de extracción y a la densidad de macromoléculas presente en la muestra.

Matriz	ADN bacteriano	ADN fágico
Agua residual urbana	5-25 mL	50 mL
Agua residual animal	10-50 mL	10-50 mL
Agua de río	50-100 mL	50-100 mL
Sedimentos	0.25 g	5 g
Lodos	0.25 g	5 g

2. PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

2.1. Protocolo de extracción de ADN bacteriano

Muestras líquidas (Modificaciones realizadas al método *QIAamp® DNA Blood Mini kit, Qiagen Inc., USA*).

- 1) Filtrar la muestra por medio de filtros de diámetro de poro 0.45 μm (47 mm, *White gridded, EZ-Pak® Membrane Filters, Millipore*).
- 2) Lavar las membranas con 10 mL de PBS 1x por duplicado para reducir la presencia de partículas virales.
- 3) Los sólidos de las membranas fueron resuspendidos en 10 mL de caldo LB.

- 4) Las suspensiones fueron centrifugadas a 3000 xg durante 10 minutos, resuspender el pellet en 200 µl de caldo LB y transferirlo a un tubo de microcentrífuga.
- 5) Añadir 20 µL de proteinasa K (*QIAGEN Protease*) y 200 µl de tampón AL. Mezclar en un vórtex durante 15 s.
- 6) Incubar a 56°C durante 10 min.
- 7) Añadir 200 µL de etanol 100% y mezclar en un vórtex durante 15 s.
- 8) Colocar la muestra en una columna (*QIAamp Mini spin column*) y centrifugar a 6000 xg durante 1 min. Colocar la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga y descartar el filtrado.
- 9) Añadir 500 µL de tampón AW1 y centrifugar de nuevo 1 min a 6000 xg. Volver a cambiar el tubo de microcentrífuga.
- 10) Añadir 500 µL de tampón AW2 y centrifugar 3 min a 20,000 xg.
- 11) Descartar el filtrado y centrifugar 1 min para eliminar los restos de tampón.
- 12) Colocar la columna en un tubo de 1,5 mL y añadir 200 µl de tampón AE o agua bidestilada estéril.
- 13) Incubar 5 min a T^a ambiente y centrifugar 1 min a 6000 xg para obtener el ADN bacteriano, almacenar a -20 °C.

Muestras sólidas (*PowerSoil® DNA Isolation Kit, MoBio Lab. Inc. USA*).

- 1) Añadir 0.25 g de muestra a los tubos *PowerBead* incluidos en el kit, mezclar usando un vórtex de manera vigorosa.
- 2) Añadir 60 µL de la solución C1 y mezclar usando un vórtex.
- 3) Colocar los tubos dentro del vórtex *Mo-Bio* de manera horizontal, agitar a máxima velocidad durante 10 min.
- 4) Centrifugar los tubos a 10.000 xg durante 30 segundos a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga.

- 5) Añadir 250 μL de la solución C2 y mezclar usando un vórtex por 5 segundos. Incubar a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. Centrifugar a temperatura ambiente durante 1 min a 10,000 xg. Transferir 600 μL del sobrenadante a un nuevo tubo.
- 6) Añadir 200 μL de la solución C3 y mezclar cuidadosamente. Incubar a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. Centrifugar a temperatura ambiente durante 1 min a 10,000 xg. Transferir 750 μL del sobrenadante a un nuevo tubo.
- 7) Mezclar la solución C4 antes del uso, añadir 1200 μL de la solución C4 al sobrenadante y mezclar usando un vórtex por 5 segundos.
- 8) Colocar aproximadamente 675 μL dentro del filtro provisto dentro del kit, y centrifugar a 10.000 xg por 1 minutos a temperatura ambiente. Descartar el líquido. Repetir el proceso hasta terminar el líquido.
- 9) Añadir 500 μL de la solución C5 y centrifugar a temperatura ambiente por 30 segundos a 10.000 xg. Descartar el flujo.
- 10) Centrifugar nuevamente a temperatura ambiente por 1 min a 10.000 xg.
- 11) Cuidadosamente colocar el filtro en un tubo de microcentrífuga limpio y añadir 100 μL de la solución C6 al centro de la membrana. Centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 g. Descartar el filtro.
- 12) Almacenar el ADN en congelación entre -20 $^{\circ}\text{C}$ y -80 $^{\circ}\text{C}$.

2.2. Protocolo de extracción de ADN fágico (Método de homogenización).

Muestras sólidas y líquidas (desde el punto 3) (Modificado Lasobras, Dellunde, Jofre, & Lucena, 1999 y Calero-Cáceres et al., 2014).

- 1) Mezclar a la muestra sólida (sedimentos, lodos, suelos) con PBS 1x en una proporción 1/10 por medio de agitación vertical a 900 osc/min; o magnética, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 2) Centrifugar los tubos a 3000 xg.

