

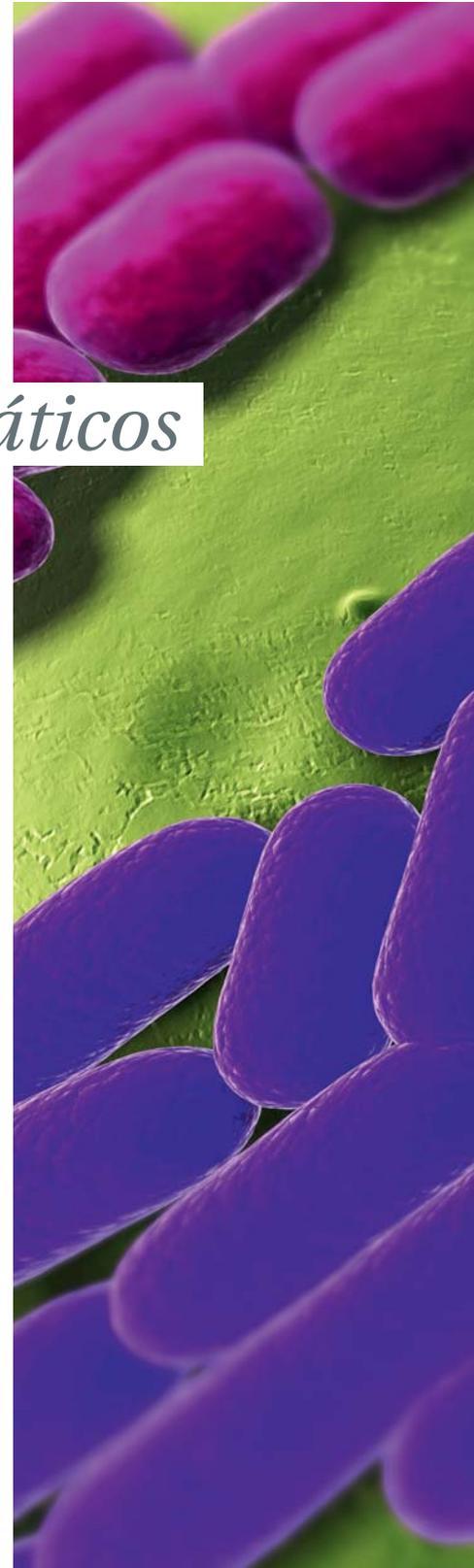
Estudio sobre su fortaleza en aguas residuales

# BACTERIAS

## *resistentes a antibióticos en medios acuáticos*

El incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos provoca numerosos problemas sanitarios, aumentando las tasas de morbilidad y mortalidad de la población. Los mecanismos para reducir este aumento de resistencias implican tanto el uso racional de los antibióticos como la eliminación de las bacterias resistentes, que se excretan a través de las aguas residuales. Los objetivos de este proyecto son: 1- Caracterizar la abundancia de bacterias fecales resistentes a antibióticos en medios acuáticos que reciben aguas residuales de una industria productora de antibióticos y de una depuradora de aguas residuales. 2- Estudiar la capacidad de las depuradoras de aguas residuales para eliminar o potenciar la resistencia a antibióticos. 3- Estudiar las tasas de variación de la resistencia a antibióticos a lo largo del río. El estudio demuestra que los vertidos de las depuradoras de aguas residuales tienen un efecto significativo sobre el aumento de bacterias resistentes. Los vertidos de las plantas de tratamiento de aguas residuales presentan mayores porcentajes de bacterias resistentes a antibióticos que las aguas de entrada. En este estudio no se hallaron diferencias significativas en el incremento de resistencias cuando se comparan sistemas convencionales (fangos activados) con sistemas de bajo coste (humedales construidos). Las diferencias en el diseño de los humedales tampoco supusieron una diferencia significativa en la variación de bacterias resistentes presentes en sus efluentes.

Por **ELOY BÉCARES MANTECÓN, JAVIER MARTÍN VILLACORTA, MARÍA HIJOSA VALSERO, RICARDO SIDRACH-CARDONA MARTÍNEZ**. Área de Ecología, Facultad de CC Biológicas y Ambientales, Universidad de León, 24071 León.





### INTRODUCCIÓN

#### La resistencia a antibióticos como estrategia adaptativa de las bacterias

La resistencia a antibióticos es uno de los aspectos de creciente interés en la salud humana. El rápido y constatado aumento de infecciones causadas por bacterias patógenas resistentes a antibióticos está produciendo una «carrera de armamento», evolutivamente hablando (Van Valen 1973), en la que el desarrollo de nuevas armas por el hombre (antibióticos) se encuentra por detrás de la capacidad de los microorganismos para evitar su efecto (aumento de resistencias).

La causa de la resistencia a antibióticos es natural, es decir, las propias bacterias han desarrollado mecanismos para inactivar las sustancias antibióticas producidas como elemento de defensa o estrategia competitiva con otros microorganismos (Martínez, 2009). Pero esta resistencia, o estrategia adaptativa de las bacterias, está potenciada por la actividad humana con el uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades humanas y animales. En este caso, el mecanismo selectivo impuesto por el hombre al aumentar la probabilidad de contacto de los antibióticos con las bacterias ha provocado una rápida selección de las poblaciones bacterianas, favoreciendo aquellas resistentes (Alonso *et al.*, 2001). Aunque la resistencia a antibióticos puede aparecer en ausencia de antibiótico por mutación genética (Henriques *et al.*, 2006), ha sido el uso excesivo de antibióticos lo que ha provocado un incremento alarmante de resistencias que incluso ha llevado a adoptar medidas legales restringiendo su libre adquisición (Kümmerer, 2004).

Este uso de antibióticos y el conse-

cuente incremento de bacterias resistentes conllevan un aumento en la exposición al medio ambiente, tanto de bacterias resistentes como de antibióticos, a través fundamentalmente de las aguas residuales. La emisión de bacterias al medio acuático favorece también el intercambio genético con poblaciones previamente no resistentes, lo que aumenta la dispersión de esta capacidad resistente en las bacterias del medio ambiente (Davison 1999).

#### Supervivencia de las bacterias resistentes a antibióticos en medios acuáticos

Las bacterias resistentes llegan a los ríos a través de las aguas residuales. Uno de los aspectos de interés es conocer la capacidad de estas bacterias para sobrevivir en condiciones naturales así como para intercambiar material genético en dichos ambientes. Aunque la mortalidad natural de las bacterias patógenas o sus indicadores es muy elevada en los medios extraenterales, su gran abundancia (valores de  $10^5$ - $10^{10}$  UFC/ml en aguas residuales) (McFeters *et al.*, 1990) y las condiciones ambientales (turbidez, temperatura, etc.) pueden mantener viables a estas poblaciones durante mucho tiempo (Davies-Colley *et al.*, 1999).