- 3) Recoger el sobrenadante y filtrarlo por medio de filtros de baja adsorción proteica con diámetro de 0.22 μm (*Millex-GP, Millipore, Bedford, USA*).
- 4) Concentrar el filtrado usando filtros concentradores de proteínas (100 kDa *Amicon Ultra centrifugal filter units, Millipore, Bedford, USA*) hasta un volumen de 500 μL , colocar el concentrado en un tubo de microcentrífuga.
- 5) Purificar el concentrado por medio de tratamiento con cloroformo (1/10), centrifugar a 16,000 $\times\text{g}$ y recuperar el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga.
- 6) Añadir ADNasa (100 unidades/mL) e incubar a 37°C durante 1 hora.
- 7) Inactivar la ADNasa por tratamiento térmico, durante 10 minutos a 80 °C.
- 8) Tomar una alícuota de 20 μL como control negativo.
- 9) Añadir 11 μL Proteinasa K (20 mg/mL) y 0.5 mL de tampón proteinasa K e incubar a 55 °C durante 1 hora.
- 10) El ADN fágico es purificado por el método fenol/cloroformo. Mezclar las muestras en una proporción 1:1 v/v con fenol/cloroformo (1:1 v/v) en tubos de phase lock (*5-Prime*) y centrifugar a 16,000 $\times\text{g}$ durante 5 minutos. Añadir cloroformo (1:1 v/v) al sobrenadante (en los mismos tubos). Se centrifugó de nuevo a 16,000 $\times\text{g}$ durante 5 minutos.
- 11) El sobrenadante es recuperado. Añadir 100 μL de acetato sódico 3M y 1.5 mL de etanol 100%. Incubar a -20°C o/n.
- 12) Recoger el sobrenadante en tubos de microcentrífuga y centrifugar a 16,000 $\times\text{g}$ durante 30 minutos. Descartar el sobrenadante, lavar el pellet con 300 μL de etanol 70%. Centrifugar durante 10 minutos a 16,000 $\times\text{g}$.
- 13) Descartar el sobrenadante, el pellet de ADN se secó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, añadir 100 μL de agua bidestilada.
- 14) Almacenar el ADN en congelación entre -20 °C y -80 °C.

3. MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS

3.1. Enumeración bacteriana por medio de filtración de membrana

Los contajes de bacterias aeróbicas y *E. coli* fueron evaluados por el método de filtración de membrana de acuerdo al método ISO 9308:1-2014 (International Organization for Standardization, 2014).

Las muestras sólidas son previamente homogenizadas con PBS 1x en una proporción 1/10 por medio de agitación vertical a 900 osc/min; o magnética, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras son centrifugadas a 300 g durante 3 minutos para descartar los sólidos suspendidos; o bien se deja decantar durante 10 minutos. Se recupera el sobrenadante en otro recipiente estéril.

- 1) Se preparan diluciones seriadas de acuerdo a la carga estimada de microorganismos, usando PBS 1x.
- 2) Las diluciones fueron filtradas filtros de diámetro de poro 0.45 μm (47 mm, *White gridded, EZ-Pak® Membrane Filters, Millipore*).
- 3) Colocar las membranas en el medio de cultivo deseado. (TSA para aeróbicas totales o agar Chromocult® (*Merck, Darmstadt, Germany*)).
- 4) Incubar las placas durante 18 horas.

Para evaluar bacterias aeróbicas o *E. coli* resistentes a antibióticos (ampicilina, ácido nalidíxico, sulfametoxazol). Antes de la incubación durante 18 horas es necesario realizar una pre-incubación en el agar de cultivo sin antibiótico durante 2 horas a 37 °C, y luego las membranas fueron transferidas al agar

con el correspondiente antibiótico y posteriormente incubarlos a 37 °C durante 18 horas.

3.2. Enumeración de colifagos somáticos.

Los contajes de colifagos somáticos fueron realizados por el método ISO 10705-2:2000 (International Organization for Standardization, 2000).

Las muestras sólidas son previamente homogenizadas con PBS 1x en una proporción 1/10 por medio de agitación vertical a 900 osc/min; o magnética, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras son centrifugadas a 3000 g durante 5 minutos para descartar los sólidos suspendidos. Recuperar el sobrenadante.

- 1) Filtrar la muestra por medio de filtros de baja adsorción proteica con diámetro de 0.22 μm (*Millex-GP, Millipore, Bedford, USA*).
- 2) Preparar diluciones seriadas de la muestra usando PBS 1x o Ringer $\frac{1}{4}$.
- 3) Inocular la cepa *E. coli* WG5 en MSB. Incubar a 37°C en agitación.
- 4) Fundir el MSA semisólido, añadir los aditivos. Dispensar en tubos estériles de 10 mL, 2,5 mL del semisólido y colocarlos en un baño térmico a 45°C.
- 5) Verificar el crecimiento de la cepa de *E. coli* por medio de la medición de densidad óptica. Se procede a la titulación en valores de DO_{600} entre 0,3 y 0,5.
- 6) En cada tubo con semisólido añadir 1 mL de muestra y 1 mL de la cepa. Agitar cuidadosamente y verte sobre la placa de agar MSA correspondiente. Homogenizar y dejar enfriar en una superficie llana.