En el presente trabajo se pretende estudiar la viabilidad de estas bacterias resistentes a antibióticos a lo largo de un río que recibe dos vertidos de diferente naturaleza. Por un lado, el vertido de las aguas residuales domésticas ya tratadas, y por otro, el vertido de las aguas residuales de una industria productora de

penicilinas y cefalosporinas. El objetivo será conocer las tasas a las que los principales grupos de bacterias fecales (coliformes totales, *E. coli*, enterobacterias y clostridios sulfito reductores) desaparecen con la distancia, y comparar si esta tasa de desaparición es paralela a la tasa de desaparición de la resistencia a antibióticos en las bacterias supervivientes. A través de pruebas cruzadas con diferentes antibióticos se estudiará además la variación en la multiresistencia, una prueba de la existencia de intercambio genético dentro de las mismas poblaciones de bacterias fecales del río, tanto las suspendidas en el agua como las retenidas en los sedimentos. Los estudios de resistencias irán acompañados del análisis químico de los antibióticos potencialmente presentes, tanto en las aguas residuales brutas como en el río.

#### Eliminación de bacterias resistentes a antibióticos. Papel de las depuradoras de aguas residuales

Uno de los métodos para destruir bacterias patógenas, o sus grupos indicadores, de las aguas residuales es su tratamiento en plantas depuradoras. Las depuradoras presentan condiciones hostiles para la supervivencia de dichas bacterias debido a su temperatura ambiente, las condiciones físico-químicas de los reactores y la gran abundancia de depredadores (organismos bacterívoros y virus). En general, las depuradoras reducen en 1-3 logaritmos la abundancia de bacterias del agua de entrada (Hirata *et al.*, 2003). Sin embargo, esta reducción en la

EL ESTUDIO COMPARA LOS DISEÑOS MÁS UTILIZADOS DE HUMEDALES CONSTRUIDOS PARA ESTUDIAR SI ALGUNO DE ELLOS PUEDE AFECTAR A LA ELIMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

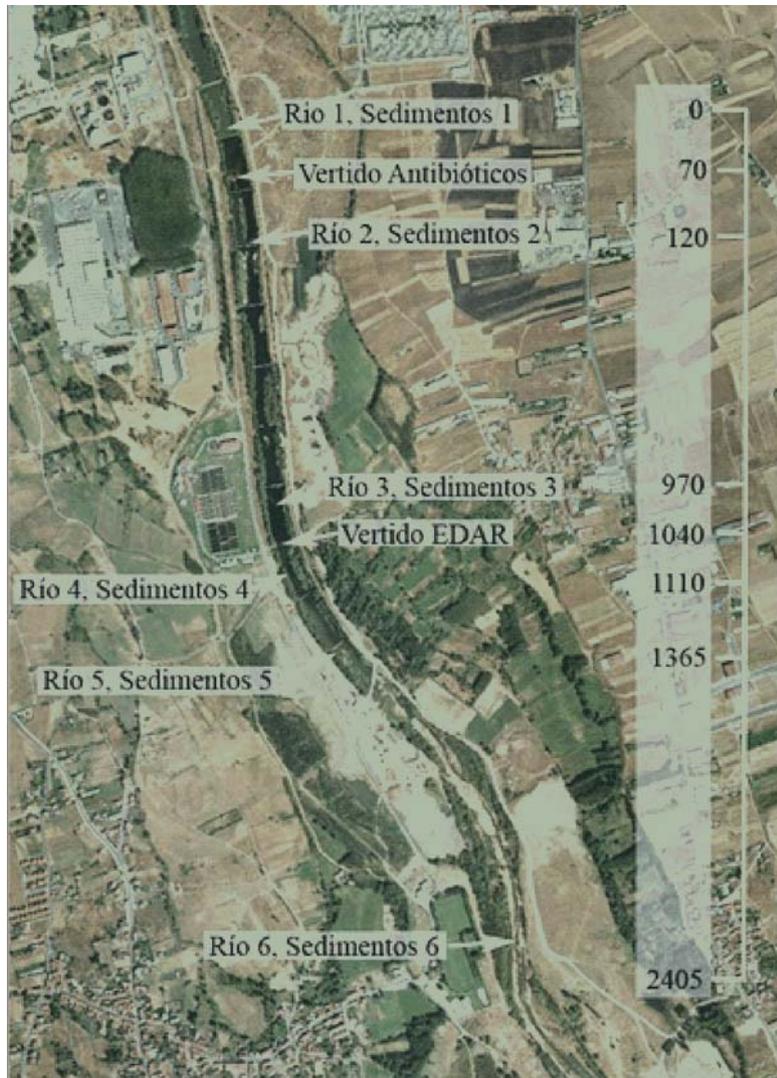


Figura 1. Distribución de los puntos de muestreo en el río (distancias acumuladas en metros).

abundancia de bacterias no va acompañada de una reducción de bacterias resistentes, sino al contrario. Las depuradoras convencionales de tratamiento de aguas residuales (fangos activados) tienden a aumentar el porcentaje de bacterias resistentes en su efluente como consecuencia de la gran abundancia de bacterias en el reactor biológico y del tiempo de contacto entre ellas, lo que incrementa las tasas de intercambio genético (conjugación, transformación y transducción), y por tanto, el porcentaje de bac-

terias resistentes a antibióticos (Da Costa *et al.*, 2006).

Debido a su excesivo coste, los sistemas de fangos activados son sustituidos en zonas rurales por sistemas de bajo coste como filtros percoladores o sistemas extensivos, como lagunajes o humedales construidos.

Otro de los objetivos del estudio es comparar los sistemas convencionales de fangos activados con sistemas de bajo coste como los humedales construidos. Ambos sistemas se diferencian en

los tiempos de retención celular, densidad de bacterias dentro de los reactores y exposición a condiciones ambientales (Ferrer *et al.*, 2007).

En este estudio se pretende estudiar si los sistemas «naturales» de tratamiento de aguas residuales tienen la misma capacidad de incrementar las tasas de resistencia que los sistemas convencionales, y cuál es el papel de los diferentes elementos de diseño (tipo de planta utilizada, flujo hidráulico empleado) sobre dicho aspecto. Está demostrado que los sistemas naturales son más eficaces que los convencionales en la eliminación de bacterias indicadoras de contaminación fecal y patógenas (García y Bécares, 1997), pero no existen evidencias que cuantifiquen la capacidad para intercambiar genes resistentes a antibióticos dentro de dichos procesos.

Por otro lado, aunque la capacidad de los procesos convencionales para la eliminación de compuestos farmacéuticos como los antibióticos es ya bastante conocida (ej., Hijosa-Valsero *et al.*, en prensa), las evidencias sobre el papel de los sistemas de bajo coste para eliminar antibióticos son aún inéditas.

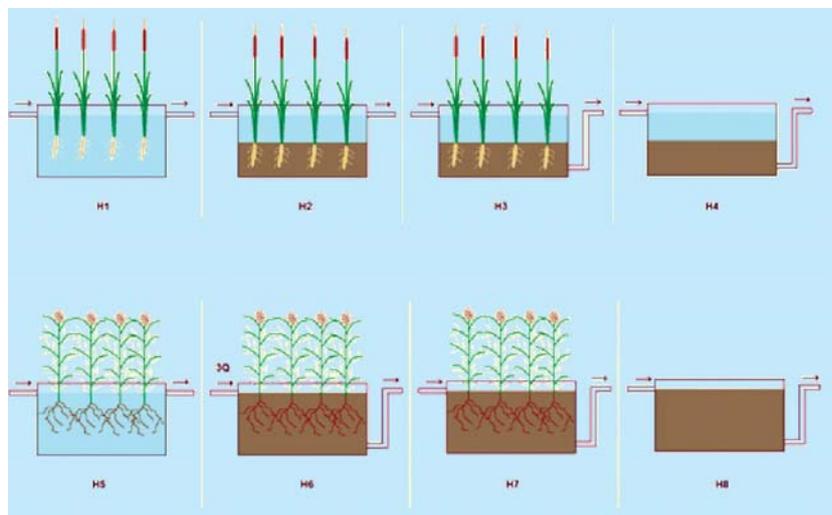
## MATERIAL Y MÉTODOS

### Toma de muestras de agua y sedimentos del río Bernesga

La zona de estudio estuvo situada al sur de la ciudad de León, en las inmediaciones del río Bernesga, zona en la que se encuentra la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de León y su alfoz, y el vertido de una industria productora de antibióticos (AB) dedicada a la elaboración de cefalosporinas y penicilinas, que en la actualidad también cuenta con su propia estación depuradora de aguas residuales.

En el río se fijó un punto de muestreo antes y después de cada vertido (AB y EDAR) (fig. 1), y dos puntos aguas abajo del último vertido, a diferente distancia, en los que se tomaron muestras tanto de agua como de sedimento, y en los que se midieron los diferentes parámetros físico-químicos. También se tomaron muestras y se hicieron mediciones de los dos vertidos.

Las muestras de agua y sedimentos se tomaron los días 24, 30 y 31 de agosto de 2010 (n=3), entre las 9.00 y las 13.00 horas. No se registraron lluvias durante la campaña de toma de muestras ni durante las dos semanas anteriores. Las localidades de muestreo se señalan en la figura 1. En las localidades Río 1 (punto 1), Río 2 (punto 2), Río 3 (punto 3), Río 4 (punto 4), Río 5 (punto 5) y Río 6 (punto 6) se recogieron muestras a lo largo de un transecto que cruzaba el río de orilla a orilla. En el caso de las muestras de agua, se cogían 1.000 ml en cada punto del transecto. En el caso de las muestras de sedimento, se utilizó un cilindro de metacrilato de 9 cm de diámetro y 50 cm de longitud para extraer el material. Después, todas las muestras correspondientes a la misma localidad se mezclaban para



**Figura 3.** Esquema de los tanques experimentales simulando diferentes diseños de humedales construidos.

conseguir una muestra integrada, tanto de agua como de sedimento.

Las medidas de temperatura, pH, oxígeno disuelto, potencial redox y conductividad se realizaron *in situ* mediante el empleo de sondas de electrodos (WTW, Weilheim, Alemania).

### Muestreo de las variables microbiológicas

Tanto las muestras de agua como las de sedimentos fueron procesadas en el mismo día que fueron tomadas para su análisis microbiológico. Se analizaron indicadores fecales, esto es, *E. coli*, coliformes totales (CT), *Enterococcus* y clostridios sulfitorreductores. Los medios de cultivo utilizados fueron: *Chomocult coliform agar* (Merck 1.10426.0500) para *E. coli* y CT, un medio cromogénico selectivo que discrimina en la misma placa esos dos grupos según el color de la colonia; para *Enterococcus* se usó agar SB (*Membrane-filter enterococcus selective agar acc. to Slanetz and Barley*, Merck 1.05262.0500), y para clostridios, sulfitorreductores agar SPS (*Agar selectivo para perfringens según ANGELOTTI*, Merck 1.10235.0500).

### Análisis de la resistencia a antibióticos

El estudio de la resistencia a antibióticos se llevó a cabo mediante dos métodos diferentes: dilución en placa y difusión en agar.

#### Dilución en placa

Mediante este método se analizaron las resistencias de cada grupo bacteriano (excepto clostridios) a dos antibióticos, amoxicilina (A) y cefalexina (C). El número de colonias que crecen en las placas con antibiótico se comparan con las placas control de medio sin antibiótico con el fin de conocer el porcentaje de bacterias resistentes. En el caso de los humedales construidos solo se probó la resistencia a amoxicilina, pero se aplicaron dos concentraciones diferentes al medio, 5 y 50 µg/ml (CT y *E. coli*) o 1 y 10 µg/ml (*Enterococcus*).

#### Difusión en agar (antibiograma)

Los discos antibióticos utilizados fueron: dos β-lactámidos (penicilina, 10U y ampicilina, 10µg), dos tetraciclinas (doxiciclina, 30µg y tetraciclina, 30µg), dos macrólidos (eritromicina, 15µg y azitro-



**Figura 2.** Toma de muestras. Core de sedimento.

micina, 15µg) y un aminoglicosido (streptomocina, 10µg), (BBL *Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Discs*, BD).

Las colonias que mostraban un comportamiento «resistente» o «intermedio» fueron clasificadas como resistentes; de otro modo, como «sensibles» (Constanzo, 2005).

### Eliminación de bacterias en sistemas naturales de tratamiento (humedales construidos)

Además de los muestreos realizados a lo largo del río, se tomaron muestras de la planta depuradora de macrófitos acuáticos (humedales construidos) situada en las instalaciones de la EDAR de León y consistente en 8 tanques de 1 m<sup>2</sup> cada uno con diferente tipo de planta y diseño (figuras 3 y 4). Cada tanque simula un sistema y condición diferente de diseño, tal como se indica a continuación:

- H1 y H5: cultivos hidropónicos de espadaña (*Typha angustifolia*) y carrizo

(*Phragmites australis*), respectivamente.

- H2: Sistema de lámina de agua libre con flujo superficial (FWS) plantado con espadaña.
- H3: Sistema de lámina de agua libre con flujo subsuperficial (FWSSF) plantado con espadaña.
- H4: Sistema de lámina de agua libre con flujo superficial, sin plantar (control del H3).
- H6: Sistema de flujo subsuperficial (SSF) plantado con carrizo y con triple carga que el resto de sistemas.
- H7: Sistema de flujo subsuperficial (SSF) plantado con carrizo.
- H8: Sistema de flujo subsuperficial sin plantar (control del H7).

El objetivo del estudio es comparar los diseños más utilizados de humedales construidos con el fin de estudiar si alguno de ellos puede afectar a la eliminación de antibióticos, o a la generación de bacterias resistentes a antibióticos, y comparar ambos aspectos con un sistema convencional de tratamiento como el de los fangos activados.



Figura 4. Vista del sistema experimental de humedales construidos en verano.