- 7) Realizar de manera simultánea un control de cepa (2,5 mL de MSAss y 1 mL de cultivo), control de PBS o Ringer $\frac{1}{4}$ (2,5 mL de MSAss, 1 mL del solvente y 1 mL de cultivo) y control positivo de colifagos somáticos (Φ X174) (2,5 mL de MSAss, 1 mL del control y 1 mL de cultivo)
- 8) Incubar a 37°C O/N.

4. EXPERIMENTOS DE INACTIVACIÓN

4.1. Cloración

Se recomienda trabajar dentro de una cabina de bioseguridad 2.

- 1) Se diluye el agua residual cruda usando agua destilada desionizada estéril, en una proporción 1/10.
- 2) Añadir hipoclorito de sodio hasta una concentración de 10 ppm de cloro libre, usar un agitador magnético, iniciar el temporizador.
- 3) Las alícuotas fueron removidas después de 1, 3, 5, 10 y 30 minutos. Neutralizar el cloro residual adicionando tiosulfato de sodio al 3% (peso/volumen).

4.2. Tratamiento térmico

- 1) Homogenizar el agua residual.
- 2) Rellenar con el agua residual tubos de vidrio con tapa rosca de 20 mL de capacidad.
- 3) Colocar los tubos dentro de un baño térmico a 60°C y 80°C y removerlos después de 30 y 60 minutos.

4.3. Radiación UV

Utilizar una fuente de radiación UV. En nuestra investigación usamos una lámpara germicida de 8W, modelo G30T8, 0.099 mW/cm², con radiación a 253,7 nm (*Sankyo Denki, Tokio, Japón*).

- 1) Calentar la lámpara durante 15 minutos antes de iniciar el experimento.
- 2) Colocar 10 mL de agua residual en una placa Petri de plástico de 90 mm de diámetro.
- 3) Colocar la placa a 10 cm de la fuente de radiación, remover las alícuotas después de 1, 5, 10 y 30 minutos (5.94, 29.7, 59.4 y 178.2 mJ/cm²).

4.4. Influencia de la temperatura y el pH

- 1) Para la temperatura: Colocar alícuotas de agua residual en tubos estériles a 4 °C, 22 °C y 37 °C. Ubicar las alícuotas en un lugar fresco, seco y apartado de la luz.
- 2) Para el pH: El agua residual fue ajustada a pH 3, 7 y 9 usando ácido clorhídrico 1N o hidróxido de sodio 1N, posteriormente llenar alícuotas en tubos estériles y colocarlos a 4 °C en un lugar fresco, seco y apartado de la luz.
- 3) Remover las muestras después de 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 42 días, verificar el pH después de cada muestreo.

4.5. Inactivación natural

Agua residual

Realizar el experimento durante invierno y verano, cuantificar los siguientes parámetros ambientales: temperatura media, radiación solar acumulada y temperatura del agua.

- 1) Para los ensayos de inactivación natural se usan membranas de diálisis (14 kDa) las cuales requieren el siguiente pretratamiento:
 - Se cortaron las membranas de diálisis en fracciones de 20 cm.
 - Hervir las membranas durante 10 min en la solución o tampón de lavado.
 - Lavar con agua bidestilada estéril.
 - Hervir durante 10 minutos con la solución de EDTA.
 - Se dejaron enfriar (se pueden conservar a 4°C durante 1 mes).
- 2) Rellenar las membranas con alícuotas de agua residual diluida en una proporción ½, sellarlas.
- 3) Colocar las membranas llenas en una piscina artificial exterior (60 m³; agua no clorada) protegida con una jaula, a una profundidad de 10 cm.
- 4) Remover las alícuotas después de 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días.

Sedimentos

Para los experimentos de persistencia fueron evaluados tres escenarios: (a) sedimentos en el fondo del río, (b) en la orilla y (c) sedimentos secos. Cuantificar los siguientes parámetros ambientales: temperatura media y radiación solar acumulada diaria.

- 1) Para el mesocosmos A se usaron membranas de diálisis (14 kDa) pretratadas, a las cuales se rellena con 10 g de sedimento. Sellarlas.