## RESULTADOS

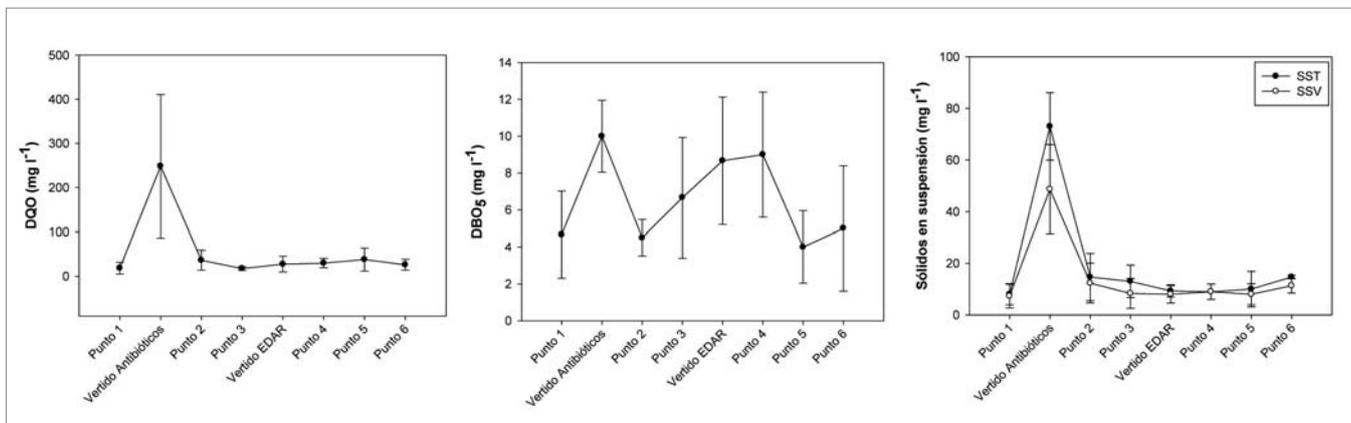
### Variables convencionales de calidad de las aguas

Los valores de DQO, DBO<sub>5</sub>, SST y SSV medidos en las muestras acuosas se indican en la figura 5. Los valores de estos parámetros son constantes y similares en todas las localidades, con la excepción del vertido Antibióticos. Este vertido se caracteriza por presentar valores relativamente altos de DQO, SST y SSV (regulados por la Resolución de 20 de abril de 2009 de Castilla y León). A pesar de ello, la descarga de estas aguas residuales no hizo incrementar de manera notable las concentraciones de DQO, SST y SSV en el río (punto 2, figura 5). Esto se debe, en gran medida, al efecto de dilución que se produce, dado que el caudal del río en el punto 1 (1,24-1,79 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>) es muy superior al caudal del vertido Antibióticos (0,09 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>). Por otra parte, el vertido de la EDAR de León es un vertido con una carga muy baja de DQO, DBO<sub>5</sub> y sólidos en suspensión, ya que se trata del agua de salida de una EDAR que debe cumplir los requisitos de la Directiva 91/271/CE; y por ello, a pesar de su gran caudal (1,24 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>), no afecta de forma excesiva al cauce del río, al menos en lo concerniente a estos contaminantes (es decir, no se observa un gran aumento en las concentraciones del punto 4 con respecto al punto 3; véase la figura 5).

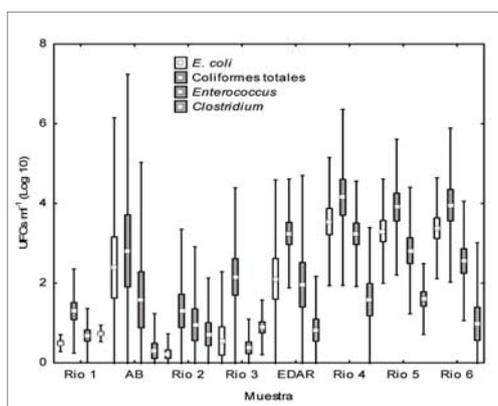
### Comunidades bacterianas del río y resistencia a antibióticos

#### Caracterización de la comunidad bacteriana

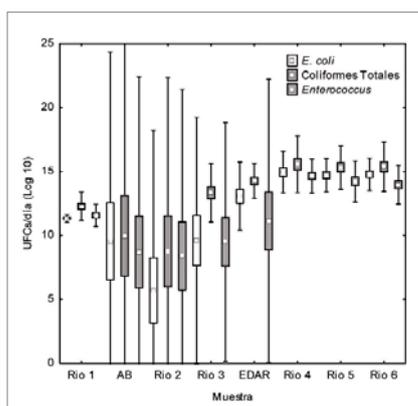
Tras la realización de los conteos de bacterias en las placas sin antibiótico (controles), se puede observar cómo tanto la depuradora de antibióticos como



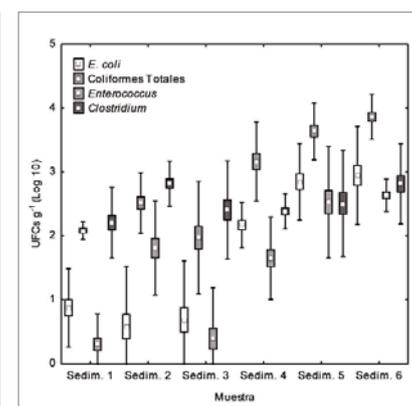
**Figura 5.** Concentraciones medias de los parámetros convencionales de calidad de las aguas (DQO, DBO<sub>5</sub>, SST y SSV) en el río Bernesga. Las barras de error indican el intervalo de confianza del 95%.



**Figura 6.** Log 10 de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro en cada punto de muestreo del río.



**Figura 7.** Carga bacteriana (UFCs/día) en cada punto de muestreo.



**Figura 8.** Log 10 de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro en cada punto de muestreo de los sedimentos.

la EDAR de León aportan bacterias al medio receptor, siendo la cantidad de bacterias de todos los grupos mucho mayor (de dos a tres logaritmos de diferencia) a partir del vertido de la EDAR (puntos Río 4, Río 5 y Río 6) (figura 6).

Estas diferencias se ven más claramente si la abundancia de bacterias se expresa en relación con el caudal del río y los vertidos (cargas de bacterias). Los caudales se midieron en el punto 1 (1,2 m<sup>3</sup> seg<sup>-1</sup>) y en el punto 6 (3 m<sup>3</sup> seg<sup>-1</sup>), los vertidos de AB y la EDAR son conocidos (0,09 y 1,2 m<sup>3</sup> seg<sup>-1</sup> respectivamente), y el resto de puntos del río puede ser calculado (pun-

tos 2 y 3: 1,8 m<sup>3</sup> seg<sup>-1</sup>. Puntos 4 y 5: 3 m<sup>3</sup> seg<sup>-1</sup>). De esta forma, se puede observar cómo el número de bacterias que pasan por cada punto del río es mayor a partir de los vertidos en casi 3 logaritmos de media (figura 7).

En el caso de los sedimentos también se observa un incremento sustancial en el número total de bacterias existentes de todos los grupos según se avanza a lo

largo del río y se van incorporando los vertidos (figura 8).

■ *Estudio de resistencias por dilución en placa*

Las muestras de agua recogidas durante el periodo de muestreo presentan un patrón de resistencia a los antibióticos dispar. En el caso de la cefalexina, el grupo bacteriano que presenta mayor

**TANTO LA DEPURADORA DE ANTIBIÓTICOS COMO LA EDAR DE LEÓN APORTAN BACTERIAS AL MEDIO RECEPTOR, SIENDO MUCHO MAYOR A PARTIR DEL VERTIDO DE ESTA**

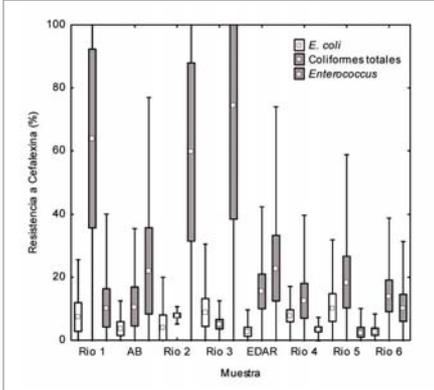


Figura 9. Porcentajes de resistencia a cefalexina en las muestras de agua del río.