- Colocarlas en una piscina artificial exterior (60 m³; agua no clorada) protegida con una jaula, a una profundidad de 100 cm.
- 2) Para el mesocosmos B, el sedimento se coloca en bandejas sobre papel filtro, el cual permanecerá húmedo por medio de la adición de agua destilada, la cual por capilaridad mantendrá húmedo al sedimento. Colocar las bandejas en el exterior, en las condiciones ambientales del mesocosmos A.
 - 3) Para el mesocosmos C, el sedimento se coloca en bandejas, las mismas que serán ubicadas en el exterior, en las condiciones ambientales del mesocosmos A y B.
 - 4) Tomar alícuotas compuestas después de 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 35 días.

5. Elaboración de estándares de qPCR

- 1) La purificación del plásmido a partir de un cultivo O/N de la bacteria con el plásmido de interés, por medio de un kit comercial *GenElute™ Plasmid Midiprep Kit (Sigma Aldrich)*, o *PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit (Life Technologies)*.
- 2) Para verificar la eficiencia de la extracción, cuantificamos la cantidad de plásmido por medio del espectrofotómetro NanoDrop, el rango usual de extracción se encuentra entre 200-2000 ng/μL y la pureza (ratio 260/280 nm) entre 1.4-1.8.
- 3) Adicionalmente, realizamos una PCR convencional utilizando como muestra al plásmido extraído y como control positivo a una cepa que contiene el gen de interés.
- 4) Si la amplificación es positiva, realizamos un banco de diluciones del plásmido a partir de agua bidestilada libre de nucleasas, la cual previamente fue irradiada en luz UV durante 30-60 minutos, en un rango entre -1 y -13 (recomendado), volumen final c/dilución: 900 μL.

- 5) Verificamos la eficiencia de la dilución por medio de la cuantificación de las diluciones -1 y -2, las cuales deberán ser equivalentes a la concentración inicial $\times 0.1$ y 0.01 respectivamente.
- 6) Se dispensa cada dilución en tres tubos de microcentrifuga, se rotulan y se obtienen tres series de diluciones y se conservan a -20°C .
- 7) Se cuantifica por medio de qPCR (VER ANEXO 4).
- 8) Los resultados se interpretan por medio del análisis cuantitativo y por el análisis de las gráficas.

a) Análisis cuantitativo.

En *PLATE LAYOUT* detalla el CT de cada pocillo en la tabla, los resultados pueden ser numéricos (0-40 ciclos) o indeterminados, cuya interpretación final será confirmada por medio del análisis de las gráficas.

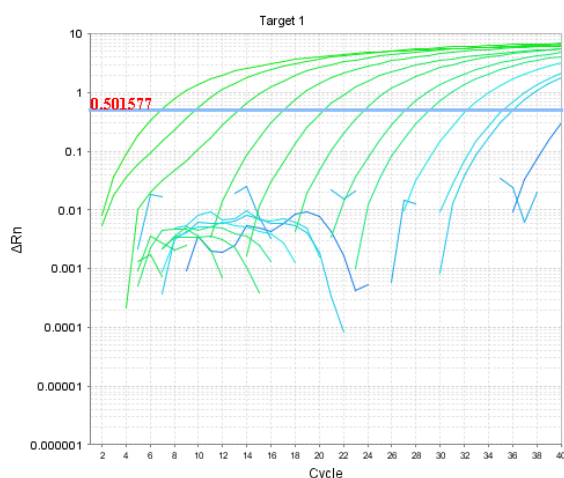
	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B								
C	S Targ... 22.2 Ct: 6.85	S Targ... 2.2 Ct: 9.71	S Targ... 0.22 Ct: 13.31	S Targ... 0.02 Ct: 16.98	S Targ... 0 Ct: 20.36	S Targ... 0 Ct: 23.69	S Targ... 0 Ct: 27.12	S Targ... 0 Ct: 29.08
D	S Targ... 0 Ct: 32.2	S Targ... 0 Ct: 35.21	S Targ... 0 Ct: 35.98	3 S Target 0 Ct: Undet	3 S Target 0 Ct: Undet			N Target Ct: Undet

ARG *sul1* dil. -1 (C1) a -13 (D5), Blanco (D8).

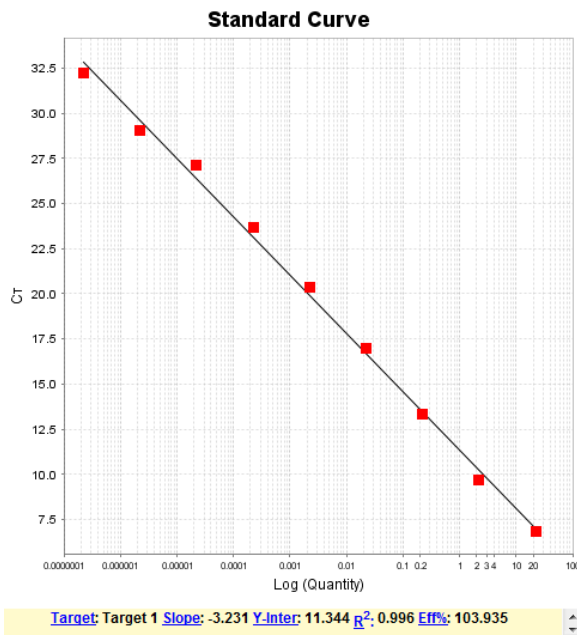
Diferencia entre C1 (-1) y C2 (-2) ≈ 3 CT

Los resultados del blanco (agua bidestilada libre de nucleasas) debe ser indeterminado o su valor estar por debajo del límite de cuantificación de cada gen ($C_t > 37$).

b) Análisis de las gráficas.