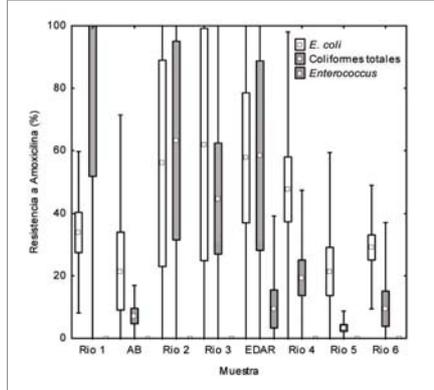


Figura 10. Porcentajes de resistencia a amoxicilina en las muestras de agua del río.

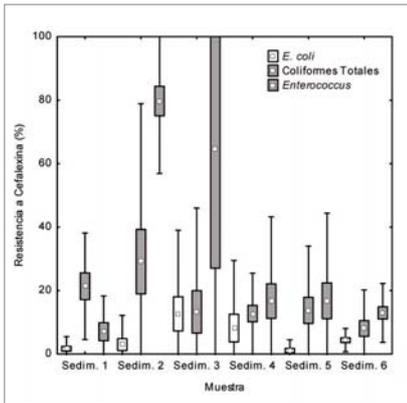


Figura 11. Porcentajes de resistencia a cefalexina en las muestras de sedimento del río.

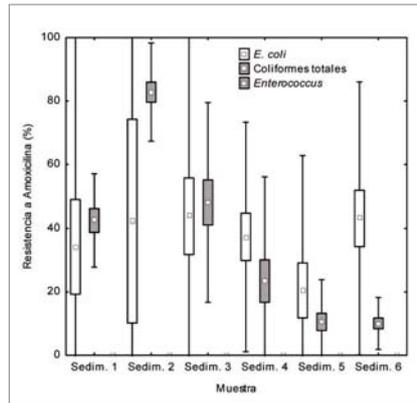


Figura 12. Porcentajes de resistencia a amoxicilina en las muestras de sedimento del río.

porcentaje de resistencia es el de los coliformes totales, alcanzando en determinadas muestras valores de hasta el 100% después del vertido de antibióticos, aunque estos porcentajes van disminuyendo a lo largo del río (figura 9), al contrario de lo que pasaba con el número total de bacterias. En el caso de la amoxicilina, tanto los coliformes totales como *E. coli* muestran porcentajes de resistencia bastante elevados, decayendo también según se avanza en el curso del río. No se encontraron *Enterococcus* resistentes salvo en el vertido de la EDAR (figura 10).

En el caso de los sedimentos los patrones son similares a los del agua: para cefalexina, las mayores resistencias se producen tras el vertido de antibióticos, disminuyendo a lo largo del curso del río, y el grupo bacteriano que mayor porcentaje de resistencias presenta es el de coliformes totales (figura 11), mientras que para la amoxicilina, tanto coliformes totales como *E. coli* presentan elevada resistencia, disminuyendo en general a lo largo del curso del río. Tampoco se encontraron *Enterococcus* resistentes a amoxicilina en los sedimentos (figura 12).

■ **Estudio de resistencias múltiples mediante antibiogramas**

De los 14 puntos de muestreo realizados entre el río, los sedimentos y los vertidos, un total de 289 colonias de *E. coli* fueron aisladas y se analizaron sus patrones de resistencia a antibióticos. La tabla 1 muestra los patrones de resistencia obtenidos para las muestras de agua del río, así como de los vertidos de antibióticos y de la EDAR de León. En la tabla 2 se muestran los resultados de los sedimentos. Se puede observar cómo tanto la eritromicina como la penicilina tienen tasas de resistencia del 100% en todos los puntos, mientras que en el caso de la azitromicina el porcentaje de bacterias resistentes no supera el 35% en ningún punto. También se puede apreciar cómo el porcentaje de resistentes disminuye justo después del vertido de antibióticos (punto Río 2), para luego aumentar y mantenerse a lo largo del río. En el caso de los sedimentos las resistencias se mantienen bastante similares a lo largo del río.

■ **Patrones de multirresistencia**

En la figura 13 se puede ver la distribución de estos porcentajes en los puntos del río y de los vertidos. Se observa que en todos los puntos el 100% de las bacterias son resistentes a 2 o más antibióticos, mientras que más del 80% presentan resistencia a 3 o más antibióticos. También se puede apreciar cómo a partir del punto 3 disminuye drásticamente el porcentaje de resistentes a 3 antibióticos, dejando paso a multirresistentes con más de 4 resistencias.

En la figura 14 se reflejan los mismos datos para el caso de los sedimentos, siendo el patrón similar: en el punto 2 prevalecen en este caso los multirresistentes con 4 resistencias, para luego descender su número, aumentando el de resistentes a 5 o más antibióticos.

**Tabla 1.** Patrones de resistencia de las colonias aisladas de *E. coli* en el río y los vertidos.

Antibiótico	Concentración (µg)	Colonias de <i>E. coli</i> resistentes en cada punto de muestreo (%)							
		Río 1 (n=20)	AB (n=5)	Río 2 (n=6)	Río 3 (n=19)	EDAR (n=22)	Río 4 (n=29)	Río 5 (n=29)	Río 6 (n=29)
Ampicilina	10	75,0	40,0	83,3	94,7	81,8	82,8	75,9	65,5
Doxiciclina	30	25,0	20,0	0,0	52,6	61,9	58,6	69,0	55,2
Tetraciclina	30	35,0	20,0	16,7	63,2	59,1	75,9	58,6	65,5
Streptomina	10	40,0	100,0	0,0	63,2	52,4	65,5	55,2	34,5
Eritromicina	15	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Azitromicina	15	11,8	0,0	16,7	31,6	9,1	17,2	17,2	20,7
Penicilina	10 (U)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

**Tabla 2.** Patrones de resistencia de las colonias aisladas de *E. coli* en los sedimentos.

Antibiótico	Concentración (µg)	Colonias de <i>E. coli</i> resistentes en cada punto de muestreo (%)					
		Sedimentos 1 (n=25)	Sedimentos 2 (n=7)	Sedimentos 3 (n=15)	Sedimentos 4 (n=27)	Sedimentos 5 (n=27)	Sedimentos 6 (n=29)
Ampicilina	10	100,0	100,0	100,0	81,5	44,4	82,8
Doxiciclina	30	80,0	100,0	46,7	66,7	55,6	55,2
Tetraciclina	30	92,0	57,1	66,7	70,4	51,9	48,3
Streptomina	10	40,0	28,6	46,7	51,9	40,7	34,5
Eritromicina	15	96,0	85,7	100,0	100,0	100,0	100,0
Azitromicina	15	16,0	0,0	7,1	33,3	14,8	3,4
Penicilina	10 (U)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Estos datos hacen pensar que las resistencias cruzadas están ampliamente desarrolladas en el ecosistema, puesto que todas las colonias aisladas fueron resistentes al menos a 2 antibióticos, y muchas de ellas a más de 3 y más de 4, encontrándose también un número significativo de colonias resistentes a todos los antibióticos probados.