Amplification plot: Una amplificación normal se muestra como un incremento exponencial de la señal de fluorescencia (ΔR_n) en función del ciclo. El CT es la intersección entre la curva de amplificación y la línea de *threshold*.

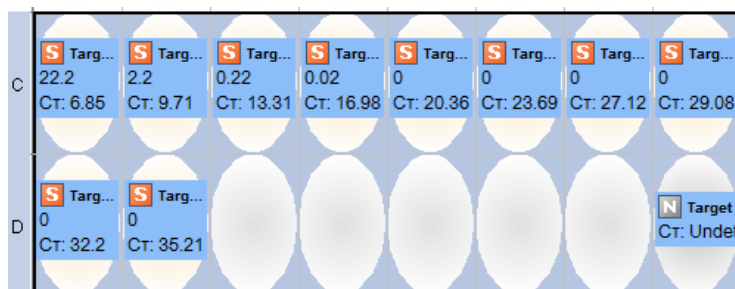


Standard curve: Es la representación logarítmica de la concentración del estándar frente a CT, mediante la evaluación de esta gráfica podemos evaluar el desempeño de la reacción de qPCR, establecer límites de cuantificación y verificar el estado de los plásmidos utilizados como estándares.

El coeficiente de correlación r^2 , evalúa el grado de relación de dos variables cuantitativas, su valor debe ser superior a >0.99 , el porcentaje de eficiencia $Eff\%$ es un valor que depende del ensayo, el desempeño de la master mix y la calidad de la muestra, generalmente, un valor entre 90 y 110% es considerado aceptable.

9) La ecuación y límite de cuantificación: Cuantificamos los estándares (diluciones -1 a -13) etiquetamos las celdas como estándares de acuerdo al nivel de concentración del plásmido. Detallaremos los pasos utilizando el ejemplo del gen *sul1* (222 ng/ μ L).

a) Análisis cuantitativo

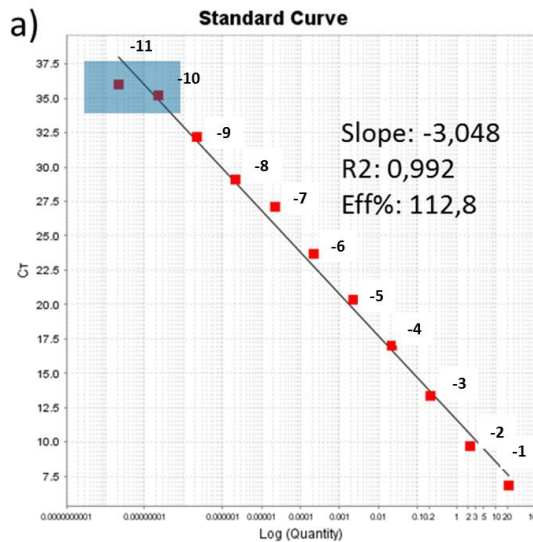


Las diferencias de Ct entre diluciones decimales es aproximadamente $\Delta Ct \approx 3.32$ y para las diluciones $\frac{1}{2}$ $\Delta Ct \approx 1$. De acuerdo a los resultados de amplificación, las diluciones -12 y -13 se encuentran por debajo

del límite de detección, el blanco no ha amplificado por lo que se descarta la contaminación de la reacción.

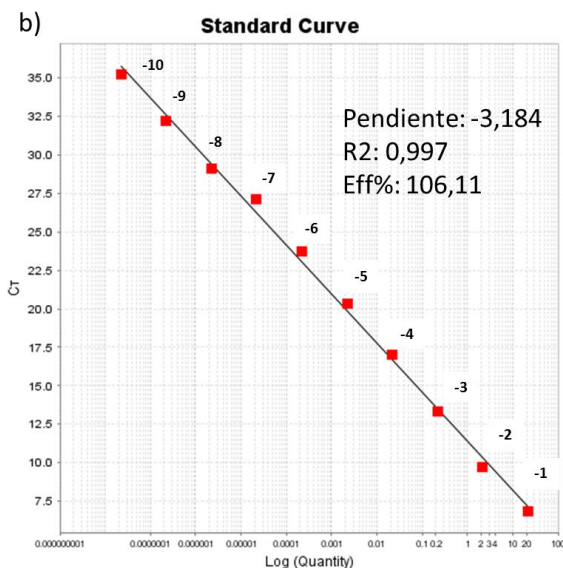
b) Análisis gráfico

Standard curve a) representa las diluciones -1 a -13 del gen *sul1*, las diluciones



-12 y -13 no se aprecian ya que su resultado fue indeterminado, nótese la tendencia lineal existente en las primeras diluciones, la misma que se pierde en la dilución -10 y -11 (zona sombreada), el coeficiente de correlación presenta un comportamiento lineal aceptable (0,992, correlación óptima = 1) sin embargo el porcentaje de eficiencia es del 112.8% (fuera de rango óptimo).