### Eliminación de bacterias resistentes a antibióticos en humedales construidos

#### Caracterización de la comunidad bacteriana

En los efluentes de los humedales construidos se puede observar la dominancia de los CT como principal grupo bacteriano, seguido de *E. coli*, siendo los *Enterococcus* el grupo menos abundante (figura 15). En cuanto a la eliminación

del número total de bacterias, todos los humedales, así como la EDAR, presentan diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ) respecto del influente (Infl.) para todos los grupos bacterianos. Asimismo, los humedales 3, 4, 7 y 8 eliminan significativamente mejor (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ) que la EDAR todos los grupos bacterianos, siendo el H7 la configuración que mejor rendimiento de eliminación presenta.

#### Análisis de las resistencias a antibióticos en los humedales construidos

Al realizar los análisis de resistencias de los efluentes de los humedales se comprueba que no presentan tasas de resistencia significativamente diferentes (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ) del efluente de la EDAR ni del influente. Los coliformes totales (figura 16) presentan tasas de resistencia muy altas, con valores medios en torno

al 100%, y en algunos casos (H7) incluso se observan mayores crecimientos en la placa con antibiótico que en la control. También se advierte cómo un aumento en la concentración de antibiótico se traduce en un menor porcentaje de resistentes. En el caso de *E. coli* (figura 17) se observan patrones similares entre los diferentes sistemas, pero con tasas de resistencia algo menores, alrededor del 50%. En general, también se observa una disminución del porcentaje de resistencias con el aumento de la concentración de antibiótico, pero menor que en el caso de los CT. En los *Enterococcus* (figura 18) se puede apreciar una sensibilidad mucho mayor al antibiótico, siendo los porcentajes máximos menores del 10%.

Aunque la mortalidad de las bacterias patógenas o sus indicadores es muy elevada en medios extraenterales, su gran abundancia (McFeters *et al.*, 1990) y determinadas condiciones ambientales pue-

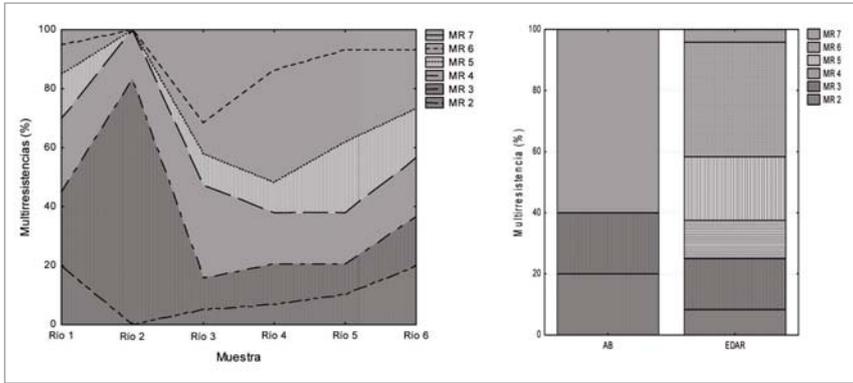


Figura 13. Distribución de los porcentajes de multirresistencia de los puntos muestreados en el río (izquierda) y de los vertidos (derecha).

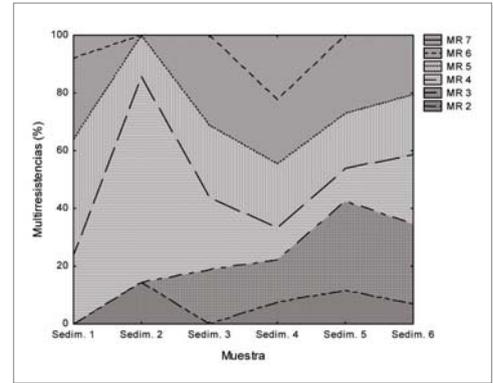


Figura 14. Distribución de los porcentajes de multirresistencia de los puntos muestreados en el sedimento.

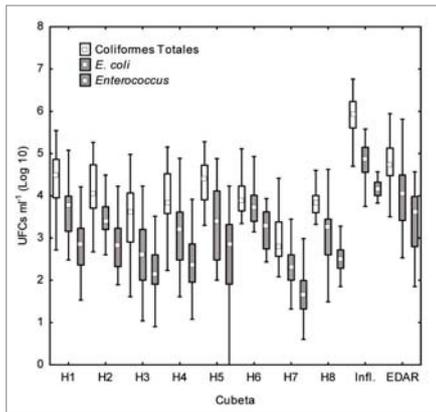


Figura 15. Log 10 de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro en los efluentes de los humedales construidos (H#), el efluente de la EDAR (EDAR) y el influente de ambos (Infl.).

den mantenerlas viables durante mucho tiempo (Davies-Colley *et al.*, 1999). Este hecho es especialmente relevante en los sedimentos, que actúan como reservorio de bacterias (Fernandes y Watanabe, 2008; Alm *et al.*, 2003; Howel *et al.*, 1995) debido a la disponibilidad de nutrientes (Davies *et al.*, 1995), a la protección adicional que éstos proporcionan frente a la luz (Davies-Colley *et al.*, 1999) y a la deprecación de los protozoos (Davies y Bavor, 2000). Diversos autores han encontrado una elevada correlación entre la densidad bacteriana en los sedimentos y el agua de diferentes medios (playas y orillas de agua dulce) (Fernandes y Watanabe, 2008;

Alm *et al.*, 2003; Junco *et al.*, 2005), lo que indica la existencia de un flujo continuo de microorganismos entre los dos medios, y por tanto, de su material genético (incluyendo los genes de resistencia). Todos estos factores pueden estar influyendo en el hecho de la elevada resistencia en los sedimentos de los puntos 2 y 3, que van disminuyendo a lo largo del río.

En general, las depuradoras reducen entre 1 y 3 logaritmos la abundancia de bacterias del agua de entrada (Hirata *et al.*, 2003; Reinthaler *et al.*, 2003). Sin embargo, esta reducción no tiene por qué ir acompañada de una reducción en el número de bacterias resistentes, sino al con-

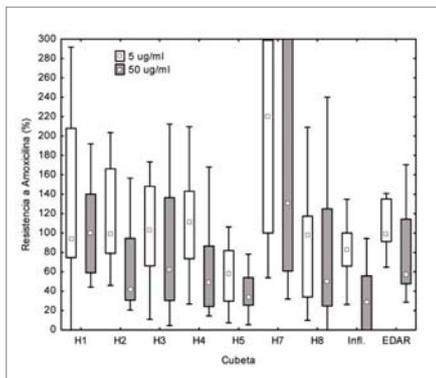


Figura 16. Porcentajes de coliformes totales resistentes a amoxicilina en los efluentes de los humedales construidos (H#), el efluente de la EDAR (EDAR) y el influente de ambos (Infl.).