Volvemos a asignar la concentración del plásmido, descartando los pocillos correspondientes a las diluciones -11 (fuera tendencia lineal) y las -12 y -13 (indeterminado) y volvemos a calcular los resultados.



Target: Target 1 Slope: -3.184 Y-Inter: 11.407 r^2 : 0.997 Eff%: 106.11

Ahora, la *Standard curve b* presenta una pendiente más acusada (mayor sensibilidad a menores concentraciones), un coeficiente de correlación r^2 de 0.997 (mayor linealidad) y un porcentaje de eficiencia de 106% (dentro del rango óptimo).

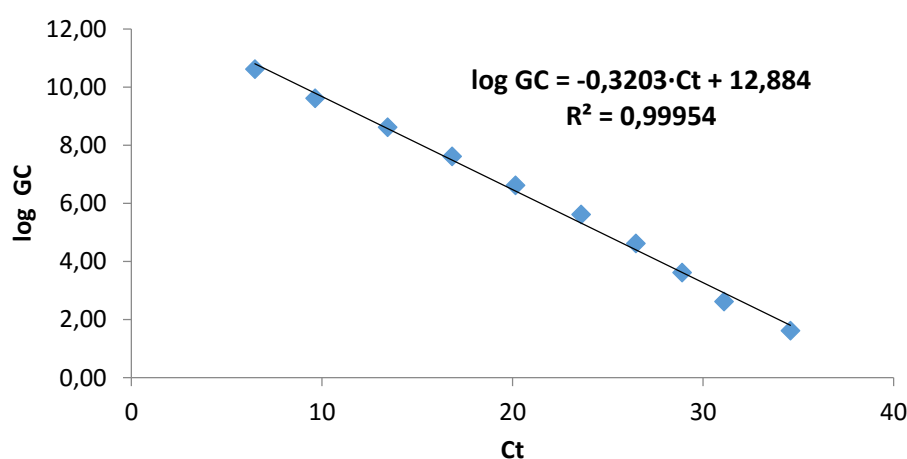
Con estos 10 puntos realizamos mínimo 5 réplicas de la cuantificación, alternando equipos de qPCR, días y analistas (si es posible), con la finalidad de verificar la repetibilidad y reproducibilidad del método y reducir las fuentes de error indeterminado y sistemático.

10) En una hoja de cálculo, colocamos los siguientes datos correspondientes a cada gen y al plásmido utilizado, en este caso trabajamos con el gen *sul1* y el plásmido R388.

				OBSERVACIONES
Tamaño del plásmido	Bp		33923	Sumatoria plásmido + inserto Concentración en nanodrop
Tamaño del inserto (<i>sul1</i>)	Bp		245	
Construcción total	Bp		34168	
Concentración del stock	ng/ μ L		222	
Masa 1 molécula plásmido	nanogr		3,74481E-08	
Nº copias en 1 μ L stock	nº copias/ μ L		5,93E+09	

	nº Copias/ μ L	V	nº copias en Real time	Log Nº copias	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Ct6x	Media CT
St	5,93E+09	9	5,34E+10	10,62	6,40	6,5	6,85	6,41	6,19	6,41	6,48
-1	5,93E+08	9	5,34E+09	9,62	9,7	9,71	9,71	9,3	9,78	9,3	9,64
-2	5,93E+07	9	5,34E+08	8,62	13,61	13,65	13,31	13,34	13,32	13,34	13,45
-3	5,93E+06	9	5,34E+07	7,62	16,98	16,98	16,98	16,65	16,56	16,65	16,83
-4	5,93E+05	9	5,34E+06	6,62	20,24	20,2	20,36	19,99	19,98	19,99	20,15
-5	5,93E+04	9	5,34E+05	5,62	23,62	23,49	23,69	23,52	23,68	23,52	23,60
-6	5,93E+03	9	5,34E+04	4,62	26,9	26,08	27,12	26,69	25,54	26,69	26,47
-7	5,93E+02	9	5,34E+03	3,62	28,77	29,38	29,08	28,35	27,7	28,35	28,90
-8	5,93E+01	9	5,34E+02	2,62	31,7	31,4	32,2	30,3	30,78	30,3	31,09
-9	5,93E+00	9	5,34E+01	1,62	34,8	34,5	35,21	33,96	34,6	33,96	34,59

11) Calculamos la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación por medio de las gráficas de dispersión. En el eje x colocamos a la media de los Ct y en el eje y al Log No. Copias.