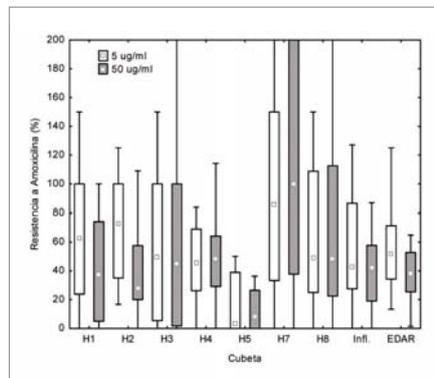


Figura 17. Porcentajes de *E. coli* resistentes a amoxicilina en los efluentes de los humedales construidos (H#), el efluente de la EDAR (EDAR) y el influente de ambos (Infl.).

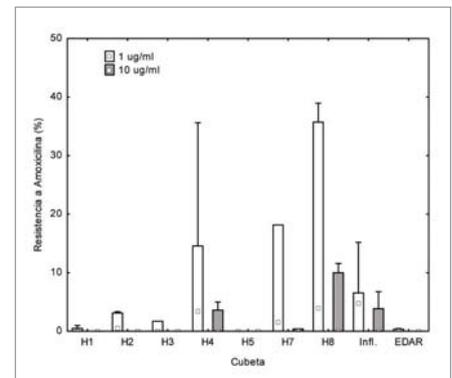


Figura 18. Porcentajes de *Enterococcus* resistentes a amoxicilina en los efluentes de los humedales construidos (H#), el efluente de la EDAR (EDAR) y el influente de ambos (Infl.).

### EN LOS EFLUENTES DE LOS HUMEDALES CONSTRUIDOS DOMINAN LOS COLIFORMES TOTALES COMO PRINCIPAL GRUPO BACTERIANO, SEGUIDOS DE *E. COLI* Y *ENTEROCOCCUS*

trario, y por tanto aumentando el porcentaje de bacterias resistentes (Da Costa *et al.*, 2006). Las bacterias cuantificadas en este estudio son indicadores fecales, y por tanto, de fácil detección en efluentes de depuradoras de aguas residuales urbanas, donde la contaminación es mayoritariamente fecal; no así en las aguas residuales industriales, como es el caso del vertido de antibióticos, por lo que, aunque en este efluente no se detecte un número demasiado elevado de indicadores fecales, es posible que se estén aportando genes de resistencia al medio a través de otro tipo de bacterias no detectadas, o incluso no cultivables (Roszak, 1987; Ash, 2002). En el caso de los humedales construidos (sistemas naturales), está demostrado que son más eficaces en la eliminación de bacterias indicadoras de contaminación fecal que los convencionales (García y Bécas, 1997), como también se ha demostrado en este estudio.

Los porcentajes de resistencia obtenidos en este estudio corresponden a los rangos de resistencia hallados por otros autores. Así, los *Enterococcus* han presentado resistencias muy bajas (del 0% en la mayoría de los casos) a amoxicilina, coincidiendo con Fernandes y Watanabe (2008). Las resistencias de *E. coli* y los CT a este mismo antibiótico también son comparables a las encontradas por otros autores (Carrol *et al.*, 2005; Fars *et al.*, 2005; Lefkowitz y Durán, 2009), aunque en el caso de los CT son un poco más altos los datos obtenidos en este estudio (cerca de un 20%). En el caso de los efluentes de los humedales construidos, las resistencias de los CT obtenidas son más altas de lo observado por otros autores. Si comparamos los resultados obtenidos a partir de los antibio-

gramas, encontramos rangos de entre el 3 y el 66% de *E. coli* resistentes a ampicilina, el 100% de resistentes a eritromicina, entre el 15 y el 33% de resistentes a tetraciclina, el 30% resistente a streptomycin y el 70% resistente a penicilina (Reinthal *et al.*, 2003; Lefkowitz y Durán, 2009; Costanzo *et al.*, 2005; Carrol *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 2003), todos ellos valores comparables con los obtenidos en el presente trabajo.

La multiresistencia es otra característica comúnmente estudiada. Chelosi *et al.* (2003) encontraron que más del 56% de las Gram negativas de sedimentos marinos cultivadas tenían resistencia a 5 o más antibióticos. Lefkowitz y Durán (2009) midieron la multiresistencia de *E. coli* en plantas de tratamiento de aguas residuales, obteniendo valores en el efluente de un 60% de multiresistentes a 2 o más antibióticos, y un 25% a 4 o más. Otros autores también lo han estudiado (Tendencia y de la Peña, 2001; Pillai *et al.*, 1997; Lin y Biyela, 2005; Torglu, 2005; Chapin *et al.*, 2005), y los datos obtenidos en este estudio se encuentran en los mismos rangos.

## CONCLUSIONES

El estudio demuestra que los dos vertidos estudiados, el de la industria productora de antibióticos y el de la EDAR de León, contribuyen tanto al incremento de la contaminación bacteriana del río como al aumento en el porcentaje de bacterias resistentes a antibióticos en dicho río. Dichos vertidos también incrementan el porcentaje de bacterias resistentes simultáneamente a varios antibióticos (multiresistencia), aunque se

observa que en el río ya existe un importante porcentaje de dichas bacterias multiresistentes antes del impacto de dichos vertidos.

En cuanto a la comparación de sistemas convencionales (EDAR de León) y sistemas extensivos (humedales construidos), se comprueba que los últimos son más eficaces en la eliminación de bacterias fecales. Aunque no se observan diferencias estadísticas entre dichos sistemas en cuanto a la producción de bacterias resistentes a antibióticos, queda claro que una mayor eliminación de bacterias por los sistemas extensivos supone una menor carga de bacterias resistentes al medio ambiente.

La comparación entre los diferentes diseños de humedales indica diferencias entre dichos diseños tanto en la eliminación de bacterias como en la producción de bacterias resistentes. Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas entre muchos de ellos, parece existir un mayor incremento de bacterias resistentes en los sistemas de flujo subsuperficial convencional, en comparación con los de flujo superficial o los sistemas hidropónicos.

Queda evidente por tanto que las bacterias resistentes a antibióticos están presentes en los ríos incluso en ausencia de vertidos próximos, pero su abundancia incrementa drásticamente por el efecto de dichos vertidos. Por otra parte se evidencia que los humedales construidos son mejores que los fangos activados tanto en la eliminación de bacterias como en la carga de bacterias resistentes al medio ambiente. ♦

## AGRADECIMIENTOS

A FUNDACIÓN MAPFRE, que subvencionó el presente estudio. A Roberto Romero, de la Universidad de Almería, por su colaboración en el análisis químico de los antibióticos. El Ministerio de Ciencia e Innovación subvencionó la construcción de las plantas piloto de humedales (proyectos CTM2005-06457-C05-03 y CTM2008-06676-C05-03TECNO).