Se mantiene un comportamiento lineal aceptable hasta 5.34 copias genómicas en Real Time. Por lo que se establece la ecuación $\log GC = -0,3203 \cdot Ct + 12,884$ y un límite de cuantificación de Ct 34.5.

ANEXO 4: REACCIONES DE PCR Y qPCR

1. Reacciones de PCR convencional

PCR (*Dream Taq Green PCR Master Mix. Fermentas*®)

Reactivo	Cantidad (μL)	Descripción
Dream Taq	12,5	ADN polimerasa DreamTaq, tampón DreamTaq Green optimizado MgCl ₂ y desoxinucleótidos (dNTP).
Primer 1	0,5	Concentración: 30 μM.
Primer 2	0,5	Concentración: 30 μM.
dd H ₂ O	9	Agua libre de nucleasas
Muestra	9	ADN bacteriano o fágico.

2. Reacción de qPCR

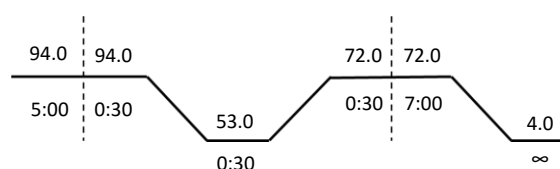
Reactivo	Cantidad (μL)	Descripción
Primer y sonda	1	Primer 1 y Primer 2: Conc. 18 μM. Sonda: Conc. 5 μM.
TaqMan®	10	<i>TaqMan Environmental Master Mix 2.0.</i>
Muestra	9	ADN bacteriano o fágico.

3. Condiciones de reacción de PCR y qPCR

Las reacciones de PCR fueron desarrolladas en 25 ciclos.

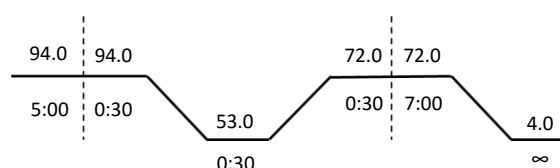
PCR *bla*_{CTX-M}

ctxC1 + ctxC2



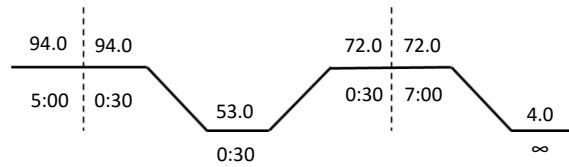
PCR *bla*_{CTX-M-9}

ctx-m-9up + ctx-m-9lp



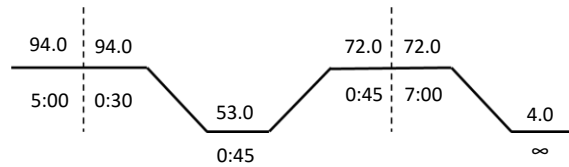
PCR *bla*_{CTX-M-15}

ctx-m-15up + ctx-m-15lp



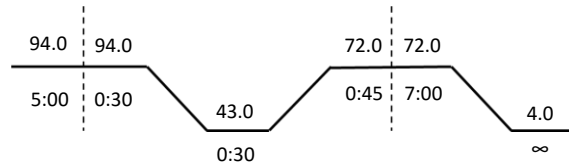
PCR *bla*_{TEM}

TEMup + TEMlp



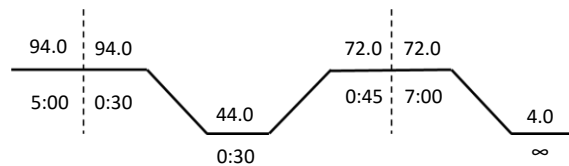
PCR *mecA*

mecAup + mecAlp



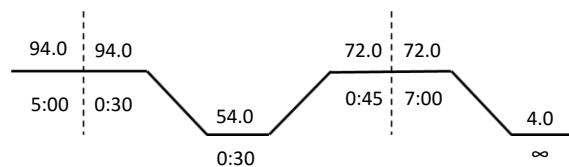
PCR pGEM

pGEMT7



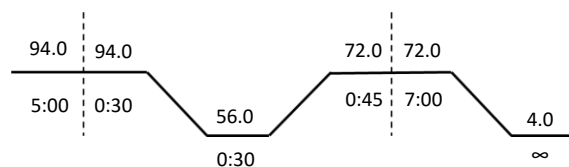
PCR *qnrA*

qnrAup + qnrAlp



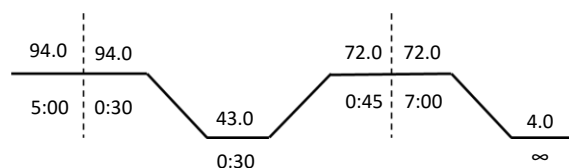
PCR *qnrS*

mecAup + mecAlp



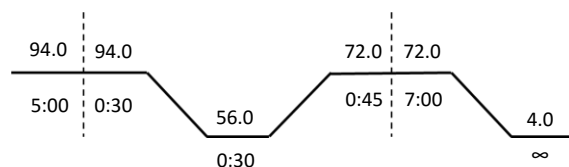
PCR *sul1*

sul1up +sul1lp

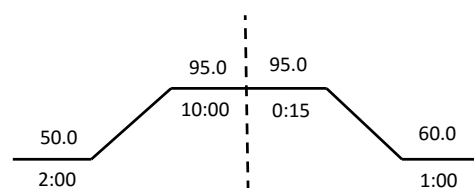


PCR16s rADN (35 ciclos)

sul1up +sul1lp



Real-Time qPCR



4. Oligonucleótidos usados en este estudio

GEN	PRIMER	SECUENCIA	AMPLÍMERO (PB)	REFERENCIA
<i>bla</i> _{TEM} PCR	UP	CTCACCCAGAAACGCTGGTG	569	(Colomer-Lluch et al, 2011a)
	LP	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA		
<i>bla</i> _{TEM} qPCR	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	85	(Lachmayr et al., 2009)
	LP	TGCATAATTCTCTTACTGTCATG		
	Sonda	6FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ		
<i>bla</i> _{CTX-M} PCR	UP	ATGTGCAGCACCAGTAAAGT	545	(Colomer-Lluch et al, 2011a)
	LP	ACCGCGATATCGTTGGTGG		
<i>bla</i> _{CTX-M-1} PCR	UP	ACGTTAAACACCGCCATTCC	356	(Colomer-Lluch et al, 2011a)
	LP	TCGGTGACGATTTTAGCCGC		
<i>bla</i> _{CTX-M-1} qPCR	UP	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	(Colomer-Lluch et al, 2011a)
	LP	ACATCGCGACGGCTTTCT		
	Sonda	6FAM – TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ		
<i>bla</i> _{CTX-M-9} PCR	UP	ACGCTGAATACCGCCATT	346	(Colomer-Lluch et al., 2011b)
	LP	CGATGATTCTCGCCGCTG		

<i>bla</i> _{CTX-M-9} qPCR	UP	ACCAATGATATTGCGGTGAT	85	(Colomer-Lluch et al., 2011b)
	LP	CTGCGTTCTGTTGCGGCT		
	Sonda	6FAM – TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ		
<i>mecA</i> PCR	UP	ATACTTAGTTCTTTAGCGAT	434	(Colomer-Lluch et al, 2011a)
	LP	GATAGCAGTTATATTTCTA		
<i>mecA</i> qPCR	UP	CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAA	92	(Volkman et al., 2004)
	LP	TGGTCTTTCTGCATTCCTGGA		
	Sonda	6FAM-AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTTCCACA-TAMRA		
<i>qnrA</i> PCR	UP	ACGCCAGGATTTGAGTGAC	565	(Lavilla et al., 2008)
	LP	CCAGGCACAGATCTTGAC		
<i>qnrA</i> qPCR	UP	AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC	138	(Colomer-Lluch et al., 2014)
	LP	TGAACTCTATGCCAAAGCAGTTG		
	Sonda	6FAM-TATGCCGATCTGCGCGA-MGBNFQ		
<i>qnrS</i> PCR	UP	AAGTGATCTCACCTTCACCGCTTG	425	(Colomer-Lluch et al., 2014)
	LP	TTAAGTCTGACTCTTTCAGTGATG		
<i>qnrS</i> qPCR	UP	CGACGTGCTAACTTGCGTGA	118	(Colomer-Lluch et al., 2014)
	LP	GGCATTGTTGGAAACTTGCA		
	Sonda	6FAM –AGTTCATTGAACAGGGTGA-MGBNFQ		
16S rDNA	27f	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1503	(Sander & Schmieger, 2001)

	1492r	TACGGCTACCTTGTTACGACTT		
<i>sul1</i> PCR	UP	TTCATGGGCAAAAGCTTGATG	964	(Modificado de Heuer & Smalla, 2007)
	LP	GGCCGGAAGGTGAATGCTA		
<i>sul1</i> qPCR	UP	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	67	(Modificado de Czekalski, Berthold, Caucci, Egli, & Bürgmann, 2012)
	LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT		
	Sonda	FAM-CGAGCCTTGCGGCGG-MGBNFQ		
pGEM	UP	TGTAATACGACTCACTAT		(Serra-Moreno, Jofre, & Muniesa, 2008)