## PARA SABER MÁS

- [1] Alm, E. W., Burke, J., Spain, A. (2003). Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. *Water Research* 37 (16), 3978-3982.
- [2] Alonso, A., Sánchez P., Martínez, J.L. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology* 3, 1-9.
- [3] Arikian, O.A., Rice, C., Codling, E. (2008). Occurrence of antibiotics and hormones in a major agricultural watershed. *Desalination* 226, 121-133.
- [4] Ash, R. J., Mauck, B. y Morgan, M. (2002). Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerging Infectious Diseases* 8, 713-716.
- [5] Bécares, E. 1995. Biología de una planta depuradora de fangos activados de doble etapa tratando aguas residuales de la industria farmacéutica. Tesis doctoral. Universidad de León.
- [6] Carroll, S., Hargreaves, M. y Gootnik, A. (2005). Sourcing faecal pollution from onsite wastewater treatment systems in surface waters using antibiotic resistance analysis. *Journal of Applied Microbiology* 99, 471-482.
- [7] Chapin, A., Rule, A., Gibson, K., Buckley, T. y Schwab, K. (2005). Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from concentrated swine feeding operation. *Environmental Health Perspectives* 113, 137-142.
- [8] Chelossi, E., Vezzulli, L., Milano, A., Branzoni, M., Fabiano, M., Riccardi, G. y Banat, I. M. (2003). Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture* 219 (1-4), 83-97.
- [9] Constanzo, S. D., Murby, J. y Bates, J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin* 51, 218-223.
- [10] Da Costa P.M.M., Vaz-Pires P.M., Bernardo F.M. (2006). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. Isolated from wastewater isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research* 40, 1735-1740.
- [11] Davies, C. M., Bavour, H. J. (2000). The fate of storm water associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond systems. *Journal of Applied Microbiology* 89 (2), 349-460.
- [12] Davies, C. M., Long, J. A. H., Donal, M. y Ashbolt, N. J. (1995). Survival of fecal microorganism in marine and freshwater sediments. *Applied Environmental Microbiology* 61 (5), 1888-1896.
- [13] Davies-Colley, R.J., Donnison A.M., Speed D.J., Ross C.M., Nageles J.W. (1999). Inactivation of faecal indicators microorganisms in waste stabilization ponds: Interactions of environmental factors with sunlight. *Water Research* 33, 1220-1230.
- [14] Davison, J. (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42, 73-91.
- [15] Fars, S., Oufdou, K., Nejmeddine, A., Hassani, L., Melloul, A. A., Bousselhaj, K., Amahmid, O., Bouhoum, K., Lakmichi, H. y Mezrioui, N. (2005). Antibiotic resistance and survival of faecal coliforms in activated sludge system in a semi-arid region (Beni Mellal, Morocco). *World Journal Of Microbiology & Biotechnology* 21 (4), 493-500.
- [16] Fernandes, A. J. y Watanabe J. M. (2008). Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Research* 42, 2242-2250.
- [17] Ferrer, C., Sangüesa, I., Bécares, E. y Llopis, J.A. 2007. La depuración en pequeños municipios de Castellón. FACS. Diputación de Castellón. 194 pp.
- [18] García M. y Bécares, E. (1997). Bacterial removal in three pilot-scale wastewater treatment systems for rural areas. *Water Science Technology* 35 (11-12), 197-200.
- [19] Henriques, I., Moura, A., Alves, A., Saavedra, M.J. y Correia, A. (2006). Analysing diversity among beta-lactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56:418-429.
- [20] Hijosa-Valsero, M., Matamoros, V., Sidrach-Cardona, R., Villacorta, M., Bécares, E. y Bayona J.M. (2010). Comprehensive assessment of the design configuration of constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and personal care products from urban wastewaters. *Water Res.* 44:3669-3678.
- [21] Hijosa-Valsero, M., Sidrach-Cardona, R., Martín-Villacorta, J. y Bécares, E. (2010). Optimization of performance assessment and desing characteristics in constructed wetlands for the removal of organic matter. *Chemosphere.* 81:651-657.
- [22] Hijosa-Valsero, M., Fink, G., Schlüsener, M.P., Sidrach-Cardona, R., Martín-Villacorta, J., Ternes, T. y Bécares, E. Removal of antibiotics from urban wastewater by means of constructed wetland. *Water Res.*
- [23] Hirata, T., Kawamura, K., Yano, K., Kaneko, M., Moniwa, T., Tosa, K. y Taguchi, K. (1993). Removal efficiencies of microorganisms in wastewater treatment processes. *Water Science Technology* 28 (7), 55-61.
- [24] Howell, J. M., Coyne, M. S., Cornelius, P. L. (1996). Effect of sediment particle size and temperature on fecal bacteria mortality rates and the fecal coliform/fecal streptococci ratio. *Journal of Environmental Quality* 25 (6), 1216-1220.
- [25] Junco, M. T. T., Martín, M. G., Toledo, M. L. P., Gómez, P. L. y Barrasa, J. L. M. (2001). Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples. *International Journal Of Hygiene And Environmental Health* 203 (4), 363-368.
- [26] Kim, S.C., Carlson, K. (2007). Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1301-1315.
- [27] Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:311-320.
- [28] Lefkowitz, J. R., Durán, M., (2009). Changes in antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* during domestic wastewater treatment. *Water Environment Research* 81 (9), 878-885.
- [29] Lin, J., & Biyela, P. T. (2005). Convergent acquisition of antibiotic resistance determinants amongst the Enterobacteriaceae isolates of the Mhlathuze River, KwaZulu-Natal (RSA). *Water SA* 31, 257-260.
- [30] Liu, H., Zhang, G., Liu, C.Q., Li, L. y Xiang, M. (2009) The occurrence of chloramphenicol and tetracyclines in municipal sewage and the Nanming River, Guiyang City, China. *Journal of Environmental Monitoring* 11, 1199-1205.
- [31] Martínez, J.L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. R. Soc. B* 276, 2521-2530.
- [32] McFeters, G.A. (1990). *Drinking water microbiology*. Springer-Verlag, New York. 185-203.
- [33] Pillai, S. D., Widmer, K. W., Maciorowski, K. G. y Ricke, S. C. (1997). Antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from rural and urban environments. *Journal of Environmental Science and Health Part A: Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control* 32, 1665-1675.
- [34] Pouliquen, H., Delépée, R., Thorin, C., Haury, J., Larhantec-Verdier, M., Morvan, M.L. y Le Bris, H. (2009). Comparison of water, sediment, and plants for the monitoring of antibiotics: a case study on a river dedicated to fish farming. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 496-502.
- [35] Reinthaler, F. F., Posch, J., Feierl, G., Wust, G., Haas, D., Rucknabauer, G., Mascher, F. y Marth, E. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research* 37 (8), 1685-1690.
- [36] Roszak, D. B., & Colwell, R. R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews* 51, 365-379.
- [37] Schwartz, T., Kohlen, W., Jansen, B. y Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 325-335.
- [38] Tang, C.M., Huang, Q.X., Yu, Y.Y. y Peng, X.Z. (2009). Multiresidue determination of sulfonamides, macrolides, trimethoprim and chloramphenicol in sewage sludge and sediment using ultrasonic extraction coupled with solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, Volume 37, 1119-1124.
- [39] Tendencia, E. A. y De la Peña, L. D. (2001). Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* 195, 193-204.
- [40] Toroglu, S., Dinçer, S. y Kormaz, H. (2005). Antibiotic resistance in gram negative bacteria isolated from Aksu River (Kahramanmaraş) in Turkey. *Annals of Microbiology* 55, 229-233.
- [41] Van Valen L. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1:1-30.
- [42] Yang, J.F., Ying, G.G., Zhao, J.L., Tao, R., Su, H.C. y Chen, F. (2010). Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC-MS/MS. *Science of the Total Environment* 408, 3424-3432.